

T.C.
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA GÜVENLİĞİ ANABİLİM DALI

BİTLİS İLİNDE TÜKETİME SUNULAN TAZE BEYAZ
PEYNİRLERDE *BRUCELLA SPP.* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZİFE KALKAN

DANIŞMAN
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ İBRAHİM HALİL ŞAHİN

KASIM 2025
BİTLİS

T.C.
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA GÜVENLİĞİ ANABİLİM DALI

BİTLİS İLİNDE TÜKETİME SUNULAN TAZE BEYAZ
PEYNİRLERDE *BRUCELLA SPP.* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZİFE KALKAN
ORCID: 0000-0001-7653-2490

DANIŞMAN
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ İBRAHİM HALİL ŞAHİN

KASIM 2025
BİTLİS

T.C.

BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ETİK BEYANI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Güvenliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisiyim. Hazırlamış olduğum “**Bitlis İlinde Tüketime Sunulan Taze Beyaz Peynirlerde *Brucella spp.* Varlığının Araştırılması**” başlıklı tezde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi; kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı; bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 15.11.2025

Nazife KALKAN

T.C.
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ YAZIM KILAVUZU UYGUNLUK BEYANI

“Bitlis İlinde Tüketime Sunulan Taze Beyaz Peynirlerde *Brucella spp.*
Varlığının Araştırılması” başlıklı yüksek lisans Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü
Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmıştır. 15.11.2025

Tezi Hazırlayan

Nazife KALKAN

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi İbrahim Halil ŞAHİN

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı Başkanı

Dr. Öğretim Üyesi Seda OĞUR

T.C.
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY SAYFASI

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Gıda Güvenliği Anabilim Dalı öğrencisi Nazife KALKAN tarafından hazırlanan “**Bitlis İlinde Tüketime Sunulan Taze Beyaz Peynirlerde *Brucella spp.* Varlığının Araştırılması**” adlı Yüksek Lisans ile ilgili tez savunma sınavı, 20/11/2025 tarihinde yapılmış ve tezin oy birliği ile kabul edilmesine karar verilmiştir.

JÜRİ:

İMZA

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Halil ŞAHİN
(Bitlis Eren Üniversitesi)

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Barış ÖTÜN
(Bitlis Eren Üniversitesi)

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN
(Ahi Evran Üniversitesi)

.....

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih vesayılı kararıyla jüri tarafından kabul edilmiş bu çalışmanın yüksek lisans olarak kabulü onaylanmıştır.

....../....../2025

Prof. Dr. Nurullah ULUTAŞ
Enstitü Müdürü

T.C.

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Gıda Güvenliği Anabilim Dalı

**BİTLİS İLİNDE TÜKETİME SUNULAN TAZE BEYAZ
PEYNİRLERDE *BRUCELLA SPP.* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Nazife KALKAN

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi İbrahim Halil ŞAHİN

Kasım 2025

ÖZET

Bu çalışma, Bitlis ili ve ilçelerinde semt pazarlarında satışa sunulan taze beyaz peynirlerin *Brucella spp.* varlığı açısından değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Toplamda 126 taze beyaz peynir örneği incelenmiş olup bunların 44'ü inek sütünden, 82'si koyun ve keçi sütünden üretilmiştir. *Brucella spp.* DNA'sının varlığının, kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) kullanılarak gerçekleştirildiği bu çalışmada, taze peynir örneklerinin 9(%7,14)'u *Brucella spp.* açısından pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin tamamı koyun ve keçi sütünden üretilen peynirlerde saptanmış olup, inek sütünden elde edilen peynirlerde *Brucella spp.* varlığına rastlanmamıştır.

Elde edilen sonuçlar, bölgede taze peynirlerin üretiminde pastörize edilmemiş çiğ süt kullanımının yaygın olduğunu ve özellikle küçükbaş hayvanların bruselloz enfeksiyonu açısından önemli bir kaynak teşkil ettiğini ortaya koymuştur. Literatürde bildirilen farklı coğrafyalardaki sonuçlarla karşılaştırıldığında, çalışmamızda tespit edilen oranların benzer veya daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak peynirde *Brucella spp.* varlığına ilişkin farklı bölgelerde oldukça değişken sonuçlar bildirilmesi, bölgesel üretim alışkanlıkları, hijyen koşulları, süt işleme yöntemleri ve hayvan sağlığı durumundaki farklılıkların etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, Bitlis bölgesinde üretilen ve açık pazarlarda satılan taze peynirlerin halk sağlığı açısından risk taşıdığı belirlenmiştir. Bu bağlamda, pastörizasyon

uygulamalarının yaygınlaştırılması, üretim ve satış aşamalarında hijyen koşullarının iyileştirilmesi, üretici ile tüketicilerin bruselloz konusunda bilinçlendirilmesi önerilmektedir. Bu önlemler, hem gıda güvenliğinin sağlanması hem de insanlarda bruselloz insidansının azaltılması açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca özellikle çiğ süt ve süt ürünleri tüketiminin yaygın olduğu bölgelerde düzenli moleküler taramaların gerçekleştirilmesinin, halk sağlığının korunmasına yönelik önleyici stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Brucella spp.* Taze beyaz peynir, RT-qPCR, Gıda güvenliği



Republic of Türkiye

Bitlis Eren University Graduate School

Department of Food Safety

**INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF *BRUCELLA SPP.* IN FRESH
WHITE CHEESES OFFERED FOR CONSUMPTION IN THE PROVINCE OF
BITLIS**

Master's Thesis

Nazife KALKAN

Supervisor: Assistant Professor Dr. İbrahim Halil ŞAHİN

NOVEMBER 2025

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the presence of *Brucella* species in fresh white cheeses sold in neighbourhood markets in Bitlis province and its districts. A total of 126 samples of fresh white cheese were examined, 44 of which were produced from cow's milk and 82 from sheep's and goat's milk. Using quantitative real-time PCR (RT-qPCR), this study determined the presence of *Brucella spp.* DNA and found that 9 (7.14%) of the fresh cheese samples were positive. All positive samples were from cheeses produced with sheep and goat milk, while no *Brucella spp.* was found in cheeses made with cow's milk.

These results reveal that unpasteurised raw milk is commonly used in the production of fresh cheeses in the region, and that small ruminants are a significant source of brucellosis infection. When compared with results reported in the literature from different geographical areas, the rates detected in our study were similar or lower. However, highly variable results regarding the presence of *Brucella spp.* in cheese in different regions suggest that regional production habits, hygiene conditions, milk processing methods and differences in animal health status may be influential factors.

Consequently, it has been concluded that fresh cheeses produced in the Bitlis region and sold in open markets pose a risk to public health. In this context, it is recommended that pasteurisation practices become widespread, hygiene conditions are improved during production and sale, and producers and consumers are educated about

brucellosis. These measures are critical for ensuring food safety and reducing the incidence of brucellosis in humans. Furthermore, regular molecular screening, particularly in regions where raw milk and dairy products are widely consumed, is believed to contribute to the development of preventive strategies for protecting public health.

Keywords: *Brucella spp.*, Fresh white cheese, RT-qPCR, Food safety.



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması sırasında, tez konusunun belirlenmesinden başlayarak son aşamaya kadar her konuda benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Selçuk KILIÇ hocama ve danışman hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi İbrahim Halil ŞAHİN'e şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmamda benden yardım ve desteklerini esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER	VII
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Bruselloz.....	2
2.1.Tarihçe	3
2.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri	6
2.3.1. Brucella Türlerinin Üreme Özellikleri.....	6
2.3.2.Brucella Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri	7
2.3.3. Brucella Türlerinin Antijenik Yapısı ve İmmünolojik Özellikleri.....	8
2.3.4.Bulaş Yolları	10
2.3.5. Brusellozis'in Epidemiyolojisi.....	12
2.3.6. Süt Ve Süt Ürünlerinde Brucella Varlığı	15
2.3.7. Koruma, Kontrol Ve Eradikasyon	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1.Numunelerin Toplanması, Transferi ve Saklanması:	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1 PCR Kitleri	20
3.2.2. Peynir Örneklerinden DNA ekstraksiyonu için kullanılan malzemeler ve cihazlar	20
3.2.3.Peynir Örneklerinden moleküler Çalışma Protokülü.....	21
4. BULGULAR	25
5.TARTIŞMA	28
5. SONUÇ	38
KAYNAKLAR	39

ÇİZELGELER

Çizelge.3.1.Rt-PCR kurulum aşamaları ve PCR çalışma programı.....	25
Çizelge.4.1. Peynir numunelerinin alındığı odaklara göre dağılımı ve pozitif/negatiflik durumu.....	26
Çizelge.4.2. Peynir örneklerinin üretildiği sütlerle göre dağılımı.....	27
Çizelge 4. 3. Koyun+keçi ve inek peynirlerinde Brucella spp. Dağılımı.....	28



1.GİRİŞ

Brusellozis, *Brucella* cinsine ait bakterilerin neden olduğu, koyun, keçi, sığır domuz ve benzeri birçok evcil hayvanda görülen, başlıca genital organlarda (testis, uterus, meme) lokalize olan kronik, nekrotik ve yangısal karakterde enfeksiyonlarla seyreden zoonotik bir hastalıktır. Bu enfeksiyon hayvanlarda kısırılık, yavru atma ve süt veriminde azalma gibi önemli patolojik sonuçlar doğurarak hem hayvansal üretimde ciddi ekonomik kayıplara yol açmakta hem de insanlara bulaşarak halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır[1]. İnsanlarda “Malta humması”, “dalgalı ateş”, “Koyun Hastalığı” ve “ondulan fever” gibi farklı isimlerle tanımlanan bu hastalık, özellikle süt ve süt ürünleri aracılığıyla bulaşması nedeniyle gıda güvenliği kapsamında da önemli bir yere sahiptir.

Brusellozis, zoonotik karakteri nedeniyle anthropozoonoz bir enfeksiyon olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bağlamda insanlardaki brusellozis olgularının temel kaynağını enfekte hayvanlar oluşturmaktadır[2][3]. Hayvancılıkla doğrudan ilişkisi olmayan bireylerde dahi hastalık çoğunlukla enfekte hayvanların çiğ sütlerinin veya bu sütlerden üretilmiş pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde tereyağı, beyaz peynir, dondurma ve krema gibi süt ürünlerinin tüketimi oldukça yaygın olup, özellikle pastörizasyon yapılmadan üretilen krema, taze peynir ve tereyağı gibi ürünler hastalığın bulaşmasında önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Ülkemizde çiğ süttten elde edilen peynir ve kaymak tüketiminin geleneksel bir alışkanlık olarak devam ettiği bilinmektedir.

Türkiye’nin farklı bölgelerinde süt ürünlerinde brusellozis varlığını araştıran çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, süt hayvancılığının ve süt ürünleri üretiminin yoğun olduğu Bitlis ilinde konuya ilişkin veriler sınırlıdır. Özellikle Bitlis bölgesinde semt pazarlarında açık şekilde satışa sunulan peynirlerin *Brucella spp.* yönünden incelenmesi, hem halk sağlığı açısından hem de bölgedeki bulaş riskinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, Bitlis il merkezinde pazarlarda satışı yapılan pastörize edilmemiş inek ve koyun sütlerinden üretilmiş taze peynirlerde *Brucella spp.* varlığının moleküler yöntemlerle(RT-qPCR) araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Bruselloz

Bruselloz, *Brucella* cinsi bakterilerin neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur. İnsanlara bulaşma, çoğunlukla sığır, koyun, keçi, manda ve domuz gibi enfekte hayvanlarla doğrudan veya dolaylı temas yoluyla gerçekleşir. Mesleki maruziyet, enfekte hayvanların kanı, plasenta dokuları, idrarı veya diğer vücut sıvılarıyla cilt sıyrıkları veya mukoza teması yoluyla organizmaya maruz kalabilecek çiftçiler, veterinerler, mezbaha çalışanları ve laboratuvar personeli arasında özellikle yaygındır. Ayrıca, enfekte hayvanlardan elde edilen pastörize edilmemiş süt, taze peynir ve diğer süt ürünlerinin tüketimi, özellikle gıda güvenliği düzenlemelerinin yeterince uygulanmadığı bölgelerde, dünya çapında en önemli bulaşma yolları arasında yer almaktadır. Aerosol haline getirilmiş *Brucella* organizmalarının solunması da belgelenmiştir, bu da organizmanın belirli koşullar altında hava yoluyla yayılma potansiyelini vurgulamaktadır[1].

Hastalık, yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin herkeste görülebilir, ancak klinik belirtiler kişiden kişiye değişiklik gösterebilir. En yaygın semptomlar arasında dalgalı ateş (yükselip alçalan ateş), gece terlemeleri, kas ve eklem ağrıları bulunur. Bu zoonotik enfeksiyon, birden fazla organ sistemini etkileyerek potansiyel olarak ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Artrit, spondilit ve sakroiliit gibi osteoartiküler tutulumlar en sık bildirilen komplikasyonlar arasındadır. Ancak nörolojik, kardiyovasküler ve genitoüriner tutulumlar daha az sıklıkta görülse de önemli morbiditeye yol açabildiği bildirilmiştir. Endokardit, nadir olmakla birlikte, brusellozla ilişkili mortalitenin başlıca nedenidir. Klinik belirtilerin geniş yelpazesi, endemik bölgelerde veya ilgili maruz kalma öyküsü olan kişilerde yüksek şüphe indeksini korumanın önemini vurgulamaktadır. Önlenabilir olmasına rağmen, bruselloz, kalıcı hayvan rezervuarları, çeşitli bulaşma yolları ve nonspesifik klinik tablosu nedeniyle dünyanın birçok bölgesinde önemli bir halk sağlığı ve veterinerlik sorunu olmaya devam etmektedir[2][3][4][5][6][7].

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında, bruselloz küresel olarak en yaygın zoonotik hastalıklardan biri olmaya devam etmekte olup, en yüksek yük Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Afrika, Latin Amerika ve Asya'nın bazı bölgelerinde gözlemlenmektedir. Buna karşın, birçok sanayileşmiş ülke, hayvan aşılama programları, test ve kesim politikaları ve süt üretiminin sıkı kontrolü sayesinde hastalık insidansında önemli düşüşler sağlamıştır (WHO, 2023). Bununla birlikte, küreselleşme, nüfus hareketleri ve gayri

resmi gıda ticareti, hem endemik hem de daha önce kontrol altına alınmış bölgelerde hastalığın yeniden ortaya çıkmasını ve devam etmesini kolaylaştırmaya devam etmektedir[2].

Brusellozun yaygınlığının devam etmesi, hayvan sağlığı, insan davranışı ve sosyoekonomik faktörler arasındaki karmaşık etkileşimi yansıtmaktadır. İnsan brusellozunun etkili bir şekilde kontrol edilmesi, büyük ölçüde hayvan popülasyonlarındaki enfeksiyonun önlenmesi ve yönetilmesinin yanı sıra süt ürünlerinin pastörizasyonu, iş güvenliği uygulamaları ve sağlık eğitimi gibi halk sağlığı önlemlerine bağlıdır. İnsan sağlığı, hayvancılık verimliliği ve ekonomik kalkınma üzerinde önemli etkisi olan bruselloz, sürdürülebilir kontrolün sağlanması için veterinerlik ve tıp sektörleri arasında koordineli çabalar gerektiren, küresel önemi büyük bir hastalık olmaya devam etmektedir.

2.1.Tarihçe

Brusellozun tarihsel geçmişi antik çağlara kadar uzanır ve insanlar, hayvanlar ve bulaşıcı hastalıklar arasındaki uzun süredir devam eden etkileşimi yansıtır. Bruselloz ile tutarlı en eski tanımlamalardan biri, MÖ 450 civarında Hipokrat'a kadar uzanır. Hipokrat, tıbbi yazılarında Akdeniz bölgesinde yaşayan topluluklarda gözlemlediği uzun süreli ateşli bir hastalığı tanımlamış ve bunu genel olarak "humma" olarak adlandırmıştır. O dönemde etiyolojik ajan bilinmemekle birlikte, onun belgelediği klinik özellikler günümüzde bruselloz olarak tanınan hastalığa çok benzemektedir, bu da hastalığın binlerce yıldır insan popülasyonlarını etkilediğini göstermektedir. Daha sonraki tıp literatüründe, hastalık yaygın olarak "Malta ateşi" olarak bilinir hale gelmiştir. Bu isim, hastalığın kapsamlı bir şekilde incelendiği Malta adasından ve tarihsel olarak endemik olduğu bölgedeki coğrafi dağılımını yansıtan "Akdeniz ateşi"nden türemiştir[8].

On dokuzuncu yüzyılda, brusellozun endemik bölgelerde görev yapan askeri personel arasında brusellozun yaygın olduğu dönemde, hastalık epidemiyolojisini ve belirsiz etiyolojisini yansıtan çeşitli bölgesel isimler aldı. İngiliz askeri kayıtlarında hastalık "Corps hastalığı" olarak anılırken, belirli bölgelerde gözlemlenen vakaları belirtmek için "Cebelitarık ateşi" ve "Kırım ateşi" gibi diğer terimler kullanıldı. Bu terminolojik farklılıklar, bu dönemde hastalık hakkında tek tip bir anlayışın olmadığını ve hastalıkların etyolojik ajanlarına göre değil, görünürdeki coğrafi kökenlerine göre isimlendirilme eğilimini göstermektedir. Klinik gözlemler arttıkça, tekrarlayan veya dalgalanan ateşin ayırt edici paterni giderek daha fazla tanınır hale geldi ve bugün tıp

literatüründe hala kullanılan “dalgalı ateş” gibi tanımlayıcı terimlerin ortaya çıkmasına yol açtı[9].

Brusellozun zoonotik yapısı, halk arasında kullanılan isimlere de yansımıştır. Koyun ve keçilerin başlıca hayvancılık türlerini oluşturduğu topluluklarda, bu hastalık genellikle “koyun hastalığı” veya “mal hastalığı” gibi halk dilinde kullanılan isimlerle anılırdı. Bu isimler, hastalığın hayvancılıkla ilişkisini ve enfekte hayvanlar veya bunların ürünleriyle temas yoluyla insanlara bulaşmasını yansıtıyordu. Bu isimler daha sonra, günümüzde dünya çapında insan brusellozunun en virülan ve en yaygın nedeni olarak bilinen *Brucella melitensis*(*B.melitensis*) türü ile ilişkilendirilmiştir. Brusellozun bilimsel olarak açıklığa kavuşturulması, on dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında ciddi bir şekilde başladı. 1861 yılında, İngiliz askeri cerrah J. A. Marston, Malta'da görev yapan İngiliz askerleri arasında görülen ateşli hastalıkları “Malta ateşi” terimini kullanarak tanımlayarak, bu hastalığı modern tıp literatürüne resmen tanıttı. 1887 yılında, İngiliz ordusu hekimi Sir David Bruce, ölümcül vakalardan alınan dalak örneklerinden küçük kokoid mikroorganizmalar izole ederek önemli bir atılım gerçekleştirdi. Bu organizmaya *Micrococcus melitensis* adını veren Bruce, hastalığın bakteriyel etiyolojisini ortaya koydu. Daha sonraki araştırmalar, aynı organizmanın keçi sütünden de izole edilebildiğini ve pastörize edilmemiş süt ürünlerinin tüketiminin insanlara bulaşmanın başlıca yolu olduğunu gösterdi[10][11].

Brusellozun anlaşılmasında daha fazla ilerleme, veterinerlik araştırmalarında ortaya konulmuştur. 1897'de Danimarkalı veteriner Bernard Bang, meslektaşı Stribolt ile birlikte, sığırlarda bulaşıcı abort vakalarından benzer bir organizma izole etti. Bu patojen daha sonra *Brucella abortus*(*B. abortus*) olarak adlandırıldı ve neden olduğu hastalık yaygın olarak “Bang hastalığı” olarak bilindi. Bernard Bang bu organizmanın tanımlanması, hücre içi yapısı ve optimal büyüme için karbondioksit ihtiyacı duyması gibi önemli özelliklerini ortaya çıkardı ve böylece *Brucella* türlerinin biyolojik davranışları hakkındaki bilgilerimize önemli katkılar sağladı. Yirminci yüzyılın başlarına, Brusellozun birçok hayvan türünü etkilediği otoriteler tarafından kabul görmeye başladı. 1914 yılında Traum, Amerika Birleşik Devletleri'nin Indiana eyaletinde düşük yapmış domuz fetüslerinden *Brucella suis*(*B. suis*)'i izole ederek domuzları enfeksiyonun bir başka önemli rezervuarı olarak tespit etti. Bu keşifler, brusellozun tek bir konakçı türüyle sınırlı olmadığını ve önemli bir zoonotik potansiyele sahip olduğunu

ortaya koyarak, hastalığın bulaşması ve kontrolü konusundaki bakış açımızı temelden değiştirdi[11].

1905 yılında Zammit, keçi ve koyunların *B. melitensis*'in rezervuar konakçıları olduğunu kesin olarak belirleyen çalışmalarıyla kritik epidemiyolojik bilgiler sağladı. Zammit, keçi sütü ve idrarından bakteriyi başarıyla izole ederek, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin brusellozun insanlara bulaşmasında önemli bir rol oynadığını doğruladı. Bu bulgunun halk sağlığı üzerinde derin etkileri oldu ve süt pastörizasyonu gibi önleyici stratejilerin temelini oluşturdu[12].

Brucella cinsi bakterilerinin taksonomik sınıflandırmasında önemli bir dönüm noktası, 1918 yılında Amerikalı bakteriyolog Alice Evans'ın Malta ateşi ve Bang hastalığından sorumlu mikroorganizmalar arasında önemli benzerlikler olduğunu göstermesiyle gerçekleşti. Evans, bu patojenlerin morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerinin karşılaştırmalı analizini yaparak, bunların aynı bakteri grubuna ait olduğunu gösterdi. Sir David Bruce'un temel katkılarının takdir edilmesi sonucunda, *Brucella* cinsi kuruldu ve bu organizmalar tek bir taksonomik tanım altında birleştirildi[13].

Türkiye’de bruselloz (Malta humması) ile ilgili ilk kayıtlar, 1915 yılına dayanmaktadır. Bu dönemde İstanbul’daki Kuleli Askeri Hastanesi’nde tedavi görmekte olan bir askerde hastalık tanımlanmış ve bu olgu, Dr. Hüsamettin Kural ile Dr. Mahmut Sabit Akalın tarafından bildirilmiştir. Aynı yıl, I. Dünya Savaşı sırasında Abdülkadir Noyan tarafından da benzer bir vaka rapor edilmiştir. Hayvanlarda görülen ilk bruselloz olguları ise 1931 yılında Zühtü Berke’nin laboratuvar analizleri ile sığırlarda, 1943 yılında ise Gölem’in koyun ve keçilerde *Brucella* bakterilerini izole etmesiyle ortaya konmuştur. Takiben, 1944 yılında Bandırma Merinos Çiftliği’nde Köylüoğlu ve Aktan tarafından *B. melitensis* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Ankara’da ise insan ve sığırlarda brusellozun varlığı ilk kez Süreyya Tahsin Aygün tarafından rapor edilmiştir. Türkiye’de *Brucella canis* enfeksiyonuna dair ilk serolojik bulgular, Diker ve çalışma arkadaşları tarafından 1984 yılında elde edilmiş; bu çalışma ile insanlarda *Brucella canis*(*B.canis*) enfeksiyonu ilk kez tanımlanmıştır[14].

2.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

2.3.1. Brucella Türlerinin Üreme Özellikleri

Brucella cinsi bakteriler, özellikle ilk izolasyon dönemlerinde besiyerlerinde yavaş üreme eğilimi göstermektedir. Laboratuvar koşullarına adapte olmuş suşlar, amonyum tuzlarını nitrojen kaynağı olarak içeren sentetik ortamlarda üreyebilse de, çoğu Brucella türü optimum gelişme için kan, serum veya doku ekstratlarıyla zenginleştirilmiş kompleks besiyerlerine ihtiyaç duyar[15]. İlk izolasyon sırasında üreme için çok sayıda amino asit ile birlikte tiyamin, biyotin, nikotinamid ve pantotenik asit içeren besiyerleri gereklidir; ancak haemin (X faktörü) ve Nikotinamid Adenin Dinükleotid (V faktörü) bu türler için zorunlu değildir[1]. Ayrıca demir ve manganez gibi eser elementler de büyüme için kritik rol oynar. Demir, bakterinin siderofor üretimi ve bakterioferritin aracılığıyla demir depolanması için gereklidir[16].

Brucella türleri protein ve pepton bakımından zengin ortamlarda üreme sırasında ortamın alkalileşmesine neden olur. Bu durum, bakterinin üremesini sınırlamakla birlikte eski kültürlerde kolonilerin çevresinde yeşilimsi-kahverengi renk oluşumuna yol açar. Üreme için optimal sıcaklık 37 °C olmakla birlikte 20–40 °C arasında da gelişim gösterebilirler. Optimal pH aralığı 6,6–7,4 olup, pH 3,5'in altına düştüğünde bakteriler hızla inaktive olur[17].

Serum dekstroza agar ve benzeri besiyerlerinde yapılan ekimlerden sonra 48–72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda koloniler görülmeye başlar. Bu koloniler küçük, yuvarlak, konveks, saydam, kaygan yüzeyli olup “şebnem tanesi” görünümünde ve S (Smooth) tipindedir. Ancak lipopolisakkaritlerin O-zincir yapısının kaybolmasıyla koloniler “Rough (R)” veya mukoid varyantlara dönüşebilir. *Brucella ovis*(*B. ovis*) ve *B. canis* türleri ise doğrudan R koloni formunda gelişim gösterir. *Brucella* kolonileri non-hemolitik ve pigmentsizdir; ancak *B. abortus* ve *B. melitensis*'in eskimiş kültürlerinde esmer renklenme gözlemlenebilir[18].

Karbondioksit gereksinim gösteren türler arasında *B. abortus* ve *B. ovis* yer almakta olup, bu bakteriler yarı katı besiyerlerinde yüzeyin birkaç milimetre altında disk şeklinde üreme paterni sergilerken, diğer türler yüzeyden dibe kadar homojen bulanıklık oluşturur.

Brucella türleri intrasellüler olmaları nedeniyle ilk izolasyon sırasında üreme zorluğu gösterebilir. Bu nedenle besiyerlerinin serum, gliserin, glikoz, et özleri, triptoz, tiamin, nikotinik asit ve biyotin gibi zengin bileşenlerle desteklenmesi üremeyi artırıcı

etki gösterir. İlk izolasyondan sonra suşlar buyyon veya jeloz gibi daha basit ortamlara adapte olabilir. Optimal sıcaklık 37 °C olmakla birlikte 10–40 °C arasında gelişim gösterebilirler; optimal pH ise 6,7–7,4'tür. DNA'daki G+C oranı yaklaşık %55–58'dir[18].

Sıvı besiyerlerinde *Brucella* türleri yavaş üreme gösterir ve homojen bulanıklık oluşturur. Ancak R tip koloniler tüp çalkalandığında granüler bir dağılım sergiler. Katı ortamlarda gelişen koloniler küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, kaygan yüzeyli olup “şebnem tanesi” görünümündedir. *B. ovis* ve *B. canis* türleri ise normal şartlarda pürüzlü (R tip) koloni oluşturur. İnokülasyondan 2–3 gün sonra koloniler mikroskopik olarak fark edilebilse de, genellikle 4–5 gün sonunda 2–3 mm çapa ulaşır[18]

2.3.2. *Brucella* Türlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Brucella türleri, temel olarak oksidatif metabolizma gösteren ve enerjiyi çeşitli amino asitler ile karbonhidrat substratlarının kullanımından sağlayan mikroorganizmalardır. Çoğu suş için i-eritritol başlıca tercih edilen enerji kaynağıdır[19]. Tüm *Brucella* türleri katalaz pozitifdir; çoğu ayrıca oksidaz pozitifdir, ancak oksidaz negatif suşların da bildirildiği kaydedilmiştir. Bu bakteriler aynı zamanda nitrat redüktaz aktivitesi göstererek nitratları nitritlere indirger[20].

Kükürt içeren amino asitlerin parçalanması sonucunda H₂S üretimi gerçekleşir ve bu özellik hem türler hem de biyovarlar arasında farklılık gösterdiği için identifikasyon basamaklarında önemli bir parametre olarak değerlendirilir[1]. Örneğin, *B. suis* suşları 3–5 gün süresince ve yüksek miktarda H₂S üretirken; *B. abortus* 2 gün süreyle daha az, *B. melitensis* ise yalnızca 1 gün boyunca ve en az miktarda H₂S üretmektedir[1].

Karbonhidrat metabolizmasında *Brucella* türleri asit veya gaz oluşturmaz; glikozu sınırlı düzeyde kullanabilirler. O-nitrofenol-β-D-galaktoz genellikle hidrolize edilmez. Proteolitik aktiviteleri zayıftır; sitrat tek karbon kaynağı olarak kullanılmaz. Asit jelatini hidrolize etmez, indol üretmez, Voges-Proskauer testi negatiftir ve metil kırmızısı testi olumsuz sonuç verir. Üreaz aktivitesi türler arasında değişkenlik gösterir: *B. suis* ve *B. canis* yüksek üreaz aktivitesine sahipken, diğer türlerde aktivite zayıftır; *B. ovis* ise üreaz negatif özelliktedir[21].

Brucella türleri aerob bakterilerdir. Özellikle *B. abortus* ve *B. ovis*'in ilk izolasyonlarında mikroaerofil özellik sergiledikleri ve üreme için %5–10 CO₂ içeren

atmosfere gereksinim duydukları, ancak laboratuvar pasajlarından sonra CO₂'siz koşullara adapte olabildikleri bildirilmiştir[22].

2.3.3. *Brucella* Türlerinin Antijenik Yapısı ve İmmünolojik Özellikleri

Brucella cinsi, farklı konaklarda brusellozun etyolojik ajanı olan, fakültatif intrasellüler, gram negatif bakterilerden oluşur. Kompleks hücre zarf yapısı ve karmaşık antijenik özellikleri nedeniyle, *Brucella spp.*'nin patogenezi, tanı ve epidemiyolojisi üzerinde farklı etkileri olan, çeşitli immünolojik davranışlar sergiler. *Brucella*'nın antijenik yapısı, esas olarak lipopolisakkarit (LPS), dış membran proteinleri (OMP'ler) ve konakçı bağışıklık sistemi ile etkileşime giren ek yüzey yapılarını içeren benzersiz dış membran bileşimi tarafından belirlenir.

Brucella spp., tipik Gram negatif hücre çeperi yapısına sahip olup, temel yapısal sütrüktürde, iç sitoplazmik membran ve çevresel peptidoglikan hücre duvarından oluşur. Ancak en dış tabakası olan dış membran, özellikle antijeniklik ve virülansın belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu dış zar, asimetric bir lipid çift tabakasıdır: iç tabakası esas olarak fosfolipidlerden oluşurken, dış tabakası enfeksiyon sırasında tanınan en immünodominant antijenler arasında yer alan yüksek yoğunlukta LPS molekülleri içerir. LPS molekülü üç alandan oluşur: lipid A, korunmuş bir çekirdek oligosakkarit ve bakteri yüzeyinden dışarıya doğru uzanan O-spesifik bir polisakkarit (O-antijen)[6].

B. abortus, *B. melitensis* ve *B. suis* gibi düzgün(smooth) *Brucella* suşlarında, O-antijeni iyi gelişmiştir ve oldukça immünojeniktir. Bu düzgün LPS (S-LPS) yapıları, konağın antikor tepkisini domine eder ve bu nedenle çoğu serolojik tanı testinde kullanılan başlıca antijenik yapıyı oluşturur. O-antijeni olarak adlandırılan bu LPS, 4-formamido-4,6-dideoxymannose homopolimerleri içerir, ancak bu şeker kalıntılarının bağlanma şekli türler arasında ve hatta bir tür içindeki biyovaryantlar arasında farklılık gösterir. Tarihsel olarak A (*abortus*) ve M (*melitensis*) olarak adlandırılan iki ana antijenik determinant, O-polisakkarit zinciri içindeki glikozidik bağların farklılıklarına karşılık gelir: A-dominant suşlar tekrarlanan α -1,2 bağlara sahipken, M-dominant suşlar epitopun konformasyonunu değiştiren periyodik α -1,3 bağları içerir. Bazı suşlar her iki epitop tipini de yaklaşık olarak eşit miktarlarda ifade ederler, bu da karışık antijenik profillere yol açar[6].

Brucella türlerinin O-antijen bileşimindeki bu yapısal farklılıklar, brusellozun tanınal serolojik reaksiyonların türler arasında neden farklılık gösterebileceğini

açıklamaktadır. *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* benzer düzgün(smooth) LPS yapılarına sahip oldukları için, *B. abortus*'tan elde edilen antijenler, düzgün koloni oluşturan türlerde brusellozu tanısı için Rose Bengal testi, kompleman fiksasyon testi ve enzim bağlı immünosorbent testleri(ELISA) gibi standart serolojik testlerde sıklıkla kullanılır. Bununla birlikte, immünojen olarak LPS'nin baskınlığı, diğer bazı gram-negatif bakterilerle önemli serolojik çapraz rekasiyon olarak bilinen bir sınırlamaya da neden olmaktadır. Bu durum, *Brucella* S-LPS'nin O-polisakkarit bileşeninin, bir dizi enterik ve çevresel bakteride yapısal olarak benzer O-antijenlere benzemesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Örneğin, düzgün *Brucella spp.* LPS ile *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'nın LPS'si arasında çapraz reaktif epitoplar olduğu ortaya konulmuştur. Bu tür çapraz reaktivite, bu diğer organizmalarla enfekte olan hayvanlar benzer LPS epitoplarını tanıyan antikorlar geliştirdiğinde, tanı testlerinde yanlış pozitif serolojik sonuçlara yol açabilir[23].

Düzgün koloni oluşturan *Brucella* suşlarının aksine, *Brucella canis* ve *Brucella ovis* gibi bazı türler doğal olarak pürüzlü(Rough) LPS (R-LPS) fenotipi sergilerler. Bu pürüzlü suşlar, uzatılmış O-antijen zincirinden yoksundur ve bunun yerine çekirdek oligosakkarit ve lipit A omurgasını (genellikle kesik formda) ortaya çıkarırlar. Sonuç olarak, pürüzsüz suşlarda hedef alınan baskın serolojik epitoplar (yani A ve M antijenleri) pürüzlü suşlarda yoktur veya önemli ölçüde azalmıştır. Dolayısıyla, standart aglütinasyon testleri gibi düzgün LPS antijenlerine karşı antikorların saptanmasına dayanan serolojik testler, genellikle *B. canis* veya *B. ovis* enfeksiyonlarını tanısında kullanıldığında, testler seronegatif sonuçlar verebilir. Bu nedenle, doğal olarak pürüzlü *Brucella spp*'nin neden olduğu enfeksiyonları doğru bir şekilde tanımlamak için pürüzlü spesifik antijenler veya rekombinant proteinler kullanan özel tanı yöntemleri gereklidir[24].

LPS'nin yanı sıra, *Brucella* dış zarı, konakçı bağışıklık tepkilerini tetikleyen ve hem teşhis hem de aşı geliştirme için araştırılan çok sayıda antijenik protein içerir. Bu dış zar proteinleri, moleküler ağırlıklarına göre birkaç gruba ayrılır. Grup 2 OMP'ler (örn. Omp2a, Omp2b) yaklaşık 36-38 kDa'lık porin benzeri proteinlerdir, Grup 3 OMP'ler ise enfeksiyon sırasında antikorlar tarafından tanınan ve rekombinant antijen bazlı testler için umut vaat eden OMP25 ve OMP31 gibi 25-34 kDa aralığındaki proteinleri içerir. 10, 16 ve 19 kDa gibi ek yüzey lipoproteinleri de *Brucella*'nın antijenik repertuarına katkıda

bulunur ve tanı özgülüğünü iyileştirmede veya aşı stratejilerinde koruyucu bağışıklık tepkilerini uyarmada yararlı olabilir[25].

Brucella türleri klasik ekzotoksinler üretmese de, LPS'leri birçok *Enterobacteriaceae* türünün yüksek toksik endotoksinlerinden belirgin şekilde farklı olmakla birlikte endotoksik aktivite gösterebilir. *Brucella* LPS'nin benzersiz kimyasal özellikleri — özellikle olağandışı lipit A yapısı ve yoğun O-polisakkarit tabakası daha güçlü endotoksinlere kıyasla nispeten düşük bir proinflamatuvar yanıtla sonuçlanır. Bu ayırt edici LPS, enfeksiyonun erken aşamalarında bağışıklık kaçışına ve bakterinin makrofajlar ve dendritik hücreler gibi konak hücrelerinde hücre içinde kalma yeteneğine katkıda bulunur. Spesifik LPS sentez genlerindeki mutasyonlar, konağın doğuştan gelen bağışıklık tanıma yeteneğini değiştirir ve virülansı zayıflatabilir, bu da LPS'nin *Brucella* patogeneziindeki merkezi rolünü vurgular[26].

Brucella türlerinin antijenik kompleksliği, laboratuvar tanıları üzerinde doğrudan etkilere sahiptir. Doğal düzgün LPS'ye dayalı serolojik testler, düzgün koloni oluşturan *Brucella* enfeksiyonlarının neden olduğu antikorları tespit etmede yüksek hassasiyetleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, büyük ölçüde diğer gram-negatif bakterilerle çapraz reaktiviteye bağlı spesifiklik sorunları ve bu testlerin pürüzlü suşlara karşı duyarsızlığı, rekombinant dış membran proteinleri ve diğer spesifik antijenleri içeren testlerin geliştirilmesi için devam eden çabaları teşvik etmektedir. Bu tür gelişmeler, enfekte ve aşılanmış bireyler arasındaki ayrımı iyileştirmeyi ve doğal olarak pürüzlü *Brucella* türleri ile enfeksiyonların doğru bir şekilde tespit edilmesini amaçlamakta ve sonuçta dünya çapında bruselloz için sürveyans ve kontrol stratejilerini geliştirmektedir[27].

2.3.4.Bulaş Yolları

Brucella cinsi bakteriler zoonotik özellik göstermekte olup, başlıca hayvansal kaynaklardan insanlara bulaşmaktadır. Etkenlerin bulaşma yolları, türün virülansı, konağın bağışıklık durumu ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bakteriler konağa girdikten sonra ilk yerleştikleri alan, genellikle giriş bölgesine yakın lenf düğümleridir. Bu bölgede çoğaldıktan sonra, vücut direncinin zayıf olduğu ve bakterinin virülansının yüksek bulunduğu durumlarda kan dolaşımına geçerek sistemik yayılım gösterirler. Özellikle meme dokusu, gebelik dönemindeki uterus, testisler, dalak

ve lenf düğümleri gibi retiküloendotelial sistemle ilişkili organlarda kalıcı olarak bulunabilmektedirler[28][29].

Dişi koyunlarda *B. melitensis* enfeksiyonlarının sıklıkla meme bezi ve uterus dokusunda yoğunlaştığı, daha nadiren de bu organlara ait lenf düğümlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Kan yoluyla meme bezine taşınan bakterilerin süt kanalları çevresinde yerleşerek intra ve interlobüler dokuda lenfositik infiltrasyon ve odaklar oluşturduğu rapor edilmiştir. Enfekte hayvanlarda kolostrum yoluyla etkenin yoğun miktarda saçılacağı, kolostrum döneminden sonra ise sütle bakteri çıkışının düzensiz ve düşük seviyede devam edebileceği belirtilmektedir. Gebeliğin ikinci yarısında, plasenta ve endometrium dokularında kolonizasyon gerçekleşerek fetusta ölüm ya da abortus gibi üreme sistemi bozukluklarına yol açabilmektedir[30]. Ayrıca bazı çalışmalar, meme ve süpermamari lenf düğümlerinden salgılanan sütte mililitre başına 1.000 ila 2.000.000 arasında *Brucella* hücresi bulunabileceğini ortaya koymuştur[1].

Erkek hayvanlarda ise *Brucella* türleri çoğunlukla testis, epididimis ve diğer genital organlarda lokalize olmaktadır. Bu lokalizasyon sonucunda orşit, epididimit, artrit ve ilerleyen dönemlerde infertilite gibi üreme bozuklukları meydana gelebilmektedir. Ayrıca semen aracılığıyla bakterilerin dişi hayvanlara veya diğer erkek hayvanlara bulaşması söz konusudur. Bu durum, özellikle sürülerde enfeksiyonun sessiz şekilde yayılmasına neden olmaktadır[31].

Gıda ve Süt Ürünleri Kaynaklı Bulaş

Brusellozisin insanlara bulaşmasında en yaygın yol, enfekte hayvanlara ait çiğ süt ve bu süttten üretilen peynir, krema ve tereyağı gibi ürünlerin tüketimidir. Özellikle pastörizasyon uygulanmamış süt ürünleri, bakterilerin uzun süre canlı kalabildiği ve tüketim sırasında konak organizmaya ulaşabildiği gıda maddeleri olarak öne çıkmaktadır[20]. Çiğ koyun sütünden yapılan peynirlerin brusellozis yönünden insan sağlığı açısından inek sütünden üretilenlere göre daha büyük risk taşıdığı bildirilmiştir. Bu durum, koyunların *B. melitensis*'e daha duyarlı olmalarından kaynaklanmaktadır[32]. Bununla birlikte yoğurt, kaşar ve tulum peyniri gibi ürünlerde bulaşma olasılığı oldukça düşüktür. Bunun nedeni, yoğurt üretimi sırasında uygulanan ısı işlem ve fermentasyon sonucu oluşan asidik ortamın *Brucella* türlerini inaktive etmesidir. Aynı şekilde kaşar peynirinde olgunlaşma ve pişirme aşamaları da bakterinin canlı kalmasını

engellemektedir. Ancak olgunlaşmadan tüketime sunulan taze peynir ve krema gibi ürünler ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır[33].

Solunum Yolu ve Mesleki Bulaş

Brucella türleri, aerosol formda solunum yoluyla da bulaşabilmektedir. Bu bulaş yolu özellikle hayvanlarla yakın temasta bulunan meslek gruplarında önem arz etmektedir. Çobanlar, çiftçiler, hayvan bakıcıları, mezbaha işçileri, kasaplar, veteriner hekimler ve laboratuvar çalışanları yüksek risk grubu içerisinde yer almaktadır. Solunum yoluyla bulaşan minimum enfektif dozun *B. melitensis* için yaklaşık 1.300 mikroorganizma, *B. abortus* ve *B. suis* için ise 100 mikroorganizmanın altında olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle aerosol bulaş, özellikle laboratuvar ortamlarında ciddi bir tehlike oluşturmakta ve *Brucella* türlerinin potansiyel biyoterörizm ajanı olarak sınıflandırılmasına neden olmaktadır[34].

İnsandan İnsana Bulaş

Brucella türlerinin insandan insana bulaşı nadir olmakla birlikte, literatürde cinsel temas veya doku nakli yoluyla bulaştığı bildirilen olgular mevcuttur. Bununla birlikte, bu bulaş yollarının halk sağlığı açısından yaygın bir risk oluşturmadığı kabul edilmektedir[35].

Laboratuvar Kaynaklı Bulaş

Laboratuvar ortamında çalışan personel için *Brucella* türleri önemli bir meslek hastalığı riskidir. Dünya Sağlık Örgütü, bu bakterileri Biyogüvenlik Seviye 3 (BSL-3) patojenler olarak sınıflandırmış ve uygun biyogüvenlik tedbirlerinin alınmasını önermiştir. Laboratuvar kaynaklı brusellozis, özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde ve biyogüvenlik önlemlerinin yetersiz olduğu durumlarda sık görülmektedir. Enfekte materyallerle doğrudan temas, iğne batmaları, mukozal sıçramalar ve aerosol inhalasyonu, başlıca bulaş yollarını oluşturmaktadır. *Brucella* izolatlarına bireysel maruziyet sonrası enfeksiyonun gelişme oranı, kontamine materyaldeki bakteri yükü ve bulaş yoluna bağlı olarak %30 ila %100 arasında değiştiği bildirilmiştir[34].

2.3.5. Brusellozis'in Epidemiyolojisi

Brusellozis, zoonotik özellik gösteren ve hem insan hem de hayvan sağlığını etkileyen önemli bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık etkeni olan *Brucella* türleri, başta

sığır, koyun ve keçi olmak üzere birçok evcil hayvanda enfeksiyona yol açmakta; ayrıca domuz, köpek, geyik, yaban domuzu ve tilki gibi yabani hayvanlarda da görülebilmektedir. Hayvanlarda enfeksiyonun temel sonucu, üreme sistemi odaklı klinik bulgular, süt veriminde düşüş, infertilite ve abortus gibi üretim kayıplarıdır. İnsanlarda ise çoğunlukla enfekte hayvanların dokularıyla direkt temas veya pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi sonucu enfekte olmaktadır. Bu nedenle brusellozis, yalnızca veteriner hekimlik açısından değil, halk sağlığı boyutuyla da küresel ölçekte dikkate değer bir hastalıktır[36][20].

Dünya genelinde brusellozis, özellikle Akdeniz havzası, Orta Doğu, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika gibi bölgelerde endemik seyretmektedir[2]. Portekiz, İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi ülkeler, hastalığın yüksek prevalansa sahip olduğu Akdeniz kuşağında yer almaktadır. Buna karşın, İngiltere, Kuzey Avrupa ülkeleri, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kanada gibi bazı gelişmiş ülkelerde, uzun yıllardır sürdürülen eradikasyon programları sonucunda hastalık tamamen ortadan kaldırılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre; yıllık yaklaşık 500.000 yeni brusellozis olgusu rapor edilmekte olup, bu rakam bildirilmeyen olgular da göz önünde bulundurulduğunda gerçekte daha yüksek olabilmektedir. Ayrıca, bazı ülkelerde resmi olarak eradike edilmiş olmasına rağmen, turizm ve göç hareketleri nedeniyle endemik bölgelerden vaka ithali görülebilmektedir.

Türkiye, coğrafi konumu ve yaygın hayvancılık faaliyetleri nedeniyle brusellozisin endemik olduğu ülkelerden biridir. Hastalığın ülkemizdeki geçmişine bakıldığında, ilk insan olgusu 1915 yılında Dr. Hüsametkin Kural ve Mahmut S. Sağlam tarafından rapor edilmiştir. Hayvan brusellozisi ise 1931 yılında sığırlarda *B. abortus*, 1943 yılında ise koyun ve keçilerde *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır[37]. Türkiye’de Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970 yılında yalnızca 37 olgu bildirilmişken, 2004 yılına gelindiğinde bu sayı 18.408’e ulaşmıştır (Sağlık Bakanlığı, 2004). Bu dramatik artışın, yalnızca gerçek prevalans artışından değil, aynı zamanda tanı ve bildirim sistemlerindeki iyileşmelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Türkiye’de yapılan seroepidemiolojik çalışmalar, brusellozis sıklığının coğrafi bölgelere ve risk gruplarına göre değişiklik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kasaplar, mezbaha ve mandıra çalışanları, veteriner hekimler ve hayvan yetiştiricileri gibi riskli meslek gruplarında seropozitiflik oranları %8,6 ile %25 arasında değişirken; risk grubu dışında kalan genel popülasyonda bu oran %0 ile %8 arasında bildirilmiştir[38].

Hayvancılığın yoğun olduğu Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ile İç Anadolu bölgeleri, hastalığın en sık görüldüğü alanlardır. Özellikle Şanlıurfa, Diyarbakır, Van, Aksaray ve Gaziantep illeri yüksek prevalans oranlarıyla dikkat çekmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2004). Kırsal alanlarda hayvansal ürünlerin çiğ tüketilmesi ve geleneksel üretim yöntemleri, hastalığın yayılımında kritik rol oynamaktadır.

Brusellozis epidemiyolojisi mevsimsel özellikler de göstermektedir. Türkiye’de hastalık her mevsimde görülse de, özellikle koyun ve keçilerin yavrulama dönemleriyle ilişkili olarak ilkbahar ve yaz aylarında vaka sayısında belirgin bir artış izlenmektedir. Bu dönem, aynı zamanda taze peynir üretiminin ve tüketiminin arttığı aylara denk gelmektedir. Dolayısıyla hem hayvan doğumları hem de süt ürünlerinin işlenme biçimi, mevsimsel dalgalanmaların temel nedenini oluşturmaktadır[39].

Cinsiyet ve yaş dağılımı incelendiğinde, gelişmiş ülkelerde brusellozis genellikle erkeklerde daha sık görülmektedir; bunun nedeni, hastalığın meslekle ilişkili risklerinden kaynaklanmaktadır. Ancak Türkiye gibi endemik bölgelerde cinsiyet farkı belirgin değildir. Bazı kırsal bölgelerde, hayvan bakımı ve süt ürünlerinin işlenmesiyle daha çok kadınların ilgilenmesi nedeniyle kadınlarda prevalansın yüksek olduğu bildirilmektedir. Hastalık sıklıkla genç ve orta yaş yetişkinlerde görülürken, çocuk ve yaşlı bireylerde insidans daha düşüktür[40][8].

Türkiye’de hayvan brusellozisinin kontrolü amacıyla yürütülen programlar, hastalığın insanlardaki prevalansını da dolaylı olarak etkilemektedir. Özellikle 1980’li yıllardan itibaren koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev 1, sığırlarda ise *B. abortus* S19 aşılarının yaygın kullanımı, kontrol programlarının temel bileşenini oluşturmuştur. 1991-1993 yılları arasında Trakya bölgesinde pilot olarak uygulanan aşılama programları, ilerleyen yıllarda ülke genelinde yaygınlaştırılmıştır. 1997 yılında başlatılan Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı projesi kapsamında yapılan geniş ölçekli serolojik taramalar, sığır popülasyonunda %1,43, koyun popülasyonunda ise %1,97 oranında seropozitiflik belirlemiştir. Bu veriler, kontrol programlarının kısmi başarı sağladığını ancak eradikasyon için yetersiz olduğunu göstermektedir[41][42][43].

Brusellozis epidemiyolojisi yalnızca hayvan popülasyonu ile değil, aynı zamanda yerel beslenme alışkanlıkları ve hijyen koşullarıyla da yakından ilişkilidir. Pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin yaygın olarak tüketildiği, hayvancılığın geleneksel yöntemlerle yapıldığı bölgelerde hastalık prevalansı yüksektir. Buna karşın, süt ve süt

ürünlerinin endüstriyel ölçekte işlendiği, hayvancılıkta biyogüvenlik önlemlerinin uygulandığı ülkelerde hastalık daha düşük oranlarda görülmektedir. Ayrıca göç, ticaret ve turizm gibi insan hareketliliği, endemik bölgelerden non-endemik bölgelere vaka taşınmasına yol açabilmektedir[44].

Sonuç olarak, bruselozis dünyanın birçok bölgesinde önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. Özellikle Türkiye gibi endemik ülkelerde, hem hayvan hem insan popülasyonlarını kapsayan entegre kontrol programlarının uygulanması büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, düzenli aşılama, serolojik taramalar, halkın bilinçlendirilmesi ve gıda güvenliği önlemleri, hastalığın kontrolü ve gelecekte eradikasyonu için kritik unsurlar olarak öne çıkmaktadır.

2.3.6. Süt Ve Süt Ürünlerinde *Brucella* Varlığı

Bruseloz etkenlerinin süt ve süt ürünlerinde hayatta kalma kapasiteleri üzerine yapılan çalışmalar, bu mikroorganizmaların farklı içsel ve çevresel faktörlere bağlı olarak uzun süre canlılıklarını sürdürebildiklerini ortaya koymaktadır. Bu özellik, *Brucella spp.*'nin relatif olarak dirençli bakteriler sınıfında değerlendirilmesine neden olmaktadır. Özellikle sıcaklık, pH, depolama süresi, ürünün yapısal özellikleri ve kullanılan üretim yöntemleri, bakterilerin canlı kalma sürelerini doğrudan etkileyen temel faktörlerdir[45]. Örneğin, *B. melitensis*'in 11–15 °C sıcaklıkta muhafaza edilen sütlerde 15 gün boyunca canlı kalabildiği, kıymız gibi fermente ürünlerde ise bu sürenin üç günle sınırlı olduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan, *B. abortus*'un sütte 0 °C'de 18 aya kadar yaşayabildiği, dondurmada 30 gün, tereyağında 142 gün, kremada 4 °C'de altı hafta ve Cheddar türü peynirlerde altı aya kadar canlılığını koruyabildiği rapor edilmiştir.

Peynir gibi süt ürünlerinin üretim ve depolama koşulları da *Brucella spp.*'nin hayatta kalma süresini doğrudan etkilemektedir. Özellikle çökelek peynirlerinde bakterilerin yaşam süresinin üç aya kadar uzayabildiği belirtilmektedir. Keçi sütünden üretilen peynirlerde ise bakterilerin 100 günden fazla canlı kalabildiği, soğuk zincir koşullarında (yaklaşık 4,4 °C) depolanan Cheddar peynirlerinde bu sürenin altı ay ile bir yıl arasında değişebildiği saptanmıştır[46]. Bu veriler, *Brucella spp.*'nin farklı süt ürünlerinde uzun süre hayatta kalabilmesi nedeniyle halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturduğunu göstermektedir.

Enfekte hayvanların sütleri ve bu sütlerden üretilen krema, peynir ve tereyağı gibi ürünler, insanlara bulaş açısından en riskli gıda maddeleri arasında yer almaktadır.

Özellikle pastörize edilmemiş süttten yapılan yumuşak peynirler, yüksek düzeyde canlı *Brucella spp.* içerebildiğinden tüketilmesi önerilmemektedir[45]. Geleneksel üretim yöntemlerinin yaygın olduğu kırsal bölgelerde bu uygulamaları değiştirmek güç olsa da, bu tür peynirlerin tüketime sunulmadan önce en az altı ay olgunlaştırılması önerilmektedir. Sert peynirler ise üretim sırasında meydana gelen laktik asit fermentasyonu ve buna bağlı pH düşüşü nedeniyle genellikle daha az risk taşımaktadır. Bununla birlikte, peynir üretimi sırasında ortaya çıkan pastörize edilmemiş peynir altı suyu hayvanlar için ek bir enfeksiyon kaynağı oluşturabilir. Ayrıca peynir yapımında kullanılan kapların yetersiz dezenfeksiyonu, çapraz kontaminasyona neden olarak *Brucella*'nın yayılımını artırabilmektedir. Benzer şekilde, peynir üretiminde kullanılan rennetin *Brucella* ile enfekte hayvanların midelerinden elde edilmesi de potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olarak tanımlanmaktadır[33].

Asidik süt ürünleri olan tereyağı, ekşi süt, ekşi krema ve yoğurt gibi gıdalarda üretim sürecinde pH düşüşü, *Brucella*'nın hayatta kalma süresini önemli ölçüde sınırlamaktadır. pH değerinin 3,5'in altına düşmesi, bakterilerin güvenilir şekilde inaktive edilmesini sağlayan kritik eşik olarak kabul edilmektedir[45]. Ancak bu ürünlerde dahi, üretim ve depolama koşullarındaki farklılıklar nedeniyle bakterilerin belirli sürelerle canlılığını sürdürebildiği bildirilmektedir.

Brucella spp.'nin canlı kalma özelliği yalnızca peynir ve tereyağı ile sınırlı olmayıp, dondurma gibi diğer süt ürünlerinde de halk sağlığı açısından risk oluşturabilmektedir. Dondurma üretiminde farklı kaynaklardan gelen sütlerin harmanlanması, olası bir kontaminasyonun yayılımını kolaylaştırmaktadır. Araştırmalar, *Brucella*'nın 37 °C'de muhafaza edilen taze pastörize edilmemiş sütte 48 saate kadar, 8 °C'de saklanan sütlerde ise birkaç gün boyunca canlı kalabildiğini göstermektedir. Ayrıca, dondurma üretimi sırasında uygulanan dondurma işleminin bakteriyi öldürmediği de rapor edilmiştir[45][47].

Brusellozisin yaygın olduğu bölgelerde, bulaşın önlenmesi için temel yaklaşım, tüm süt ve süt ürünlerinin ısıtılma işleminden geçirilmesidir. Kaynatma ya da pastörizasyon, *Brucella* bakterilerini etkili bir şekilde öldürmektedir. Pastörizasyonun mümkün olmadığı koşullarda süttün en az 80–85 °C'ye ısıtılması ve bu sıcaklıkta birkaç dakika tutulması ya da doğrudan kaynatılması önerilmektedir[48]. Bu tür ısıtılma işlemleri, özellikle çiğ süt

tüketiminin yaygın olduğu ve hijyen koşullarının sınırlı olduğu bölgelerde hastalığın kontrolünde kritik bir öneme sahiptir.

Mevcut veriler, *Brucella* türlerinin farklı süt ürünlerinde oldukça uzun süre canlılığını sürdürebildiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, *B. melitensis*'in süt içinde 11–15 °C sıcaklıkta 15 gün, kıımızda üç gün; *B. abortus*'un ise sütte 0 °C'de 18 ay, dondurmada 30 gün, tereyağında 142 gün, kremada 4 °C'de altı hafta ve Cheddar peynirlerinde altı ay boyunca canlı kalabildiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir[47][48]. Bu direnç, koyun ve keçi sütü ürünlerinde daha da belirgin olup, özellikle Akdeniz ülkelerinde brusellozis kontrolünde önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Nitekim koyun ve keçi sütünden üretilen peynirlerin insan sağlığı açısından daha yüksek risk taşıdığı, bu ürünlerdeki *Brucella*'nın yok edilmesinin daha güç olduğu bildirilmektedir[48].

Epidemiyolojik veriler, insan brusellozis vakalarının önemli bir bölümünün doğrudan hayvanlarla temas veya hayvansal ürünlerin tüketimi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. *B. abortus* enfeksiyonlarının yaklaşık %60'ının enfekte hayvanlarla doğrudan temas sonucu, %40'ının ise enfekte hayvan sütlerinin içilmesi ya da bu sütlerden hazırlanan ürünlerin tüketimiyle ortaya çıktığı rapor edilmiştir[49]. Bu durum, özellikle süt ve süt ürünlerinin hijyenik üretimi ve işlenmesi konusundaki önlemlerin brusellozis kontrolünde ne kadar kritik olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır.

2.3.7. Koruma, Kontrol Ve Eradikasyon

Brusellozis, insanlarda ve hayvanlarda kronik seyirli enfeksiyonlara neden olan zoonotik bir hastalık olup, tedavisinde çeşitli antibiyotik rejimleri kullanılmaktadır. İnsan brusellozisinin tedavi süreci genellikle uzun sürmekte ve vakaların yaklaşık %10'unda kronik enfeksiyon gelişmektedir[50]. Tedavide temel olarak tetrasiklin ve doksisisiklin gibi antibiyotikler tek başına ya da rifampisin ve streptomisin ile kombinasyon halinde tercih edilmektedir[51].

Koruma ve kontrol stratejileri, hastalığın yayılmasını önlemede kritik bir öneme sahiptir. Bu stratejilerin temel unsurları; eğitim, gıda hijyeninin sağlanması ve kişisel korunma önlemlerinin uygulanmasıdır. Bazı ülkelerde hayvancılık sektöründe çalışan risk gruplarına yönelik aşılama programları uygulanmakla birlikte, bu uygulamalar rutin hale getirilememiştir. Gelişmiş ülkelerde brusellozis riski daha iyi tanımlanmış ve kontrol altına alınmışken, gelişmekte olan ülkelerde göçebe hayvancılık faaliyetleri ve kültürel alışkanlıklar nedeniyle hayvanlarla temasın yoğun olması, hastalığın yayılımını

kolaylaştırmaktadır[51]. Özellikle göçebe toplulukların hayvanlarını daha verimli meralarda otlatma amacıyla sürekli yer değiştirmeleri, enfeksiyonun sürüler arasında hızla yayılmasına neden olmaktadır.

Gıda Kaynaklı Bulaşmanın Önlenmesi

Brusellozis'in insanlar arasında yayılımında en önemli faktörlerden biri çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketimidir. Çiğ süt tüketimi veya süt ürünlerinin yetersiz ısıl işleminden geçirilmesi, *Brucella spp.*'nin canlılığını sürdürmesine ve enfeksiyonun bulaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, süt ürünlerinin güvenli hale getirilebilmesi için pastörizasyon kritik bir adımdır. Sütün 63 °C'de 30 dakika veya 72 °C'de 15 saniye süreyle pastörize edilmesi, *Brucella* türleri dahil patojen organizmaların büyük oranda elimine edilmesini sağlamaktadır[52].

Endüstrileşmiş ülkelerde pastörizasyon ve hijyenik üretim süreçleri sayesinde brusellozis halk sağlığını tehdit eden bir hastalık olmaktan çıkmıştır. Ancak gelişmekte olan ülkelerde süt ve süt ürünleri genellikle ilçe, kasaba ve köy ölçeğinde üretildiği için hastalık insidansı halen yüksektir. Bu durumun temel nedenleri arasında hijyen eksiklikleri, geleneksel üretim yöntemleri ve hayvanların düzenli sağlık kontrolünden geçirilmemesi yer almaktadır[51].

Hayvan Brusellozisinde Kontrol Yöntemleri

Hayvan popülasyonlarında brusellozis kontrolü, enfekte ve sağlıklı hayvanların ayrılması ve düzenli serolojik tarama programları ile sağlanmaktadır. Enfekte hayvanların, özellikle abort yapanların, sürüden izole edilmesi ve en az bir ay süreyle karantina altında tutulması önerilmektedir. Serolojik testlerle enfeksiyon tespit edilen hayvanlar, bulaşmayı önlemek amacıyla sürüden uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca, enfekte hayvanların yavrularını emzirmesi engellenmeli, hayvan atıkları ve abort materyalleri uygun şekilde imha edilmelidir[43].

Hayvan brusellozunun en etkili korunma yöntemlerinden biri aşılama programlarıdır. Günümüzde en yaygın kullanılan aşı, sığırlara uygulanan *B. abortus* S19 canlı aşısıdır. Bu aşı, enfeksiyon ve abort oranlarını %60–70 oranında azaltabilmektedir. Aşının 4–8 aylık buzağılara ve seronegatif düvelere uygulanması önerilmektedir (Office International Epizootiologie, 2004). Son yıllarda geliştirilen *B. abortus* RB51 aşısı, rifampisine dirençli olması ve S19'a benzer bağışıklık sağlaması nedeniyle bazı kontrol programlarında tercih edilmektedir[53]. Küçük ruminantlarda ise *B. melitensis* Rev-1

aşısı yaygın olarak kullanılmakta olup, saha koşullarında uzun süreli immün koruma sağladığı bildirilmektedir[54].

Türkiye’de brucellozis kontrol programları çerçevesinde, hastalık çıkan bölgelerde S19 ve Rev-1 aşılarının uygulanmasına yönelik kapsamlı protokoller yürürlüğe konmuştur. Sığırlarda prevalansın %1’in üzerinde olduğu illerde 4–6 aylık dişi danalara genç S19 aşısı rutin olarak uygulanmakta, koyun ve keçilerde ise 3–8 aylık kuzu ve oğlaklara Rev-1 aşısı yapılmaktadır. Ayrıca, hastalık mihrakı görülen bölgelerde ek koruyucu aşılama ve serolojik takip testleri zorunlu kılınmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Numunelerin Toplanması, Transferi ve Saklanması

Bu tez çalışması için Bitlis il merkezi ve ilçelerinden Mayıs-Ağustos 2023 tarihleri arasında satışa sunulan ve pastörize edilmemiş 82siu çiğ koyun+keçi sütünden, 44'ü çiğ inek sütünden olmak üzere toplam 126 adet pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze peynir örneği, *Brucella spp.* cinsi patojen bakterilerin varlığı açısından incelendi.

Bitlis merkez ve bağlı ilçe ve köylerden semt pazarlarında açıktan satılan peynir örnekleri steril bistüri ve pens kullanılarak yaklaşık 100 gram kadar olacak şekilde, 200 ml hacmindeki steril plastik kaplara alındı. Peynir örneklerinin alınması esnasında satıcılara hangi hayvanın sütünden üretildiği, peynir yapımı sırasında sütün pastörizasyon işlemine tabi tutulup tutulmadığı soruları sorularak örnek bilgi formuna işlendi. Alınan tüm taze peynir örnekleri soğutucu ortam kullanılarak bekletilmeden laboratuvara ulaştırıldı ve *Brucella spp.* varlığı açısından analiz edilinceye kadar -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1 PCR Kitleri

Peynir örneklerinden *Brucella spp.* araştırılması için; peynir örneklerinin ön-ışleme protokolü uygulanmış ve nükleik asit ekstraksiyonu için manyetik boncuk tabanlı otomatize Hızlı Nükleik Asit Kiti (Zybio EXM3000 robotic system, Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) ile RT-PCR için **Bio-speedy©*Brucella spp.* RT-qPCR tanı kiti**(Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır.

3.2.2. Peynir Örneklerinden DNA ekstraksiyonu için kullanılan malzemeler ve cihazlar

1. Ependorf tüpler
2. Otomatik pipet seti (Axygen)
3. Mikropipet uçları
4. Tris EDTA solüsyonu (1X)
5. STL-B (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) solüsyonu

6. Proteinaz K solüsyonu (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye)
7. Vortex
8. Mikrosantrifüj (soğutmalı,
9. Isıtıcı blok
10. Manyetik Boncuk Tabanlı Tam Otomatize Nükleik Asit ekstraksiyon cihazı (Zybio EXM3000, Çin)
11. Mic IVD qPCR cihazı(Bio Molecular System, Avustralya)

3.2.3.Peynir Örneklerinden moleküler Çalışma Protokülü

Brucella spp. Genomik Materyal İzolasyonu

1. 1g taze peynir örneği santrifüj tüpüne alındı ve üzerine 1ml yıkama solüsyonu (Tris EDTA pH=8.0) eklendi. Steril bir eküvyon çubuğu yardımıyla homojenize edildi.
2. Tüpler vortekslendi ve 4°C'de 13.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifügasyon sonrası işleme alınan peynir numunesinin üst katmanında yağ katmanı fazla ise örneğinin üzerine 750 µl N-hekzan eklendi ve oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi. Takiben 60 saniye boyunca vortekslenerek numunedeki yağdan arındırıldı.
4. Numuneler 4000 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifügasyon sonrası oluşan lar atıldı.
5. Tüpteki pellete 750 STL-B (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) sıvısı + 50 µl 20 mg proteinaz K solüsyonu (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) eklendi.
6. Isıtıcı blokta 60°C'de 60 dakika süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sırasında tüpler 5 dakikada bir alt üst yapılarak numuneler karıştırıldı.
7. Ardından karışım 4°C'de 12.000 rpm de 4 dakika süreyle santrifüj edildi.
8. Orta fazdan alınan 200 µl örnek Zybio EXM3000 cihazında manyetik boncuk tabanlı tam otomatize nükleik asit ekstraksiyon işlemine tabii tutuldu.

Hızlı Nükleik Asit Ekstraksiyonu Manyetik Boncuk Tabanlı Tam Otomatize Nükleik Asit ekstraksiyon cihazı (Zybio EXM3000, Çin):

Bio-Speedy Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti kullanıldığı Zybio EXM3000 Nükleik Asit İzolasyon Sistemi ile total nükleik asit izolasyonu yapıldı. Robotik ekstraksiyon protokolünde ilk olarak 15 µL Proteinaz K, kitte bulunan 6 kuyulu ekstraksiyon kartuşunun ilk kuyusuna eklendi. Ön işlem sonucunda orta fazdan alınan 200 µl örnek kartuşun ilk kuyucuğuna eklendi. Kartuş standı cihaza yüklendi ve manyetik çubuk kılıfı cihaza takıldı. Cihaz dokuz dakikalık ekstraksiyon programıyla çalıştırıldı. İzolasyon tamamlandığında, kartuşun son kuyucuğundaki 80 µL izolat toplandı ve 80 µl nükleik asit ekstraksiyonu DNase/RNase free eppendorf tüplerine aktarıldı.

PCR çalışması: Ön işleme alınmış ve hızlı ekstraksiyon kiti ile total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmış peynir örneklerinden *Brucella* spp. varlığı Bio-speedy©*Brucella* spp. RT-qPCR kiti ile araştırıldı.

Brucella DNA amplifikasyonu; Bio-speedy©*Brucella* spp. RT-qPCR kitinde, *Brucella* IS711 ve 31 kDA'luk immünojenik protein (BCSP31) gen bölgelerini hedefleyen tek aşamalı ters transkripsiyon ve gerçek-zamanlı PCR (RT-PCR) Bio-speedy©*Brucella* spp. RT-qPCR tanı kiti (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda Mic IVD qPCR cihazından çalışıldı ve PCR sonuçları Sigmoida Yazılımı ile değerlendirildi.

Bio-speedy©*Brucella* spp. RT-qPCR tanı kiti içeriği

1. 2x Prime Script Mix
2. *Brucella* Spp. Oligo-Mix: FAM etiketli *Brucella* spp. hedefli nükleotidleri içerir.
3. Non-Template Control (NTC): Negatif Kontrol (Herhangi bir nükleik asit ve nükleaz içermeyen su)
4. PC Mix: Pozitif Kontrol (*Brucella* spp. Oligo-Mix içindeki hedeflerin sentetik genetik materyal karışımı)
5. İnhibisyon ve Reaktif Kontrol-NA kalıbı": Nükleik asit numunelerinden kaynaklanan inhibisyonun ve reaktiflerin kontrolü amacıyla "İnhibisyon ve Reaktif Kontrol-NA kalıbı" kullanılmaktadır. İnhibisyon ve reaktiflerin kontrolü PCR'da HEX etiketli "İnhibisyon ve Reaktif Kontrol- NA kalıbı" kullanılarak okunmaktadır.

***Brucella* IS711 ve bcsp31 Geninin PCR ile oğaltılması**

DNA rnekleri *Brucella* IS711 ve 31 kDA’luk immünojenik protein (BCSP31) gen bölgelerini hedefleyen tek aşamalı ters transkripsiyon ve gerçek-zamanlı PCR (RT-PCR) Bio-speedy©*Brucella spp.* RT-qPCR tanı kiti (Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri, İstanbul, Türkiye) ile üretici firmanın nerileri doğrultusunda Mic IVD qPCR (Bio Molecular System, Australia) cihazından çalışıldı ve PCR sonuçları Sigmoida Yazılımı ile değerlendirildi.

RT-qPCR çalışması için Rt-PCR kurulum aşamaları ve PCR alışma programı izelge.3.1’de özetlenmiştir. RT-qPCR reaksiyon hacmi 9 l olacak şekilde QPCR ekleme alanında hazırlanmış ve üzerine 2 l NA rneği eklenmiştir. Her bir qPCR çalışmasında temiz alanda 2 l Negatif kontrol (herhangi bir nükleik asit veya nükleaz içermeyen su- Non-Template Control-NTC) ve template nükleik asit ekleme alanında PC miks (*Brucella spp.* oligo-miks içerisindeki hedeflerin sentetik genetik materyal fragmanı) eklenmiştir. RT-qPCR reaksiyonu toplamda 11 l olacak şekilde hazırlanmış ve “Touch-down” RT-qPCR programıyla gerçek zamanlı amplifiye edilmiştir (izelge.3.1). RT-qPCR programında ilk aşamada 52 C’de 3 dakikalık bir enzim aktivasyonunu (ters transkripsiyon aşamasını) takiben 95C’de 10 saniye süreli bir n inkübasyon aşaması uygulandı. Sonraki aşamada, 95C’de bir saniyelik denatürasyonu takiben bağlanma ve uzama işleminde 67C’den her döngüde 1C azalma olacak şekilde 30 saniyelik bir 12 “Touch-down” döngüsü uygulandı. Ardından 95C’de 1 saniye ve 55C’de 30 saniye olacak şekilde 30 döngüde çoğalma işlemine tabii tutuldu. *Brucella spp.* amplifikasyonu için FAM ve inhibisyon kontrolü için de HEX kanallarında okuma yapıldı.

Çizelge.3.1.Rt-PCR kurulum aşamaları ve PCR çalışma programı

İÇERİK	KURULUM ALANI	EKLEME SIRASI	RT-PCR HEDEF/ İNH. ve RXN KONTROL	RT-PCR NTC	RT-qPCR PC
2X Prime Script Miks	RT-qPCR Karışım Ekleme Alanı (PCR Kabini)	1	5 µl	5 µl	5 µl
<i>Brucella Spp.</i> Oligo Miks		2	3 µl	3 µl	3 µl
Non-Template Control (NTC)		3		2 µl	(-)
İnhibisyon ve Reaksiyon Kontrol (Inh/Rxn C)	Template NA Ekleme Alanı (Kirli PCR Kabini)	4	1 µl	(-)	1 µl
Nükleik Asit (NA Template)		5	2 µl	(-)	(-)
Pozitif Kontrol (PC) Miks		6	(-)	(-)	2 µl
Toplam PCR Rxn Hacmi (µl)			11 µ	10 µl	11 µl

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Reverse Transkripsiyon	1	52°C	3 dk
Ön İnkübasyon	1	95°C	10 Saniye
Denatürasyon	12 Touch Down Döngü Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma	95°C	1 Saniye
Bağlanma ve Uzama		67°C -- 56°C	30 Saniye
Denatürasyon	30 Döngü	95°C	1 Saniye
Bağlanma ve Uzama		55°C	30 Saniye
Okuma		FAM / HEX	

4. BULGULAR

Bu tez çalışması için Bitlis il merkezi ve ilçelerinden Mayıs-Ağustos 2023 tarihleri arasında satışa sunulan ve pastörize edilmemiş 82'si çiğ koyun+keçi sütünden, 44'ü çiğ inek sütünden olmak üzere toplam 126 adet pastörize edilmemiş çiğ sütlerden yapılmış taze peynir örneği, *Brucella spp.* varlığı açısından incelendi.

Çalışmaya alınan taze peynir örnekleri, Reverse Transcription and Real-time PCR(RT-PCR) kiti kullanılarak *Brucella* IS711 ve 31 kDA'luk immünojenik protein (BCSP31) gen bölgeleri araştırıldı. İncelenmiş olan toplam 126 taze peynir örneğinin 9(%7.14)'unda *Brucella spp.* yönünden pozitif sonuçlar alındı.

Çizelge.4.1. Peynir numunelerinin alındığı odaklara göre dağılımı ve pozitif/negatiflik durumu

Pozitif/Negatif	Negatif(n)	Pozitif(n)
Odak		
Merkez	12	2
Ahlat	18	0
Tatvan	20	1
Hizan	24	4
Mutki	12	1
Adilcevaz	12	0
Güroymak	19	1
Toplam	117(%92.86)	9(%7.14)

Çalışmamızda *Brucella spp.* varlığı açısından incelenen toplam 126 peynir numunesinin 9(% 7.14)'u pozitif, 117(%92.86)'si negatif olarak bulundu. Odaklara göre pozitiflik yüzdeleri yaklaşık olarak; merkezden alınan 14 taze peynir örneğinin 2(% 14.28)'sinde, Hizan'dan alınan 28 örneğin 4(% 14.3)'ünde, Güroymak'tan alınan 20 örneğin 1(% 5)'inde, Tatvan'dan alınan 21 örneğin 1(% 4.76)'inde ve Mutki'den alınan 13 örneğin 1(%8.33)'i, *Brucella spp.* açısından pozitif bulunurken, Adilcevaz ve Ahlat'tan alınan peynir örneklerin hiçbirinde *Brucella spp.* DNA'sı saptanmamıştır.

Ahlat ve Adilcevaz ilçelerinde alınan numunelerde *Brucella spp.* varlığı açısından pozitiflik saptanmaması, bu bölgedeki süt ürünlerinde yaygın bir kontaminasyon olmadığını düşündürürse de, bu bölgelerin bruselloz açısından tamamen risksiz olduğu anlamına gelmemektedir.

Çizelge.4.1'deki değerler göz önüne alındığında, en yüksek pozitiflik oranı Merkez, Hizan ve Mutki'de, en düşük ise Ahlat ve Adilcevaz'da görülmesinde, coğrafik yapının farklılığından ve uygulanan hayvancılık yöntemleri farklılığından kaynaklanabilir.

Pozitifliğin yoğunlaştığı bölgeler, muhtemelen sıcak mevsimlerde yaylara yoğun hayvan hareketlerinin olduğu göç yolları üzerinde olmaları, hayvancılık yapısının farklı olduğu, kayıt dışı üretimin olabileceği veya hijyen kontrollerinin yeterli olmadığı alanlar olabilir.

Çizelge.4.2. Peynir örneklerinin üretildiği sütlere göre dağılımı

Örnek Türü Odak	Koyun+Keçi(n)	İnek(n)	Toplam(n)	%
Merkez	10	4	14	11.11
Ahlat	11	7	18	14.28
Tatvan	15	6	21	16.66
Hizan	16	12	28	22.22
Mutki	9	4	13	10.32
Adilcevaz	8	4	12	9.52
Güroymak	13	7	20	15.88
Toplam	82(% 65.08)	44(% 34.92)	126	100

Çizelge.4.2'deki verilere göre; çalışma örneklerinin elde edildiği odaklar %22.22 (28) oranla en fazla Hizan, bunu sırasıyla %16.66(21) ile Tatvan, %15.88(20) ile Güroymak, %14.28(18) ile Ahlat, %11.11(14) ile merkez, %10.32(13) ile Mutki ve %9.52(12) ile Adilcevaz izlemektedir.

Bölgesel üretim deseninin koyun-keçi ağırlıklı olduğunu gösteren Çizelge.4.2'deki verilerine göre; Koyun+keçi sütünden yapılan peynirler örneklerinin

%65.08(82)' ile büyük bir kısmını oluştururken, geriye kalan %44.92(44)'lik kısmını inek sütünden yapılmış peynir örnekleri oluşturmaktadır. Bu durum; bölgemizde küçükbaş hayvancılığın(koyun-keçi) daha yaygın olması nedeniyle bu tür hayvanların sütüne dayalı geleneksel peynir üretiminin daha yaygın olmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4. 3. Koyun+keçi ve inek peynirlerinde *Brucella* spp. dağılımı

Peynir türü	(n)	Pozitif(n)	Negatif(n)
Koyun+keçi	82	9	73
İnek	44	0	44
Toplam	126	9	126

Brucella spp. pozitifliğinin peynir türleriyle ilişkisini Gösteren Çizelg.4.3'teki verilere göre; 82 koyun+keçi peyniri örneğinin 9($\approx$ %10.97)'u *Brucella* spp. açısından pozitif iken, 73'i negatif olarak saptanmıştır. 44 inek sütünden yapılmış peynir örneğinin hiçbirinde(% 0) *Brucella* spp. pozitifliği saptanmamıştır. Bu sonuç, pozitifliğin tamamen koyun-keçi sütü kaynaklı peynir örneklerinde ortaya çıktığını göstermektedir.

Brucella spp. kontaminasyonunun sadece koyun-keçi sütünden yapılmış peynirlerde tespit edilmiş olması, bölgemizde koyun ve keçi popülasyonlarında *Brucella* spp. dolaşımının daha yüksek olduğu beklentisiyle uyumlu olup, Çizelge 4.3'teki veriler bu beklentiyle uyumluluk arz etmektedir.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, Bitlis ili ve ilçelerinde semt pazarlarında satışa sunulan taze beyaz peynirlerin *Brucella spp.* varlığı açısından değerlendirilmesini amaçlamıştır. Çalışmada, 82'si koyun-keçi sütünden ve 44'ü pastörize edilmemiş inek sütünden yapılmış olmak üzere toplam 126 taze peynir örneği, kantitatif gerçek zamanlı PCR-qPCR yöntemi kullanılarak *Brucella spp.* kontaminasyonu yönünden incelenmiş, örneklerin 9(%7,14)'u *Brucella spp.* varlığı açısından pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin tamamının koyun ve keçi sütünden üretilmiş peynirlerden elde edilmesi, bölgede küçükbaş hayvanların bruselloz açısından önemli bir rezervuar olduğunu düşündürmektedir. Pastörize edilmemiş inek sütünden imal edilmiş peynir örneklerinde *Brucella spp.* pozitifliğin görülmemesi, süt ürünlerinde hayvan türüne bağlı enfeksiyon dinamiklerinin besin zincirine yansması bakımından dikkat çekici bir faktör olduğu izlenimini vermektedir.

Brucella spp. varlığı özellikle pastörize edilmemiş süt ve bu süttten üretilen peynirlerde önemli bir kontaminasyon kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Isıl işlem uygulanmayan sütlerde bakterinin uzun süre canlı kalabildiği ve peynir gibi olgunlaşma süreci tamamlanmadan tüketilen ürünlerde etkenin insanlara bulaşma riskinin arttığı bildirilmektedir[55][56]. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da bu epidemiyolojik literatür bilgisiyle uyumlu olup, özellikle çiğ süt ve bu sütlerden elde edilen ürünlerin tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturmaya devam ettiğini göstermektedir.

Geleneksel süt ve süt ürünlerine olan ilginin arttığı günümüzde, yüksek besin değerine sahip bir süt ürünü olan peynirin yaklaşık 2000 türü tanımlanmıştır. Doku ve aroma özelliklerindeki farklılıklarla karakterize peynir türlerindeki bu farklılıklar, kullanılan sütün kaynağına ilişkin faktörler (hayvan türü ve ırkı, hayvanın beslenme özellikleri), hammadde nitelikleri, üretimin gerçekleştirildiği çevresel koşullar ile endüstriyel enzim uygulamaları, fermantasyon süreçlerinin yapısı ve ilgili teknolojik işlemler gibi üretim basamaklarından kaynaklanır. Küresel süt ve süt ürünleri tüketim verilerine göre 2024 yılında en fazla peynir tüketimi 9135 ton ile Avrupa birliği ülkelerinde gerçekleşmiştir. Birleşik Devletler 5956 ton ile ikinci sırada yer alırken, bunu 1367 ton ile Rusya federasyonu takip etmiştir. Bu veriler ışığında yapılan tahminler, 2027 yılı itibarıyla küresel peynir pazarı hacminin 113 USD dolarını aşacağını göstermektedir[57].

Dünyanın farklı bölgelerinde ve ülkemizde literatürde çiğ süt ile yapılan taze peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının kültür yöntemiyle bakteri izolasyonu ya da PCR tabanlı moleküler yöntemlerle bakteri spesifik gen bölgelerinin varlığının araştırıldığı çalışmalarda bildirilen oranlar oldukça farklılık göstermektedir.

Yapılan meta-analizler, taze peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı çalışmalarda, küresel düzeyde prevalansının yaklaşık olarak % 3.14–12.31 arasında değiştiği, ortalama %7.10 civarında olduğu bildirilmiştir[58]. Süt ürünlerinde en sık rastlanılan *Brucella spp.* türünün, *B. melitensis* olduğu ve peynirlerde görülme sıklığının ortalama %7.10, sütte görülme sıklığının ortalama %17 olduğu bildirilen bu meta-analizdeki veriler, hem çalışmamızda elde ettiğimiz oran(%7.14) hem de bölgemizde insan izolatlarının moleküler karakterizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada tespit edilen baskın türün *B. melitensis* olmasıyla benzerlik göstermektedir[59].

Orta Doğu bölgesindeki ülkelerde, Süt ve süt ürünlerinde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı ve 30 çalışmanın dahil edilerek gerçekleştirildiği başka bir meta analizde, süt ürünlerinde *Brucella spp.* varlığının %29, peynir örneklerinde ise ortalama %9 oranında olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz pozitiflik oranının bu meta analizde bildirilen ortalama ile büyük oranda örtüşmesi, bölgemiz epidemiyolojik koşulları açısından beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte çalışmaların gerçekleştirildiği ülkeler arasında ve hatta aynı ülkenin farklı bölgelerinde tespit edilen oranların önemli değişiklikler göstermesi ile analiz edilen çalışmaların çoğunda örneklemin süt örneklerinden(23/30) meydana gelmiş olması ve ülkemizde peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma ile temsil edilmesi, süt ve süt ürünlerinde ülkemize özgü risk değerlendirmelerinin dikkatle yorumlanması gerektiğini düşündürmektedir[60].

Gelişmiş ülkelerde uygulanan aşılama programları, serolojik taramalar, gözetim ve kontrol stratejileri gibi uygulamalar, bu ülkelerde brusellozun eradikasyonuna önemli katkılar sağlamıştır. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü(DSÖ)'nün belirlediği(Güneydoğu Asya, Amerika, Avrupa, Doğu Akdeniz, Afrika ve Batı Pasifik bölgeleri) 6 bölge arasında, süt ve süt ürünlerinde *Brucella spp.* varlığı heterojen bir dağılım göstermektedir. Latin Amerika, Afrika, Asya'nın bazı bölgelerinde ve Ortadoğu da zoonotik karakterli bu enfeksiyon ajanı halk sağlığı için hala ciddi bir tehdit olmaya devam etmekte ve Güneydoğu Asya bölgesinde bu oranın %25,55 ulaştığı bildirilmektedir[61].

Komşu ülkelerden İran'ın farklı bölgelerinde ve farklı zamanlarda taze peynirlerde *Brucella spp.* varlığının Konvansiyonel ve/veya moleküler(PCR) yöntemiyle araştırıldığı çalışmalarda, pozitiflik oranı %0-39.1 oranında olduğu bildirilmiştir. Özellikle *Brucella spp.* varlığının PCR kullanılarak gerçekleştirildiği çalışmalarda bildirilen pozitiflik oranlarının, kültür izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalara kıyasla daha yüksek bulunması dikkat çekmektedir[61][62]. Bu durum, moleküler tabanlı analiz yöntemlerin canlı bakteri içermeyen veya düşük miktarda kontamine süt ve süt ürünlerinde dahi *Brucella spp.* DNA'sını saptayabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir..

İran'ın Şiraz ilinde, 46'sı peynir olmak üzere 238 pastörize edilmemiş süt ürünlerinde *B. abortus* ve *B. melitens* prevalansını Nested PCR yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, analiz edilen tüm örneklerde %5,04(12/238) oranında pozitiflik saptanmış olmasına rağmen, peynir örneklerinin hiçbirinde(%0) *Brucella spp.* DNA'sı tespit edilememiştir[63]. İran'ın Sarab şehri ve kırsalından pastörize edilmemiş peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının kültür yöntemiyle araştırıldığı bir başka çalışmada, toplam 1000 peynir numunesin %2.2(22)'sinden etken izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, bu bölgede pastörize edilmemiş süt ürünlerinin hala önemli bir brusellloz kaynağı olduğu bildirmişlerdir[64]. İran'ın 3 farklı ilinde, 50'si geleneksel yöntemlerle imal edilen peynir örneği olmak üzere toplamda 200 süt ürününde *B. abortus* ve *B. mellitensis* kontaminasyon oranının PCR yöntemiyle araştırdıkları bir çalışmada, peynir örneklerinin %2.5 oranında pozitiflik elde edilmiştir[65].

İran'ın kuzeybatısında çiğ koyun ve keçi sütünden yapılmış 266 geleneksel peynir örneğinde *Brucella spp.*'nin yaygınlığını ve miktarını belirlemek amacıyla, qPCR ve kültür yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada. Peynirlerde *Brucella spp.* Pozitifliği qPCR ile %22.93(61/266), kültür yöntemiyle %4.51(13/266) oranında bulunmuştur[61]. Aynı ülkenin farklı bir bölgesinde 23'ü pastörize edilmemiş peynir olmak üzere toplam 208 süt ve süt ürünü örneğinde *Brucella spp.* varlığının RT-PCR ile araştırıldığı bir çalışmada, pastörize edilmemiş peynir örneklerinin %39.1'inde *Brucella spp.* DNA'sı tespit edilmiştir[66].

Çalışmamızda elde ettiğimiz %7.14'lük oran. Komşu ülkelerimizden İran'da taze peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının PCR ile araştırıldığı bu çalışmalarda elde edilen sonuçlardan %2.5'lik orandan yüksek, diğer çalışmalarda elde edilen(%22.93 ile

% 39.1) oranlardan oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bunun temel nedeninin, süttten peynir üretim uygulamaları, çiğ süttün elde edildiğı kaynaklar veya bu bölgedeki hayvan sağılığı durumundaki farklılıklarından kaynaklanıyor olabilir.

Güney Amerika ülkelerinden Brezilya'da geleneksel yöntemlerle üretilen peynirlerin mikrobiyolojik kalitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, analiz edilen peynir numunelerinin %25'inde patojenik karakter taşıyan koliform bakteriler ile *S. aureus* tespit edilmiş olmasına rağmen *Brucella spp.*'ye rastlanılmamıştır[67]. Bu çalışmanın örneklem bölgesini oluşturan bölgedeki analiz edilen peynir örneklerinin brusellozu bulaştırma potansiyeline sahip olmamalarına rağmen, insan sağılığı için patojenik mikroorganizmalar varlığının endişe verici düzeyde besin zehirlenmesi riski taşıdığı bildirilmiştir. Brezilya'nın Serro bölgesinde 55 Minas yöresel peynir örneğinde *Brucella spp.* varlığının PCR ve kültür yöntemiyle araştırıldığı bir çalışmada, peynir örneklerinin %30,9(17/50)'unda *Brucella spp.* DNA'sı tespit edilmiş olup, kültür yöntemiyle sadece 1(%1.8) örnekte bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir[68].

Brezilya'nın São Paulo şehrinde 38 peynir olmak üzere toplam 81 gıda örneğinde *Campylobacter*, *Listeria* ve *Brucella spp.* varlığının hem konvansiyonel hem de PCR ile araştırıldığı bir çalışmada, pastörize edilmemiş süttten elde edilen peynir örneklerinin %13,16(5/38)'sında *Brucella spp.* DNA'sı yönünden pozitif bulunmuştur[69]. Aynı bölgede 192 pastörize edilmemiş süttten yapılan peynir örneğı ile yapılan başka bir çalışmada da, peynir örneklerinde % 19.27(37/192) gibi bir pozitiflik oranı elde edilmiştir. Her iki çalışmada da PCR ile pozitiflik elde edilmiş olmasına rağmen, kültür yöntemiyle izolasyon gerçekleştirilememiştir[70]. Ayrıca Kolombiya'da da pastörize edilmemiş inek süttüyle geleneksel olarak üretilen yerel peynirlerde *Brucella* varlığının RT-qPCR ile araştırıldığı bir çalışmada, 27 peynir örneğinin %22.2(6/27)'sinde *Brucella spp.* tespit edilmiştir[71].

Çalışmamızda elde ettiğimiz oranla karşılaştırıldığında, kültür yöntemiyle sınırlı sayıda izolasyon gerçekleştirildiğı ancak PCR ile %22–30.9 arasında değişen pozitiflik oranlarının elde edildiğı Brezilya ve Kolombiya'daki bu çalışmalardan elde edilen bulgular, moleküler(PCR) yöntemlerin süurveyans çalışmalarında daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmaların gerçekleştirildiğı bölgelerde, yerel peynir üretiminde sütt kaynağı olarak kullanılan hayvan popölasyonlarında

brusellozun endemik olması ve bu peynirlerin, pastörize edilmemiş inek sütünden ilkel bir teknolojiyle ve hijyenik prosedürler olmadan üretilmesinden kaynaklanıyor olabilir.

Mısır'ın Mansoura şehrinde bulunan sokak satıcılarından ve süpermarketlerden toplanan 50 adet karish peyniri numunesinde geleneksel PCR yöntemi kullanılarak *Brucella spp.* DNA'sının araştırıldığı bir çalışmada, 50 analiz örneğinin %20(10)'si moleküler olarak *B. melitensis* DNA'sı yönünden pozitif bulunmuştur. Bakteri izolasyonun gerçekleştirilmediği bu çalışmada, bu peynir örneklerinin halk sağlığı açısından risk oluşturduğu bildirilmiştir[56].

İran, Mısır ve Brezilya'da süt ürünlerinde, *Brucella spp.* varlığının hem PCR ile spesifik genlerin varlığının araştırıldığı hem de kültür yöntemiyle bakteri izolasyonun gerçekleştirildiği çalışmalarda, pozitiflik oranının kültür yöntemiyle daha düşük bulunması, sadece peynir örneklerinde belli orandaki canlı bakterileri tespit edebilen kültür yöntemlerine göre, PCR tabanlı testlerin özellikle düşük düzeyli kontaminasyonları ortaya çıkarmada daha etkili olduğunu ve moleküler testlerin sürveyans çalışmaları için daha yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermektedir.

Komşu ülkelerimizden Irak'ın Basra şehrinde 100'ü çiğ süttten üretilen yerel peynir olmak üzere toplamda 300 süt ürününde *Brucella spp.* varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada, 100 yumuşak peynir örneğinin %8(8)'inden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, 4'ü *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır[72]. Irak'ın Bakuba şehrinde üretilen yerel peynirlerde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı bir başka çalışmada, 50 pastörize edilmemiş süttten üretilen peynir örneğinin %12(11)'sinden *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[73]. Irak'ın başkenti Bağdat'ta 15'i çiğ süttten yapılmış peynir olmak üzere, farklı besinlerde *Salmonella* ve *Brucella* varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı bir başka çalışmada, peynir örneklerinin %26.6(4/15)'sından *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[74].

Tunus'un dört bölgesindeki pazarlarda satılan pastörize edilmemiş inek sütünden yapılmış 102'si taze peynir örneği, 58'i Ricotta, 40'ı taze süt olmak üzere toplam 200 süt ve süt ürününün qPCR ile *Brucella spp.* varlığı açısından analiz edildiği bir çalışmada, Ricotta peynirlerinin %86,2'si, taze peynir örneklerinin ise %69,6'sının *Brucella spp.* DNA'sı yönünden pozitif olduğu bildirilmiştir[75]. Bu çalışmada tespit edilen yüksek *Brucella spp.* kontaminasyon seviyeleri ile ilgili birçok faktörünün varlığı ileri sürülmüştür. Farklı hayvanların sağımında, sütlerin ortak bir kaba toplanmasında ve

transferinde aynı kapları kullanmaları, peynir satıcılarının bütün süt ürünlerini aynı kap ile işlem yapmasının çapraz kontaminasyona neden olabileceğini ve örnekleme döneminde sürülerde *Brucella* enfeksiyonlarının artmasıyla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda elde ettiğimiz %7.14'lük oran ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir pozitiflik oranının bildirildiği bu çalışmanın sonuçları, bir ülkedeki yerel epidemiyolojik koşulların ve hayvan rezervuarlarında brusellozun önlenmesi için o ülkede uygulanan kontrol önlemleri eksikliğinin, süt ve süt ürünlerinde *Brucella spp.* kontaminasyon düzeylerini ne kadar güçlü bir şekilde etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Almanya'daki pazarlarda, süpermarketlerde ve şarküterilerde satılan, Brusellozun endemik olduğu ülkelere gelen ve çiğ süttten yapılmış 200 peynir örneğinde *Brucella spp.* DNA'sının varlığının qPCR ve bakteri izolasyonu için kültür yöntemi kullanarak araştırıldığı bir çalışmada, analiz edilen örneklerde *Brucella spp.*'nin moleküler yaygınlığının %20,5(41) olduğu bildirilmiştir. Kültür yöntemiyle canlı bakteri izole edilemeyen bu çalışmada, ithal çiğ süt peynirlerindeki *Brucella spp.* varlığının, Avrupa Birliği'ndeki gıda güvenliği standartları için hâlâ bir sorun teşkil ettiği bildirilmiş ve Avrupa'daki Bruselloz vakalarının muhtemel kaynağının ithal edilen çiğ süttten yapılmış süt ürünlerinin olabileceği bildirilmiştir[55].

Ülkemizin farklı bölgelerinde taze peynir örneklerinden konvansiyonel yöntemlerle bakteri izolasyonu gerçekleştirildiği birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ancak moleküler(PCR) yöntemlerle peynir örneklerinden doğrudan *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Moleküler yöntemler kullanılarak peynir örneklerinden doğrudan *Brucella spp.* DNA varlığının araştırıldığı bu çalışmalarda %5-22.5 oranında pozitiflik bildirilmiştir[76][77]. Konvansiyonel yöntemlerle peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı çalışmalarda ise %0-25 oranında bakteri izolasyonunun gerçekleştirildiği oldukça farklı sonuçlar bildirilmiştir[78].

Ülkemizde iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak 40 taze peynir örneğinde doğrudan *Brucella melitensis* ve *Brucella abortus* DNA varlığının PCR yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, taze peynir örneklerinde %5(2/40) oranında *Brucella abortus* DNA'sı tespit edilmiş olup, kültür yöntemiyle her iki *Brucella* türü izole edilememiştir[76]. Ülkemizin Güneydoğusunda, 80'i çiğ süttten üretilmiş peynir örneği

olmak üzere toplam 258 süt ve süt ürününde *Brucella spp.*'ye karşı oluşmuş antikorlarının indirekt ELISA ile ve DNA varlığının RT-PCR ile araştırıldığı başka bir çalışmada ise, taze peynir örneklerinin %22.5(18)' i pozitif bulunmuştur[77]. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonucun(%7.14), ülkemizde peynir örneklerinden doğrudan *Brucella spp.* DNA'sının varlığının araştırıldığı bu çalışmaların birincisinden(%5) yüksek bulunmasının, örneklem büyüklüğün farklı olması ve kullanılan ekstraksiyon ve PCR yönteminin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şanlıurfa'da gerçekleştirilen ikinci çalışmada elde edilen sonuçtan(%22.5) düşük olmasının temel nedeninin, örneklemen gerçekleştirildiği bölgenin ve mevsimin farklılığı, kullanılan ekstraksiyon ve uygulanan PCR yönteminin farklılığından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu durum, *Brucella spp.*'nin bölgemizde süt ve süt ürünlerinde varlığını sürdürdüğünü göstermekle birlikte, bazı endemik bölgelere kıyasla daha düşük kontaminasyon düzeyinde olabileceğini düşündürmektedir.

Ülkemizin bazı bölgelerinde süt ve süt ürünlerinde *Brucella spp.* varlığının farklı metodolojiler kullanılarak gerçekleştirildiği çalışmalarda bildirilen çok yüksek ve düşük oranlar(%0-25) taze peynir üretim yöntemleri veya süt kaynaklarındaki farklılıkları yansıttığı gibi, aynı ülkenin farklı bölgeler arasında bile süt ürünlerinde *Brucella* kontaminasyonun belirgin bir şekilde değişebileceğini göstermektedir.

Ülkemizde peynirlerde *Brucella spp.* varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı ve *Brucella spp.* izolasyonun gerçekleştirilemediği birçok çalışma gerçekleştirilmiş olup bu çalışmalar şu şekilde özetlenebilir.

Erzurum'da, 30 beyaz peynir örneğinin mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı bir çalışma ile aynı merkezde, 100 peynir örneği analizi ile gerçekleştirilen başka bir çalışmanın her ikisinde de *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilememiştir[79][48]. Ankara'da, 94 beyaz peynirde *Brucella* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, İstanbul piyasasından toplanan, 30'u beyaz peynir olmak üzere toplamda 90 peynir örneğinde *Brucella spp.* ve *Listeria spp.*'nin araştırıldığı bir çalışmada ve Niğde'de, 50'si çiğ koyun-keçi peyniri olmak üzere toplamda 150 peynir örneğinde *Brucella melitensis* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, bakteri izolasyonu gerçekleştirilememiştir[80][81][82]. Benzer şekilde, Kars yöresinde tüketime sunulan 50'si taze peynir olmak üzere toplam 315 süt ve süt ürününün *Brucella* varlığı açısından incelendiği bir çalışmada, süt

örneklerinin %4(1.86)'ünden bakteri izolasyonu gerçekleştirildiği halde, peynir numunelerinin hiçbirinden *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilememiştir[83].

Diyarbakır'da 100 pastörize edilmemiş süttten yapılmış taze inek peynirinde, *Brucella spp.* , *Salmonella spp.* ile *E. coli* O157 gibi bakterilerin araştırıldığı bir çalışmada, hiçbir peynir örneğinden *Brucella spp.* varlığı saptanmamıştır[84].

Ülkemizde taze peynirlerde *Brucella spp.* varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı çalışmalarda, *Brucella spp.* izolasyon oranlarının %2-20.5 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu çalışmaların bir kısmı şu şekilde özetlenebilir;

Afyonkarahisar'da 100 ev yapı taze peynir, 100'ü tulum peynir olmak üzere toplam 200 peynir örneğinde *Brucella* varlığı ve kontaminasyon düzeyini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, taze peynirlerin %8(8)'inden, tulum peynirlerin %6(6)'sından *Brucella spp.* izole edilmiştir[47]. Aynı merkezde, 100 taze peynir, 100'ü tulum peynir ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, taze peynir örneklerinin %9(9)'undan *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[85]. Sivas'ta 135'i taze beyaz peynir, 120'si salamura beyaz peynir olmak üzere toplamda 255 peynir örneğinde *Brucella spp.* varlığının konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada, salamura peynirlerin hiçbirinden *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilmemesine rağmen, 135 taze peynirin %5.9(8/135)'undan, 4'ü *B. melitensis*, 4'ü *B. abortus* olma üzere toplamda 8 izolat elde edilmiştir[86]. Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satışa sunulan 89 peynir örneğinin *Brucella spp.* varlığından araştırıldığı başka bir çalışmada %7.8(7/89) oranında izolasyon gerçekleştirilmiştir[87]. İstanbul'da bazı semt pazarlarından toplanan beyaz peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığının konvansiyenl yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada %8(8/100) oranında bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiş olup, 45'i peynir örneği olmak üzere toplam 100 süt ve süt ürünü ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, hiçbir peynir örneğinde *Brucella spp.* izole edilememiştir[88][89].

Burdur semt pazarlarında satışa sunulan 100 taze peynir örneğinde *Brucella* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, %7(7/100)'sinden *Brucella spp.* izole edilmiştir[90].

Kayseri 'deki semt pazarlarında satışa sunulan taze beyaz peynir örneklerinde *Brucella spp.*'nin varlığının araştırıldığı bir çalışmada, 100 taze peynir örneğinin% 13(13/100)'ünden bakteri izolasyonu gerçekleştirilmiştir[91]. Aynı ilde, 100'ü taze beyaz peynir olmak üzere toplamda 300 süt ve süt ürünü örneğinde *Brucella spp.* varlığının

konvansiyonel yöntemlerle araştırıldığı bir başka çalışmada, beyaz peynir örneklerinin %2(2)'sinden *B. melitensis* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[78].

Elazığ'da tüketime sunulan 30'u taze beyaz peynir ile 55'i tulum peynir olmak üzere toplam 85 peynir örneğinin *Brucella spp.* varlığı açısından incelendiği bir çalışmada, taze beyaz peynirlerin %3.33(1/30)'ünden *Brucella spp.* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[92]. Ankara'daki semt pazarlarında satılan 100 taze beyaz peynir örneğinin *Brucella spp.* varlığı açısından incelendiği bir çalışmada, analiz edilen örneklerin %4(4)'ünden izolasyon gerçekleştirilmiştir[93]. Van otlu peynir örneğinde *Brucella spp.* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, 40 peynir örneğinden, 6'sı *B. melitensis*, 1'i *B. abortus* olmak üzere toplamda 7(% 17.5)örnekten *Brucella* izolasyonu gerçekleştirilmiştir[94]. Kırıkkale'de, 70'i peynir olmak üzere 105 süt ve süt ürünüde *Brucella* varlığının araştırıldığı bir çalışmada, 35 çiğ koyun sütün yapılmış peynir örneğinin 5(%14.28)'inden *B. melitensis* izole edilmiş olup, çiğ inek sütü ve peynir örneklerinin hiçbirinden *Brucella spp.* izole edilememiştir[95].

Ülkemizde peynir örneklerinde *Brucella spp.* varlığına ilişkin bildirilen farklı oranlar, o bölgelerde gerçekleştirilen bölgesel hayvancılık uygulamaları, süt işleme teknikleri ve peynirin olgunlaşma süresi, sürülerin sağlık durumu gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda pozitif örneklerin yalnızca koyun ve keçi peynirlerinden izole edilmesi, bu hayvan türlerinin Bruselloza daha duyarlı olmasından kaynaklanabilir. Türkiye'de insan brusellozis'inin en yaygın etkeni *B. melitensis* olup, bu türün özellikle küçükbaş hayvanlardan kaynaklandığı pek çok epidemiyolojik çalışmada bildirilmiştir[96][87]. Ayrıca, koyun ve keçi sütlerinin genellikle pastörize edilmeden peynir üretiminde kullanılması ve bölgedeki taze peynir tüketim alışkanlıkları, bu türlerde pozitifliğin daha yüksek saptanmasını açıklamaktadır.

Peynirlerde *Brucella* canlılığını etkileyen başlıca faktörler, sütün pastörizasyon durumu, tuz oranı ve olgunlaşma süresidir. Sütlerin kaynatılmadan veya yetersiz ısı uygulanarak peynir üretiminde kullanılması, bakterinin hayatta kalmasına olanak tanımaktadır[97]. Bitlis'te pastörize edilmemiş süttten yapılan taze peynirlerin yaygın şekilde tüketilmesi, çiğ süttten yapılan peynir tüketimi ile *Brucella* pozitifliği arasında anlamlı ilişki bulunduğu dair raporları destekler nitelikte, bruselozun bölgemizde yaygın bir şekilde görülmesindeki en önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır[98].

Taze beyaz peynirlerin hijyen koşullarına uyulmadan üretimi ve açıkta satışa sunulması, yalnızca bruselloz değil, diğer zoonotik enfeksiyonların da bulaşması açısından risk teşkil etmektedir. Bitlis'te üreticilerle yapılan görüşmelerde, kaynatma işleminin hem peynir verimini azalttığı hem de damak tadını olumsuz etkilediği gerekçesiyle tercih edilmediği öğrenilmiştir. Ayrıca ısı işlem uygulamasında kullanılan yakıt maliyetlerindeki artışın da çiğ süt ve süt ürünleri kullanımını artıran faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Bu durum, bölgesel üretim alışkanlıklarının halk sağlığı riskleriyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma, bölgemizde pastörize edilmemiş süttten üretilen peynirlerde *Brucella spp.* varlığının RT-qPCR kullanılarak araştırıldığı ilk çalışmadır. PCR tabanlı yöntemlerle gerçekleştirilmiş diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen pozitiflik oranı, literatürde bildirilen düşük ve orta düzeydeki oranlarla uyumluluk göstermektedir. Literatürde bildirilen çalışmalar arasındaki varyasyonlar; çalışmaların gerçekleştirildiği bölgelerin Bruselloz prevalansındaki farklılıklar, örneklem büyüklüğü, incelenen peynirlerin üretim süreçleri ile bu peynirlerden *Brucella spp.* DNA'sının ekstraksiyonu ve tespiti için kullanılan PCR hedeflerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği ile açıklanabilir. Bununla birlikte, hem bizim çalışmamızda hem de PCR ile gerçekleştirilen diğer çalışmalar arasında incelenen örneklerde *Brucella spp.* DNA'sının tutarlı biçimde saptanması, taze peynir tüketiminin Bruselloz'a maruziyet açısından potansiyel bir risk kaynağı olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca ülkemizdeki insan bruselloz insidansının en yüksek olduğu bölgemizde, süt ürünlerinde *Brucella* kontaminasyonunun izlenmesinde RT-qPCR'nin duyarlı ve güvenilir bir araç olduğunu desteklemektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, Bitlis ilinde semt pazarlarında satılan taze beyaz peynirlerin %7,14'ünde RT-qPCR ile *Brucella spp.* DNA'sı tespit edilmiştir. Pozitif örneklerin tamamının koyun ve keçi sütünden üretilen peynirlerden elde edilmiş olması, literatürde yapılmış olan çalışmalarla benzerlik göstermekte ve küçükbaş hayvanların bölgede hastalığın başlıca rezervuarı olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen bulgular, Bitlis ili ve çevresinde pastörize edilmemiş sütlerden üretilen taze peynirlerin *Brucella spp.* açısından potansiyel bir halk sağlığı riski oluşturduğunu göstermektedir. Bu riskin en aza indirilmesi için, bölgemizdeki hayvan sağlığı ile ilgili programlarının güçlendirilmesi, küçükbaş hayvanlarda bruselloz kontrolünün artırılması ve geleneksel peynir üretiminde hijyen koşullarının iyileştirilmesi için tek sağlık anlayışıyla gerçekleştirilecek etkili müdahalelerin, brusellozun önlenmesi açısından kritik öneme sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] M. J. Corbel, 'Brucellosis in humans and animals.', *World Health Organization. World Health Organization*, 2006. <https://iris.who.int/handle/10665/43597>
- [2] G. Pappas, P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou, and E. V Tsianos, 'The new global map of human brucellosis', *Lancet Infect. Dis.*, vol. 6, no. 2, pp. 91–99, Feb. 2006, doi: 10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
- [3] M. N. Seleem, S. M. Boyle, and N. Sriranganathan, 'Brucellosis: A re-emerging zoonosis', *Vet. Microbiol.*, vol. 140, no. 3–4, pp. 392–398, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.
- [4] B. G. Mantur *et al.*, 'Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area', *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, no. 7, pp. 897–903, Jul. 2006, doi: 10.1099/jmm.0.46097-0.
- [5] Z. Memish, M. W. Mah, S. A. Mahmoud, M. A. Shaalan, and M. Y. Khan, 'Brucella Bacteraemia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients', *J. Infect.*, vol. 40, no. 1, pp. 59–63, Jan. 2000, doi: 10.1053/jinf.1999.0586.
- [6] S. Christopher, U. B. L., and R. K. L., 'Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis', *J. Lab. Physicians*, vol. 2, no. 02, pp. 055–060, Jul. 2010, doi: 10.4103/0974-2727.72149.
- [7] M. P. Franco, M. Mulder, R. H. Gilman, and H. L. Smits, 'Human brucellosis', *Lancet Infect. Dis.*, vol. 7, no. 12, pp. 775–786, Dec. 2007, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70286-4.
- [8] E. J. Young, *Brucella Species*, 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005.
- [9] J. Ariza *et al.*, 'Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations', *PLoS Med.*, vol. 4, no. 12, p. e317, Dec. 2007, doi: 10.1371/journal.pmed.0040317.
- [10] A. El-Sayed and W. Awad, 'Brucellosis: Evolution and expected comeback.', *Int. J. Vet. Sci. Med.*, vol. 6, no. Suppl, pp. S31–S35, 2018, doi: 10.1016/j.ijvsm.2018.01.008.
- [11] J. Godfroid *et al.*, 'From the discovery of the Malta fevers agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis', *Vet. Res.*, vol. 36, no. 3, pp. 313–326, May 2005, doi: 10.1051/vetres:2005003.
- [12] M. MM, *Madkour's brucellosis*, 2nd ed. Berlin: Springer International Publishing,

2012.

- [13] G. S. Hall, *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*, 13th ed. St. Louis: Mosby, 2014.
- [14] Z. Yumuk and D. O'Callaghan, 'Brucellosis in Turkey — an overview', *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 4, pp. e228–e235, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ijid.2011.12.011.
- [15] L. M. J. & D. E. P. G. G. Alton, *Laboratory techniques in brucellosis*, 2nd ed. Geneva: World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1975. [Online]. Available: <https://iris.who.int/handle/10665/38676>
- [16] V. L. Atluri, M. N. Xavier, M. F. de Jong, A. B. den Hartigh, and R. M. Tsois, 'Interactions of the Human Pathogenic Brucella Species with Their Hosts', *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 65, no. 1, pp. 523–541, Oct. 2011, doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102905.
- [17] P. . Quinn, *Clinical Veterinary Microbiology*, 1th ed. London: Mosby, 1994.
- [18] P. M. H. Stephen H Gillespie, *Principles and practice of clinical bacteriology*, 2th ed. John Wiley & Sons., 2006.
- [19] K. W. H Smith, A E Williams, J H Pearce, J Keppie, P W Harris-Smith, R B Fitz-George, 'Foetal Erythritol: A Cause of the Localization of Brucella Abortus in Bovine Contagious Abortion', *Nature*, vol. 193, no. 4810, pp. 47–49, Jan. 1962, doi: 10.1038/193047a0.
- [20] G. G. Alton, L. M. Jones, and D. E. Pietz, 'Laboratory techniques in brucellosis.', in *Monograph series. World Health Organization*, 1975, pp. 1–163. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/812265>
- [21] M. J. Corbel, 'Brucellosis: an Overview', in *Emerging Infectious Diseases*, Jun. 1997, pp. 213–221. doi: 10.3201/eid0302.970219.
- [22] P. Yagupsky, P. Morata, and J. D. Colmenero, 'Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis', *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1128/CMR.00073-19.
- [23] B. Hurvell, 'Serological Cross-Reactions Between Different Brucella Species and Yersinia Enterocolitica Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis', *Acta Vet. Scand.*, vol. 13, no. 4, pp. 472–483, Dec. 1972, doi: 10.1186/BF03547153.
- [24] J. Jin *et al.*, 'Immunopeptidome Landscape During Brucella melitensis Infection in Mice', *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 26, no. 18, p. 8874, Sep. 2025, doi:

10.3390/ijms26188874.

- [25] A. Bulashev and S. Eskendirova, 'Brucellosis detection and the role of *Brucella* spp. cell wall proteins.', *Vet. world*, vol. 16, no. 7, pp. 1390–1399, 2023, doi: 10.14202/vetworld.2023.1390-1399.
- [26] R. Conde-Álvarez *et al.*, 'The Lipopolysaccharide Core of *Brucella abortus* Acts as a Shield Against Innate Immunity Recognition', *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 5, p. e1002675, May 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002675.
- [27] I. M. Ahmed, S. Khairani-Bejo, L. Hassan, A. R. Bahaman, and A. R. Omar, 'Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane proteins (rOMPs) from *Brucella melitensis* in mouse model using indirect enzyme-linked immunosorbent assay', *BMC Vet. Res.*, vol. 11, no. 1, p. 275, Dec. 2015, doi: 10.1186/s12917-015-0587-2.
- [28] D. I. Bounous, F. M. Enright, K. A. Gossett, and C. M. Berry, 'Phagocytosis, killing, and oxidant production by bovine monocyte-derived macrophages upon exposure to *Brucella abortus* strain 2308', *Vet. Immunol. Immunopathol.*, vol. 37, no. 3–4, pp. 243–256, Aug. 1993, doi: 10.1016/0165-2427(93)90197-C.
- [29] K. A. Qureshi *et al.*, 'Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment—a comprehensive review', *Ann. Med.*, vol. 55, no. 2, Dec. 2023, doi: 10.1080/07853890.2023.2295398.
- [30] P. Nicoletti, 'The epidemiology of bovine brucellosis.', *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, vol. 24, pp. 69–98, 1980, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6779513>
- [31] M. Plommet, A. Serre, and R. Fensterbank, 'Vaccines, vaccination in Brucellosis', *Ann. l'Institut Pasteur / Microbiol.*, vol. 138, no. 1, pp. 117–121, Jan. 1987, doi: 10.1016/0769-2609(87)90089-5.
- [32] G. González-Espinoza, V. Arce-Gorvel, S. Mémet, and J.-P. Gorvel, 'Brucella: Reservoirs and Niches in Animals and Humans', *Pathogens*, vol. 10, no. 2, p. 186, Feb. 2021, doi: 10.3390/pathogens10020186.
- [33] Y. Yoon, S. Lee, and K.-H. Choi, 'Microbial benefits and risks of raw milk cheese', *Food Control*, vol. 63, pp. 201–215, May 2016, doi: 10.1016/j.foodcont.2015.11.013.
- [34] Ö. Ergönül, A. Çelikbaş, D. Tezeren, E. Güvener, and B. Dokuzoğuz, 'Analysis of risk factors for laboratory-acquired brucella infections', *J. Hosp. Infect.*, vol. 56, no. 3, pp. 223–227, Mar. 2004, doi: 10.1016/j.jhin.2003.12.020.

- [35] F. F. Tuon, R. B. Gondolfo, and N. Cerchiari, 'Human-to-human transmission of Brucella – a systematic review', *Trop. Med. Int. Heal.*, vol. 22, no. 5, pp. 539–546, May 2017, doi: 10.1111/tmi.12856.
- [36] G. Simpson *et al.*, 'Brucellosis in wildlife in Africa: a systematic review and meta-analysis', *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 5960, Mar. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-85441-w.
- [37] Z. Yumuk and D. O'Callaghan, 'Brucellosis in Turkey an overview', *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 4, pp. e228–e235, Apr. 2012, doi: 10.1016/j.ijid.2011.12.011.
- [38] K. Kılıç Tekin, Merve Erbağcı, Enes Şevik, 'Analysis of Epidemiological, Clinical, and Laboratory Characteristics of Patients Diagnosed with Brucellosis: A Comprehensive Study', *Namık Kemal Tıp Derg.*, pp. 163–170, Sep. 2024, doi: 10.4274/nkmj.galenos.2024.52386.
- [39] A. Ç. Altunçekiç Yıldırım, 'Ordu İlinde Bruselloz Sıklığının Araştırılması: Beş Yıllık Değerlendirme', *J. Biotechnol. Strateg. Heal. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 129–133, Aug. 2020, doi: 10.34084/bshr.733070.
- [40] F. E. Ö. A. Murat Mehli, Tekin Karşlıgil, Efgan Doğan Gayyurhan, 'The relationship between standard tube agglutination titres and the Rose Bengal test results with biochemical parameters in brucellosis', *Turkish Microbiol. Soc.*, vol. 38, no. 1, pp. 16–22, 2008.
- [41] A. Y. Tekin ŞAHİN, 'Hatay Yöresindeki Koyun ve Keçilerde Brusellozisin Seroprevalansının Araştırılması', *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.*, vol. 20, no. 5, 2006.
- [42] G. A. Nihat Yumuşak, 'Adıyaman Yöresindeki Koyun ve Keçilerde Brusellozis'in Seroprevalansının Araştırılması', *Harran Üniv Vet Fak Derg.*, vol. 3, no. 2, pp. 55–58, 2014.
- [43] S. Y. Ayşe Selma İyisan, Ömer Akmaz, Gökçen Selma Düzgün, Yusuf Ersoy, Seza Eskiizmirliler, Leyla Güler, Kadri Gündüz, Nurettin Işık, A. Kasım İçyeroğlu, Hakan Kalender, Ziver Karaman, Uğur Küçükayan, Canan Özcan, Şenay Seyitoğlu, İsmail Tuna, Taskin Tunca, 'Türkiye' de sığır ve koyunlarda brucellosis' in seroepidemiolojisi', *Pendik Vet. Mikrobiyoloji Derg.*, vol. 31, no. 1, pp. 21–75, 200AD.
- [44] S. C. Olsen and M. V. Palmer, 'Advancement of Knowledge of Brucella Over the Past 50 Years', *Vet. Pathol.*, vol. 51, no. 6, pp. 1076–1089, Nov. 2014, doi: 10.1177/0300985814540545.
- [45] O. Kuplulu and B. Sarimehmetoglu, 'Isolation and identification of Brucella spp.

- in ice cream', *Food Control*, vol. 15, no. 7, pp. 511–514, Oct. 2004, doi: 10.1016/j.foodcont.2003.08.002.
- [46] S. Öncel, 'Brusella Enfeksiyonları: Değerlendirme Ve Yönetim', *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 2, no. 3, pp. 25–30, Sep. 2016, doi: 10.30934/kusbed.358664.
- [47] Z. G. Şebnem Pamuk, 'Detection of Prevalence and contamination level of *Brucella* spp. in local cheese produced in Afyonkarahisar, Turkey', *Kocatepe Vet. J.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, May 2014, doi: 10.5578/kvj.6928.
- [48] S. Urçar, 'Erzurum İli Piyasasında Tüketime Sunulan Bazı Peynirlerde *Brucella* Spp. Varlığının Araştırılması', Atatürk Üniversitesi, 2011.
- [49] A. . Akcan Kale, 'Burdur Yöresinde Tüketime Sunulan Taze Beyaz Peynirlerde *Brucella* spp. varlığı', Selçuk Üniversitesi, 2009.
- [50] G. Delvecchio, O. Fracassetti, and N. Lorenzi, 'Brucella endocarditis', *Int. J. Cardiol.*, vol. 33, no. 2, pp. 328–329, Nov. 1991, doi: 10.1016/0167-5273(91)90366-W.
- [51] S. M. Alavi and L. Alavi, 'Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years.', *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 636–41, 2013, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009951>
- [52] A. C. Coelho, J. G. Díez, and A. M. Coelho, 'Risk Factors for *Brucella* spp. in Domestic and Wild Animals', in *Updates on Brucellosis*, InTech, 2015. doi: 10.5772/61325.
- [53] T. J. Roffe, S. C. Olsen, T. Gidlewski, A. E. Jensen, M. V. Palmer, and R. Huber, 'Biosafety of Parenteral *Brucella abortus* RB51 Vaccine in Bison Calves', *J. Wildl. Manage.*, vol. 63, no. 3, p. 950, Jul. 1999, doi: 10.2307/3802809.
- [54] D. W. Pascual, Z. I. Goodwin, E. Bhagyaraj, C. Hoffman, and X. Yang, 'Activation of mucosal immunity as a novel therapeutic strategy for combating brucellosis', *Front. Microbiol.*, vol. 13, Dec. 2022, doi: 10.3389/fmicb.2022.1018165.
- [55] W. Jansen, C. Linard, M. Noll, K. Nöckler, and S. Al Dahouk, 'Brucella-positive raw milk cheese sold on the inner European market: A public health threat due to illegal import?', *Food Control*, vol. 100, pp. 130–137, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.01.022.
- [56] M. El-Diasty, H. Shahin, M. El-Sherbini, and A. Abdelkhalek, 'Prevalence and Molecular Differentiation of *Brucella* Species in Buffalo Raw Milk and Karish Cheese in Egypt', *Zagazig Vet. J.*, vol. 50, no. 3, pp. 228–240, Sep. 2022, doi:

10.21608/zvjl.2022.145521.1184.

- [57] S. del C. Rangel-Ortega *et al.*, 'Biological control of pathogens in artisanal cheeses', *Int. Dairy J.*, vol. 140, p. 105612, May 2023, doi: 10.1016/j.idairyj.2023.105612.
- [58] M. Dadar, Y. Fakhri, Y. Shahali, and A. Mousavi Khaneghah, 'Contamination of milk and dairy products by Brucella species: A global systematic review and meta-analysis', *Food Res. Int.*, vol. 128, p. 108775, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2019.108775.
- [59] İ. H. Şahin, S. Erdenliğ Gürbilek, N. Özcan, A. M. Saytekin, and A. Güllü Yüce-tepe, 'Molecular typing of Brucella species in human brucellosis cases from Eastern Türkiye', *Rev. Científica la Fac. Ciencias Vet.*, vol. XXXIV, no. 3, pp. 1–5, Jan. 2025, doi: 10.52973/rcfcv-e34470.
- [60] A.-S. Abedi *et al.*, 'The prevalence of Brucella spp. in dairy products in the Middle East region: A systematic review and meta-analysis', *Acta Trop.*, vol. 202, p. 105241, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105241.
- [61] A. Saber Marouf, S. Hanifian, and J. Shayegh, 'Prevalence of Brucella spp. in raw milk and artisanal cheese tested via real-time qPCR and culture assay', *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 347, p. 109192, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109192.
- [62] A. Shakerian, P. Deo, E. Rahimi, A.-R. Shahjavan, and F. Khamesipour, 'Molecular detection of Brucella melitensis in sheep and goat milk in Iran', *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 15, no. 5, p. 913, May 2016, doi: 10.4314/tjpr.v15i5.3.
- [63] F. Abdali, S. Hosseinzadeh, E. Berizi, and M. Pourmontaseri, 'Prevalence of Brucella species in unpasteurized dairy products consumed in Shiraz province using PCR assay.', *Mol. Biol. Res. Commun.*, vol. 9, no. 3, pp. 117–121, Sep. 2020, doi: 10.22099/mbrc.2020.37381.1506.
- [64] A. J, 'The prevalence of Brucella abortus and Brucella melitensis in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication', *African J. Microbiol. Res.*, vol. 5, no. 12, pp. 1500–1503, Jun. 2011, doi: 10.5897/AJMR11.002.
- [65] A. Shakerian, 'Study of contamination rate in raw milk and its traditional products with Brucella abortus, and Brucella mellitensis in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari Provinces', *J Shahrekord Univ Med Sci*, vol. 17, no. 1, pp. 16–23, 2015.
- [66] et al. Moslemi E, Soltandalal M M, Beheshtizadeh M R, Taghavi A, Kheiri Manjili

- H, 'Detection of *Brucella* spp. in Dairy Products by Real-Time PCR', *Arch Clin Infect Dis*, vol. 13, no. 1, p. e12673, 2018.
- [67] B. C. Coelho Galafassi *et al.*, 'Artisanal cheeses from Minas Gerais, Brazil: microbiological quality and detection of *Brucella* spp.', *Int. Dairy J.*, vol. 173, p. 106474, Feb. 2026, doi: 10.1016/j.idairyj.2025.106474.
- [68] M. R. Silva *et al.*, 'Recovery of *Brucella* in raw milk Minas artisanal cheese approved for consumption by official inspection agency in Brazil: assessment of prevalence and risk factors through One Health integrated approaches', *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 116, no. 11, pp. 1091–1099, Nov. 2022, doi: 10.1093/trstmh/trac083.
- [69] P. D. F. Kobayashi, A. F. de Carvalho, R. C. Fredrigo, A. M. Costa, R. M. Piatti, and E. S. Pinheiro, 'Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo', *Semin. Ciências Agrárias*, vol. 38, no. 4, p. 1897, Aug. 2017, doi: 10.5433/1679-0359.2017v38n4p1897.
- [70] S. Miyashiro *et al.*, 'Detection of *Brucella abortus* DNA in illegal cheese from São Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR)', *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 38, no. 1, pp. 17–22, Mar. 2007, doi: 10.1590/S1517-83822007000100005.
- [71] Z. E. Soto-Varela, C. G. Gutiérrez, Y. De Moya, R. Mattos, H. J. Bolívar-Anillo, and J. L. Villarreal, 'Molecular detection of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Brucella* spp. in fresh artisanal cheese marketed in the city of Barranquilla: A pilot study', *Biomédica*, vol. 38, pp. 30–36, Aug. 2018, doi: 10.7705/biomedica.v38i3.3677.
- [72] B. A. Abbas and A. B. Talei, 'Isolation, Identification And Biotyping Of *Brucella* Spp. From Milk Product At Basrah Province', *Basrah J. Vet. Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 152–162, Jun. 2010, doi: 10.33762/bvetr.2010.55133.
- [73] I. I. K. Suhail Jawdat Fadhil, 'Investigation of *Brucella* spp. from locally produced cheeses in Baquba city-Iraq', *Diyala J. Pure Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 83–90, 2016.
- [74] S. T. Abdallah, N. M., & Ahmed, 'Prevalence of Multidrug-Resistant *Salmonella* and *Brucella* from Minced Meat, Chicken Meat, Cheese and Raw Milk Samples in Baghdad', *Biochem. Cell. Arch.*, vol. 20, no. 2, pp. 4189–4195, 2020.
- [75] A. Béjaoui, I. Ben Abdallah, and A. Maaroufi, 'Brucella spp. Contamination in Artisanal Unpasteurized Dairy Products: An Emerging Foodborne Threat in

- Tunisia', *Foods*, vol. 11, no. 15, p. 2269, Jul. 2022, doi: 10.3390/foods11152269.
- [76] H. Öngör, B. Çetinkaya, M. Karahan, and H. Bulut, 'Evaluation of Immunomagnetic Separation–Polymerase Chain Reaction in Direct Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from Cheese Samples', *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 3, no. 3, pp. 245–250, Sep. 2006, doi: 10.1089/fpd.2006.3.245.
- [77] K. O. and T. O. Altun SK, Yiğın A, Gürbilek SE, Gürbüz S, Demirci M, 'An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Brucella* Specific Antibody and Real-Time PCR for Detecting *Brucella* Spp . in Milk and Cheese in Şanlıurfa , Turkey.', *Pak Vet J*, vol. 37, no. 1, pp. 39–42, 2017.
- [78] A. F. Erdoğan S, Abay S, 'Çiğ Süt ve Peynirlerden *Brucella* spp. İzolasyonu ve Elde Edilen İzolatların Fenotipik ve Moleküler Yöntemler ile Biyotiplendirilmesi', *Erciyes Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.*, vol. 15, no. 2, pp. 94–102, 2018.
- [79] K. M. Sert S, 'Erzurum Piyasasında Taze Olarak Tüketime Sunulan Beyaz Peynirlerin Hijyenik Kaliteleri Üzerinde Bir Araştırma', *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Derg.*, vol. 15, no. 1, pp. 3–4, 2011.
- [80] Y. Ayaz, 'Ankara Piyasasında Satılan Beyaz Peynirlerde Brucellosis Etkenlerinin Araştırılması', *Etlik Vet. Mikrobiyoloji Derg.*, vol. 5, no. 10, pp. 109–116, 1986.
- [81] D. Parlakgöl, 'Brucella ve *Listeria* bakterilerini peynirden ayırabilmek için balıklı besiyerinin geliştirilmesi ve İstanbul'da satılan peynirlerde bu bakterilerin araştırılması', 1991.
- [82] ve S. A. F. Karadal, N. Ertas Onmaz, C. Bağcı, Y. Yıldırım, S. Al, 'Niğde İlinde Satışa Sunulan Koyun-Keçi Sütü ve Peynirlerinde *Brucella melitensis* ve Biyotiplerinin Araştırılması', *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, vol. 13, no. 2, pp. 101–108, 2016.
- [83] G. Gulbaz and U. Kamber, 'The Detection of *Brucella* Bacteria with PCR and Bacteriological Method in Raw Milk and Some of the Dairy Products Which Are Consumed in Kars', *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Vet. Med.*, vol. 73, no. 1, May 2016, doi: 10.15835/buasvmcn-vm:11820.
- [84] H. B. Mehmet Emin Erkan, Simten Yesilmen, Aydın Vural, 'Study for Determining the Presence of *Brucella* spp, *Salmonella* spp, *E. coli* O157 and Some other Gram Negative Microorganisms in Fresh Cow's Cheeses', *Int. J. Nutr. Food Sci.*, vol. 3, no. 5, p. 443, 2014, doi: 10.11648/j.ijnfs.20140305.22.
- [85] A. L. Kara R, 'Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarahisar', *Br. J. Dairy Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 5–8, 2013.

- [86] A. Ataş, M., Poyraz, Ö., Alim, A., Ataş, A. D., & Çelik, 'Investigation of Brucella in the Fresh White Cheeses and Brine for Pickling Cheeses Sold in Central of the Sivas', *Turk Hij Den Biyol Derg*, vol. 64, no. 2, pp. 9–14, 2007.
- [87] T. D. Alim A, 'Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerin Brucella yönünden araştırılması', *Mikrobiyol Bült*, vol. 39, no. 2, pp. 219–223, 2005.
- [88] S. A. NAMİN, 'İstanbul'da Bazı Semt Pazarlarına Toplanan Beyaz Peynir Örneklerinde Brucella Bakterilerinin Aranması', İstanbul Üniversitesi, 1990.
- [89] A. Mohamed, Riham Mohamed Hamid, Ünver Alçay, 'Investigation of the presence of Brucella Species in milk and dairy products in Istanbul', *Anadolu bil Mesl. yüksekokulu Derg.*, vol. 15, no. 59, pp. 263–290, 2005, doi: 10.17932/IAU.ABMYOD.2006.005/abmyod_v15i59003.
- [90] A. S. A. Kale, 'Burdur yöresinde tüketime sunulan taze beyaz peynirlerde Brucella spp. varlığı', Selçuk Üniversitesi, 2009.
- [91] K. Buğdaycı, 'Kayseri ilinde çiğ sütlerden yapılan taze beyaz peynirlerde brucella spp. aranması', İstanbul Üniversitesi, 2003.
- [92] A. H. Patır, B., Dinçoğlu, 'Elazığ'da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde Brucella spp'nin varlığı üzerine araştırmalar', *Firat Üniversitesi Sağlık Bilim. Derg.*, vol. 15, no. 1, pp. 15–22, 2001.
- [93] T. M., 'Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin Brucellosis riski yönünden incelenmesi', Ankara Üniversitesi, 1992.
- [94] Y. H. Sancak YC, Boynukara B, 'Van otlu peynirlerinde Brucella'ların varlığı ve dayanma süresinin saptanması', *Veterinarium*, vol. 4, no. 1, pp. 1–3, 1993.
- [95] A. Kasimoğlu, 'Determination of Brucella spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kirikkale.', *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, vol. 109, no. 7, pp. 324–6, Jul. 2002, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161972>
- [96] G. Tantillo, A. Di Pinto, A. Vergara, and C. Buonavoglia, 'Polymerase Chain Reaction for the Direct Detection of Brucella spp. in Milk and Cheese', *J. Food Prot.*, vol. 64, no. 2, pp. 164–167, Feb. 2001, doi: 10.4315/0362-028X-64.2.164.
- [97] K. Y. Méndez-González, R. Hernández-Castro, E. M. Carrillo-Casas, J. F. Monroy, A. López-Merino, and F. Suárez-Güemes, 'Brucella melitensis Survival During Manufacture of Ripened Goat Cheese at Two Temperatures', *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 8, no. 12, pp. 1257–1261, Dec. 2011, doi: 10.1089/fpd.2011.0887.

- [98] S. A. Adetunji, G. Ramirez, A. R. Ficht, L. Perez, M. J. Foster, and A. M. Arenas-Gamboa, 'Building the Evidence Base for the Prevention of Raw Milk-Acquired Brucellosis: A Systematic Review', *Front. Public Heal.*, vol. 8, Mar. 2020, doi: 10.3389/fpubh.2020.00076.

