



**BRUSELLOZİS TANISINDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONUNUN ETKİNLİĞİNİN SEROLOJİK
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI ve
VİRÜLANS GENLERİNİN SAPTANMASI**

Engin Vedat SEYHAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI**

Yüksek Lisans Tezi - 2019

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

**BRUSELLOZİS TANISINDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONUNUN ETKİNLİĞİNİN SEROLOJİK
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI ve
VİRÜLANS GENLERİNİN SAPTANMASI**


Engin Vedat SEYHAN

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI**

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2018/1434 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2019**

 İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	KABUL ONAY FORMU	Doküman No	
		Yayın Tarihi	
		Revizyon No	
		Revizyon Tarihi	
		Sayfa No	

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
BRUSELLOZİS TANISINDA POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONUNUN ETKİNLİĞİNİN SEROLOJİK
YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI VE VİRÜLANS
GENLERİNİN SAPTANMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ


DANIŞMAN
PROF.DR.YUSUF YAKUPOĞULLARI


HAZIRLAYAN
ENGİN VEDAT SEYHAN

Jürimiz tarafından 03/01/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda bu tez **oybirliği** /**oyçokluğu** ile başarılı bulunarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul etmiştir.

Jüri Üyelerinin Unvanı Adı Soyadı

- 1.Prof.Dr.Mehmet Sait TEKEREKOĞLU
- 2.Prof.Dr.Yusuf YAKUPOĞULLARI
- 3.Prof.Dr.Zülal AŞÇI TORAMAN

İmza


.....
.....
.....

O N A Y

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve 20.../..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Tarihçe.....	3
2.2 Epidemiyoloji.....	4
2.3 Bulaş Yolları.....	6
2.4 Brucella Türleri.....	6
2.5 Mikrobiyolojik Özellikler.....	7
2.6 Biyokimyasal Özellikler.....	9
2.7 Dirençlilik.....	10
2.8 Antijenik Yapı.....	10
2.9 Genetik Özellikler.....	11
2.10 Virülans Faktörleri.....	11
2.11 Patogenez.....	12
2.12 Klinik Bulgular.....	13
2.13 Komplikasyonlar.....	14
2.13.1 Osteoartiküler Komplikasyonlar.....	14
2.13.2 Nörobruselloz Komplikasyonları.....	14
2.13.3 Solunum Yolu Komplikasyonları.....	14
2.13.4 Gastrointestinal ve Hepatobiliyer Sistem Komplikasyonları.....	14
2.13.5 Genitoüriner Sistem Komplikasyonları.....	15
2.13.6 Kardiyovasküler Sistem Komplikasyonları.....	15
2.13.7 Göz Komplikasyonları.....	15
2.13.8 Hematolojik Komplikasyonlar.....	15
2.13.9 Deri Komplikasyonları.....	15
2.14 Tanı.....	15
2.14.1 Direkt Tanı Yöntemleri.....	16

2.14.2 İndirekt Tanı Yöntemleri.....	18
2.15 Tedavi.....	20
2.16 Korunma.....	21
3. MATERYAL VE METOT.....	23
3.1 Çalışma Dizaynı ve Örneklerin Seçimi.....	23
3.2 Kullanılan Materyaller.....	23
3.3 Metodlar.....	24
3.3.1 Hasta Serumunun Ayrıştırılması ve Serolojik Testler.....	24
3.3.2 Kan Kültürü ve Tanımlama.....	27
3.3.3. Moleküler Metodlar.....	30
3.3.4 Veri Analizi.....	32
4. BULGULAR.....	34
4.1 Hastaların Demografik Özellikleri.....	34
4.2 Kan Kültürü Sonuçları.....	36
4.3 Serolojik Test Sonuçları.....	36
4.4 Real Time PCR Sonuçları.....	37
4.5 Tür Tayini ve Virülans Genleri.....	37
4.6 PCR Yönteminin Tanı Etkinliği.....	38
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	52
EKLER.....	63
EK-1 Özgeçmiş.....	63
EK-2 Etik Kurul Onayı.....	64

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında emeği olup bana desteğini esirgemeyen, tecrübeleriyle yol gösteren, her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLAR'ına; yüksek lisans eğitimim süresince bana her zaman destek olan değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL'a; manevi desteklerini her zaman hissettiğim, akademik eğitim sürecimde her zaman yol gösteren ve üzerimde emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU ve Doç. Dr. Yücel DUMAN'a; eğitimimde emeği geçen, fikirleri ile yol gösterip bana her zaman destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Barış OTLU ve Prof. Dr. Selma AY'a; çalışmanın veri analizinde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Harika Gözükara BAĞ'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma;

Bu çalışmanın yapılması için projeye maddi destek veren İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Eğitim sürecimde beni yalnız bırakmayan ve her zaman destek olan sevgili eşim Ayben SEYHAN ve canım kızım Ceylin Ecem SEYHAN'a;

Sonsuz teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Engin Vedat SEYHAN

ÖZET

Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virülans Genlerinin Saptanması

Amaç: Bruselloz, çoklu organ tutulumu ile ilerleyen zoonotik bir enfeksiyondur. Klasik tanıda kullanılan kültür ve serolojik testler uzun süre gerektirmekte ve yanlış-negatif olarak sonuçlanabilmektedir. Bu çalışmada, hızla gelişen ve birkaç saatte sonuçlanabilen bir tanı yöntemi olan PCR'in bruselloz tanısındaki etkinliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmaya, hastanemizde 01 Ocak 2018 ile 31 Temmuz 2018 tarihleri arasında saptanan 60 hasta ve 60 kontrol numunesi dahil edildi. Numunelerde real-time PCR yöntemi ile *Brucella spp.* DNA'sı araştırıldı ve pozitif örneklerde PCR yöntemi ile tür ayrımı ve virülans genleri çalışıldı. PCR yönteminin tanı etkinlik değerleri hesaplandı.

Bulgular: Hasta numunelerinin sekizinin kan kültüründe *Brucella spp.* üremesi oldu. Serolojik yöntemlerle antikor saptanan 60 hastanın 50'sinde akut hastalık göstergesi olan $\geq 1/160$ titre değeri mevcuttu ve bu hastaların 32'si akut hasta, geri kalan 18'i ise tedavi altındaki hastalardı. Yapılan real-time PCR testi ile hasta grubunda 19 örnekte *Brucella spp.* DNA'sı saptanırken, bu türlerin hepsi *Brucella melitensis* olarak belirlendi. Pozitif örneklerin hepsinde *omp19*, *wbkA*, *manA*, *mviN*, *ure* ve *perA* virülans genleri pozitif bulundu. PCR'in hasta grubu ve akut hastalar için saptanan duyarlılığı sırasıyla %31.6 ve %59.3; özgüllük ve Pozitif Prediktif Değeri %100 ve akut hastalar için Negatif Prediktif Değeri ise %87.1 olarak hesaplandı.

Sonuç: Çalışmamızda, *Brucella* PCR testi ile akut hastaların yaklaşık %60'ının tanısının yapılabildiği, bu testin özgüllüğünün mükemmel düzeyde olduğu, olgularının hepsine *B. melitensis*'in neden olduğu ve suşların tüm önemli virülans genlerini taşıdığı saptanmıştır. Daha hassas saptama limiti olan PCR kitlerinin geliştirilmesi ve hastadan uygun dönemde numune alınması ile PCR'in bruselloz tanısındaki etkinliği artacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Brucella spp.*, Bruselloz, Serolojik Testler, PCR, Virülans.

ABSTRACT

Comparison of the Efficacy of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Brucellosis by Serological Methods and Detection of Virulence Genes.

Aim: Brucellosis is a zoonotic infection that progress with multiorgan involvement. The classical diagnostic methods, including culture and serological tests, require long time to be completed and may yield false negative results. In this study, the performance of PCR, as a rapidly-developing method that is able to give results within hours, was aimed to be evaluated on the diagnosis of brucellosis.

Material and Method: A total 60 patients and 60 control patients' samples which were assessed between January 1st, 2018 and July 31th, 2018 in our hospital were included. *Brucella spp.* DNA was investigated in the clinical samples with real-time PCR method, and species typing and virulence genes were studied with PCR. The diagnostic efficacy of PCR method was analyzed.

Results: *Brucella spp.* growth occurred in eight of the patients' blood cultures. Fifty out of 60 patient samples which were found positive for antibody were determined as having $\geq 1/160$ serum titer, and 32 of them having acute disease. Resting 18 patients were accepted as the patients who were currently under treatment. In the real-time PCR analysis, DNA of *Brucella spp.* were found positive in 19 samples in the patient group. *Brucella melitensis* were identified in all PCR-positive samples, and all these samples were also found positive for all the studied virulence genes including *omp19*, *wbka*, *manA*, *mviN*, *ure* and *perA*. Of the PCR method, the sensitivity for patients group and acute patients were found as 31.6% and 59.3%, respectively; specificity and Positive Predictive values were determined as 100%, and Negative Predictive Value for acute patients was found as 87.1%.

Conclusion: In this study, it was determined that *Brucella* PCR could diagnose almost 60% of acute patients, the specificity of this test was excellent, *B. melitensis* was the causative agent in all patients and all these strains were carrying all substantial virulence genes. It is concluded that more sensitive PCR kits having lower detection limit are required, and sampling from the patients in appropriate time will increase the efficacy of PCR in the diagnosis of brucellosis.

Key Words: *Brucella spp.*, Brucellosis, Serological Tests, PCR, Virulence.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
2-ME	: 2-Merkaptoetanol
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
H₂S	: Hidrojen sülfür
Ig	: İmmünoglobulin
İFA	: İndirekt floresan testi
KOB	: Koloni oluşturan birim
LPS	: Lipopolisakkarit
Mb	: Megabayt
NPD	: Negatif prediktif değer
OPG	: Ozmoregüler periplazmik glukanlar
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PMNL	: Polimorf nüveli lökosit
PPD	: Pozitif prediktif değer
RES	: Retiküloendotelyal sistem
R-LPS	: Pürüzlü lipopolisakkarit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SF	: Serum fizyolojik
S-LPS	: Pürüzsüz lipopolisakkarit
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
spp.	: Türler
STA	: Standart tüp aglütinasyon testi
SXT	: Trimetoprim-Sülfametoksazol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Türkiye’de bruselloz vaka sayılarının yıllara göre Dağılımı 2008-2017.....	5
Şekil 2.2. <i>Brucella melitensis</i> ’in besiyerindeki koloni görüntüsü.....	8
Şekil 3.1 Rose-Bengal testi negatif ve pozitif reaksiyon görüntüsü.....	25
Şekil 3.2 <i>Brucella jelli</i> coombs testi negatif ve pozitif sonuç görüntüsü.....	27
Şekil 3.3 Kanlı agar ve çikolatamsı agar besiyerinde <i>Brucella spp.</i> kolonileri.....	28
Şekil 3.4 Gram boyaması yapılan preparatın mikroskopik görüntüsü.....	29
Şekil 4.1 Hasta (A) ve kontrol (B) gruplarının cinsiyet dağılımları.....	34
Şekil 4.2 Hasta grubunun yaş dağılımı.....	34
Şekil 4.3 Çalışma grubunda bulunan 60 hastanın geldiği illere göre dağılımı.....	35
Şekil 4.4 Çalışma grubunda bulunan 60 hastanın kliniklere göre dağılımı.....	35
Şekil 4.5 <i>Brucella spp.</i> için yapılan real-time PCR.....	37
Şekil 4.6 <i>Brucella spp.</i> için bir virülans geni olan manA’ya ait 297 bazlık DNA bandının saptandığı PCR agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	38

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1 Türkiye’de bruselloz istatistik verileri 2008-2017.....	5
Tablo 2.2 <i>Brucella</i> türlerinin koloni morfolojileri ve rezervuar konakları.....	8
Tablo 2.3 <i>Brucella</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler-1	9
Tablo 2.4 <i>Brucella</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler-2.....	9
Tablo 3.1 <i>Brucella melitensis</i> ayırımı için kullanılacak DNA primerleri.....	31
Tablo 3.2 Virülans genlerinin saptanması için kullanılan spesifik primerler.....	32
Tablo 4.1 Çalışmaya alınan 60 hasta ve 60 kontrol grubunda elde edilen serolojik test sonuçlarının hasta sayısına göre dağılımları.....	36
Tablo 4.2 PCR ile saptanan tanı performans değerleri.....	38

1. GİRİŞ

Brucella spp., gram-negatif kokobasil morfolojisinde küçük, aerobik, intraselüler enfeksiyon yapan zoonotik bir bakteri olup bruselloz olarak adlandırılan hastalığa neden olur. Bruselloz, tüm dünyada görülmekle beraber özellikle Akdeniz Havzası, Ortadoğu, Güney ve Güney-Doğu Asya ve bazı Latin Amerika ülkelerinde daha yaygın ve endemik halde görülür. Bruselloz; “Ondülan Ateş”, “Akdeniz Ateşi”, “Malta Humması” veya “Bang Hastalığı” olarak da adlandırılmaktadır. Hastalığın insanlara bulaşı çoğunlukla enfekte koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların pastörize edilmemiş süt ve et ürünlerinin tüketilmesi veya bu hayvanların idrar, kan ve vücut sıvılarına temas sonucu ortaya çıkar. Hastalık, çiftlik hayvanlarında et ve süt veriminin düşmesine, enfekte hayvanların ölmesine veya gebe hayvanların yavru atmasına neden olduğu için tarım ve hayvancılıkta önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. (1-3).

Bruselloz insanlarda akut, subakut ve kronik enfeksiyonlar şeklinde görülebilen, çoklu organ ve doku tutulumu yapan ve bazen de hayatı tehdit eden önemli klinik tablolar oluşturur. Bulaşıcılığının yüksek olması ve hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli bir hastalık oluşturması nedeniyle *Brucella spp.*'nin biyolojik savaş silahı olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır (1-4).

Bruselloz, ateş, eklem ve kas ağrıları ve kilo kaybı gibi özgül olmayan semptomlara yol açtığından hastalığın klinik tanısında sorunlarla karşılaşmaktadır (2). Ayrıca, etkenin yavaş üreme hızı ve bakterinin kanda bulunmadığı dönemlerin olması gibi nedenlerle brusellozun kesin laboratuvar tanı metodu olan kültürün etkinliği en fazla %50 dolayındadır (5). Bu nedenle, hastanın serumunda etkene karşı üretilmiş antikorların saptandığı serolojik testler bruselloz tanısında günümüze kadar en çok kullanılan tanı yöntemleri olmuştur. Ancak bu testlerin yaklaşık 24 saatlik inkübasyon süresi gerektirmesi, okuyucu kaynaklı yorumlama hatalarına açık olmaları ve %68-90 dolayında duyarlılık göstermeleri nedeniyle daha hızlı ve daha kesin tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur (6, 7).

Bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), ilk uygulamasından beri gittikçe daha da geliştirilmiş ve örneklerde 5-50 KOB/ml yoğunluktaki bakteriyel DNA'yı saptayabilecek düzeyde duyarlılık kazandırılmış bir tanı yöntemidir (8). Günümüzde PCR viral etkenler başta olmak üzere bakteri, mantar ve

parazit enfeksiyonlarının tanısında ve insan gen özelliklerinin belirlenmesi gibi klinik uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. PCR, sadece mikropların neden olduğu hastalıkların tanısında değil aynı zamanda patojenin DNA'sında bulunan ve hastalığın şiddeti ile ilişkili virülans özelliklerini de kodlayan gen bölgelerini saptayabildiği için klinik olarak ayrıca önemli bir tanı yöntemi olmuştur (9).

PCR'ın sağladığı bu üstün tanı gücüne rağmen günümüze kadar bu yöntemin bruselloz tanısındaki etkinliğinin araştırıldığı az sayıda çalışma yapılmış; ülkemizden sadece birkaç, bölgemizden ise hiç bilimsel araştırılma üretilmemiştir. Ayrıca, PCR teknolojisi yıllar içinde hızlı bir gelişim göstererek daha duyarlı tanılabilir kit ve cihazlar üretilmiş olmasına rağmen konu hakkındaki bilimsel çalışmalar bu gelişen teknolojiyi yakalamakta yetersiz kalmıştır.

Bu çalışmada, ülkemizin Doğu ve Güney-Doğu Anadolu bölgesinde önemli bir bölgesel referans merkezi olan hastanemize, bruselloz şüphesi ile gelmiş hastalardan alınan serum örnekleri kullanılarak PCR yöntemi ile etkenin tespit edilmesi, serolojik testler ile PCR'ın etkinliğinin karşılaştırılması ve saptanan suşların virülans genleri yönüyle özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan bu tez çalışması ile PCR'ın daha kısa bir sürede (4 saat), laboratuvar personelinin etkene maruz kalma riskini azaltarak, yorumlama hatalarına neden olmadan ve etkenin kanda çok düşük konsantrasyonda bulunması durumunda dahi hastalığın tanısının yapılabilir olup-olmadığı saptanacak ve bruselloz tanı yöntemleri içinde nükleik asit amplifikasyon yöntemlerinin etkinliği ortaya konulacaktır. Bu çalışma kapsamında ayrıca, saptanan kökenlerin virülans gen epidemiyolojileri hakkında önemli veriler sağlanacaktır ki bu konuda ülkemizden bildirilen veri miktarı yok denecek kadar azdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tarihçe

Bruselloz'un tanımı ilk defa milattan önce 460 yılında Hipokrat tarafından yapılmıştır. Bruselloza ait klinik semptomlar ilk kez asistan bir cerrah olan J. A. Marston tarafından 1861 yılında yapılmış ve Dr. Marston bu hastalığı *Gastric Remittent Fever* olarak tanımlamıştır (4). İskoç bir cerrah olan David Bruce 1887 yılında Malta adasında, ateşli hastalıktan ölen İngiliz askerlerinin dalaklarının lekeli kısımlarından çok sayıda küçük bakteriler izole etmiş ve bu organizmaları Malta adasında keşfettiği için Latince "*Melita*" isminden esinlenerek bakterinin ismini *Micrococcus melitensis* olarak belirlemiştir (3, 4).

Hughes 1897 yılında hastaların ateşli dönemlerinde gördüğü dalgalanma nedeniyle brusellozun insanlardaki klinik özelliklerine bazı eklemeler yaparak detaylandırmıştır. Yine aynı yıl içerisinde Wright ve Smith, hayvan ve insan enfeksiyonlarının ilişkisini yaptıkları aglütinasyon testleri ile araştırmış, hayvan ve insan serumlarında bulunan *Micrococcus melitensis*'e karşı antikorları saptamış ve etkenin zoonotik özelliğini ortaya koymuşlardır (4).

Danimarkalı bir veteriner hekim olan Bang, 1897 yılında doğum yapan sığırların uterus salgısından gram-negatif koko-basil morfolojisindeki etkeni izole etmiş ve daha sonra bu türü *Brucella abortus* olarak adlandırmıştır (3, 4).

Maltalı genç bir doktor olan Zammit, 1905 yılında Akdeniz Ateş Komisyonunda çalıştığı sırada, halen *Micrococcus melitensis* olarak adlandırılan mikroorganizmayı, keçinin idrar ve süt ürünlerinden izole etmiştir. Bunun sonucunda, keçilerin *Micrococcus melitensis* için bir rezervuar olduğu ve bu hayvanların süt ve peynirlerinin çiğ tüketilmesinin insanlarda enfeksiyona neden olduğu sonucuna varılmıştır (4).

Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) İndiana eyaletinde, 1914 yılında erken doğan domuz yavrularının mide, karaciğer ve böbreklerinden *Brucella suis* ilk olarak izole edilmiştir (3).

Amerikalı bir bakteriyolog olan A. Evans 1918 yılında, keçilerden ve sığırlardan izole edilen gram-negatif basillerin morfolojik olarak aynı olduğunu, kültür ve biyokimyasal özelliklerinin de farklı olmadığını ortaya koymuş; ancak, aglütinasyon-absorbsiyon testinde antijenik farklılık olduğunu tespit etmiştir. Daha sonraki yıllarda

Meyer ve Shaw yapılan bu gözlemleri doğrulamış ve bu mikroorganizmaların cins ismini, Sir David Bruce'un onuruna *Brucella* olarak belirlenmesini önermişlerdir (4).

Buddle ve Boyce, Yeni Zelanda ve Avustralya'da koçlarda epididimit nedeni olan *Brucella ovis*'i 1956 yılında izole etmiştir. Stoenner ve Lackman ise 1957 yılında, ABD'de orman ratlarından *Brucella neotomae*'yi izole etmiştir (4). Carmicheal ve Bruner, 1968 yılında av köpeklerinde gelişen salgından *Brucella canis*'i izole etmişlerdir (3, 4).

Yirminci yüzyılın son birkaç yılında, denizde yaşayan hayvanlarda da *Brucella* türlerinin enfeksiyona yol açtığı saptanmıştır. Deniz memelilerinden *Phoca vitulina*, *Phocoena phocoena*, *Delphinus delphis* ve şişe burunlu bir yunus türü olan *Tursiops truncatus*'ta *Brucella* türlerine ait ilk izolasyonlar yapılmış, daha sonra *Brucella* tarafından enfekte edilen deniz canlı türü sayısı daha da genişlemiştir (10).

Ülkemizde ise, *Brucella melitensis* ilk kez Mahmut S. Akalın ve Hüsamettin Kural tarafından 1915 yılında hastanede yatan bir askerde; Zühtü Berke tarafından sığırlardaki *Brucella* cinsine ait ilk izolasyonlar 1931 yılında ve koyun ve keçilerden *Brucella* cinsine ait saptamalar ise Golem, Köylüoğlu ve Aktan tarafından 1943-1944 yılları arasında yapılmıştır (3).

2.2 Epidemiyoloji

Bruselloz, insanların sağlığını ciddi bir şekilde etkileyen ve dünya genelinde hayvancılık verimliliğini olumsuz düzeyde etkileyen zoonotik bir hastalıktır (11). Bu hastalık aynı zamanda özellikle hayvanlar ile temasın yoğun olduğu kırsal bölgelerde yaşayan insanlar başta olmak üzere enfekte ettiği insanların yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve bazen de hayatlarını kaybetmelerine yol açmaktadır (12).

Dünya çapında görülebilen bu zoonotik hastalık, özellikle Akdeniz havzasında, Hindistan bölgesinde, Arap ülkelerinde, Orta ve Güney Amerika ile Meksika'nın bazı bölgelerinde endemiktir (4).

Her yıl dünya genelinde 500 000 yeni bruselloz olgusu bildirilmektedir. Yıllar içinde tıp ve veterinerlik hizmetlerinin gelişmesi ve yaygınlaşması sonucunda bruselloz prevalansı ve insidansında kayda değer bir azalma olmasına rağmen; hem yerel hem de uluslararası sağlık kuruluşları için bir halk sağlığı tehdidi olmaya devam etmektedir (13).

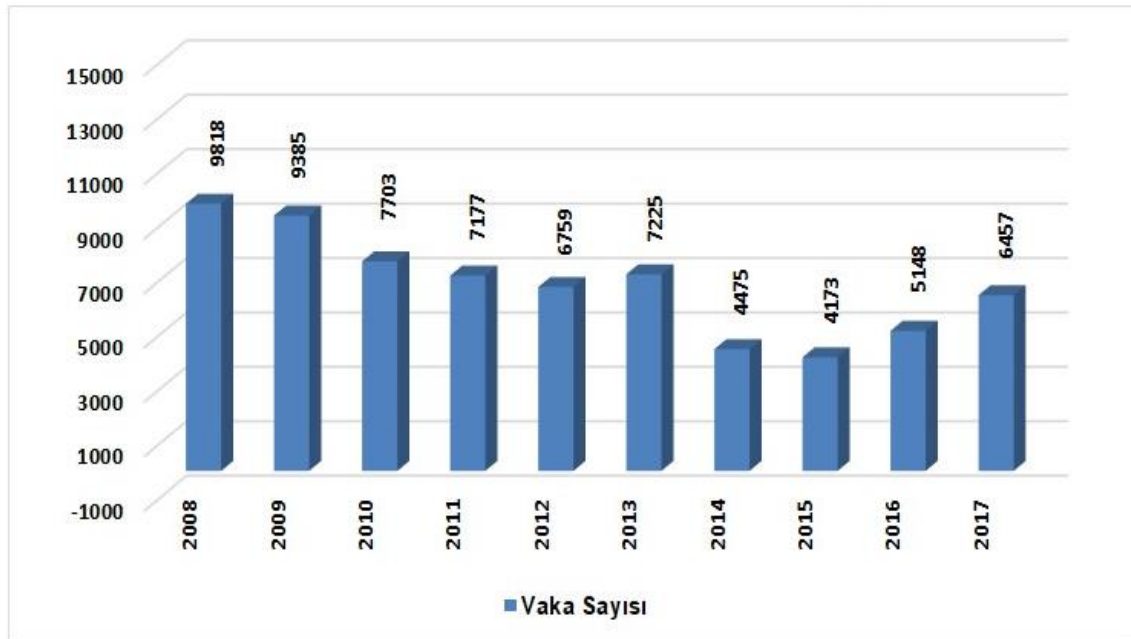
Bruselloz, %2 gibi düşük bir mortalite oranına sahip olmasına rağmen yüksek morbidite ile sonuçlanan önemli bir hastalık olarak kabul edilir (14, 15). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde 2008-2017 yılları arasında bruselloz hastalığına ait vaka sayıları 9818'den 6457'ye düzenli bir düşüş göstermiştir.

Sağlık Bakanlığı'nın 2008-2017 yılları arasındaki bruselloz hızları, mortalite ve morbidite değerleri Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de gösterilmiştir (16).

Tablo 2.1: Türkiye'de Bruselloz İstatistik Verileri 2008-2017 (16).

Yıllar	Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)	Ölüm Sayısı	Mortalite Hızı (1.000.000)
2008	71.517.100	9818	13.73	1	0.01
2009	72.561.312	9385	12.93	0	0.00
2010	73.722.988	7703	10.45	0	0.00
2011	74.724.269	7177	9.60	0	0.00
2012	75.627.384	6759	8.94	0	0.00
2013	76.667.864	7225	9.42	0	0.00
2014	77.695.904	4475	5.76	0	0.00
2015	78.741.053	4173	5.30	0	0.00
2016	79.814.871	5148	6.45	0	0.00
2017	80.810.525	6457	7.99	0	0.00

Bu verilere göre, 2008-2017 yılları arasında ülkemizde toplam 68.320 hastanın bruselloza yakalandığı, bunlardan bir kişinin hastalık nedeniyle hayatını kaybettiği ve bruselloza bağlı morbidite hızının ise 13.73'ten 7.99'a (100 bin nüfusta) düştüğü görülmektedir.



Şekil 2.1: Türkiye'de Bruselloz Vaka Sayılarının Yıllara Göre Dağılımı 2008-2017 (16).

Brusellozun global sıklığına bakıldığında ise; insanlarda görülen brusellozun endemik bölgelerdeki insidansı 100.000 nüfusta 0.01 ile 200 arasında değişmektedir (17). Ancak; insanlarda görülen brusellozun gerçek insidansı çoğu ülke için halen tam olarak bilinmemektedir. Hatalı yapılan bildirimler ve yanlış hesaplamalara bağlı olarak, gerçek insidans oranının bildirilenden 25 kat daha fazla olabileceği tahmin edilmektedir (4).

2.3 Bulaş Yolları

Brusellozun insanlara bulaşma yolları arasında, enfekte hayvanların süt ve süt ürünlerinin pastörize edilmeden tüketilmesi, insanların bütünlüğü bozulmuş deri ve mukoz membranlarına bu hayvanların vücut salgılarının teması ve enfekte aerosollerin inhalasyonu bulunmaktadır (18).

Bruselloz hastalığı mesleki maruziyet nedeni ile mezbaha ve çiftlik çalışanlarında, hayvan ürünlerinin paketlenmesi işinde çalışanlar ve veteriner hekimler arasında da bir meslek hastalığı olarak görülebilmektedir (3). İnsandan insana geçiş çok nadir olmakla birlikte, hastalığın cinsel yolla bulaştığına dair raporlar mevcuttur (19). Bruselloz ayrıca; enfeksiyonu taşıyan vericilerden kan transfüzyonları, böbrek ve kemik iliği transplantasyonlarında da bulaşabilir. Transplental yolla, enfekte annenin sütünden veya doğum sırasında neonatal enfeksiyon oluşabilir. *Brucella* türlerine ait enfeksiyonlar; laboratuvar ortamında organizmayı içeren kültür veya örneklerinin kaza sonucu dökülmesi veya havaya karışarak inhale edilmesi sonucu da yine bir mesleki hastalık olarak tıbbi laboratuvar çalışanlarında ortaya çıkabilmektedir (20).

2.4 *Brucella* Türleri

“*Brucella* türleri; *Proteobacteria* şubesinin α -2 alt bölümü, *Rhizobiales* takımı ve *Brucellaceae* ailesinde yer alır. *Rhizobiales* takımı, aynı zamanda *Bartonellaceae*, *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae* ve *Aurantimonadaceae* ailelerini de içerir. *Brucella* türleri; *Agrobacterium*, endosimbiyotik *Rhizobium* ve *Mesorhizobium* türleri, *Bartonella* türleri, *Ochrobactrum* türleri ve tropikal bitkilerin serbest yaşayan kemoototrof patojenleri olan *Phyllobacterium* türleri ile ilişkilidir” (20).

Brucella cinsi bakteriler; özgün olarak 6 klasik tür içermektedir. Bunlar; *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* ve *Brucella neotomae*’ dir. Günümüze kadar *Brucella* türlerinin adlandırılmalarında yerleştikleri konak türlerine göre isimlendirilme yapılması tercih edilmiştir (20).

Brucella türleri, “smooth” –düzgün- Lipopolisakkarit (LPS) ile ilişkili olan M ve A antijenlerinin serolojik aglütinasyonuna göre biyovarlarına ayrılırlar. *Brucella abortus* primer olarak sığırların patojenidir. Ancak; koyun, keçi, deve, köpek, at ve insanlara da

bulaşabilmektedir. *Brucella abortus*'un sekiz biyovarı mevcuttur (20, 21). *Brucella melitensis* temel olarak keçi ve koyunlarda bruselloza neden olan türdür. Enfekte koyun ve keçi sürüleriyle birlikte yaşayan veya bu tür hayvanların enfekte vücut çıkartıları ile teması olan sığırlara da *B. melitensis* bulaşabilir. Üç adet biyovarı mevcut olan bu tür, insanda görülen akut brusellozun en sık nedeni olarak bilinir. *Brucella suis* beş adet biyovar içermektedir ve biyovarlar arasında konak özgüllüğü farklılık göstermektedir. Biyovar 1, 2, ve 3 domuzlarda, biyovar 4 ren geyiğinde, biyovar 5 ise geviş getiren küçük kemirgenleri enfekte etmektedirler. Tüm bu biyovarların insanlarda hastalık oluşturabilme olasılığı vardır. *Brucella neotomae* sadece çöl farelerinden sınırlı bir coğrafi bölgede izole edilebilmekte olup tek bir biyovar içerir. *Brucella ovis* yine tek bir biyovar içerir ve koçlar ve koyunlar için yüksek özgüllük göstermektedir. *Brucella canis* tek bir biyovar içerir ve köpeklere yüksek özgüllük göstermektedir (20, 22).

Cloekaert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda birçok yeni *Brucella*-benzeri bakteri izole edilmiştir. Bunlardan, foklarda izole edilenlere *Brucella pinnipediae*, deniz memelileri izolatları için *Brucella cetaceae* olarak adlandırılmıştır (23). Şişe burunlu yunus fetüslerinden elde edilenler için de *Brucella delphini* adı önerilmiştir (24). Bu isimlendirme, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabının yeni baskısına da girmiş ve bu türler *Brucella phocae* (fok), *Brucella delphini* (yunus) ve *Brucella phocoenae* (domuz balıkları) olarak bilimsel literatüre geçmiştir (20).

Scholz ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmalar sonucunda *Microtus arvalis*'ten (tarla faresi) yeni bir tür izole edilerek *Brucella microti* olarak isimlendirilmiştir (25).

Yine Scholz ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir başka çalışmada, bruselloz ile uyumlu klinik semptomları olan bir kadın hastanın meme yara sıvısından ve kanından yeni bir tür izole edilmiş ve *Brucella inopinata* olarak isimlendirilmiştir (26). İnsan enfeksiyonuna neden olduğu saptanan bu son türün klinik önemi hakkında daha fazla bir bilgi yoktur.

2.5 Mikrobiyolojik Özellikler

Brucella türleri; kok, koko-basil veya kısa basiller şeklinde olabilen, 0.5-0.7 µm eninde, 0.5-1.5 µm boyunda bir veya ikili hücreler ve kısa zincirler şeklinde görünebilen hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz gram-negatif bakterilerdir (22).

Küçük olduklarından ve çok sınırlı hareket özelliklerinden dolayı mikroskopik incelemede "titreşir" (*Braurien* hareketi) olarak görünürler (3).

Brucella türlerinin tümü aerobiktir. *Brucella abortus* ve *B. ovis* gibi bazı türler üremek için CO₂ gereksinimi duyarlar. *Brucella spp.*, özellikle ilk izolasyonda kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyarlar. Hemin (faktör X) ve nikotin amid dinükleotid (faktör V) üremeleri için gerekli değildir. Jelatini eritemezler ve eritrositlerde hemoliz yapmazlar. *Brucella* 10-40 °C’de üreme özelliği bulunmakla birlikte ideal üreme ısısı 37 °C’dir (22).

Brucella türlerinin üremesi için optimal pH düzeyi 6.7-7.4’tür. İlk koloniler inkübasyondan 24-36 saat sonra görülebilir. Düzgün (S tipi) koloni ve mukoid suşlarda kapsül gösterilebilse de düzensiz (R tipi) koloni şekillerinde kapsül bulunmaz. Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli ve parlak koloniler oluştururlar (3). *Brucella*’nın kültür plağında saptanan koloni görüntüsü Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: *Brucella melitensis*’in besiyerindeki koloni görüntüsü (27).

Koloni özellikleri ve rezervuar konak seçiciliğine göre *Brucella* türleri farklılıklar gösterir. Bu özellikleri Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2: *Brucella* Türlerinin Koloni Morfolojileri ve Rezervuar Konakları (28).

Tür	Koloni Morfolojisi	Rezervuar Konak
<i>Brucella abortus</i>	S*	sığırlar ve boynuzlular
<i>Brucella suis</i>	S	domuz, ren geyiği, tavşan
<i>Brucella melitensis</i>	S	koyun ve keçi
<i>Brucella neotomae</i>	S	çöl faresi
<i>Brucella ovis</i>	R**	koç
<i>Brucella canis</i>	R	köpek
<i>Brucella ceti</i>	S	deniz memelileri
<i>Brucella pinnipedialis</i>	S	yüzgeç ayaklılar
<i>Brucella microti</i>	S	tarla faresi

*S: Düzgün, **R: Pürüzlü

2.6 Biyokimyasal Özellikler

Brucella türlerinin tamamı aerobiktir ve bu nedenle klinik örneklerden izole edilmeleri için oksijene ihtiyaç duyarlar (20).

Brucella türlerinin tanımlanmasında kullanılan bazı biyokimyasal özellikler Tablo 2.3 ve Tablo 2.4’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3: *Brucella* Türlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Özellikler–1 (20).

TÜR	FUKSİN	TİYONİN	TBİLİSİ FAJİ ile LİZİS	WEYBRIDGE FAJİ ile LİZİS
<i>B. melitensis</i>	+	+	-	-
<i>B. abortus</i>	+(a)	-(c)	+	+
<i>B. suis</i>	-(b)	+	-	+
<i>B. canis</i>	+/-	-	-	-
<i>B. ovis</i>	D	-	-	-
<i>B. neotomae</i>	-	-	D	+
<i>B. pinnipedialis</i>	+	-	-	+
<i>B. cetaceae</i>	+	-	-	-

+ : Pozitif Reaksiyon, - : Negatif Reaksiyon, D : Değişken Reaksiyon, (a): Biyovar 2 hariç, (b): Biyovar 3 hariç, (c): Biyovar 1, 2 ve 4

Brucella türlerinin metabolizmaları büyük ölçüde oksidatifdir ve gereksinim duydukları enerji, aminoasitler ile karbonhidratlardan elde edilir. *Brucella* türleri oksidaz ve katalaz testi pozitif olup indol negatiftir. Birçok türü nitratı nitrite indirger (20, 22). Geleneksel olarak *Brucella* türlerinin tanımlanmasında üremeleri için CO₂ gereksinimi, üreaz aktiviteleri ve H₂S üretimi yanında, bazik fuksin (1:50.000 ve 1:100.000), tiyonin (1:25.000, 1:50.000 ve 1:100.000) ve tiyonin mavisi boyalarına duyarlılıkları da kullanılabilir (20).

Tablo 2.4: *Brucella* Türlerinin Tanımlanmasında Kullanılan Fenotipik Özellikler–2 (20).

TÜR	H ₂ S ÜRETİMİ	ÜREAZ	SAFRANİN İNHİBİSYONU	CO ₂ 'de ÜREME
<i>B. melitensis</i>	-	+, 24 saat	-	-
<i>B. abortus</i>	+(d)	+, 24 saat	-	+(f)
<i>B. suis</i>	+(e)	+, 15 dakika	+	-
<i>B. canis</i>	-	+, 15 dakika	-	-
<i>B. ovis</i>	-	-	-	+

+ : Pozitif Reaksiyon, - : Negatif Reaksiyon
(d): Biyovar 5 hariç, (e): Biyovar 1 hariç, (f): Biyovar 1-4

Brucella türlerinin hidrojen sülfür (H₂S) oluşturma özellikleri türler ve biyovaryolar arasında farklılıklar göstermekle birlikte bu özellik birbirlerinden ayırt edilmeleri işleminde kullanılabilir. *Brucella suis* ve *Brucella canis* türlerinde üreaz aktivitesi yüksek olmasına rağmen, diğer türlerin bazılarında zayıftır. Hatta *Brucella ovis* türünde üreaz aktivitesi hiç yoktur. Glikozdan asit oluşturma yetenekleri yoktur (22).

2.7 Dirençlilik

Brucella türleri, ısıya, asitlere ve dezenfektanlara karşı duyarlıdır. Kuruluğa karşı ise oldukça dirençlidirler (3).

Yüzde bir fenol eriyiğinde, %2 formalin ve %1 lizol gibi kimyasallar içinde 15 dakikada ölürler. Ayrıca, %70'lik etanol, iyot ve fenol içeren dezenfektanlara karşı duyarlıdır. *Brucella* türleri, %10 oranında tuz içeren salamura bir peynirde 45 gün, %17 oranında tuz içeren salamura bir peynirde ise 30 gün yaşayabilmektedirler (30).

Türlerin, süt içerisinde 17 gün, tereyağında 142 gün, dondurmalarında 30 gün, tuzlanmış domuz etinde 3 hafta, çeşme suyunda 8 °C'de 57 gün, 25 °C'de ise 10 gün, insan idrarında 7 gün, hayvan dışkısında 100 gün, ahırların duvarlarında 4 ay canlı kalabildiği bildirilmiştir. Antibiyotiklere duyarlılıkları çeşitli olmakla birlikte, suşların çoğu gentamisin, tetrasiklin, kloramfenikol ve rifampisine duyarlıdır. Penisiline ise dirençlidirler (3, 22, 29).

2.8 Antijenik Yapı

Lipopolisakkarit (LPS), *Brucella*'nın endotoksin aktivitesi olan ana yüzey antijenidir (22). *Brucella* türlerindeki LPS, O-polisakkarit zincirlerinin varlığına ve yokluğuna bağlı olarak pürüzsüz (S-LPS) veya pürüzlü lipopolisakkarit (R-LPS) şeklinde olabilir (31).

Pürüzsüz LPS içeren suşlar, makrofaj, monosit ve polimorf nüveli lökositler (PMNL) tarafından hücre içi öldürmeye karşı dirençlidirler. *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve *Brucella suis* türleri "abortus" için A ve "melitensis" için M olarak isimlendirilen, ısıya dayanıklı, aglütinasyon reaksiyonlarından sorumlu iki majör antijenik determinant içerir. *Brucella abortus* ve *Brucella suis*'de M antijeni az, A antijeni fazla; *Brucella melitensis*'de ise A antijeni az, M antijeni fazladır. Buradan anlaşılacağı üzere serolojik yöntemler ile *Brucella melitensis*'i, *Brucella abortus* ve *Brucella suis*'den ayırmak mümkün iken, *Brucella abortus*'u *Brucella suis*'den ayırmak bu yolla olası değildir (3, 20).

Brucella türlerinin antijenleri *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae* O:1, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*, *E.coli* O:157 ve *Salmonella* O:30 gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verir (3, 20).

Brucella türlerinde bulunan diğer antijenler ise; hücre yüzeyinde veya yüzeye yakın bulunan dış membran proteinleridir (22). *Brucella* türlerinin bazılarında, özellikle *Brucella abortus* suşlarında *Salmonella*'nın Vi antijenlerine benzeyen L antijenleri de saptanmıştır. Bu antijen yeni izole edilen bakterilerde mevcut olup, bunlar immün serumlar ile aglütinasyona engel olmaktadır (3).

2.9 Genetik Özellikler

Günümüzde *Brucella* cinsi, *Proteobacteria* α -2 alt grubunda bulunan *Rhizobiaceae* ailesinde sınıflandırılmaktadır. Türlerin birçoğu %55-59 oranında Guanin+Sitozin DNA baz yapısına sahiptir (15). Yapılan hibridizasyon çalışmaları, tüm türler arasında DNA'da %90 benzerlik olduğunu göstermiştir (21). Ribozomal DNA (rRNA) ile yapılan DNA hibridizasyonu çalışmalarında *Brucella* genusu ile *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Mycoplasma*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* ve *Rhizobium* cinsleri arasında yakın bir genetik ilişki ortaya çıkmıştır (22).

Junos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Brucella suis* biyovar 1'in yaklaşık 2.6 Mb ve 1.15 Mb büyüklüğünde iki kromozoma sahip olduğu, *Brucella suis* biyovar 2 ve 4'ün ise 1.85 Mb ve 1.35 Mb'lık iki kromozoma sahip olduğu gösterilmiştir. *Brucella suis* biyovar 3'ün genetik yapısında 3.1 Mb büyüklüğünde tek bir halkasal kromozom olduğu ve muhtemelen iki kromozom içeren türlerin, *Brucella suis* biyovar 3 gibi atasal bir türden evrimleştiği ileri sürülmüştür (33).

Her bir *Brucella* genomu farklı büyüklüklerde olan iki dairesel kromozom içerir. Her genomda yaklaşık olarak 3200-3400 gen vardır (34). *Brucella* türleri arasında kromozom büyüklükleri ve düzenleri açısından bazı delesyonlardan kaynaklanan farklılıklar olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda ayrıca bazı *Brucella* suşlarında küçük plazmid kopyaları bulunmuş olmasına karşın *Brucella*'da kromozom dışı DNA varlığı halen tartışmalıdır. Doğal *Brucella* suşlarında, plazmidler tarafından kodlanan antibiyotik direnci gösterilememiştir (22).

2.10 Virülans Faktörleri

Brucella türlerinin virülans faktörleri genellikle konak savunma mekanizmalarından kaçma yeteneği ile ilgilidir. Diğer bakterilerde saptanmış olan virülans ile bağlantılı klasik faktörler *Brucella*'da yoktur. Ayrıca; pilus, kapsül, fimbriya, sitolizin, hemolizin ve ekzotoksin gibi klasik virülans faktörleri de üretmezler. Genetik

değişim mekanizması sergilemeyen bu organizmaların lizojenik bakteriyofajları da bugüne kadar saptanmamıştır (20).

Brucella türlerinin çoğunda LPS ve tip IV salgılama sistemi makrofajlar içindeki hücre içi canlı kalma sürecinde kritik rol oynamaktadır (34). Pürüzsüz LPS, bakterinin hücreye girişinde ve enfekte olmuş hücrenin immün sistemden kaçışında rol oynar. Aynı zamanda bu yapı enfekte hücrelerdeki apoptozu inhibe etme yeteneğindedir (20, 35). *Brucella* türleri, makrofaj içinde bakterinin çoğalmasını önlemek için üretilen oksijen radikallerini nötralize eden süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler üretirler. Osmoregüler periplazmik glukanlar (OPG) olarak isimlendirilen özgül proteinler, fagozom-lizozom birleşmesini kesintiye uğratırlar. Ayrıca, *virB* operon proteinleri veziküler pH'nın nötralizasyonuna ve hücre içinde bakterilerin çoğalmalarına yardımcı olur (20).

Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan LPS, *Brucella* türleri için ana virülans faktörüdür. LPS, üç bölümden oluşur. Bu bölümler, Lipit-A, oligosakkarit çekirdeği ve O-antijenidir (36). Siklik β -1-2-glukanlar, fagozom-lizozom füzyonunun kontrolüne katılarak bakterilerin çoğalmasına katkıda bulunurlar. Sitokrom oksidaz, *Brucella* türlerinin makrofajlarda hayatta kalmasını kolaylaştıran bir enzimdir. Bu enzim elektron taşınmasını katalize eder (37).

Üreaz enzimi, asidik koşulları nötralize eden ve azot kaynağı sağlayan önemli bir virülans faktörüdür. Bu enzim, ürenin amonyak ve karbondioksit'e yıkılmasını sağlayarak amonyum karbonat formuna dönüştürür. Ortam pH'ı alkali olur ve böylece bakterinin asitli ortamın sağladığı yüksek H^+ yoğunluğundan kurtularak hayatta kalmasını sağlar (38).

Brucella'nın hücre içinde hayatta kalmasına katkıda bulunan çeşitli virülans faktörleri de vardır. Bunlar, *membran-bound protein (MviN)*, *monose-6-phosphateisomerase (manA)*, *mannosyltransferase (WbkA)* ve *perosamine-synthetase (perA)*'dır (39). Bu faktörler tüm *Brucella* türlerinde olmayıp bakterinin hücre içine penetrasyonu, fagozom-lizozom birleşmesinin sekteye uğratılması ve hücre içi doğal bağışıklık reseptörlerinin aktivasyonunu bozucu etkileri olduğundan bakteriye enfekte ettiği hücrede yaşamını devam etmesi ve çoğalması özelliğine katkıda bulunurlar.

2.11 Patogenez

Brucella, gram-negatif fakültatif hücre içi bir bakteri olup, insanlarda ve çeşitli hayvanlarda zoonotik bir hastalık olan bruselloza neden olur. Sınıflandırılmış 10 *Brucella* türünden, insanlar için patojen olanlar; *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve *Brucella*

suis türleridir (40). İnsanlarda etkenin vücuda giriş bölgeleri en sık bağırsak sistemi, mukoz membranlar, deri ve solunum epitelidir (41).

İnsanlarda en yaygın, *Brucella melitensis* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar görülür. Bu tür, nadiren de olsa ölüme sebep olabilecek düzeyde ciddi hastalık tablolarına yol açabilir. *Brucella suis*, sıklıkla yaygın ve püy dolu lezyonlar oluşmasına yola açıp uzun süreli bir hastalığa neden olmaktadır. *Brucella abortus* ve *Brucella canis* enfeksiyonları diğer iki türe göre daha hafif klinik tablolara yol açar (42).

Brucella, ağız mukozasından vücuda giriş yaptığında faringeal lenf yollarında; bağırsağa ulaştığında bağırsak mukozasından geçerek mezenter lenf bezlerinde, konjunktiva ve deriden giriş yaparsa bölgesel lenf nodüllerinde ilk olarak çoğalmaya başlar. Sayılan bölgesel lenf dokularında çoğalan bakteri ductus torasikus yolu ile kana geçer ve ilk bakteriyemi oluşturur. Kandaki bu ilk bakteriyemi sonrasında bakteri karaciğer, kemik iliği, diğer lenf bezeleri ve diğer retikuloendotelyal sistem (RES) dokularını invaze ederek buralarda çoğalmaya devam eder ve bu dokularda yaklaşık 0.2-2 mm çapında iltihabi odaklar oluşturur (3). Bakteri bu aşamadan sonra invaze ettiği bu dokularda üreyerek kana karışır ve ikinci bakteriyemi dönemini oluşturur. Bu dönemlerde hastanın ateşi yükselir, halsizlik-kırgınlık gibi semptomları artar ve kas ve eklem tutulumları belirginleşir (3).

Brucella'nın hücre içi yaşam tarzı, adaptif immün yanıtı sınırlar ve organizmayı bazı antibiyotiklerin etkilerinden korur (43).

Gebe hayvanların *Brucella*'ya karşı duyarlı olması, hayvanın fotal zarlarında bulunan ve *Brucella* için bir gelişme faktörü olan eritrol yapısında bir madde ile açıklanmıştır. Bu madde insan plasentasında bulunmadığı için hamile kadınlarda bruselloz abortusa yol açmaz (3).

2.12 Klinik Bulgular

Bakterinin vücuda girmesi ile birlikte 1 hafta ile 2-3 ay arasında değişen bir inkübasyon dönemi sonrasında klinik semptomlar oluşmaya başlar. Bruselloz için ortalama 2-3 haftalık bir inkübasyon döneminden bahsedilir. Bu süreç sonunda klinik şikayetler ani yada sinsi bir şekilde kendini gösterir (20). Birçok organ ve sistemi tutabilmesi nedeniyle klinik açıdan geniş bir yelpazeye sahip olan brusellozun klinik seyri konağın yaşına, direncine, etken olan *Brucella* türünün virülansına ve uygulanan tedavi yöntemlerine kadar geçen süreye bağlı olarak değişiklikler gösterir (44).

Klinik süreç açısından bruselloz, başlangıç sürelerine göre 3 kategoriye ayrılmaktadır. Sekiz haftadan kısa olan klinik tablo akut bruselloz, 8-52 hafta arasında

olan tablo subakut bruselloz ve 52 haftadan uzun olan tablo ise kronik bruselloz olarak sınıflandırılmıştır. Akut brusellozda başlangıçta halsizlik, terleme, sırt ağrısı ve devamlı olmayan -aralıklı devam eden- ateş gibi belirtiler görülür. Sepsis şeklindeki başlangıç özellikle *Brucella melitensis* türünün neden olduğu enfeksiyonlarda görülür. Subakut brusellozda kas ve iskelet sistemine ait tutulumlar görülür. Öğleden sonra ateş yükselip, gece yarısı bol terleme ile düşmesi bu olgularda tipiktir. Kronik brusellozda, normalin biraz üstünde seyreden ateş, yorgunluk ve nöropsikiyatrik şikayetler görülmektedir (44). Kronik brusellozda hastalık sinsi seyredebilir. Bunun dışında lokalize organ tutulumları, tekrarlayan nüks atakları ve antimikrobiyal tedaviye yanıtız olabilir (3).

2.13 Komplikasyonlar

2.13.1 Osteoartiküler Komplikasyonlar

Brusellozda artrit, sakroileit, bursit, spondilit, osteomyelit gibi kemik ve eklem tutulumu en sık görülen komplikasyonlar olup bu tutulumun en sık gözlenen etkeni *Brucella melitensis* 'dir. Artrit ve sakroileit, pediatrik hastalarda akut enfeksiyon ile ilişkili iken, spondilit, vertebral osteomyelit, epidural ve paravertebral apseler ise yaşlı hastalarda kronik enfeksiyon ile görülmektedir (20).

2.13.2 Nörobruselloz

Nörobruselloz, çoğunlukla kronik veya subakut meningoensefalit şeklinde görülmekle birlikte menenjit, ensefalit ve serebellar ataksi şeklinde de seyredebilir (20). Hastalar, genellikle baş ağrısı, ateş, terleme, bulantı ve kusma gibi şikayetlerle kliniğe başvurmaktadır. Ancak bazen bu hastaların fizik muayenesinde ense sertliği görülmeyebilir (45). Beyin omurilik sıvısında (BOS), *Brucella* 'nın üretilmesi, pleositoz, protein seviyesinde artış, glukoz seviyesinin düşmesi ve anormal hücre sayıları nörobrusellozda klinik tanı için önemlidir (20, 46).

2.13.3 Solunum Yolu Komplikasyonları

Bruselloz komplikasyonları içerisinde en az görülen ve semptomları göreceli olarak daha hafif seyreden bir tutulumdur. Aerosollerde bulunan organizmanın direkt inhalasyonu sonucu meydana geldiği için laboratuvar çalışanları, mezbaha çalışanları, ahır temizleyenler ve veterinerler risk altındadır. En sık görülen klinik şikayet kuru öksürüktür. Bu komplikasyonda bronşit, akciğer apsesi, ampiyem gelişebilir (20, 22).

2.13.4 Gastrointestinal ve Hepatobiliyer Sistem Komplikasyonları

Gastrointestinal tutulumda kusma, ishal, kabızlık gibi hafif belirtiler olduğu gibi, mezenterik lenfadenit gibi ciddi belirtiler de olabilir (47) Kolit, enterokolit, pankreatit gibi gastrointestinal patolojiler uzun süren enfeksiyonlarda görülebilir. Karaciğer

enzimlerdeki artış, karaciğer tutulumu için bir göstergedir (20). Ayrıca karaciğer en büyük retiküloendotelyal organ olduğu için aktif bir brusellozdan çok sık etkilenmektedir (22).

2.13.5 Genitoüriner Sistem Komplikasyonları

Epididimoorşit en sık görülen tutulumdur ve bruselloz hastalarının %2-20'sinde görülür. Endemik olduğu bölgelerde *Brucella melitensis* epididimoorşitin yaygın nedenidir (20, 22, 48).

2.13.6 Kardiyovasküler Sistem Komplikasyonları

Nadir görülen bir komplikasyon olmasına rağmen endokard tutulumu brusellozda görülen en sık ölüm nedenidir (20, 22). Brusellozun neden olduğu inflamatuvar değişiklikler kapak hasarına ve hastalık süresine bağlı olarak kalp yetmezliğine yol açabilir. Perikardit ve miyokardit tutulumu ortaya çıkabilir (49).

2.13.7 Göz Komplikasyonları

Brusellozda olağan olmayan geç komplikasyonlardan biri de göz enfeksiyonlarıdır. En sık görülen olgusu üveittir (20).

2.13.8 Hematolojik Komplikasyonlar

Brusellozda hematolojik görüntü normal olabilir ve tanıda kullanılabilecek özgün bir bulgu yoktur. Laboratuvar bulguları olarak lökopeni, lenfomonositoz ve anemi saptanabilir (3, 22).

2.13.9 Deri Komplikasyonları

Brucella, deri ve subkutan dokularda bulunan bütünlüğün bozulduğu alanlardan giriş yapabilir. Derideki aberasyondan ve kesikten giriş yaparak hematojen yolla sisteme yayılması çok sık görülür. Bakterinin ilk giriş yerinde eritematöz ve purpurik lezyonlar oluşabilir, ayrıca takip eden sistemik yayılım sonucu Stevens-Johnson sendromu-benzeri klinik tablolar ortaya çıkabilir (20, 22).

Brusellozun klinik seyrinde hastalarda spesifik olmayan ve geçici cilt bulguları gelişebilir. Bunlar, raş, papül, ülser, eritema nodozum, peteşi ve purpura tarzı lezyonlardır.

2.14 Tanı

Brusellozun özgül olmayan çok çeşitli klinik semptomlarının olması ve çoğunlukla sinsi seyretmesi klinik tanıda zorluklara neden olmaktadır. Mikrobiyolojik yöntemler sonucunda elde edilen bulgular kesin tanı koymada yardımcı olmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılığı genel olarak incelenen örnek içerisinde bulunan mikroorganizmaların sayısına bağlıdır (50).

2.14.1 Direkt Tanı Yöntemleri

Mikroskopi: Mikroskopi, enfekte hayvan materyallerinin incelenmesinde daha değerlidir. Bunun nedeni; insandan alınan örneklerde bakteri sayısının az olmasıdır. *Brucella* türleri zayıf asit dekolarizasyonuna dirençlidir ve zıt bir zeminde kırmızı veya turuncu renkte görülür (22).

Kültür: Bruselloz tanısında etkenin kültürü açısından incelenen örneklerin başında kan ve kemik iliği gelmektedir. Ayrıca karaciğer ve dalak biyopsileri, apse, BOS, idrar, eklem ve periton sıvıları da örnek olarak incelenmektedir. Serum, serolojik çalışmalarda en sık kullanılan örnektir (50). Kültür, brusellozun kesin tanı yöntemi olup bu nedenle hastalığın laboratuvar tanısında altın standart olarak kabul edilir (51).

Brucella türlerinin kültür yöntemleri ile izolasyonunda genellikle katı besiyerleri kullanılmaktadır (50). Serum dekstroz agar, kontamine olmayan bir örnekten bakterinin izolasyonu için kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerine antibiyotik eklenerek seçici bir hale getirilebilir. Farrel tarafından geliştirilen ve Farrel antibiyotik besiyeri adlı bu formül süt, plasenta ve vajinal akıntı gibi kontamine örneklerden bakterinin izolasyonu için kullanılır.

Kan ve diğer sıvı örneklerden *Brucella*'nın izolasyonunda, içerisinde sıvı ve katı besiyerlerinin bir arada bulunduğu Castaneda Bifazik kan kültür şişeleri kullanılmaktadır (22). *Brucella* türleri kanlı ve çikolatamsı agar besiyerlerinde yavaş ürerler. Kolonileri 2-5 gün sonunda gözle görülebilir hale gelmektedir (20). İzolasyonda kullanılan diğer besiyerleri triptik soy agar ve *Brucella* K-vitaminli agardır. İnkübasyonlar normal atmosfer koşullarında ve %5-10 CO₂'li etüv içinde olmak üzere ikili yapılmalıdır (3).

Antibiyotik kullanan hastaların kan kültürlerinde hatalı negatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu nedenle, bruselloz şüphesi olan hastalarda kan kültürünün negatif olması durumunda kemik iliği kültürünün yapılması önerilir (50). Kemik iliğinden yapılan kültürün verimliliği, periferik kan kültüründen %15-20 daha fazladır (51).

Brucella türlerinin yavaş üremeleri, konvansiyonel kan kültürlerinde inkübasyon süresini 4-6 haftaya çıkarmayı gerektirmektedir (20). Ancak; sürekli izlem yapan otomatize kan kültür sistemleri daha yüksek verim sağlar (51). *Brucella* türlerinin hızlı izolasyonunda kullanılan diğer bir alternatif yöntem lizis-santrifügasyon metodudur. Bu yöntem ile 2-4 gün içerisinde izolasyon sağlanır ve bakteriyemi düzeyi yarı-kantitatif olarak belirlenir (20).

Moleküler Yöntemler: Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), multipleks PCR ve gerçek zamanlı PCR gibi çeşitli moleküler yöntemler, *Brucella* türlerinin tanısında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (20).

İlk defa 1987 yılında tanıtılan PCR yöntemi, hassas ve duyarlı olması özellikleri nedeniyle hızlı testlere ihtiyaç duyulan ve biyolojik savaş ile tarımsal terör tehlikesi altındaki çağımızda son derece önemli bir tanısal potansiyele sahiptir. *Brucella* tanısı için üretilen ilk PCR yöntemi Fekete ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (52). Bu yöntem, *Brucella abortus* S19 suşunun 43-kDA dış membran proteinini kodlayan genin amplifikasyonuna dayandırılmıştır (53).

Daha sonra Herman ve De Ridder tarafından *Brucella* 16S rRNA geni hedef seçilerek yeni bir yöntem geliştirilmiştir (52). Baily ve arkadaşları ise 1992 yılında *bcs31*'i kodlayan genin tespitine dayalı yeni bir PCR yöntemi geliştirmiştir (54).

Brucella kromozomunda türe ve biyovara özgül olarak bulunan *IS711* bölgesinin çoğaltılmasına dayalı olarak Bricker ve Halling 1994 yılında bir multipleks PCR yöntemi geliştirip daha sonra *Brucella abortus* 'un patojenik suşları ile aşı suşlarını (S19 ve RB51) ayırt edebilecek yeni primerler dizilerini oluşturdu. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* ve *Brucella suis* 'i tespit ettiği için de bu yönteme AMOS PCR adı verilmiştir (55). Daha sonra Redkar ve arkadaşları tarafından *IS711* bölgesinin 3' ucundan köken alan primerlerin kullanıldığı gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirilmiştir (56).

Ewalt ve Bricker, daha hızlı tanı yapmak için AMOS PCR yönteminin geliştirilmiş bir versiyonunu üretmişlerdir (57). Ficht ve arkadaşları tarafından *omp2* lokusunu hedef alan PCR yöntemi tasarlanmıştır. Cloeckert ve arkadaşları *omp2A* ve *omp2B* gen sekanslarına dayanan bir PCR analizi geliştirmiştir (52). Rees ve arkadaşları *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve diğer *Brucella* türlerini tanımlamak için değişik sayıda ardışık tekrar analizini (Variable Number Tandem Repeat; VNTR) kullanan tek tüplü PCR yöntemi geliştirmişlerdir (58).

Mitka ve arkadaşları, *bcs31*, *omp2*, *omp28* ve *bp26* gibi her biri farklı primer çiftlerini ve gen hedeflerini kullanan PCR yöntemi geliştirmişlerdir (59). Çeşitli *Brucella* türlerini tanımlayabilen Bruce-ladder adı verilen bir moleküler yöntem 2002 yılında geliştirilmiştir (20).

Scott ve arkadaşları, türler arasında veya içerisinde tekli nükleotid farklılıklarını tanımlayabilen tek nükleotid polimorfizmi analizini (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) kullanarak *Brucella* türlerini saptamışlardır (60). Koylass ve arkadaşları Bruce-

ladder ile SNP yöntemini karşılaştırarak SNP bazlı yöntemin *Brucella canis* ve *Brucella suis* türlerinin ayırt edilmesinde daha güvenilir bir metod olduğunu göstermiştir (61). Winchell ve arkadaşları *Brucella* türlerini spesifik olarak tespit etmek için yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizini kullanarak gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde yedi farklı primer kullanılmış ve her biri farklı bir erime profili göstermiştir (62). Kattar ve arkadaşları bruselloz teşhisi için LightCycler hibridizasyon probu kullanılarak sırasıyla 16S-23S ITS, *omp25* ve *omp31* genini tespit etmeye dayalı gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir (63).

Quiapo-Orturo ve arkadaşları, insan serum örneklerinde *Brucella* türlerinin saptanması için SYBR Green I ve LightCycler tabanlı gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde *bcs31* immünojenik membran proteininin 223 baz çiftlik bir bölgesi amplifiye edilmektedir (64). Dolayısı ile moleküler yöntemler, sadece tanımlamada değil suş tiplendirmesinde de kullanılmaktadır (20).

2.14.2 İndirekt Tanı Yöntemleri

İndirekt tanı yöntemleri bakteriyel antijenlerin yada bu antijenlere karşı oluşan immün yanıtın bir sonucu olan antikörlerin belirlenmesini için kullanılan yöntemlerdir (50). Bu testlerden en sık kullanılanları şunlardır:

Rose Bengal Testi: Hızlı bir tarama testi olarak kullanılan bu testin duyarlılığı yüksek olup, nörobruselloz gibi komplikasyonların hızlı doğrulanmasında değerli bir testtir (4). Duyarlılığı her ne kadar yüksek olsa da özellikle endemik bölgelerde hastalığa tekrar maruz kalan kişilerde güvenilir bir uygulama değildir (65). Bu testte yaklaşık olarak pH 3.65'e tamponlanmış, Rose Bengal boyası ile boyanmış *Brucella abortus* 1119-3 suşunun antijen süspansiyonu kullanılır (66). Sınırlı imkanlara sahip laboratuvarlarda kullanılsa da prozon sorunu ve çapraz reaksiyonlar vb. karışıklıklar nedeni ile DSÖ tarafından diğer testler ile doğrulanması önerilmektedir (67).

Spot Test: Kitle taramalarında kullanılan bu test, *Brucella* bakteri süspansiyonundan hazırlanmış antijenin üzerine, parmak ucundan alınan bir damla kanın damlatılması sonucunda aglütinasyon görülme prensibine dayanır (3).

Standart Tüp Aglütinasyon Testi: Standart Tüp Aglütinasyon Testi (STA), bruselloz teşhisinde serolojik tanı yöntemleri içerisinde altın standart olarak kabul edilir. Bu testte hastanın kanındaki antikör düzeyine ait titre tayini yapılabilmektedir (68). Bu test bruselloz tanısında ilk kez 1897 yılında Wright ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (69). Bu testte *Brucella abortus*'un 456 numaralı suşu kullanılır. Burada kullanılan antijen *Brucella abortus*'un S kültürlerinin ısı ile öldürülmüş fenollü

süspansiyonudur. *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* ve *Brucella suis* için spesifik olan IgM ve IgG'leri saptamak amacı ile kullanılır. (3). Bu testte, hasta serumları seri sulandırım yapılarak üzerine antijen damlatılır ve 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonrasında tüplerde aglütinasyon görülüp-görülmemesi açısından değerlendirilir (68). *Brucella*'ya maruz kalma potansiyeli olan ve klinik semptomları ile bruselloz şüphesi olan hastaların 1/160 ve üzeri titreleri aktif bruselloz olarak kabul edilir (66). Bu testte oluşan aglütinasyonlar direk bakı ile değerlendirildiğinden kullanıcının deneyimi testin yorumlanmasında önemli olup kullanıcılar arasında farklılıklar oluşabilmektedir.

2-Merkaptoetanol – Rivanol Testi: Standart Tüp Aglütinasyon Testinde etkene karşı oluşmuş olan IgM ve IgG arasında ayırım yapılamaz. 2-Merkaptoetanol Testinde (2-ME) kullanılan merkaptoetanol IgM antikorlarının disülfid bağlarını parçalayarak ortamdaki IgM antikorlarını elimine eder. Böylelikle bu test sonrasında elde edilen aglütinasyonun merkaptoetanole dirençli IgG tarafından oluşturulduğu anlaşılır (22). Bu test, STA ile birlikte değerlendirildiğinde hastanın serumunda bulunan antikorların ne kadarının IgG, ne kadarının IgM olduğu tayin edilir. Bu testte, 2-Merkaptoetanol yerine, serum glikoproteinlerini presipite edip spesifik olmayanları azaltan rivanol de kullanılabilir (70).

Coombs Testi: İmmünglobülin-A sınıfından olan blokan antikorlar, IgG ve IgM'nin antijen ile birleşmesini engelleyerek kümeleşme oluşumunu önlerler. Bu nedenle STA'yı tamamlayıcı test olarak coombs testi uygulanır. Aglütinasyon vermeyen standart tüp dilüsyonları serum fizyolojik ile üç kez yıkanıp tekrar süspansiyon edilir. Üzerlerine bir damla coombs serumu (anti-insan globülini) damlatılır ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Daha sonra aglütinasyon oluşup oluşmadığı değerlendirilir. Bu test özellikle kronik veya tekrarlayan hastalıkların tanısında yararlıdır (20, 68).

Brucellacapt Testi: İmmünocapture (antikor yakalama) prensibine dayanan bu testte, anti-insan IgG ve IgA molekülleri ile kaplı mikropalak çukurları kullanılır. Bu çukurlara ilk başta sulandırılmış hasta serumu eklenerek IgG antikorları yakalanır. İnkübasyondan sonra bu çukurlara formalinle muamele edilmiş *Brucella abortus* hücre süspansiyonu eklenir ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Çukurların dibinde bakteri süspansiyonun kümeleşmesi pozitif, düğme gibi çökmesi ise negatif sonucu gösterir. Bu test özellikle endemik bölgelerde kronik enfeksiyonların tanısı için önerilir ve 1/320 üzerindeki titreler anlamlı kabul edilir (20, 68).

Kompleman Fiksasyon Testi: Bu test ilk defa Larson tarafından bruselloz tanısında kullanılmış olup, uzun yıllar veteriner hekimlikte de kullanılmıştır. Bu test, uzun zaman alan, yoğun bir iş gücü isteyen ve birçok ayırıcın kullanıldığı bir yöntemdir (22).

Enzyme – Linked Immunosorbent Assay Testi: Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testi bruselloz teşhisi için kullanılan, IgM, IgA ve IgG antikorlarının tespitini yapabilen, hassas ve hızlı bir yöntemdir. Daha çok endemik bölgelerde tercih edilen bu testte, bakterinin S-LPS antijenleri kullanılmaktadır (68, 71). Antijen modifikasyonları ile çapraz reaksiyon riskinin en aza indirilmesi ELISA yönteminin avantajlarından biridir. Aynı zamanda akut ve kronik enfeksiyonlarda antikor profilini göstermede yardımcı bir testtir (72).

İndirekt Floresan Testi: Özellikle veterinerlik alanında kullanılan bu yöntemde düşük yapmış hayvanların fetuslarından spesifik tür aranır. Bu test bazı yöntemlerle paralellik gösterse de testin özel cihazlar ve farklı kalitede ayıraçlar gerektirmesi sonuçların yorumlanmasında karşılaşılan sorunlardır (22).

Dipstick Testi: Özellikle brusellozun yaygın olduğu kırsal alanlarda ve yeterli donanımına sahip olmayan laboratuvarlarda akut bruselloz teşhisinde kullanılabilen kolay bir testtir (73). *Brucella abortus* 1119-2'nin ısıya dirençli antijeninin kullanıldığı bu testte koloidal boya parçacıklarına konjüge edilmiş anti-insan IgM antikorundan oluşmuş bir reaktif kullanılır. Testte kullanılacak antijen kaplı şerit, serum ve reaktif karışımı içine konularak 3 saat inkübe edilir. Kırmızı rengin görülmesi pozitif olarak kabul edilir (69,74,75).

Deri Testi: Bu testte; öldürülmüş bakteri, saflaştırılmış bakterilerin 21 günlük kültür süzüntüleri veya ticari olarak hazırlanmış rekombinant bakteri proteinleri antijen olarak kullanılır. Elde edilen antijenler deri içine enjekte edilir ve 24 saat sonra bu bölgede kızarıklık, şişme ve sertlik görülürse test pozitif kabul edilir. Bu metot içinde klinik uygulamada en sık kullanılan yöntem “*Brucellergen*” testidir (3, 50).

2.15 Tedavi

Brusellozun farklı klinik spektrumu, çoklu organlarda komplikasyon oluşturma eğilimi ve kronik enfeksiyon gelişme olasılığı gibi nedenlerden dolayı farklı tedavi stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir. Uygulanan tedavinin başarılı olması için kombine ilaç kullanımı ve uzun süreli uygulamaya ihtiyaç vardır. Antimikrobiyal ilaçlar içinden fagositik hücrelere penetre olanlar seçilmektedir (20).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından bruselloz için önerilen standart tedavilerin uygulanması, tedavi başarısızlığı veya nüks oranını azaltmıştır. Komplike olmayan bruselloz tedavisinde ilk seçenek doksisiklin-aminoglikozid kombinasyonu olup, ayrıca doksisiklin-rifampin kombinasyonu da önerilen diğer bir tedavi seçeneğidir (76).

Monoterapi, brusellozda relaps oranlarının yüksekliği nedeniyle yetersizdir. Seftriakson gibi üçüncü kuşak bir sefalosporin ile yapılan monoterapinin başarısızlıkla sonuçlandığı gösterilmiştir (20, 77). Trimetoprim-sülfametaksazol'un (SXT) rifampin ile kombinasyonunun özellikle pediatrik hastalardaki brusellozda başarılı olduğu kanıtlanmıştır (77). Sekiz yaşından küçük çocuklarda dişlerde oluşacak lekelenmeler nedeniyle tetrasiklin ve doksisiklin kullanımı kontrendike olarak bildirilmektedir (76).

Santral sinir sistemi hastalığında, aminoglikozid rejimleri bu ilaçların BOS'da terapötik düzeylere ulaşamadıkları için kontrendikedir. Bu tip durumlarda doksisiklin, rifampin ve SXT gibi üçlü kombinasyonlar önerilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü önerisine göre altı hafta boyunca oral bir şekilde uygulanacak tetrasiklin veya doksisiklin streptomisin kombinasyonu daha az relaps ile ilişkilidir (20).

2.16 Korunma

Brusellozun kontrolünde, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ve DSÖ hayvanları hastalıktan korumak, hasta hayvanların belirlenip itlafi ve 4-8 aylık dişi danaların aşılınmaları gibi üç program önermektedir (3).

Brusellozdan korunmak için;

- ✓ Risk altındaki personellerin kendilerini koruyucu ekipmanları kullanması
- ✓ Sütlerin pastörizasyonu
- ✓ Taze peynir imalatının önlenmesi
- ✓ Etlerin ve hastalıklı kümes hayvanlarına ait yumurtaların çiğ yenmemesi
- ✓ Hayvan idrarı ile bulaş riskinden dolayı özellikle endemik bölgelerde sebzelerin uygun dezenfeksiyon işleminden sonra pişirilerek tüketilmesi
- ✓ Bruselloz kuşkulu kişiler ile cinsel ilişkiye girilmemesi
- ✓ Güzellik merkezlerinde kullanılacak olan plasenta hücrelerinin sağlıklı sığırlardan elde edilmesi gibi önlemler alınabilir.
- ✓ Bruselloz olgularının mutlaka Sağlık Bakanlığı'na ihbar edilip o bölgenin geniş bir şekilde incelenmesi sağlanmalıdır (3).

Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Orman Bakanlığı'nın, özellikle brusellozun eradike edildiği ülkelerdeki çalışmaların incelenmesi sonucunda hazırlamış olduğu 18.06.2019 tarihli "Brusellanın Konjunktival Aşısı İle Kontrol ve Eradikasyonu"

genelgesinde aşılama programına dikkat çekilmiştir. *Brucella*'nın tespiti için yapılan bakteriyolojik testlerde pozitif olgunun bulunması durumunda, enfekte olmuş hayvanlar 10 gün içinde sürüden ayrılarak şarta tabi kesime gönderilecek veya itlaf-imha edilecektir. Bu işlemler esnasında her türlü biyogüvenlik tedbirlerinin alınması zorunlu tutulmuştur. Ayrıca ilgili personellerin, hayvancılıkla uğraşanların ve kamuoyunun bilinçlendirilmesi için afiş, broşür gibi gerekli çalışmalar yapılması hedeflenmiştir (78).



3. MATERYAL – METOT

3.1 Çalışma Dizayını ve Örneklerin Seçimi

Bu çalışmada, brusellozun klinik tanısında kullanılmakta olan PCR yönteminin tanı etkinliğinin saptanması, elde edilen tanı performansının rutin tanıda kullanılmakta olan serolojik yöntemler ile karşılaştırılması ve saptanan izolatlarda bazı virülans genlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, prospektif olarak yapılan ve rutin tanıda kullanılan in vitro tanı yöntemlerinin performans analizidir.

Çalışmaya, 01 Ocak 2018 ile 31 Temmuz 2018 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nin çeşitli servis ve polikliniklerinden bruselloz ön tanısı ile Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen hasta serum örnekleri alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilecek hasta sayısı Power Analizi ile hesaplanmıştır. Buna göre; PCR ve serolojik yöntemlerin tanı etkinliğinin saptanabilmesi için aradaki farkın 0.20 olacağı ve uyumsuz oranın 0.25 olacağı öngörüsüyle %95 güven düzeyinde ($\alpha=0.05$) ve %80 güç ile ($\beta=0.20$) gereken minimum örnek sayısı grup başına 59 olarak hesaplanmıştır. Bu veri ışığında çalışmaya 60 pozitif ve 60 negatif olmak üzere toplam 120 örnek dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan tüm örnekler Rose-Bengal testi sonucuna göre pozitif ve negatif olarak ayrıştırılmıştır. Rose-Bengal testi pozitif olan ve klinik olarak bruselloz düşünülen hasta numuneleri çalışma grubunu oluşturmuştur. Buna göre; ilgili tarihler arasında laboratuvarımıza gelen 134 pozitif örnekten rastgele örneklem yöntemi ile 60 numune seçilerek çalışma grubuna alınmıştır. Rose-Bengal, kültür ve diğer serolojik testleri negatif olan ve klinik olarak bruselloz düşünülmeyen numuneler ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Buna göre; ilgili tarihler arasında laboratuvarımıza gelen 816 negatif örnekten rastgele örneklem yöntemi ile 60 numune seçilerek kontrol grubuna alınmıştır.

Bu çalışma, Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2018/53 sayılı kararı ile etik onay almış ve İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından 2018/1434 numaralı proje desteği ile desteklenmiştir.

3.2 Kullanılan Materyaller

Çalışmanın yapılması için aşağıda belirtilen gereç, cihaz ve kitler kullanılmıştır.

- Vakumlu jelli kan alma tüpleri, steril seroloji tüpleri

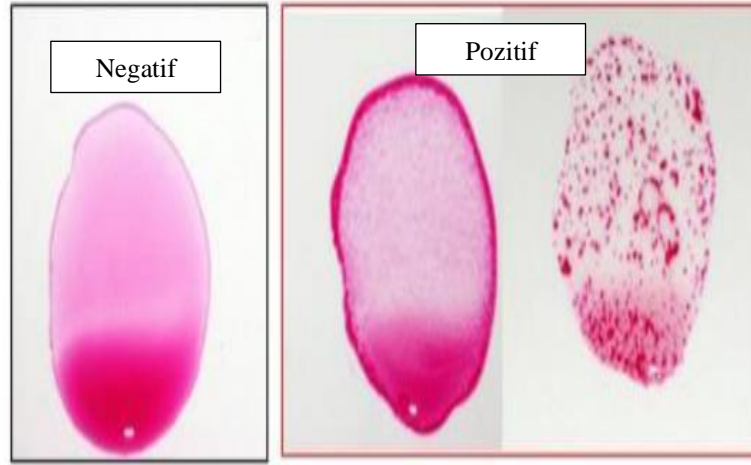
- Spor
- Santrifüj cihazları, vorteks
- Pipetler (10, 100, 1000 µl) ve pipet uçları
- Eppendorf tüpleri (1.0-1.5 ml)
- Etüv
- Biyogüvenlik kabini (Sınıf 2-A)
- Derin dondurucu (-20 ve -80 °C) ve buzdolabı (+1 ila +8 °C)
- Steril plastik öze (tek kullanımlık)
- Kan kültürü şişeleri ve otomatize kan kültürü cihazı
- Besiyerleri: Kanlı agar, EMB agar, çikolatamsı agar, brucella agar, üre agar
- Çeşitli kimyasallar: katalaz ve oksidaz reaktifleri
- Kurutma kağıdı, lam, immersiyon yağı
- Kimyasal boyalar (kristal viyole, lügol iyot, bazik fuksin)
- Alkol (%70 ve %96) ve distile su
- Mikroskop
- Anti-brucella antikoru pozitif ve negatif hasta serumları
- Rose-Bengal antijeni
- STA antijeni
- Coombs antijeni
- Otomatize DNA ekstraksiyon cihazı
- **DNA ekstraksiyon kitleri (DNA mini kit)**
- **Brucella real-time PCR kitleri**
- **Virülans genleri için DNA primerleri (toplam 6 set)**
- **Yüksek çözünürlüklü DNA kiti (DNA high resolution kit)**
- Elektroforez tankı

3.3 Metodlar

3.3.1 Hasta Serumunun Ayırıştırılması ve Serolojik Testler

Hastalardan usulüne uygun olarak alınan kan örnekleri steril jelli tüp içerisinde olmak üzere ilgili numune kabul kriterleri dikkate alınarak laboratuvarımıza kabul edildi. Vakumlu, jelli serum separatör tüpleri (BD Vacutainer SST II, Becton Dickinson Ltd.Şti., İstanbul) santrifüj cihazında 3000 rpm/dk hızda 5 dakika çevrilerek hasta serumu ayırıştırıldı ve aşağıdaki serolojik testler uygulandı.

Rose-Bengal Testi: Test için Seromed marka (Seromed Ltd, İstanbul, Türkiye) Rose-Bengal kiti kullanılmıştır. Bu kit, *Brucella abortus* S99 suşu kökenli antijenlerin Rose Bengal boyası ile boyanmış süspansiyonunu içermektedir. Test, üretici firma önerileri doğrultusunda şöyle yapılmıştır: Rose-Bengal test süspansiyonu ve hasta serumu oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi. Hasta serumundan 50 µl'lik bir örnek pipet ile alınarak beyaz renkli ve temiz plastik bir slayt üzerine konup üzerine 50 µl Rose-Bengal antijeni damlatıldı. Temiz karıştırıcı çubuk yardımıyla antijen ve serum karıştırılıp daha sonra dört dakika boyunca dairesel hareketler ile iki sıvının karışımı sağlandı. Bu süre sonunda gözle görülebilen bir çökeltme olması (aglutinasyon) pozitif sonuç olarak değerlendirilirken aglutinasyon görülmeyen hastalar negatif olarak kabul edildi. Şekil 3.1'de Rose-Bengal testinin pozitif ve negatif sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Rose-Bengal testi negatif ve pozitif reaksiyon görüntüsü (67).

Standart Tüp Aglutinasyon Testi: Test için Seromed marka (Seromed Ltd, İstanbul, Türkiye) STA test kiti kullanılmıştır. Bu kit, *Brucella abortus* S99 suşunda üretilen ve *Brucella* antiserumu ile standardize edilmiş antijen içermektedir. Bu antijen ile hasta kanında oluşan *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* ve *Brucella suis* türlerine spesifik IgM ve IgG türü antikorlar saptanmaktadır.

Test, üretici firma önerileri doğrultusunda şöyle yapılmıştır: Test edilecek hasta serumları, kontrol serumu ve STA *Brucella* antijeni, 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Test için uygun steril cam tüplerden, her bir hasta için yedi adet hazırlandı. İlk tüpe 950 µl serum fizyolojik (SF), diğer altı tüpe ise 500 µl SF kondu. Daha sonra ilk tüpe hasta serumundan 50 µl konularak karıştırıldı. Bu tüpten ikinci tüpe 500 µl aktarıldı ve bu işlem son tüpe kadar sırasıyla yapılarak seri dilüsyon sağlandı. Son tüpten de 500 µl dışarı atıldı.

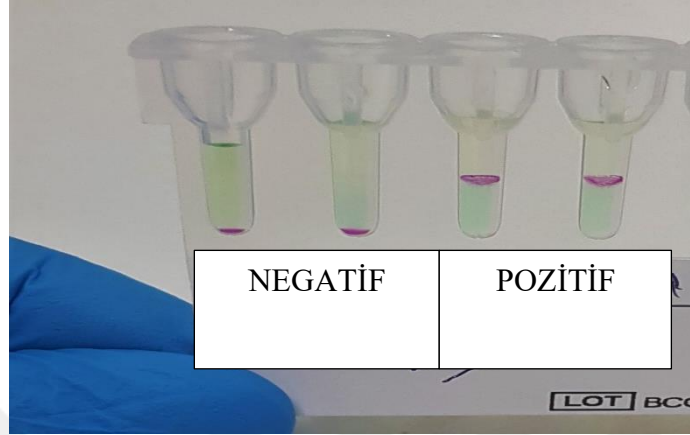
Tüm tüplere 500 µl *Brucella* antijeni dağıtıldı. Tüplerdeki titre oranları birinci tüp 1/40, ikinci tüp 1/80, üçüncü tüp 1/160, dördüncü tüp 1/320, beşinci tüp 1/640, altıncı tüp 1/1280 ve son tüp 1/2560 olarak ayarlandı. Tüpler, etüvde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüplerde oluşan en son çökelpmenin olduğu konsantrasyon, ölçülen antikor titresini olarak kabul edildi. Gözle ilgili yanılgıları önlemek için, test pozitif ve negatif kontrol serumları ile birlikte yapıldı.

Brucella Coombs'lu Jel Testi: Bu test için ODAK Brucella Coombs Gel Matriks kiti (ME-SA Med. Ltd., İstanbul, Türkiye) ve U tabanlı dilüsyon pleitleri kullanıldı. Kit içeriğinde; *Brucella* dilüent, *Brucella* bakteriyel antijen süspansiyonu (inaktif *Brucella abortus* süspansiyonu), *Brucella* jel matriks, *Brucella* negatif kontrol ve *Brucella* pozitif kontrol reaktifleri bulunmaktadır.

İncelenecek hasta serumları, kullanılacak tüm kit ve içerikleri oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İlk olarak tarama işlemi yapıldı. Bunun için dilüsyon pleitindeki ilgili kuyucuğa 100 µl *Brucella* dilüent kondu. Üzerine hasta serumundan 5 µl konularak karıştırıldı. Buradan 50 µl süspansiyon dışarı atılarak üzerine 50 µl *Brucella* antijeni eklendi. Pleitin üzeri koruyucu bantla kapatılıp 37 °C'de 60 dakika etüvde bekletildi. Daha sonra kuyucuktan 50 µl alınarak *Brucella* jel matriks'teki ilgili kuyucuğa pipet ile transfer edildi. Yaklaşık 3000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra sonuç gözle değerlendirildi. Üretici firma önerileri doğrultusunda; pembe renkli *Brucella* antijeninin jelin dip kısmına çökmesi negatif sonuç (serumda *Brucella* 'ya karşı antikor yok), antijenin jelin üstünde kalması pozitif sonuç (serumda *Brucella* 'ya karşı antikor var) olarak değerlendirildi. Bu uygulamada saptanan pozitif sonuç için serum titre değeri en az 1/40 olduğundan pozitif bulunan hasta serumları aşağıda belirtilen ileri titrasyon işlemine alındı.

Her bir hasta için dilüsyon pleitlerinde yedi kuyucuk ayrıldı. Birinci kuyucuğa 100 µl, kalan diğer üç kuyucuğa 50 µl *Brucella* dilüent kondu. Birinci kuyucuğa 5 µl hasta serumu konularak karıştırıldı. Birinci kuyucuktan 50 µl alınarak ikinci kuyucuğa, ikinci kuyucuktan 50 µl alınarak üçüncü kuyucuğa, sırasıyla diğer kuyucuklara aynı seri dilüsyon yapılarak son kuyucuktan 50 µl alınarak dışarı atıldı. Daha sonra, bütün kuyucuklara 50 µl *Brucella* antijeni kondu ve kuyucuklardan 50 µl alınarak *Brucella* jel matriks'teki ilgili kuyucuklara pipetleme işlemi ile dağıtıldı. Yaklaşık 3000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edilerek sonuçlar gözle değerlendirildi. Pembe renkli *Brucella* antijeninin jelin dip kısmına çökmesi negatif sonuç (serumda *Brucella* 'ya karşı antikor yok), antijenin jelin üstünde kalması pozitif sonuç (serumda *Brucella* 'ya karşı antikor

var) olarak değerlendirildi. Bu işlem sonucunda ilk kuyucuk titre değeri 1/40 olup, son kuyucuk titre değeri 1/2560 olarak değerlendirildi. Şekil 3.2’de *Brucella* Coombs’lu Jel Testi pozitif ve negatif görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.2: *Brucella* Jelli Coombs testi negatif ve pozitif sonuç görüntüsü

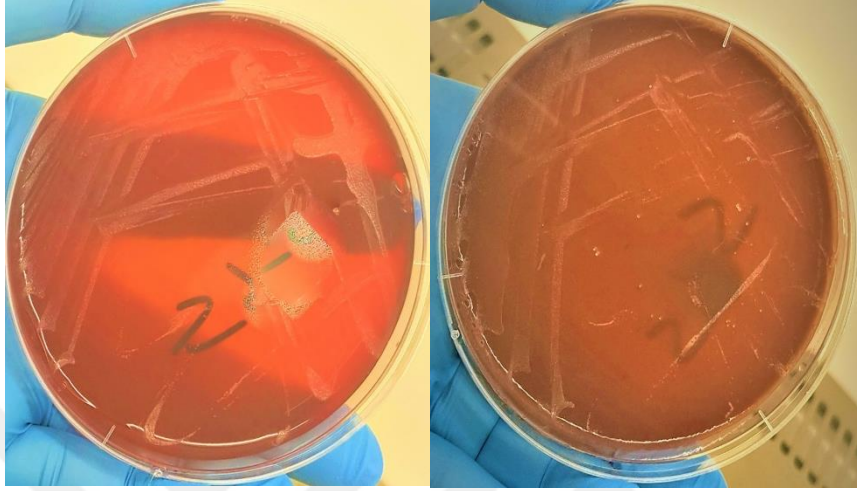
2-Merkapto Etanol (2-ME) Testi: 2-Merkapto etanol stok çözeltisinden (Merck, Almanya) 1 ml alınıp 3 ml SF ile sulandırılarak 2-ME solüsyonu hazırlandı. Test edilecek hasta serumu 56 °C’de 30 dakika inaktive edildi. Beş adet steril cam tüp alındı, ilk tüpe 2-ME solüsyonundan 950 µl, diğer tüplere ise 500 µl kondu. Hasta serumundan 50 µl ilk tüpe eklendi ve karıştırıldı. İlk tüpten 500 µl alınarak ikinci tüpe eklenip diğer tüplere de aynı şekilde seri dilüsyon yapıldı. Son tüpte kalan 500 µl dışarı atıldı. Bütün tüplere 500 µl *Brucella* antijeninden eklendi ve 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüplerde oluşan en son çökelmenin olduğu konsantrasyon, ölçülen antikor titresini olarak kabul edildi.

3.3.1 Kan Kültürü ve Tanımlama

Hastaların kan kültürleri BACT/ALERT 3D (bioMérieux, Fransa) tam otomatize kan kültür cihazı kullanılarak yapıldı. Hastaların kan alınacak vücut bölgesinde povidon iyot ve alkol ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra steril şırınga yardımıyla hastanın venöz dolaşımından 10-15 ml kan alınarak kan kültürü şişesine inoküle edildi. Örnek bulunan kan kültürü şişeleri laboratuvarımıza en kısa sürede ulaştırıldı ve kan kültürü cihazına yüklenerek 2 hafta inkübasyona alındı.

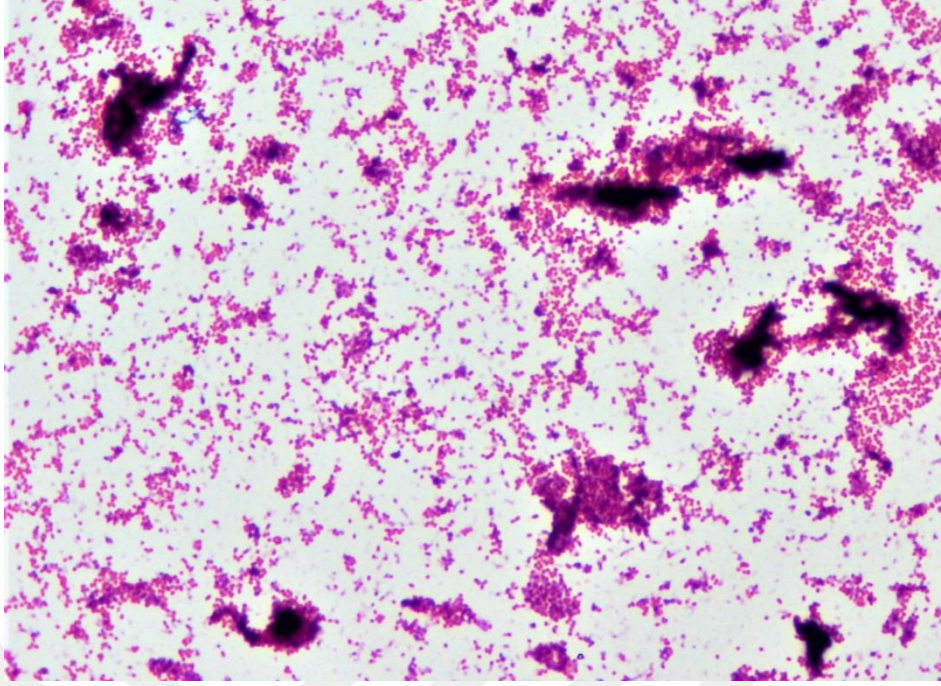
Bu süre içinde pozitif sinyal veren şişeler cihazdan çıkarıldı. Steril bir şırınga yardımıyla şişeden 3 ml örnek aspire edilerek %5-7 kanlı agar, EMB agar, çikolatamsı agar ve *Brucella* agar besiyerine (Oxoid, İngiltere) pasaj ekimleri yapıldı ve 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

Plaklar, biyogüvenlik kabini içinde değerlendirildi. Besiyerinde yuvarlak, küçük, saydam, hemoliz oluşturmeyen veya ıslak koloni yapısı oluşması *Brucella*-şüpheli üreme olarak değerlendirilerek tanımlama işlemlerine geçildi. Şekil 3.3'de plakta üreyen *Brucella spp.* kolonilerini gösterilmiştir.



Şekil 3.3: Kanlı agar ve çikolatamsı agar besiyerinde *Brucella spp.* kolonileri.

Biyogüvenlik kabini içerisinde temiz bir lam üzerine bir damla SF damlatıldı. Daha sonra steril bir öze yardımıyla bakteri kolonisinden bir miktar alınarak SF içerisine süspansiyonu sağlandı. Havada kurutulduktan sonra bek alevinde preparat tespit edildi ve Gram boyaması yapıldı. Hazırlanan preparatın üzerine ilk önce kristal viyole boyası damlatıldı ve 30 saniye beklendi. Su ile lam üzerindeki boya yıkandıktan sonra lügol solüsyonu damlatıldı ve 60 saniye beklendi. Su ile lam yıkandı ve sonra %96'luk etil alkol damlatıldı ve 20-30 saniye beklendi. Su ile lam üzerindeki alkol yıkandıktan sonra üzerine sulu fuksin boyası damlatıldı ve 30 saniye beklendi. Su ile üzerindeki boya yıkandıktan sonra preparat kurutma kağıdı ile kurutuldu ve 100'lük objektifte immersiyon yağı kullanılarak bakterilerin morfolojisi belirlendi. Mikroskopta, çok küçük, Gram-negatif kok veya koko-basil morfolojisindeki bakteriler *Brucella*-şüpheli olarak değerlendirilerek bir sonraki tanımlama sürecine devam edildi. Şekil 3.4'te Gram boyaması yapılan preparatın mikroskopik görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Gram boyalı preparatta *Brucella spp.*'nin mikroskopik görüntüsü.

Biyogüvenlik kabini içerisinde kültür plağında üreyen koloniler için katalaz testi yapıldı. Temiz bir lam üzerine %3'lük H₂O₂ damlatıldı ve daha sonra steril bir öze yardımı ile bakteri kolonisinden bir miktar bakteri alınarak hidrojen peroksit solüsyonu içine bırakıldı. Saniyeler içerisinde gaz kabarcıklarının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Üreyen *Brucella*-şüpheli koloniler için oksidaz testi yapıldı. Biyogüvenlik kabini içerisinde temiz bir filtre kağıdına 1-2 damla tetrametil -p- fenilendiamin dihidroklorid (oksidaz ayırıcı) damlatıldı. Steril bir öze yardımıyla bakteri kolonisinden bir miktar bakteri alınarak oksidaz ayırıcı ile ıslatılmış kağıt üzerine sürüldü. Bir-iki dakika içinde sürülen kolonilerde mavi-mor renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

Üremiş bakteri kolonilerinden üre besiyerine (Oxoid, İngiltere) biyogüvenlik kabin içinde ekim yapılarak 37 °C'de %5 CO₂'li etüvde inkübasyona alındı. Saatler içinde üre besiyerinde kırmızı renk değişimi olması pozitif sonuç olarak kabul edildi.

Daha önceden elde edilen anti-*Brucella* antikorları pozitif hasta serumu oda ısısında 10-15 dakika bekletildi. Biyogüvenlik kabini içinde temiz bir lam üzerine bir-iki damla bu serumdan damlatıldı ve sonrasında *Brucella*-şüpheli bakteri kolonisinden steril bir öze yardımıyla bir miktar bakteri alınarak bu serum içinde süspansiyon edildi. Lam üzerinde bulunan süspansiyon dairesel hareketler ile karıştırıldı ve dakikalar içinde serumda çökelme (aglutinasyon) oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.3.3 Moleküler Metodlar

DNA İzolasyonu (Ekstraksiyon): Serum örneklerinden ve kültür plağında üreyen bakteri kolonilerinden DNA izolasyonu QIASymphony Otomatize DNA Ekstraksiyon Cihazında (Qiagen, Almanya) QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kiti kullanılarak yapıldı. Kullanılan bu kit, manyetik partikül teknolojisi ile nükleik asitlerin otomatik olarak izolasyonu ve saflaştırılmasını sağlamaktadır. Ekstraksiyon işlemi, dört adımdan oluşmaktadır: 1- lizis, 2- bağlanma, 3-yıkama ve 4- elüsyon.

Örneklerdeki bakteriyel DNA'nın ekstraksiyonu üretici firma önerileri doğrultusunda yapıldı. Kısaca; hasta numunesi veya kültür plağından steril SF içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonu 2 ml hacimli steril ve vida kapaklı polipropilen tüplere konuldu. Ekstraksiyon cihazının ilgili bölmelerine kit içeriğinden çıkan test reaktif kartuşu, delme kapağı, enzim askısı, Na-azit içeren 20 µl tampon, guanidin tuzları içeren 2 ml tampon ve taşıyıcı RNA gibi sarf malzemeleri yerleştirildi ve cihaza başla komutu verildi. Yaklaşık bir saatlik çalışma sonucunda izole edilmiş ve saflaştırılmış 60 µl bakteriyel DNA örneği elde edildi ve örnekler cihazın elüsyon çekmecesinden alınarak -20 °C'de saklandı.

Real-Time PCR: Hasta örneklerinde *Brucella spp.* DNA'sı bulunup bulunmadığı FTD Tropical Fever real-time multipleks PCR kiti (Fast Track Diagnostic, Lüksemburg) kullanılarak araştırıldı. Bu kit, DNA primerleri ve TaqMan prop teknolojisi kullanarak klinik örneklerde *Brucella spp.* DNA'sı saptamak için geliştirilmiş bir real-time multipleks PCR kiti olup firma tarafından bildirilen ölçüm hassasiyeti 10^3 - 10^9 KOB/ml'dir.

Klinik örneklerden yapılan ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen özütlenmiş DNA örnekleri, üretici firma önerileri doğrultusunda FTD-tampon, FTD-37 ve FTD-Enz reaktifleri ile karıştırılarak Rotor-Gene Q (Qiagen, Almanya) PCR termal döngü cihazında 35 siklus boyunca amplifiye edildi. Real-Time PCR işlemi basamakları; 94 °C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu, 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 60 °C'de 30 saniye ilk bağlanma, 72 °C'de 1 dakika ilk sentez ve 72 °C'de 10 dakika son sentez olarak ayarlandı.

Oluşan amplifikasyonlar, optik modül kuyucuklarından yayılan floresan sinyallerinin analiz algoritması kullanılarak PC tabanlı izleme ekranı üzerinde gözlemlendi. PCR ürünlerinin izlenmesi ve yüksek çözünürlükte ayrıştırılması için QIAxel DNA High

Resolution kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak pozitif ve negatif örnekler tespit edildi. Test için negatif ve pozitif kontroller kullanıldı.

Brucella melitensis Saptamak için PCR: Real-time PCR ile pozitif bulunan örnekler ve kültür izolatlarında *B. melitensis* DNA'sı saptamak için in-house PCR testi yapıldı. Bu amaçla *Brucella* genomu üzerinde bulunan 99 bp'lik *B. melitensis*'e özgü bölge çoğaltıldı. Bunun için Tablo 3.1'de gösterilen DNA primerleri Ella Biotech (Almanya) firmasına sentezlettilerilerek kullanıldı. Kısaca, ekstrakte edilmiş DNA molekülleri ile TopTaq DNA Polimeraz Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak PCR karışımı hazırlandı. Bu karışım içinde kısaca, 250 ünitelik TopTaq DNA Polimeraz enzimi (Qiagen, Almanya), 10 x TopTaq PCR tamponu (1.2 ml), MgCl₂ (1.2 ml), RNaz'dan arındırılmış steril su (3x1.9 ml) ve spesifik primerler koyularak SensoQuest Labcycler (SensoQuest, Almanya) termal döngü cihazında ürün amplifiye edildi. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 3.1: *Brucella melitensis* ayırımı için kullanılacak DNA primerleri.

Primerin Adı	Primer Dizilimi	Çoğaltılacak Bölgenin Büyüklüğü (bp)
UF1	F: 5'-GGCTATCGGCTGGGAAAGG-3'	99
UR1	R: 5'-CCTTCCGAAGAAAATACCCCT-3'	

Amplifikasyon işleminde kullanılacak karışım şunları içermektedir; 12.5 µl 10x TopTaq PCR Master mix karışımı, 2.5 µl CoralLoad, spesifik primerlerden 1 µl Forward ve 1 µl Reverse olmak üzere toplamda 2 µl, 6 µl RNaz'dan arındırılmış PCR grade su ve 2 µl DNA örneği.

Virülans Genleri için PCR: Real Time PCR ile pozitif saptanan örneklerde ve kültür izolatlarında *omp19*, *wbka*, *mana*, *mviN*, *ure* ve *perA* genleri olmak üzere toplam altı adet virülans geni in-house PCR yöntemi ile araştırıldı. Bunun için Tablo 3.2'de gösterilen DNA primerleri Ella Biotech (Almanya) firmasına sentezlettilerilerek kullanıldı. Kısaca, ekstrakte edilmiş DNA molekülleri ile TopTaq DNA Polimeraz Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak PCR miksi hazırlandı (250 ünitelik TopTaq DNA Polimeraz enzimi (Qiagen, Almanya), 10 x TopTaq PCR tamponu (1.2 ml), MgCl₂ (1.2 ml), RNaz'dan arındırılmış steril PCR suyu (3x1.9 ml), spesifik primerler) ve SensoQuest Labcycler (SensoQuest, Almanya) termal döngü cihazında ürün amplifiye edildi. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi.

Tablo 3.2: Virülans genlerinin saptanması için kullanılan spesifik primerler

Gen Adı	DNA Primer Dizilimi	Çoğaltılacak Bölgenin Büyüklüğü (bp)
omp19	F: 5'-TGATGGGAATTTCAAAAAGCA-3' R: 5'-GTTTCCGGGTCAGATCAGC-3'	550
wbkA	F: 5'-AATGACTTCCGCTGCCATAG-3' R: 5'-ATGAGCGAGGACATGAGCTT-3'	931
manA	F: 5'-TCGATCCAGAAACCCAGTTC-3' R: 5'-CATAACCACGATCCACTGC-3'	271
mviN	F: 5'-GCAGATCAACCTGCTCATCA-3' R: 5'-GGCCATAGATCGCCAGAATA-3'	344
ure	F: 5'-GCTTGCCCTTGAATTCCTTTGTGG-3' R: 5'-ATCTGCGAATTTGCCGACTCTAT-3'	1282
perA	F: 5'-GGAACGGTGGCACTACATCT-3' R: 5'-GGCTCTCTGTGTTCCGAGTT-3'	716

Amplifikasyon işleminde kullanılacak karışım şunları içermektedir; 12.5 µl 10x TopTaq PCR Master mix karışımı, 2.5 µl CoralLoad, spesifik primerlerden 1 µl Forward ve 1 µl Reverse olmak üzere toplamda 2 µl, 6 µl RNaz'dan arındırılmış PCR grade su ve 2 µl DNA örneği.

Elektroforez ve Görüntüleme: Elektroforez işlemi için 10 x Tris Boric Asit EDTA (TBE) solüsyonu, distile su ile sulandırılıp 1X oranında hazırlandı. Toplam 1.5 g agaroz tartılıp steril bir balon jöje içine konuldu ve üzerine 100 ml 1X TBE solüsyonu eklenerek karıştırıldı. Daha sonra mikrodalga fırın içinde bu karışım ısıtılarak agarın tam olarak erimesi sağlandı ve oda ısısında soğumaya bırakıldı. Agar eriyiği 45-50 °C'ye kadar soğuyunca içine 2 µl %1'lik etidyum bromür eklendi ve jel kalıbına eriyik dökülerek soğutuldu. Daha sonra DNA yükleme kuyucuklarını oluşturan taraklar çıkarıldı ve jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirildi. Kuyucuklara 10 µl PCR amplifikasyon ürünlerinden pipetle yükleme yapıldı ve 100 volt akımda 2.5 saat elektroforez işlemi uygulanarak oluşan amplifikasyon ürünleri yürütüldü. Yükleme sırasında 10 X CoralLoad boyası, DNA büyüklük markırı olarak da 100 bp'lik Biolabs DNA Ladder (Biolabs Inc, Almanya) kullanıldı.

Elektroforez işlemi sonunda yürütülen DNA bantları Kodak Gel Logic 2200 cihazında (Kodak Inc, ABD) UV ışık altında değerlendirildi. Pozitif ve negatif bantlar saptanarak test sonuçlandırıldı.

3.3.4 Veri Analizi

Elde edilen kalitatif veriler sayı ve oran olarak ifade edildi. Kullanılan PCR yönteminin brusellozu olan hastaları tanımlama performansının saptanması için

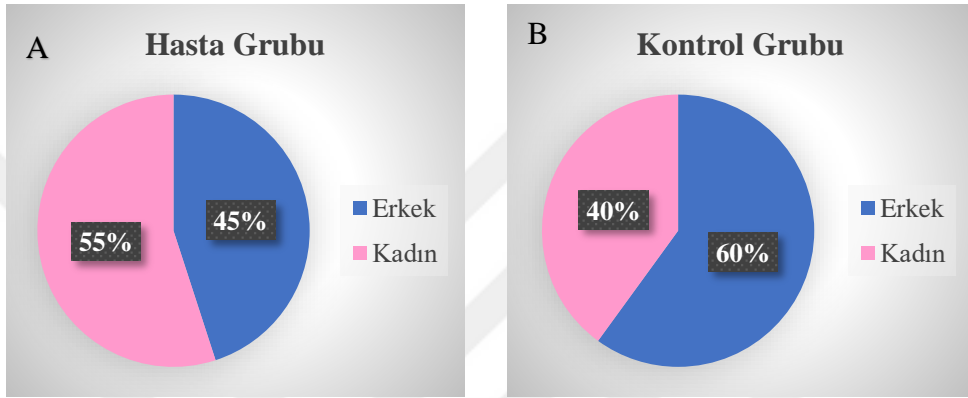
duyarlılık, özgüllük, Pozitif Prediktif Değer (PPD) ve Negatif Prediktif Değeri (NPD) hesaplandı.

Duyarlılık; hastalık olan ve PCR ile pozitif bulunmuş numune sayısının, hastalık olan numune sayısına bölünüp 100 ile çarpılması sonucu elde edilen değer olarak hesaplandı. Özgüllük; hastalık olmayan ve PCR testi ile negatif bulunmuş numune sayısının tüm hastalık olmayan numune sayısına bölünüp 100 ile çarpılması sonucu elde edilen değer olarak hesaplandı. Pozitif Prediktif Değer, hastalık olan ve PCR ile pozitif bulunmuş numune sayısının, PCR ile pozitif bulunmuş total numune sayısına bölünüp 100 ile çarpımı sonucu ortaya çıkan değer olarak; NPD ise hastalık olmayan ve PCR ile negatif bulunmuş numune sayısının PCR ile negatif bulunmuş toplam numune sayısına bölünerek 100 ile çarpılması sonucu elde edilen değer olarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1 Hastaların Demografik Özellikleri

Çalışmaya, 60 pozitif ve 60 negatif olmak üzere toplam 120 hasta dahil edildi. Hasta grubunun 27'si (%45) erkek ve 33'ü (%55) kadındı. Kontrol grubunun ise 36'sı (%60) erkek, 24'ü (%40) ise kadından oluştu. Çalışmaya alınan hastaların cinsiyet dağılımları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



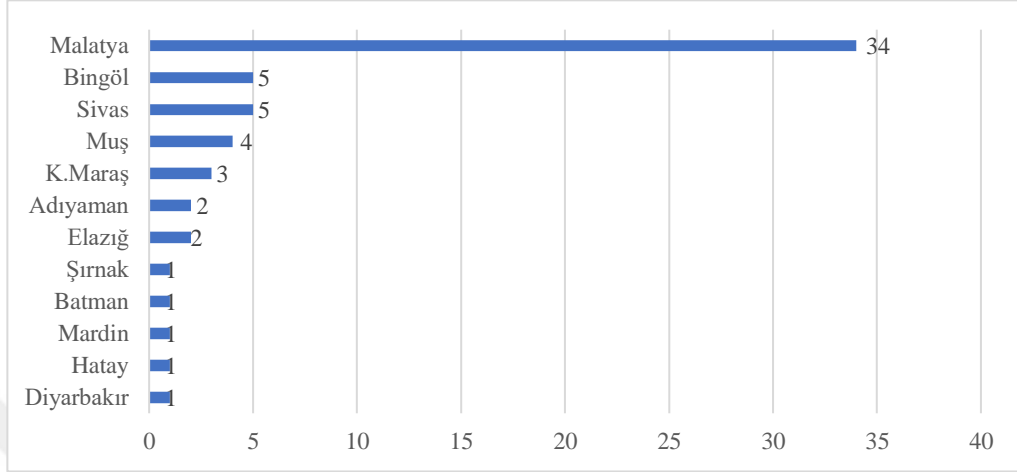
Şekil 4.1: Hasta (A) ve kontrol gruplarının (B) cinsiyet dağılımları.

Hastaların yaş özelliğine bakıldığında; pozitif grubun yaş ortalaması 39.3 yıl (3-77) ve negatif grubun yaş ortalaması 33 yıl (6-69) olarak bulundu. Çalışma grubunun yaş dağılımı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



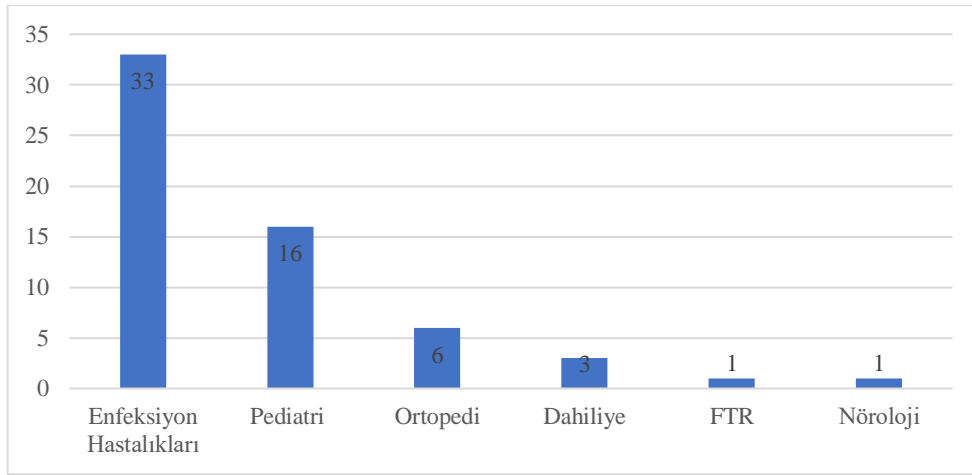
Şekil 4.2: Hasta grubunun yaş dağılımı.

Çalışmaya alınan 60 pozitif hastanın 34'ü (%56.6) Malatya ilinden geliyordu. Geri kalan 26 hasta ise 11 farklı şehirden hastanemize gelmişti. Bunlardan, Malatya ilinden sonra beşer hasta ile Bingöl ve Sivas illeri takip etti. Şekil 4.3'te hastaların geldiği illere göre dağılımları gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Çalışma grubunda bulunan 60 hastanın geldiği illere göre dağılımları.

Çalışmaya alınan 60 pozitif hastanın 33'ü (%55) enfeksiyon hastalıkları kliniğinden gelmişti. Geri kalan 27 hasta ise beş farklı klinikte bruselloz ön tanısı ile değerlendirilmekteydi. Enfeksiyon hastalıkları kliniğinden sonra en fazla hasta saptanan klinik ise 16 hasta ile çocuk hastalıkları kliniği ve altı hasta ile ortopedi kliniği oldu. Şekil 4.4'te hastaların geldikleri kliniklere göre dağılımları gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Çalışma grubunda bulunan 60 hastanın kliniklere göre dağılımı.

4.2 Kan Kültürü Sonuçları

Çalışma grubunu oluşturan 60 hastanın 31'inden kan kültürü istemi yapıldığı saptandı. Bu numunelerin yapılan kültür sonucunda sekiz (%25.8) hastanın kan kültüründe *Brucella spp.* üremesi görüldü. Üreme olan örneklerin tümü hasta grubunda bulunuyordu. Üreme olan örneklerin kan kültüründe pozitif sinyal verme süresi ortalama 5.07 gün (min:3, maks:8 gün) olarak hesaplandı.

4.3 Serolojik Test Sonuçları

Hasta grubunda bulunan 60 örneğin Rose-Bengal aglütinasyon testi pozitif, kontrol grubunda bulunan 60 hastanın Rose-Bengal aglütinasyon testi negatifti. Hasta grubunda bulunan örneklerin STA testleri 1/40 ila 1/2560 titreler arasında pozitif saptanırken Coombs'lu *Brucella* Jel testleri ise negatif ile 1/2560 arasında titre ile sonuçlandı. Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubunun serolojik test sonuçları Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan 60 hasta ve 60 kontrol grubunda elde edilen serolojik test sonuçlarının hasta sayısına göre dağılımları.

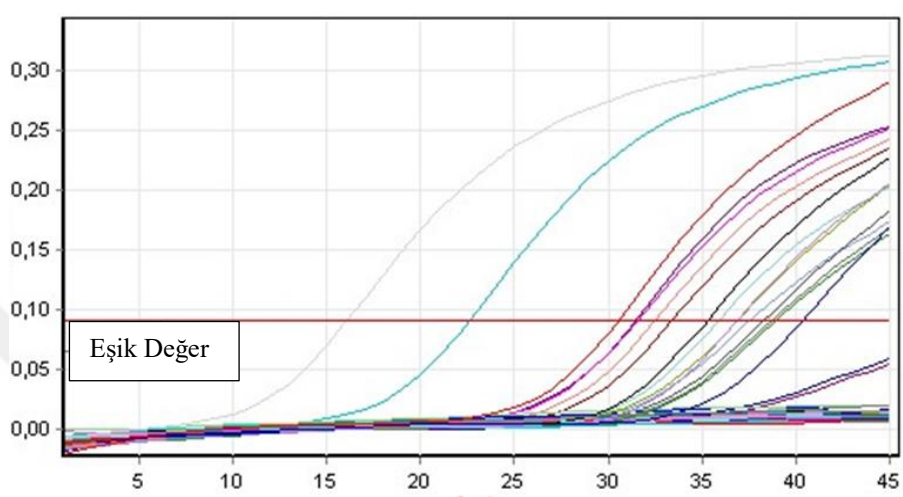
Grup	STA					Coombs'lu Aglütinasyon				
	(-)	1/40	1/80	1/160	≥1/320	(-)	1/40	1/80	1/160	≥1/320
Hasta grubu (n=60)	0	2	8	8	42	2	1	9	8	40
Kontrol grubu (n=60)	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Standart tüp aglütinasyon testinde akut hastalık göstergesi olarak 1/160 titre ve üstünü sağlayan toplam 50 (%83.3) numune bulunuyorken geri kalan 10 (%16.6) hasta numunesinin tüp aglütinasyon titreleri 1/40 ila 1/80 aralığında tespit edildi. Yapılan Coombs'lu *Brucella* Jel testinde ise STA'da pozitif bulunan iki hasta örneği negatif olarak sonuçlanmış, geri kalan hastalarda ise bir ila üç kat titre azalması saptanarak blokan antikorların varlığı düşünülmüştür.

Tüp aglütinasyon testleri ile 1/160 titre ve üstü değer elde edilen 50 hastanın yapılan incelemeler sonucunda 18'inin takipli ve tedavi altındaki hastalar olduğu, geri kalan 32'sinin ise akut hastalık veya relaps tanısı aldığı saptandı.

4.4 Real Time PCR Sonuçları

Çalışmaya alınan toplam 60 pozitif hastanın 19'unun (%31.6) kan örneklerinde real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptanırken kontrol grubunu oluşturan 60 hastanın kan örneğinin hiçbirinde pozitif sonuç alınmadı. Şekil 4.5'te real-time PCR testi sonuçları gösterilmiştir.



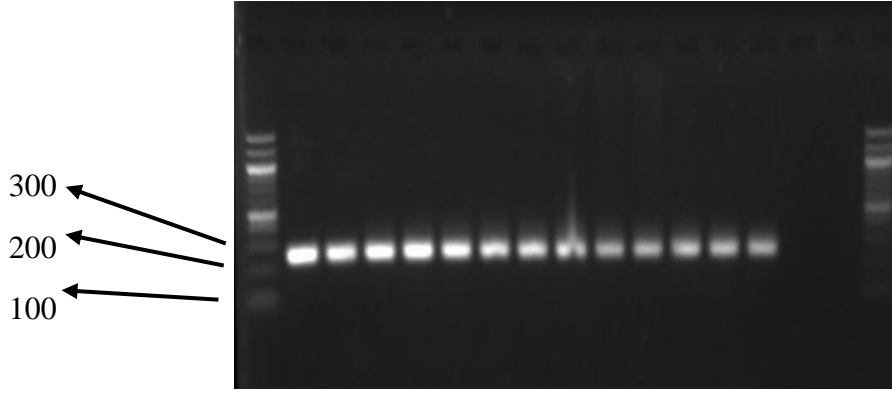
Şekil 4.5: *Brucella spp.* için yapılan real-time PCR sonuçları.

Hasta grubunda bulunan ve serolojik testler ile akut hastalık veya relaps tanısı alan 32 hastanın 19'unda (%59.3) real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptandı. Hasta grubundaki geri kalan 28 hastanın kan örneklerinde real-time PCR yöntemiyle *Brucella spp.* DNA'sı saptanmadı.

4.5 Tür Tayini ve Virülans Genleri

Brucella spp. DNA'sı saptanan 19 hastanın hepsinde yapılan PCR işlemi ile etkenin *B. melitensis* olduğu bulunurken bunun dışında başka bir tür saptanmadı.

Virülans genleri için yapılan PCR işlemi sonucunda PCR-pozitif tüm hastalarda çalışılan *omp19*, *wbkA*, *manA*, *mviN*, *ure* ve *perA* genlerinin hepsi pozitif olarak sonuçlandı. Şekil 4.6'da virülans genleri için yapılan PCR testinin agaroz jel elektroforez görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 4.6: *Brucella spp.* için bir virülans geni olan *manA*'ya ait 297 bazlık DNA bandının saptandığı PCR agaroz jel elektroforezi görüntüsü

4.6 PCR Yönteminin Tanı Etkinliği

Serolojik testler ile bruselloz tanısı alan hastalarda PCR yönteminin hasta grubunda bulunan 60 hasta için saptama duyarlılığı %31.6; 1/160 ve üstü aglütinasyon titresi saptanan 50 hastayı saptama duyarlılığı %38 ve tedavi altında ve takipli hastalar dışlandıktan sonra akut hastalık veya relaps olarak tanı konulmuş 32 hasta için tanı duyarlılığı %59.3 olarak hesaplandı. PCR yönteminin özgüllüğü ise %100 olarak bulundu.

PCR yönteminin Pozitif Prediktif Değeri % 100 olarak bulunurken 60 kişilik hasta grubu için saptanan Negatif Prediktif Değeri %59.4; 1/160 ve üstü aglütinasyon titresi saptanan 50 hasta için NPD'i %69.3 ve akut hastalık veya relaps olarak tanı konulmuş 32 hasta için NPD'i %87.1 olarak bulundu. PCR yöntemi için hesaplanan tanı performans değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: PCR ile saptanan tanı performans değerleri

Test Performans Parametreleri	Hasta Grubu (n=60)	≥1/160 Olan Hastalar (n=50)	≥1/160 ve Akut Hasta Tanısı Alanlar (n=32)
Duyarlılık (%)	31.6	38	59.3
Özgüllük (%)	100	100	100
PPD* (%)	100	100	100
NPD** (%)	59.4	69.3	87.1

*PPD: Pozitif prediktif değer

**NPD: Negatif prediktif değer

5. TARTIŞMA

Bruselloz, tanısı zor yapılan enfeksiyonlardan biri olma özelliğini halen devam ettirmektedir. Hastalığın neden olduğu tanısız sorunlar klinik değerlendirme aşamasından itibaren başlar. Brusellozun en sık semptomlarının ateş, terleme, kas ve eklem ağrısı gibi genel bulgular olması, hastalığın kendine özgü bir semptomunun bulunmaması, tutulum yerlerine göre farklı klinik tablolara yol açması, sinsi bir başlangıç göstermesi ve inkübasyon döneminin değişkenliği gibi özellikler klinik tanıda karşılaşılan sorunların temel nedenleridir (22).

Brusellozun laboratuvar tanısında da halen önemli sorunlar mevcuttur. Yapılan ilk seçenek tetkiklerden kan sayımında beyaz küre sayısında orta düzeyde artış ve lenfosit hakimiyeti geçici bir viral enfeksiyonu akla getirirken, kan biyokimyasında hafif veya orta düzeyde artış gösteren karaciğer enzimleri olası bir mikrobiyal veya ilaca bağlı hepatit tablosu hakkında şüphe oluşmasına neden olmaktadır. Diğer taraftan, ilk seçenek görüntüleme yöntemlerinden direkt grafilerde hastalığa bağlı doku ve organ tutulumları etkili bir şekilde saptanamamaktadır. Dolayısı ile brusellozdan klinik olarak şüphelenilmesi ve doğru tanıya yardımcı olacak testlerin etkili bir şekilde kullanılması önemli düzeyde bilgi, deneyim ve ileri test olanakları gerektirmektedir (22, 51).

Brusellozun laboratuvar tanısında; kültür ve serolojik testler bulunmakta olup son yıllarda hızla gelişmekte olan nükleik asit amplifikasyon metodu esaslı tanı yöntemleri tanıda gittikçe yerini almaya başlamıştır. Kan, kemik iliği aspiratı, BOS ve diğer vücut sıvılarından yapılan kültür tetkikleri ile etkenin izole edilmesi bruselloz için kesin tanı anlamı taşır (79). Bunlar arasında kan kültürü; uygulama kolaylığı ve olası başka etkenleri de ortaya koyması nedeniyle en fazla kullanılan yöntem olmuştur. Ancak, hastanın bakteriyemik olmadığı bir dönemde numune alınması, etkenin çoğunlukla hücre içi yerleşimi ve bakterinin yavaş üreme hızı nedeniyle kan kültürü hastaların çok az bir kısmında pozitif sonuçlanmaktadır. Bu nedenle hastalardan kemikiliği aspirasyon kültürlerinin yapılması önerilmekte ise de klinik örneğin alınımının hasta açısından oldukça zor bir invaziv girişim gerektirmesi nedeniyle kullanımını oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, rutin klinik tanıda hasta kanında *Brucella spp.*'ye karşı gelişen antikorların saptandığı indirekt tanı metotlarından serolojik testler en fazla kullanılagelen yöntemler olmuştur. Ancak bu testlerin, en az bir gün gerektirmesi, hastanın serumunda bulunan antikorların

özelliği ve düzeyi ve kullanıcı hataları nedeniyle sık yanlış negatif olarak sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile brusellozun laboratuvar tanısında standardize edilmiş, hızlı sonuç verebilen, yüksek duyarlık ve özgüllükle çalışan yeni test metotlarına gereksinim devam etmektedir (79). Bu açıdan, bir nükleik asit amplifikasyon metodu esaslı tanı yöntemi olan PCR'ın kullanımını gittikçe artmış ve gelecek adına ümit vadeden bir yöntem olma özelliği kazanmıştır. Ancak, PCR'ın bruselloz tanısındaki etkinliği hakkında hem sınırlı sayıda çalışma bulunmakta ve hem de yapılan çalışmalarda oldukça değişken aralıklarda tanısal performans değerleri bildirilmektedir. Dolayısı ile brusellozun endemik olarak bulunduğu bölgemizde PCR yönteminin tanı etkinliğinin saptanması, patojenin tür ayrımının yapılması ve taşıdığı altı önemli virülans geninin varlığının araştırılması hem klinik tanı yöntemlerinin yeniden gözden geçirilmesi ve mevcut bilimsel bilgiye katkı yapma potansiyeli nedeniyle önemlidir.

Bu çalışmaya, serolojik yöntemlerle brucella antikoru saptanmış 60 hasta alınmış ve negatif olan 60 hasta numunesi ise kontrol grubu olarak katılmıştır. Çalışmaya alınan numunelerin 63'ü erkek ve geri kalan 57'si kadın hastalardan geliyordu. Çalışma grubunun yaş aralığına bakıldığında en fazla klinik örneğin 27 örnekle 40-69 yaş aralığından daha sonra da 20 örnekle 19 yaş ve altı hastalardan geldiği görüldü.

Bruselloz, gelişmiş ülkelerde çocuk yaş grubunda daha az görülmektedir. Ancak ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelerde her yaşta görülebildiği bildirilmektedir. Ayrıca, hastalığa maruz kalma oranı açısından erkek ve kadın cinsiyet arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır (80). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, Kuyumcu'nun 2017 yılında İstanbul Haydarpaşa Numune Hastanesinde yaptığı çalışmada, brusellozun tanısında serolojik testlerin etkinliği birbirleri ile karşılaştırılmış ve çalışma için 42 bruselloz şüpheli hastayı değerlendirmeye almıştır. Bu hastaların %51.8'i erkek, %48.2'si kadın olarak bildirilmiştir (81). Parlak'ın 2011 yılında Van bölgesindeki *Brucella* türlerinin identifikasyonu ve antibiyogram duyarlılıklarının belirlenmesi için yaptığı çalışmada elde edilen 75 *Brucella spp.* suşunun ürettiği hastaların %58.6'sı kadın, %41.4'ü erkek olarak bildirilmiştir (82). Lari ve arkadaşlarının 2011 yılında İran'da bruselloz teşhisinde PCR ve Elisa etkinliklerinin karşılaştırılması için 100 hasta ile yaptıkları çalışmada, hastaların %59'u kadın, %41'i erkek olarak bulunmuştur (83). Çam'ın 2011 yılında Gaziantep ilinde yaptığı çalışmada, bruselloz tanısında PCR etkinliği serolojik testler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmadaki bruselloz tanısı alan 56 hastanın yaş ortalaması 39.9 yıl; Çeken ve arkadaşlarının Ankara'da yaptıkları çalışmada akut bruselloz tanısı almış 35 hastanın yaş ortalaması 42.1 yıl olarak bildirilmiştir (84,

85). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda hasta grubunun %45 erkek ve %55 kadından oluşması ve yaş ortalaması olarak da 39.3 yıl olması daha önce yapılmış bu çalışmalarda bildirilen değerlere benzer olarak bulunmuştur.

Kan, kemik iliği ve vücut sıvıları gibi klinik örneklerin kültürleri brusellozun laboratuvar tanısında yardımcı olabilen klinik örneklerdir. Bakteriyolojik boyalar kullanılarak klinik örneklerin mikroskopik incelenmesi önemli olsa da etkenin hücre içi yerleşim göstermesi ve çok küçük boyutlarda olması, bakterinin mikroskopik incelemede gözden kaçma riskini arttırmaktadır (86).

Hasta da klinik olarak bruselloz belirtileri veya bulguları olsa da, hastalığın kesin tanısı etkenin kültürde üretilmesiyle konulmaktadır. Bu nedenle kültür, bruselloz tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, kültüre alınan klinik örneğin türü ve miktarı, etkenin türü ve yavaş üreme hızı, hastalığın evresi, hastanın şikayetleri nedeni ile daha önceden antibiyotik kullanması gibi nedenler etkenin kültürde izolasyon oranını etkileyen faktörlerdir. Özellikle kronik vakalarda kültürden etkeni izole etme şansı önemli ölçüde azalmaktadır (51, 87).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Kuyumcu'nun 2017 yılında İstanbul Haydarpaşa Numune Hastanesinde yaptığı tez çalışmasında, bruselloz tanısında serolojik testlerin etkinliği karşılaştırılmış ve bruselloz tanısı alan 12 hastadan dördünün (%33) kan kültürü pozitif saptanmıştır (81). Çalık ve Gökengin'in yaptığı ve 1990-2009 tarihleri arasında Türkiye'de yapılan bruselloz çalışmalarının incelendiği derlemede 4209 hastanın 1019'unun kan kültürü pozitif bulunmuş ve kan kültürünün hastaların ancak %24'ünü saptadığı bildirilmiştir (88). Çeken ve arkadaşlarının akut bruselloz tanısında PCR testinin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarında 35 hastanın 16'sında (%45) kan kültürü pozitif saptanmıştır (85).

Bruselloz tanısında kemik iliği kültür yönteminin duyarlılığı kan kültürüne oranla daha yüksektir. Dizer ve arkadaşlarının 2000-2003 yılları arasında Ankara'da yaptıkları bruselloz tanı yöntemlerinin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada 32 hastanın dokuzunda (%28.1) kemik iliği kültürü pozitif, altısında (%18.7) kan kültürü pozitif saptanmıştır (89). Demir ve arkadaşlarının Van Yüzüncü Yıl Üniversitesinde bruselloz tanısı alan 48 hastanın prospektif olarak incelendiği çalışmasında *Brucella melitensis*, 11 hastada (%23) kan kültüründen, 25 hastada (%52) kemik iliği kültüründen izole edilmiştir (90). Özkurt ve arkadaşlarının Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptıkları *Brucella melitensis*'in otomatize sistemler ile tespit edilmesi çalışmasında 50 hastanın 35'inde (%70) kemik iliği pozitif, 24'ünde (%48) kan kültürü pozitif bulunmuştur (91). Gotuzzo

ve arkadaşlarının bruselloz tanısında kemik iliği kültürünün etkinliğinin incelendiği çalışmada 50 hastanın 35'inin (%70) kan kültürü pozitif, 46'sının (%92) kemik iliği kültürü pozitif saptanmıştır (92). Yaptığımız bu çalışmada ise kan kültürü istemi yapılan 31 hastanın sekizinde (%25.8) test pozitif sonuçlanmıştır. Elde edilen bu değer yukarıda belirtilen veriler ile uyumluluk göstermiştir.

Kan kültürü yönteminin duyarlılığının düşük olması ve etkeni saptamak için geçen sürenin uzun olması nedeniyle brusellozun laboratuvar tanısında serolojik testler önemli bir yer tutmakta ve rutin tanıda çok daha fazla kullanılmaktadır (93).

Rose-Bengal testi, yüksek duyarlılığa sahip olması, yaklaşık dört dakika gibi hızlı bir sürede sonuç vermesi, kullanım kolaylığı ve düşük maliyete sahip olması nedeni ile bruselloz tanısında kullanılan hızlı bir serolojik tarama testidir (65). Bu test, yüksek duyarlılığa sahip olsa da özellikle endemik bölgelerde düşük özgüllük göstermektedir. Martin Moreno ve arkadaşlarının 1992 yılında İspanya'da 171 hasta grubu ile yaptığı çalışmada Rose-Bengal testinin duyarlılığı %95, özgüllüğü ise %75 bulunmuştur (94). Araj ve arkadaşlarının Kuveyt'te 573 serum örneği ile yaptığı çalışmada akut bruselloz teşhisi alan 159 hastanın tamamında Rose-Bengal testi pozitif sonuç vermesine rağmen, kronik bruselloz teşhisi alan 23 hastanın %61'inde pozitif sonuç vermiştir (95). Sonuç olarak; kullanım kolaylığı, hızlı bir tarama testi olması, maliyetinin düşük olması ve özellikle akut bruselloz hastalarının tanısında göreceli olarak daha iyi sonuçlar vermesi Rose-Bengal testinin avantajları olarak görülse de, özellikle kronik vakalarda yanlış negatif sonuçlar vermesi testin dezavantajlarından biridir (51).

Brusellozun serolojik tanısında en fazla kullanılan testlerden birisi STA testidir. Isı veya fenolle öldürülmüş *B. abortus* antijenlerinin kullanıldığı bu testte aglütinasyon oluşumu hasta serumunda etkene yönelik antikor varlığına işaret eder. Bu testte, 1/160 ve üzeri titreler aktif enfeksiyonu gösterse de özellikle endemik bölgelerde geçirilmiş enfeksiyon olasılığı da göz önüne alınıp hastanın klinik bulguları da birlikte değerlendirilmesi gerektiği önerilmektedir (68). Tansel ve arkadaşlarının Trakya Bölgesinde 1994-2001 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada, bruselloz tanısı alan 40 hastanın klinik ve laboratuvar bulguları incelenmiş, STA testi ile 35 hasta pozitif bulunmuş ve testin duyarlılığı %87.5 olarak saptanmıştır (96). Demirdağ ve arkadaşlarının çalışmasında, Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları servisine 1995-2001 tarihleri arasında yatan ve bruselloz tanısı alan 146 hastanın klinik ve laboratuvar bulguları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Toplam

139 hastanın STA testi 1/160 titre ve üzeri tespit edilerek pozitif bulunmuş ve testin duyarlılığı %95.2 olarak bildirilmiştir (97). Kara ve arkadaşlarının, 2009-2014 tarihleri arasında Erzurum Bölge Eğitim ve Araştırma hastanesinde bruselloz tanısı alan 94 çocuk hastanın klinik ve laboratuvar bulgularının retrospektif olarak incelendiği çalışmada STA testinin duyarlılığı %88.2 olarak bulunmuştur (98). Dal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Kars, Erzurum ve Erzincan ilinde yaşayan bruselloz şüpheli 249 hastanın tanısında PCR ve serolojik testlerin etkinliği karşılaştırılmıştır. Standart tüp aglütinasyon testi çalışmasına alınan 153 hastanın 88'i pozitif tespit edilmiş ve STA testinin duyarlılığı %57.5 olarak bulunmuştur (99).

Standart tüp aglütinasyon testi çok sık kullanılan bir yöntem olmasına rağmen; IgA yapısındaki blokan antikorlarının varlığı bruselloz tanısını güçleştirmektedir. Blokan antikorlar nedeni ile STA testi göz ardı edilmeyecek oranda yanlış negatif sonuçlar verebilmektedir. Turan'ın 2017 yılında yaptığı çalışmada coombs testinin bruselloz tanısındaki önemi araştırılmış ve çalışmadaki 100 hastadan STA testi negatif olan 89 hastanın 43'ünde (%51) coombs testi pozitif bulunmuştur (27). Ayrıca; STA testinde yaşanan olumsuz durumlardan bir diğeri de antikorun veya antijenin diğerinden fazla olmasından dolayı gerçekleşen prozon ve postzon olaylarıdır. Bunun yanında çeşitli Gram negatif bakteriler ile çapraz reaksiyon vermesinden dolayı yalancı pozitiflik oluşabilmesi önemli tanısal sorunlar oluşturur (68). Özellikle blokan antikorlarının varlığı nedeniyle STA testinin doğrulanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bunun için coombs anti-*Brucella* veya immünocapture aglütinasyon testleri gibi serolojik testler kullanıma sunulmuştur (100).

Mantur ve arkadaşlarının Hindistan'da yaptığı bir çalışmada bruselloz tanısında immünocapture testi diğer serolojik testler ile karşılaştırılmış ve çalışmaya bruselloz şüpheli 211 hasta dahil edilmiştir. Bu hastaların 21'i (%9.9) STA pozitif, 69'u (%32.7) coombs pozitif ve 76'sı (%36) immünocapture pozitif olarak tespit edilmiştir (101). Hancı ve arkadaşlarının 2017 yılında *Brucella* coombs jel testinin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada, bruselloz belirtileri olan 43 hastadan ve sağlıklı 45 kişiden serum örnekleri çalışmaya alınmıştır. Çalışmada brusella coombs jel testi, STA testi ile karşılaştırılmış ve coombs jel testinin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur (102). Kalem ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada, Konya Numune Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve bruselloz tanısı alan 78 hasta prospektif olarak

incelenmiştir. Çalışmada coombs jel testinin duyarlılığı %100, immünocapture testinin duyarlılığı %100 ve STA testinin duyarlılığı ise %71.4 olarak bulunmuştur (103).

Bruselloz, hastalığın başlangıç süresine göre akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır. Klinik belirtilerin sekiz haftadan daha kısa olması akut, 8-52 hafta arasında olması subakut ve 52 haftadan daha uzun süre olması durumunda kronik brusellozdan bahsedilir (44). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda ülkemizde akut bruselloz olgularının çok daha fazla olduğu gösterilmiştir. Uluğ M ve Uluğ NC'nin Eskişehir'de 78 bruselloz olgusunun klinik olarak incelendiği çalışmasında, hastaların %79'u akut, %16'sı subakut ve %5'i ise kronik olduğu bildirilmiştir (104). Kökoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 2000-2002 yılları arasında Türkiye'deki iki üniversite hastanesindeki bruselloz olgularının klinik ve laboratuvar özellikleri incelenmiş ve hastaların %57.2'si akut, %26.1'i kronik ve %16.7'si subakut olarak saptanmıştır (105). Güler ve arkadaşlarının Kahramanmaraş ilinde yaptıkları çalışmada, 370 bruselloz hastası retrospektif olarak incelenmiş, hastaların 261'i (%70.5) akut, 73'ü (%19.7) subakut ve 36'sı (%9.7) kronik bruselloz olarak tanımlanmıştır (106). Yaptığımız bu çalışmada ise çalışma grubunda bulunan 60 hastanın Rose-Bengal, STA ve Coombslu tüp aglütinasyon testleri sonuçları ve epikriz bilgilerine göre 10'u geçirilmiş enfeksiyon (<1/160), 18'i takipli ve tedavi altındaki hasta ve geri kalan 32 hasta ise akut enfeksiyon olarak tanımlanmıştır.

Kan kültüründen sonuç almanın uzun sürmesi ve duyarlılığının düşük olması, serolojik testlerde yaşanan çapraz reaksiyonlar, yalancı negatiflik, hastalığın tedavisinden sonra da kanda antikor varlığının olması, postzon ve prozon olaylarının gerçekleşme olasılığı gibi olumsuz durumlar nedeniyle son yıllarda bruselloz tanısında PCR gibi moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (66, 68, 107).

Bir nükleik asit amplifikasyon testi olan PCR, hasta numunesinde bulunan etkenin DNA'sını yaklaşık dört saatte yakalayabilen, etkenin tür ayrımını yapabilen ve etkenin DNA'sı üzerinde taşınan virülans genelerini gösterebilen bir moleküler analiz yöntemidir. Bu çalışmada üç aşamada PCR metodu kullanılmış olup bunlar; 1- *Brucella spp.* DNA'sının hasta serumunda bulunup-bulunmadığının saptanması, 2- PCR ile pozitif olarak saptanan numunelerde etkenin hangi tür olduğunun belirlenmesi ve 3- pozitif örneklerde altı adet virülans geninin varlığının araştırılmasıdır.

PCR testi, Kary Mullis tarafından ilk kez 1983 yılında tanımlanmıştır. Yöntem, etkene özgü DNA bölgelerinin in vitro ortamda çoğaltılarak görüntülenmesi esasına dayanır (20). Bruselloz tanısında PCR testinin ilk kullanılması 1990 yılında Fekete ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (53). Daha sonraki yıllarda, bruselloz tanısında kullanılan PCR yönteminin geliştirilmesine yönelik birçok farklı çalışma yapılmıştır. Baily ve arkadaşları, *B. abortus* ile *B. melitensis*'in ayırt edilmesi için *bcbp31*'i kodlayan geni çoğaltmış (54); Bricker ve Halling ise 1994 yılında *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* ve *Brucella suis*'i tespit edebilen AMOS PCR yöntemini geliştirmişlerdir (108). Redkar ve arkadaşlarının 2001 yılında IS711 gen bölgesini hedeflemiş, real-time PCR yöntemi ile daha önceki yöntemlere göre 30 dakika daha kısa bir sürede sonuç alınmıştır (56). Queipo-Ortuno ve arkadaşları 2005 yılında SYBR Green-I ve LightCycler tabanlı gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirmiş, bu yöntemde *bcbp31* gen bölgesi hedef seçilmiş ve testin duyarlılığı %91.9, özgüllüğü ise %95.4 olarak bulunmuştur (109). Mitka ve arkadaşları 2007 yılında *bcbp31*, *omp2*, *omp28* ve *bp26* gen bölgelerinin hedef alan primerlerin kullanıldığı dört farklı PCR testi üzerinde çalışmışlardır. Çalışma sonucunda PCR testinin akut bruselloz tanısında, tedavi sonrası ve relapsların takibinde yararlı bir yöntem olacağı belirtilmiştir (59). Scott ve arkadaşları, 2007 yılında türler arasında veya türlerin kendi içlerinde tekli nükleotid farklılıklarını tanımlayabilen tek nükleotid polimorfizimi (SNP) yöntemini uygulamışlardır. Bu yöntemin, tüm tür ve biyovaryantları tanımlayamayan AMOS PCR gibi mevcut ve iyi bilinen yöntemlerin aksine daha fazla tür ve biyovaryant tanımlamak için potansiyel taşıdığı altı çizilmiştir (60). Lopez-Goni ve arkadaşları, 2008 yılında farklı coğrafi bölgelerden gelen 625 *Brucella* suşunu tanımlamak için Bruce-Ladder multiplex PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışma sonucunda Bruce-Ladder PCR yönteminin *Brucella* suşlarının hızlı tanımlanması için yararlı bir yöntem olacağı gösterilmiştir (110). Winchell ve arkadaşları 2010 yılında *Brucella* türlerini tanımlamak için yüksek çözünürlüklü erime eğrisi analizini kullanarak gerçek zamanlı bir PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmada yedi farklı primer kullanılmış ve test edilen 153 brusella suşunun tamamı saptanmıştır (62). Koylass ve arkadaşları 2010 yılında SNP ve Bruce-Ladder yöntemini karşılaştırmış; 24 *B. canis* izolatının test edildiği yöntemde SNP tüm izolatları doğru tanımlarken Bruce-Ladder yöntemi 11 izolatı yanlışlıkla *B. suis* olarak tanımlamıştır. Çalışma sonucunda, SNP bazlı yöntemin *B. suis* ve *B. canis* türlerinin ayırt etmede daha güvenilir olduğu bildirilmiştir (61).

Uluslararası literatürde bruselloz tanısında PCR testinin etkinliğini gösteren bazı çalışmalar olsa da ülkemizden belli başlı beş çalışma olduğu dikkat çekicidir. Çırak ve arkadaşının 2002 yılında Ankara Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptığı çalışmada, 29 akut bruselloz tanılı hastaya ait kan örneklerinde ve kan kültürleri negatif ancak STA titresi 1/80 olan 10 hastaya ait örneklerde PCR etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada iki farklı gen bölgesini hedef alan primerler kullanılmıştır. Çalışma sonucunda *IS6501* gen bölgesini hedef alan PCR testinin duyarlılığı %51.7, 31 kDA'luk *B. abortus* antijenini kodlayan 223 baz çiftlik gen bölgesini hedef alan PCR testinin duyarlılığı %48.3 olarak bulunmuştur. PCR testinin bruselloz tanısında geleneksel yöntemlere kıyasla iyi bir alternatif olacağı sonucuna varılmıştır (111). Sürücüoğlu ve arkadaşlarının 2009 yılında Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesinde yaptıkları çalışmada, farklı klinik bruselloz formlarına sahip hastalarda TaqMan real-time PCR yönteminin etkinliği araştırılmış ve çalışmaya 50 hasta serumu dahil edilmiştir. Daha önce bruselloz tanısı almayan ya da *Brucella spp.*'ye maruz kalma öyküsü olmayan 30 kişi negatif hasta grubunu oluşturmuştur. Çalışmada kan kültürü duyarlılığı %36, STA testi duyarlılığı %98 bulunmuştur. PCR testinin duyarlılığı %88, özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada, PCR testinin PPD değeri %100, NPD değeri ise %83 olarak belirlenmiştir (112). Çeken ve arkadaşlarının Ankara ilinde yaptıkları çalışmada, akut bruselloz tanısında PCR yönteminin etkinliği araştırılmıştır. Çalışma grubu akut bruselloz olduğu düşünülen 35 hastadan oluşturulmuş ve PCR testinde bu hastalara ait lökositler ayrıştırılarak kullanılmıştır. Çalışmada, PCR testinde 31 kDA'luk *B. abortus* antijenini kodlayan 223 baz çiftlik gen bölgesini çoğaltmak için B4 ve B5 primerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda PCR testinin duyarlılığı %97, özgüllüğü ise %100 olarak bulunmuştur (85). Dal ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmada, Kars, Erzurum ve Erzincan illerinde hastanelere başvuran bruselloz şüpheli 249 hastaya ait serum örneklerinde serolojik testler, kültür ve multipleks real time PCR yöntemlerinin etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada, *bcs31* genini çoğaltmak için uygun primerler ve proplar kullanılmış; PCR testinin duyarlılığı, immünocapture testine göre %70.2, Coombs testine göre %83, STA testine göre %77.3, kan kültürüne göre %97.2 olarak tespit edilmiştir (99). Dizer ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınlanan çalışmalarında, bruselloz tanı yöntemlerinin etkinliği araştırılmış, 2000-2003 yılları arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğine başvuran ve hastanede yatıp bruselloz tanısı alan 32 hasta çalışma grubunu oluşturmuştur. Kontrol grubu ise sağlıklı 30 gönüllü kişiden oluşmuştur. Çalışmada, PCR testi 32 hastanın üçünde (%9) pozitif

bulunmuştur. Çalışma sonucunda PCR testinde serum yerine kan mononükleer hücrelerin ve BOS, eklem sıvıları, doku örneklerinin kullanılmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır (89).

Uluslararası literatürde bruselloz tanısında PCR'in etkinliğinin gösterildiği az sayıda çalışma olmakla birlikte testin etkinliğinin çok daha yüksek saptandığı sonuçlar bulunmaktadır. Elfaki ve arkadaşlarının bruselloz hastalarına ait serum örneklerinde etken DNA'sının saptanmasına yönelik PCR testinin kullanılması ile ilgili 2005 yılında Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada bruselloz semptomları olan 25 hasta değerlendirmeye alınmıştır. STA testinin duyarlılığı %84, PCR testinin duyarlılığı ise %96 olarak bulunmuştur (113). Colmenero ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada ise İspanya'da 1998-2002 tarihleri arasında nörobruselloz tanısı alan 6 hastada SYBR Green I tabanlı real-time PCR testinin etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan PCR için *B. abortus*'a özgü 31 kDA'luk membran proteinini kodlayan gen bölgesini çoğaltılmış, STA testinin duyarlılığı %66.6, kültür duyarlılığı %33.3, PCR testinin duyarlılığı ise %100 olarak bulunmuştur (114). Mitka ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, akut bruselloz ve relapslarda PCR testi diğer konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılmıştır. Çalışma için 1998-2004 tarihleri arasında Yunanistan'da bruselloz teşhisi konan 200 hastadan toplam 4926 örnek toplanmıştır. Bunların 1642'si periferik tam kan örneği, 1642'si buffy coat ve 1642'si de serum örnekleri olup PCR testi için dört farklı primer kullanılmıştır. Bu çalışmada PCR testinin duyarlılığı tam kan, buffy coat ve serum örneklerinde sırasıyla %95.5 ile %100, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %93.5 ile %100 arasında bulunmuştur (59). Baddour ve Alkhalifa'nın yaptığı çalışmada, insanda periferik kanda *Brucella spp.* DNA'sının tespiti için üç farklı PCR tekniği kullanılmıştır. PCR testinin özgüllüğü üç testte de %100 olarak bulunmuş, duyarlılıkları ise sırası ile %53.1, %88.4 ve %98 olarak tespit edilmiştir (115). Al-Ajlan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Suudi Arabistan'da insanlara ait kan örneklerinde *Brucella spp.* tespiti için dört farklı PCR yöntemi kullanılmış, 160 hasta çalışma grubunu oluştururken, herhangi klinik bir belirtisi veya bruselloz geçmişi olmayan 40 kişi de negatif hasta grubunu oluşturmuştur. Çalışmada dört farklı gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılarak 160 hastanın 89'u pozitif olarak bulunmuştur. Konvansiyonel PCR testinin duyarlılığı kan kültürüne göre %100, serum örneklerinde %54; real-time PCR testinin duyarlılığı kan kültürüne göre %100, serum örneklerinde %60 olarak bulunmuştur. Her iki testin özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir (116). Asaad ve

Alqahtani'nin 2012 yılında yayınlanan çalışmasında brusellozun serolojik ve moleküler tanısı araştırılmıştır. 2010-2011 tarihleri arasında Suudi Arabistan'ın güneybatısındaki Najran kentindeki bir hastaneye başvuran ve klinik belirtileri nedeniyle bruselloz şüphesi olan 340 hasta değerlendirmeye alınmış ve 54 hastada bruselloz tanısı doğrulanmıştır. Bu 54 hastada STA testinin duyarlılığı %92.6, ELISA testinin duyarlılığı %85.2, PCR testinin duyarlılığı %70.4, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD %94.7 olarak bulunmuştur (117). Sohrabi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insan brusellozunda etkin tanı ve tedavi takibinde TaqMan kantitatif real-time PCR testinin etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada, etkene ait 31 kDa'luk membran proteinini kodlayan *bcs31* genini çoğaltmak için uygun primerler kullanılmış, 37 hasta pozitif, 25 hasta negatif bulunmuştur. Bu çalışmada PCR testinin duyarlılığı pozitif hastalarda %100 iken bruselloz şüphesi olan 25 hasta da ise %72 olarak saptanmış ve testin özgüllüğü ise %100 olarak bildirilmiştir (118). Li ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada, 2013-2017 tarihleri arasında Çin'in başkenti Pekin'de bir hastanede bruselloz spondilit tanısı alan 31 hastaya ait doku örneklerinde real-time PCR testinin tanı etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada STA testinin duyarlılığı %80.6, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %76.9 olarak bulunmuştur. Real-Time PCR testinin duyarlılığı ise %93.5, özgüllüğü %100, PPD %100, NPD ise %90.9 olarak saptanmıştır (119).

Yaptığımız bu çalışmada ise geçirilmiş enfeksiyon ve takipli hastalar çıkarıldıktan sonra geri kalan 32 hastanın 19'unun (%59.2) serum örneklerinde real-time PCR yöntemi ile etkenin DNA'sı saptanmıştır. Kullanılan PCR testinin özgüllüğü ve PPD'i %100; NPD'i ise %87.1 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar yukarıda ülkemizden bildirilen veriler ile uyumlu bulunmuş ancak saptadığımız duyarlılık düzeyi uluslararası literatür bilgilerine yakın fakat göre göreceli olarak düşük bulunmuştur. Bu durumun olası nedenleri olarak şu faktörler dikkat çekmiştir: 1- Hasta numunesi olarak çalışmamızda serum kullanılmıştır. *Brucella*, hücre içi yerleşen bir etken olduğundan kanda daha çok fagositik hücreler içine yoğunlaşmaktadır. Dolayısı ile tam kan kullanılması testin etkinliğini arttırabilecek bir husus olarak görülebilir. Ancak yine de hastadan tek numune alınarak tanıya gidilmesinde ve PCR'ın serum etkinliğinin gösterilmesi yönünden elde ettiğimiz sonuç önemlidir. 2- Test için hastadan ateşli dönemde veya ateş yükselmesi öncesi dönemde numune alınması kandaki bakteri sayısı arttığı için önemli olup bu durumda hasta kanındaki etken DNA'sı daha bol bulunmaktadır. 3- Bu çalışmada kullanılan real-time PCR kitinin test saptama limiti $>10^3$ KOB/ml olduğu için bu düzeyin

altındaki bakteriyemilerde testin yanlış negatif sonuçlandığı olasıdır. Dolayısı ile daha hassas real-time kitlerinin geliştirilmesi ve kullanıma sunulması bu tür negatiflikleri önleyecek bir etki oluşturacaktır.

Çalışmamızda PCR-pozitif örneklerin hepsinde etken *B. melitensis* olarak bulunmuştur. Bu durum ilimiz ve bölgemizde bu türün çok yoğun olarak bruselloza neden olduğunu göstermiştir. *Brucella melitensis*, temel olarak koyun ve keçileri enfekte eden *Brucella* türüdür. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuç, ülkemiz verileri ile tam uyum göstermiş olup Türkiye’de özellikle koyun ve keçi peynirlerinin çok tüketilmesi nedeniyle bruselloz tanısı alan hastalarda en fazla üreyen tür *B. melitensis* olarak bildirilmiştir (120). Akgün ve arkadaşlarının 2017 yılında Adıyaman ilinde yaptıkları çalışmada, 40 hastanın kan kültürlerinden izole edilen *Brucella* suşlarının identifikasyonu real-time PCR yöntemi ile yapılmış ve suşların tamamı *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır (121). Çerekci ve arkadaşlarının 187 *Brucella* suşunun konvensiyonel yöntemler ve multipleks real-time PCR yöntemi ile tiplendirildiği çalışmasında tüm suşlar *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır (122). Benzer olarak, Abu ve arkadaşlarının 2017 yılında Kuveyt’te yaptıkları çalışmada 75 *Brucella* suşu real-time PCR yöntemi ile tanımlanmış ve çalışma sonucunda tüm suşlar *B. melitensis* olarak tiplendirilmiştir (123). Bruselloza neden olan etkenin tür tayininin yapılması klinik tedaviyi yönlendirmede çok önemli bir gereklilik olmasa da, enfeksiyon epidemiyolojisine ait verilerin tam olarak belirlenmesi ve önleyici girişimlerin ve aşılama çalışmalarının doğru olarak planlanması açısından önemli öngörüler oluşmasına katkı sunacaktır. Bu çalışma ve ülkemiz verileri dikkate alındığında ülkemizde özellikle küçükbaş hayvancılıkta brusellozun azaltılması ve eradike edilmesi için ivedilikle çalışmalar yapılmasına olan gereksinim ortaya çıkmıştır.

Brucella türlerinin bu güne kadar belirlenen en önemli virülans genleri *omp19*, *wbkA*, *manA*, *mviN*, *üre*, *perA*’dır. Bu genler tarafından kodlanan faktörler bakterinin enfeksiyon patogenezeine, doku yayılımına ve optimal olmayan koşullarda hayatta kalma özelliğine katkı sunan etkiler sağlamakta olup çalışmamızda bu altı virülans geni araştırılmıştır. Çalışmaya alınan ve *Brucella spp.* DNA’sı saptanan tüm örneklerde çalışılan bu altı virülans geninin hepsi pozitif bulunmuştur. Bu sonuç, ilimiz ve bölgemizde saptadığımız suşların virülans özelliklerinin güçlü olduğunun bir göstergesidir. *Brucella* türlerinin virülans geni yönüyle özelliklerinin bildirildiği çalışma sayısı uluslararası literatürde oldukça sınırlı, ülkemizde ise yok denecek kadar az

miktardadır. Mirnejad ve arkadaşlarının 2017 yılında yayınlanan çalışmasında 2015-2016 yılları arasında İran'ın farklı bölgelerinden izole edilen *B. melitensis* ve *B. abortus* suşlarında bulunan virülans faktörleri moleküler yöntemler ile araştırılmıştır. Çalışmaya insanlara ait 63 kan örneği, 23 sığır, keçi ve koyunlara ait kan örneği ve 14 süt ürünleri alınmış, örneklerin 57'sinde *B. melitensis*, 21'inde *B. abortus* varlığı saptanmış ve multipleks PCR yöntemi ile *manA* %100, *mviN* %94.9, *omp19* %93.6, *perA* %92.3, *wbKA* %89.7 ve *üre* %74.4 oranında tespit edilmiştir (39). Rahdar ve arkadaşlarının yine İran'da yaptığı çalışmada 90 romatoid artritli hastaya ait sinovyal sıvı örneklerinden bruselloz etkeni ve bunlarda bulunan virülans genlerinin çeşitliliği multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Toplam 90 örneğin dokuzu *B. melitensis* ve beşi ise *B. abortus* olarak saptanmıştır. Bu suşlardaki virülans genlerinden *virB*, *omp31* ve *cbg*, pozitif saptanan 14 örnekte de %100 oranında, *zhuA* ve *manA* geni *B. melitensis* suşlarının hepsinde (%100) saptanmıştır. *Brucella abortus* suşlarında ise *zhuA* virülans geni %60, *manA* geni ise %80 oranında tespit edilmiştir (9).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, PCR'ın bruselloz tanısındaki etkinliği, tür tayini ve virülans gen sıklığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre PCR'ın brusellozlu hastaların önemli bir kısmını birkaç saatte doğru tanımlamış olması ve hiç yanlış-pozitif sonuç vermemiş olması önemli bulunmuştur. Daha hassas PCR kitlerinin kullanılması, hastadan bakteriyemik olduğu dönemde numune alınmasına azami dikkat edilmesi ve tam kandan direkt çalışma yapılmasının PCR'ın tanı duyarlılığını arttırabileceği öngörülmüştür. Bu çalışma ile ayrıca, ilimiz ve bölgemizde *B. melitensis*'in etken olarak bulunduğu ve bu suşların önemli virülans genlerinin hepsini taşıdığı saptanmıştır. Ülkemizden bildirilen daha önceki veriler ile birlikte elde ettiğimiz bu sonuç Türkiye'de bruselloz olgularının neredeyse tamamının küçükbaş hayvan kaynaklı olduğunu göstermiş olup hastalığın azaltılması ve eradike edilmesi için öncelikle bu hayvan grubundan çalışmalara başlanması gerekliliğini de ortaya çıkartmıştır. Ülkemizde brusellozlu hastaların hızlı ve doğru tanımlanması, uygun ve etkin antimikrobiyal tedaviye alınmaları ve ayrıca özellikle küçükbaş hayvanlarda hastalığın hızlı bir şekilde kontrol altına alınmasına ve eradike edilmesine olan gereksinim devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against Brucella. *J Vet Sci* 2017, 18: 281-90.
2. Sanjuan-Jimenez R, Colmenero JD, Morata P. Lessons learned with molecular methods targeting the BCSP-31 membrane protein for diagnosis of human brucellosis. *Clin Chim Acta* 2017, 469: 1-9.
3. Baysal B. Brucella. İçinde: Ustaçelebi Ş, Cengiz AT, Mutlu G, İmir T, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999: 571-7.
4. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J Med Microbiol* 2007, 25: 188-202.
5. Shehabi A, Shakir K, El-Khateeb M, Qubain H, Fararjeh N, Shamat AR. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J Infect* 1990, 20: 5-10.
6. Bhaskar S, Anupam J, Anuradha V. Lab diagnosis of brucellosis. *Pediatr Infect Dis* 2016, 8: 40-4
7. Rahman AA, Berkvens D, Saegerman C, Fretin D, Muhammad N, Hossain A, Abatih E. Seroprevalence of brucellosis in patients with prolonged fever in Bangladesh. *J Infect Dev Ctries* 2016, 10: 939-46.
8. Romero C, Lopez-Goni I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65: 3735-7
9. Rahdar HA, Golmohammadi R, Mirnejad R, Ataee RA, Alishiri GH, Kazemian H. Diversity of virulence genes in Brucella melitensis and Brucella abortus detected from patients with rheumatoid arthritis. *Microb Pathog* 2018, 118: 247-50.
10. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, 57: 2688-93.

11. Franc KA, Krecek RC, Hasler BN, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health* 2018, 18: 125.
12. Pelerito A, Cordeiro R, Matos R, Santos MA, Soeiro S, Santos J, Manita C, Rio C, Santo M, Paixão E, Nunes A, Nuncio S. Human brucellosis in Portugal- Retrospective analysis of suspected clinical cases of infection from 2009 to 2016. *PLoS One* 2017, 12: 7.
13. Aloufi AD, Memish ZA, Assiri AM, McNabb SJ. Trends of reported human cases of brucellosis, Kingdom of Saudi Arabia, 2004-2012. *J Epidemiol Glob Health* 2016, 6: 11-8.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Brucellosis Treatment. <https://www.cdc.gov/brucellosis/treatment/index.html> 09 Kasım 2018.
15. Rossetti CA, Arenas-Gamboa AM, Maurizio E. Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis* 2017, 11: 8.
16. T.C. Sağlık Bakanlığı. Bruselloz İstatistik Verileri. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/zoonotikvektorel-bruselloz/istatistik> 1 Haziran 2019.
17. Corbel MJ. Brucellosis: An overview. *Emerg Infect Dis* 1997, 3: 213-21.
18. Gunala O, Berk S, Baruta HS. Brusellozda akciğer tutulumu. *Deneysel ve Klinik Tıp Dergisi* 2011, 28: 128-31.
19. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E. Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* 2010, 51: 12-5.
20. Torun MM, Bektore B, Kaleli I, Aslan SO, Ogunc D, Dundar D, Alışkan HE, Otgün SN. Zor üreyen çeşitli gram-negatif basiller. İçinde: *Koneman Renkli Atlas ve Tanısal Mikrobiyoloji*, Başustaoğlu A, Us AD (Çeviri Editörleri). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. 7. Baskı, Ankara, Hipokrat Yayınevi, 2017: 516-32.
21. Torres Higuera LD, Jiménez Velásquez SDC, Rodríguez Bautista JL, Patiño Burbano RE. Identification of *Brucella abortus* biovar 4 of bovine origin in Colombia. *Rev Argent Microbiol* 2019, 51: 221-8.
22. Madkour MM, *Bruselloz*. Ang O, Yumuk Z. İstanbul: Nobel, 2008.

23. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* 2001, 3: 729-38.
24. Miller WG, Adams LG, Ficht TA, Cheville NF, Payeur JP, Harley DR, House C, Ridgway SH. *Brucella* induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 1999, 30: 100-10.
25. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampf P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, 58: 375-82.
26. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kampf P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010, 60: 801-8.
27. Turan O. *Brucella* Tanısında Coombs Testinin Yeri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi, 2017.
28. Banai M, Corbel M. Taxonomy of *Brucella*. *Open Vet Sci J* 2010, 4:85-101.
29. Cengiz AT, Dolapci GI. *Brucella*'ların özellikleri ve brusellozda tanı yöntemleri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 1997, 50: 41-6.
30. Gezgen C, Seker E. Brusellozis: Güncel Yaklaşımlar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* 2014, 12: 28-66.
31. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, De Miguel MJ, Martín-Martín AI, Cloeckaert A, Grilló MJ, Vizcaíno N. Role of the *omp25/omp31* family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* 2007, 75: 4050-61.
32. Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt MS. *Brucella* outer membrane lipoproteins share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, 6: 627-9.
33. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998, 27: 99-106.

34. He Y. Analyses of Brucella pathogenesis, host immunity, and vaccine targets using systems biology and bioinformatics. *Front Cell Infect Microbiol* 2012, 2: 1-17.
35. Christopher S, Umapathy BL, Ravikumar KL. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *J Lab Physicians* 2010, 2: 55-60.
36. Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, Zafari P, Zarifian A. A review of the immunopathogenesis of brucellosis. *Infectious Diseases* 2019, 51: 321-33.
37. Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A. Brucella – virulence factors, pathogenesis and treatment. *Pol J Microbiol* 2018, 67: 151-61.
38. Sangari FJ, Cayón AM, Seoane A, García-Lobo JM. Brucella abortus ure2 region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol* 2010, 10: 1-12.
39. Mirnejad R, Jazi FM, Mostafaei S, Sedighi M. Molecular investigation of virulence factors of Brucella melitensis and Brucella abortus strains isolated from clinical and non-clinical samples. *Microb Pathog* 2017, 109: 8-14.
40. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to Brucella infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries* 2015, 9: 697-701.
41. Gur D. Brusellalar. İçinde: *Jawetz, Melnick ve Adelberg Tibbi Mikrobiyoloji*, Yenen OS, Gur D, (Çeviri editörleri). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology, Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri 2014: 271-3.
42. Cheney RW. Brucella. 2nd ed. *Salem Press Encyclopedia of Health*, 2018.
43. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rosetti CA, Adams LG. Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of Brucella-host interactions. *Am J Pathol* 2015, 185: 1505-17.
44. Ertek M. Bruselloz: Klinik formları ve özellikleri. *Ankem Dergisi* 2003, 17: 333-5.
45. Tanyel E. Neurobrucellosis. *Ortadogu Tıp Dergisi* 2017, 9: 39-41.
46. Heper Y, Yılmaz E, Akalin H, Mistik R, Helvaci S. Nörobruselloz: 9 olgunun irdelenmesi. *Klinik Dergisi* 2004, 17: 99-102.
47. Shahid A, Awadh A, Abdulkarim A. A review of gastrointestinal manifestations of Brucellosis. *Saudi J Gastroenterol* 2005, 11: 20-7.

48. Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Alfaro EM, Atienzar M, Ariza J. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis* 2001, 33: 2017-22.
49. Dautović-Krkić S, Mehanić S, Ferhatović M, Adrović A. Cardiovascular manifestations of brucellosis. *Medical Journal* 2012, 18: 127-9.
50. Aktas O. Brusellozda mikrobiyolojik tanı. *Ankem dergisi* 2003, 17: 336-9.
51. Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. *Int J Antimicrob Agents* 2010, 36: 12-7.
52. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002, 90: 435-46.
53. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1990, 69: 216-27.
54. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 1992, 95: 271-5.
55. Bricker BJ, Ewalt D, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 2003, 15: 374-8.
56. Redkar R, Rose S, Bricker B, Del Vecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 2001, 15: 43-52.
57. Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 3085-6.
58. Rees RK, Graves M, Caton N, Ely JM, Probert WS. Single tube identification and strain typing of *Brucella melitensis* by multiplex PCR. *J Microbiol Methods* 2009, 78: 66-70.
59. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 1211-8.
60. Scott JC, Koylass MS, Stubberfield MR, Whatmore AM. Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73: 7331-7.

61. Koylass MS, King AC, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL, Whatmore AM. Comparative performance of SNP typing and 'Bruce-ladder' in the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol* 2010, 142: 450-4.
62. Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R, Bowen MD, Hoffmaster AR. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 2010, 48: 697-702.
63. Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SS, Khalife S, Deeb M. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, 59: 23-32.
64. Queipo-Ortuño MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 2005, 40: 260-4.
65. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero JD. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11: 221-5.
66. Al Dahouk S, Nockler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011, 9: 833-45.
67. Diaz R, Casanova A, Ariza J, Mariyon I. The Rose Bengal test in human brucellosis: A neglected test for the diagnosis of a neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2011, 19: 950.
68. Us AD. *Temel İmmünoloji ve Seroloji*, 1. Baskı. Ankara, Hipokrat Kitapevi, 2016: 183-6.
69. Aliskan H. Kültür ve serolojik yöntemlerin insan brusellozu tanısındaki değeri. *Mikrobiyol Bül* 2008, 42: 185-95.
70. Nielsen K, Yu WL. Serological diagnosis of brucellosis. *Prilozi* 2010, 31: 65-89.
71. Hasibi M, Jafari S, Mortazavi H, Asadollahi M, Esmaeeli DG. Determination of the accuracy and optimal cut-off point for ELISA test in diagnosis of human brucellosis in Iran. *Acta Med Iran* 2013, 51: 687-92.

72. Tumturk A, Yetkin MA, Tulek N, Kilic D. Brusellozun tanı ve takibinde serum aglütinasyon testi ve “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” yönteminin yeri. *Klimik Dergisi* 2004, 17: 107-12.
73. Altuglu I, Zeytinoglu A, Bilgic A, Kamcioglu S, Karakartal G, Smits H. Evaluation of Brucella dipstick assay for the diagnosis of acute brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, 44: 241-3.
74. Smits HL, Basahi MA, Diaz R, Marrodan T, Douglas JT, Rocha A, Veerman J, Zheludkov MM, Witte OW, De Jong J, Gussenhoven GC, Goris MG, Van Der Hoorn MA. Development and evaluation of a rapid dipstick assay for serodiagnosis of acute human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1999, 37: 4179-82.
75. Clavijo E, Díaz R, Anguita A, García A, Pinedo A, Smits HL. Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specific Immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003, 10: 612-5.
76. Alavi SM, Alavi L. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. *Caspian J Intern Med* 2013, 4: 636-41.
77. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, Colmenero JD, Corbel MJ, Falagas ME, Memish ZA, Roushan MRH, Rubinstein E, Sipsas NV, Solera J, Young EJ, Pappas G. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations. *PLoS Med* 2007, 4: e317.
78. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı. Brusellanın Konjunktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu. <https://kms.kaysis.gov.tr/Home/Kurum/24308110> 10 Ekim 2019.
79. Al Dahouk S, Sprague LD, Neubauer H. New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev Sci Tech* 2013, 32: 177-88.
80. Yüce A, Alp-Cavus S. Türkiye’de Bruselloz: Genel bakış. *Klimik Dergisi* 2006, 19: 87-97.
81. Kuyumcu ÇA. Brusellozun Serolojik Tanısında Kullanılan Coombs Gel Testi ile Elisa ve STA Testlerinin Karşılaştırılması. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Bakteriyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, 2017.
82. Parlak M. Bölgemizde İzole Edilen Brucella Suşlarının Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığının

- Belirlenmesi. Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Van: Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 2011.
83. Lari AR, Karimi A, Fallah F, Angoti G, Sanaei A, Azimi L. The Efficacy of multiplex PCR in comparison with agglutination and ELISA in diagnosis of human brucellosis. *Iran J Clinic Infect Dis* 2011, 6: 3-6.
84. Çam ÖY. Akut, Kronik ve Fokal Komplikasyonlarla Seyreden Brusellozis Hastalarının Tanısında Tüp Aglütinasyonu, Kan Kültürü ve Real Time PCR Testlerinin Tanısal Değerlerinin İrdelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi, 2012.
85. Ceken S, Kaygusuz S, Kilic D, Agalar C. Akut bruselloz tanısında polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin kullanımı. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2015, 72: 91-8.
86. Özinel MA. Brucella. İçinde: Tıbbi Mikrobiyoloji, Başustaoğlu AC (Çeviri Editörü). *Medical Microbiology*, Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık, 2010: 362-3.
87. Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of Brucella bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 2673-4.
88. Calik S, Gokengin A. Human brucellosis in Turkey: a review of the literature between 1990 and 2009. *Turk J Med Sci* 2011, 41: 549-55.
89. Dizer U, Beker CM, Cicek H, Guner OR, Zeren I, Pahsa A. Bruselloz tanı yöntemlerinin etkinliğinin araştırılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005, 31: 87-93.
90. Demir C, Karahocagil MK, Esen R, Atmaca M, Gonullu H, Akdeniz H. Bone marrow biopsy findings in brucellosis patients with hematologic abnormalities. *Chin Med J* 2012, 125: 1871-6.
91. Ozkurt Z, Erol S, Tasyaran MA, Kaya A. Detection of Brucella melitensis by the BacT/Alert automated system and Brucella broth culture. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8: 749-52.
92. Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Llosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis: the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 1986, 153: 122-5.
93. Güzelant A, Kurtoğlu MG, Kaya M, Keşli R, Terzi Y, Baysal B. Brusellozis'in tanısında brucellacapt'in diğer serolojik testler ile karşılaştırılması. *Selçuk Tıp Dergisi* 2009, 25: 125-31.

94. Moreno SM, Esquerdo LG, Gonzalez PC, Visedo OR, Garcia CS, Calvo Del OT, Reverte CD. Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. *Med Clin* 1992, 98: 481-5.
95. Araj GF, Brown GM, Haj MM, Madhvan NV. Assessment of brucellosis card test in screening patients for brucellosis. *Epidemiol Infect* 1988, 100: 389-98.
96. Tansel O, Yavuz M, Kuloglu F, Akata F. Trakya Üniversitesi Hastanesine başvuran 40 bruselloz olgusunun değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi* 2003, 17: 1-4.
97. Demirdag K, Ozden M, Kalkan A, Celik I, Kilic SS. Bruselloz: 146 olgunun retrospektif değerlendirilmesi. *Flora* 2002, 7: 120-5.
98. Kara SS, Aslan MH, Volkan B, Ozel M, Fettah A. Bruselloz tanılı 94 çocuk hastanın retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2016, 17: 60-5.
99. Dal T, Kara SS, Cikman A, Balkan CE, Acikgoz ZC, Zeybek H, Uslu H, Durmaz R. Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis. *J Infect Public Health* 2019, 12: 337-42.
100. Irvem A, Yucel FM, Aksaray S, Bor E. Brusellozun serolojik tanısında yeni ve hızlı bir yöntem olan brucella coombs jel testi ile diğer yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2015, 49: 181-7.
101. Mantur BG, Amarnath SK, Parande AM, Walvekar RR, Desai AS, Parande MV, Shinde RS, Chandrashekar MR, Patil SD, Shivaram C, Salagare RC. Comparison of a novel immunocapture assay with standard serological methods in the diagnosis of brucellosis. *Clin Lab* 2011, 57: 333-41.
102. Hanci H, Igan H, Uyanik MH. Evaluation of a new and rapid serologic test for detecting brucellosis: Brucella coombs gel test. *Pak J Biol Sci* 2017, 20: 108-12.
103. Kalem F, Ergun AG, Durmaz S, Doğan M, Ertugrul O, Gundem S. Comparison of a new and rapid method: Brucella coombs gel test with other diagnostic tests. *J Clin Lab Anal* 2016, 30: 756-9.
104. Ulug M, Can Ulug N. Brusellozlu 78 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Dergisi* 2010, 23: 89-94.
105. Kokoglu OF, Hosoglu S, Geyik MF, Ayaz C, Akalin S, Buyukbese MA, Cetinkaya A. Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in Southeast Turkey. *Trop Doct* 2006, 36: 49-51.

106. Guler S, Kokoglu OF, Uçmak H, Gul M, Ozden S, Ozkan F. Human brucellosis in Turkey: Different clinical presentations. *J Infect Dev Ctries* 2014, 8: 581-8.
107. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004, 4: 115-23.
108. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1994, 32: 2660-6.
109. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Pachón ME, Gonzalez M, Morata P. Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11: 713-8.
110. López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Corrêa de Sá MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all Brucella species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 2008, 46: 3484-7.
111. Cirak MY, Hizel K. The value of polymerase chain reaction methods targeting two different gene regions for the diagnosis of brucellosis. *Mikrobiyol Bul* 2002, 36: 271-6.
112. Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, Yurtsever SG. Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. *Pol J Microbiol* 2009, 58: 15-9.
113. Elfaki MG, Uz-Zaman T, Al-Hokail AA, Nakeeb SM. Detection of Brucella DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 53: 1-7.
114. Colmenero JD, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P. Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005, 76: 1025-7.
115. Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol* 2008, 54: 352-7.
116. Al-Ajlan HH, Ibrahim AS, Al-Salamah AA. Comparison of different PCR methods for detection of Brucella spp. in human blood samples. *Pol J Microbiol* 2011, 60: 27-33.

117. Asaad AM, Alqahtani JM. Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 2012, 5: 189-94.
118. Sohrabi M, Mohabati MA, Khoramabadi N, Hosseini DR, Behmanesh M. Efficient diagnosis and treatment follow-up of human brucellosis by a novel quantitative TaqMan real-time PCR assay: a human clinical survey. *J Clin Microbiol* 2014, 52: 4239-43.
119. Li M, Zhou X, Li J, Sun L, Chen X, Wang P. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Medicine* 2018, 97: 62.
120. Zer Y, Namiduru M, Cam R. Kan kültüründen izole edilen *Brucella melitensis* suşlarına Tigesiklin'in in-vitro etkinliği. *Ankem Dergisi* 2007, 21: 42-5.
121. Akgun S, Tarhan G, Sayiner HS. Adıyaman ilinde kan kültürlerinden izole edilen brusella türlerinin identifikasyonu. *Ortadoğu Tıp Dergisi* 2017, 9: 150-4.
122. Cerekci A, Kilic S, Bayraktar M, Uyanik MH, Yasar E, Esen B. Comparison of Conventional Methods and Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification and Typing of *Brucella* Isolates of Human Origin. *Mikrobiyol Bul* 2011, 45: 392-400.
123. Mustafa AS, Habibi N, Osman A, Shaheed F, Khan MW. Species identification and molecular typing of human *Brucella* isolates from Kuwait. *PLoS One* 2017, 12: e0182111.

EKLER

Ek-1 Özgeçmiş

Ad: Engin Vedat

Soyad: SEYHAN

Doğum Yeri: İdil

Doğum Yılı: 1981

Adres: Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Cep Telefonu: 0 541 817 20 07

E-Posta Adresi: engin.seyhan@inonu.edu.tr

Eğitim Durumu

Lisans: İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (1999-2004)

Tezsiz Yüksek Lisans: Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji (2004-2005)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (2017-2019)

Yabancı Dil: İngilizce

Ek-2 Etik Kurul Onayı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virulans Genlerinin Saptanması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2018/53

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞLLARI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>				
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU
İmza:

27.12.2018
Kadriye YÜKSEL
Malatya Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virulans Genlerinin Saptanması				
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2018/53				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama				
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>				
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>				
	İLAN	<input type="checkbox"/>				
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>				
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>				
Diğer:	<input type="checkbox"/>					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2018/53	Tarih: 16.05.2018				
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.					
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOĞLU					

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Saim YOĞLU	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıkları	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Barış OTLU	Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet GÜL	Histoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemalettin AYDIN	Genel Cerrahi	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. Hakan HARPUTLUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOĞLU
İmza:

KADRIYE YÜKSEL
Malatya Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Sekreteri

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Brusellozis Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun Etkinliğinin Serolojik Yöntemlerle Karşılaştırılması ve Virulans Genlerinin Saptanması							
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2018/53							
Prof. Dr. Yılmaz TABEL	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Yılmaz</i>
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Seda</i>
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Mehmet</i>
Yrd. Doç. Dr. Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Sedat</i>
Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Hasan KONAN	Sivil Üye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>Hasan</i>

23.12.2018
Kadriye YÜKSEL
 Malatya Klinik Araştırmaları
 Etik Kurulu Sekreteri

Etik Kurul Başkanı
 Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOĞLU
 İmza: