



Çiğ Süt ve Peynirlerden *Brucella* spp. İzolasyonu ve Elde Edilen İzolatların Fenotipik ve Moleküler Yöntemler ile Biotiplendirilmesi*

Sevgi ERDOĞDU¹, Seçil ABAY², Fuat AYDIN²

¹Ahi Evran Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kırşehir-TÜRKİYE

²Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri-TÜRKİYE

Özet: Bu çalışmada, Kayseri ilinde tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *Brucella* spp.'nin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Bu amaçla 100 adet çiğ süt, 100 adet taze beyaz peynir ve 100 adet salamura beyaz peyniri olmak üzere toplam 300 örnek materyal olarak kullanıldı. Örneklerden *Brucella* spp. izolasyonu için, Farrell yönteminden (Farrel Broth'da ön zenginleştirmeyi takiben Farrell agara ekim) yararlanıldı. İzolatların identifikasyonu, fenotipik testler ve Abortus Melitensis Ovis Suis-Polymerase Chain Reaction, (AMOS-PCR) ile yapıldı. Çalışmada, süt örneklerinin birinden (%1) ve peynir örneklerinin ikisinden (%2) *Brucella* spp. saptanırken salamura peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadı. İzolatların fenotipik identifikasyonu sonucunda süt örneğinden elde edilen izolat, *Brucella abortus* biyotip 1, taze peynirden elde edilen izolatlar ise *Brucella melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Ayrıca izolatlar AMOS-PCR ile de tür ve biyotip düzeyinde doğrulandı. Sonuç olarak, Kayseri şehir merkezinde satışa sunulan süt ve peynirlerde belirlenen *Brucella* spp. izolasyon oranlarının düşük olmasına rağmen enfeksiyonun şiddeti dikkate alındığında, *Brucella* türlerini içeren süt ve peynirlerin, halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: AMOS-PCR, *Brucella* spp., peynir, süt

Isolation of *Brucella* spp. from Raw Milk and Cheese and Biotyping of Recovered Isolates by Phenotypic and Molecular Methods

Summary: In this study, it was aimed to investigate *Brucella* spp. in cow raw milk and cheeses presented for consumption in Kayseri province by conventional and molecular methods. For this purpose, A total of 300 samples consist of 100 raw milk, 100 fresh white cheese and 100 pickled white cheese were used as material. The Farrell method (following pre-enrichment in Farrell broth, culture was made in Farrell agar) was utilized for the isolation of *Brucella* spp. from samples. Phenotypic tests and Abortus Melitensis Ovis Suis-Polymerase Chain Reaction, (AMOS-PCR) were used for the identification of the isolates. *Brucella* spp. could not be detected from pickled cheese while one of the (1%) milk samples and two of (2%) fresh cheese samples examined were found to be positive for *Brucella* spp. in this study. One isolate from milk and two isolates from fresh cheese were identified as *B. abortus* biotype 1 and *B. melitensis* biotype 3 with phenotypic tests respectively. In addition, isolates were also confirmed at the species and biotype level by AMOS-PCR. As a result, although the lower rate of isolation of *Brucella* in milk and cheeses sold in Kayseri city, considering the severity of the infection, indicates that milk and cheeses containing *Brucella* species poses a potential risk for public health.

Key words: AMOS-PCR, *Brucella* spp., cheese, milk

Giriş

Brusellozis, insan ve hayvanlarda ciddi klinik bulgular ve ekonomik kayıplara neden olan önemli zoonotik hastalıklardan biridir (19,58). Konak spesifitesi, fenotipik özellikler, virulens çeşitliliği ve genotiplendirme verileri temelinde, *Brucella* cinsinde *B. abortus*, *B. melitensis*, *B.*

suis, *B. canis*, *B. ovis* ve *B. neotomae* olmak üzere altı tür ve bu türlere ait 15 biyovarin varlığı bilinmekte iken (24,57) son yıllarda *Brucella* cinsine *B. pinnipedia*, *B. cetaceae*, *B. microti*, *B. inopinata* ve *B. papionis* sp. nov. olmak üzere yeni türler dahil edilmiştir (15,45,56,57).

Enfeksiyon, hayvanlardan insanlara doğrudan temas, kontamine süt ve süt ürünlerinin taze olarak tüketilmesi, enfekte damlacıkların inhalasyonu ve bazen et tüketimi ile bulaşmaktadır (18,19). Gelişmiş ülkelerde tamamen ortadan kaldırılmakla birlikte, hayvancılığın yoğun yapıldığı, çiğ süt ve süt ürünlerinin tüketiminin yaygın

Geliş Tarihi/Submission Date : 21.02.2017
Kabul Tarihi/Accepted Date : 22.08.2017

*Bu araştırma, ilk isimli araştırmacının yüksek lisans tezinden üretilmiş olup Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSY-11-3592 nolu proje ile desteklenmiştir.

olduğu ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde halen önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (18).

İnsan brusellozisi, veteriner hekimler, çiftçiler, çobanlar, hayvan bakıcıları, süt ve peynir imalathanelerinde çalışanlar, kasaplar ve mezbaha işçilerinde görülen bir meslek hastalığı olarak tanımlanmıştır (19). Hastalık etkeni, insanlarda titreme ile yükselen ateş sonrası kas ve şiddetli eklem ağrıları ile seyreden, uzun süreli sistemik bir enfeksiyon meydana getirir (18,19).

Brusellozisin bulaşmasında en önemli vasıta süttür. Bunun dışında taze peynir ürünleri özellikle keçi ve koyun peynirleri bulaşmadan ikinci derecede sorumlu besinlerdir. *Brucella* bakterileri bu ürünlerde 20 gün ile 3 ay arasında değişen sürelerde canlı kalabilmektedir. Et ürünleri bruselloz için nadiren kaynak oluştururlar. Bu durumun çiğ et tüketim oranlarının düşük olması ve kas dokusu içindeki mikroorganizma sayısının çok düşük olması ile ilgili olabileceği bildirilmiştir (58).

Ülkemizde süt ve süt ürünleri (beyaz peynir, tereyağı, krema, kaymak, dondurma vb.) sevilerek tüketilmektedir. Yöresel taze peynir yapımı çiğ sütün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir randımanı) tercih nedenidir. Özellikle taze peynir, tereyağı ve krema gibi ürünler, pastörize edilmemiş sütlerden yapıldığı bölgelerde insanlar için enfeksiyonun kaynağını oluşturur.

Brusellozisin tanısında direkt ve indirekt yöntemler kullanılmaktadır. İndirekt tanı için çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır. Bu testler hızlı, pratik ve az maliyetli olmasına rağmen, bazı durumlarda yanlış pozitif veya negatif sonuçlar verebilmektedirler (33). Ayrıca bazı durumlarda kesin tanı için birden fazla testin bir arada kullanılması gerekebilmektedir. Yine sütlerde *Brucella* bakterilerine ait DNA'nın saptanması esasına dayanan moleküler analizden de yararlanılmaktadır (49). *Brucella* spp.'nin izolas-

yonuna dayanan kültürel yoklamalar "Altın Standart" olarak kabul edilmekte ve her zaman geçerliliğini korumaktadır.

AMOS PCR, *Brucella* türlerinin identifikasyonu için kullanılan önemli PCR analizlerinden biridir. Bu yöntem, *Brucella* kromozomunda yerleşen IS711 sekansının türe özgü lokalizasyonundan kaynaklanan polimorfizm üzerine kuruludur ve *B. abortus*'u (biyovar 1, 2, ve 4), *B. melitensis*'i (biyovar 1, 2 ve 3), *B. ovis*'i ve *B. suis*'i (biyovar 1) identifiye edebilmektedir (12). Bu metot, son zamanlarda *B. abortus* S19 ve RB51 aşı suşları gibi ek suşların da tanımlanabilmesi ve türlerin tanımlanma performansının artırılması için yeni spesifik primerler eklenerek modifiye edilmiştir (12,16).

Bu çalışmada, Kayseri ilinde pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan çiğ süt ve peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığının konvansiyonel kültür yöntemi ve AMOS-PCR ile araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Süt ve peynir örnekleri

Çalışmada, Mayıs-Haziran 2012 tarihleri arasında, Kayseri ilinde pazar, market ve şarküterilerde tüketime sunulan çiğ inek sütü (100 adet), taze beyaz peynir (100 adet) ve salamura beyaz peynirlerden (100 adet) alınan toplam 300 örnek materyal olarak kullanıldı.

Süt örnekleri 50'şer mL, peynir örnekleri ise steril bistüri ve pens yardımıyla yaklaşık 100 gram olacak şekilde steril plastik kaplara alınarak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Örnekler, analizler yapılincaya kadar +4°C'de saklandı.

Standart suş

Brucella spp. izolasyonu, izolatların fenotipik testler ve moleküler analiz ile identifikasyonu aşamalarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunan *B. melitensis* ve *B. abortus* saha suşları (koyun ve sığır abort vakalarından izole edilen ve PCR ile tanımlanan) kullanıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerler ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Sequence 5'-3'	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT		
<i>B. melitensis</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA	731	Bricker ve Halling, 1994 (12)
<i>B. abortus</i>	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC	498	
<i>B. ovis</i>	CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG	976	

DNA ekstraksiyonu

Brucella izolatlarından DNA izolasyonu, MoBio Ultra Clean™ Microbial DNA (Mo Bio Laboratories, 12224-250, ABD) ekstraksiyon kiti ile yapıldı.

Primerler

AMOS-PCR testinde IS711, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. ovis* primerleri kullanıldı (Tablo 1).

***Brucella* spp. izolasyonu**

Süt örnekleri 6000-7000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üstteki kaymak tabakası uzaklaştırıldıktan sonra alt kısımda yer alan süt örneğinden 5'er mL alınarak ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 45 mL Farrell broth [(*Brucella* Broth (Himedia M.348, Hindistan), %5 at serumu (Oxoid SR0035, İngiltere), 10g/L Glikoz (Merck 1.083461000, Almanya), 1vial/500mL *Brucella* Selective Supplement (Oxoid SR0083A, İngiltere)] bulunan iki tüpe ilave edildi. Tüpler 37°C'de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise %5-10 CO₂'li (Thermo Scientific™, CN0025A, ABD.) ortamda her gün karıştırılarak inkübe edildi.

Her bir peynir örneğinin farklı bölgelerinden yaklaşık 10 gram alındı. Steril stomacher poşetlerine konuldu. Üzerine 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ilave edildi ve stomacherde orta hızda 3 dk karıştırılarak homojen hale getirildi. Ön zenginleştirme amacıyla içerisinde 90 mL Farrell broth bulunan iki stomacher poşeti alındı. Homojen hale getirilmiş peynir örneğinden 10'ar mL alınarak bu poşetlere ilave edildi. Stomacher poşetlerinin ağızları lastik ile gevşek olarak kapatıldı. Ekim yapılan stomacher poşetleri, 37°C'de 5 gün süreyle biri aerob, diğeri ise %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresince ekim yapılan poşetler yavaşça karıştırıldı. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan süt ve peynir örneklerini içeren tüp ve stomacher poşetleri karıştırıldıktan sonra her birinden 0.1 mL alınarak Farrell agara [*Brucella* Medium Base (Himedia M.1638, Hindistan), %5 at serumu (Oxoid SR0035, İngiltere), 1vial/500ml *Brucella* Selective Supplement (Oxoid SR0083A, İngiltere)] ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petripler ilk izolasyonda kullanılan atmosferde 37°C'de 3-5 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda etüvden çıkarılan petripler *Brucella* spp. yönünden incelendi. *Brucella* spp. şüpheli kolonilerden kanlı agara pasaj yapılarak saf kültürler elde edildi.

***Brucella* spp.'nin fenotipik yöntemler ile identifikasyonu**

Makroskobik morfolojilerine göre *Brucella* spp. şüpheli kolonilerden elde edilen saf kültürlerin identifikasyonu için; Gram boyama, katalaz, oksidaz, hareket, CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, üreaz aktivitesi, boya tolerans testleri, monospesifik serumlarla aglutinasyon gibi fenotipik testler yapıldı (11).

***Brucella* spp.'nin AMOS-PCR ile identifikasyonu**

Süt ve peynir örneklerinden izole edilen ve fenotipik testlerle identifiye edilen *Brucella* spp. izolatları, AMOS-PCR ile moleküler olarak incelendi (12). PCR işlemi, AMOS-PCR yöntemine göre aşağıda bildirildiği gibi yapıldı.

Toplam 50 µL hacimde hazırlanan PCR karışımı için, 10xPCR buffer (Applied Biosystems N8080129, ABD), 1.5 mM MgCl₂ (ThermoFisher R0971, ABD), her bir dNTP (ThermoFisher R0241)'den 0.25mM, IS711 primerinden 1 µM olmak üzere, diğer primerlerden (*B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. ovis*) 0.2'şer µM ve 1U taq DNA polimeraz enzimi (ThermoFisher EPO402) kullanıldı. Karışımın üzerine 5 µl ekstrakte edilmiş hedef DNA ilave edildi. PCR'de kullanılan amplifikasyon koşulları; 95°C'de 1.15 dk denatürasyon, 55.5°C'de 2 dk primer bağlanması ve 72°C'de 2 dk primer uzamasından oluşan 35 siklus ve 72°C'de 5 dk final uzamadan oluştu. Amplifikasyon sonucunda elde edilen PCR ürünleri, etidium bromide ilave edilmiş (3µL/50mL), % 1.5'lik agaroz jelde; 120 volt gerilimde 500 A'de 60 dk, elektroforez işlemine tabi tutulduktan sonra, jel dökümantasyon sistemi (Vilber Lourmat, Fransa) kullanılarak görüntülendi. Bu test sonunda *Brucella* türleri; jeldeki bantlar, beklenen bant büyüklükleri karşılaştırılarak belirlendi (Tablo 1).

Aşı suşu ve saha suşlarının fenotipik testlerle ayırımı

Bu amaçla Erdenliğ Gürbilek ve ark. (21)'nin bildirdiği yöntemden yararlanıldı. *B. abortus* S19 aşı suşunun saha suşundan ayırımı için; 5 IU penisilin/mL, 1 mg/mL i-eritritol ve 2µg/mL tiyoinin mavisinin ilave edildiği üç ayrı serum dekstroz besiyerinde üreme testleri kullanıldı. Ayrıca izolatın üremesi için CO₂ gereksinimi değerlendirildi. *B. melitensis* izolatlarının, *B. melitensis* Rev-1 aşı suşundan ayırımı için; 20 µg/mL bazik fuksin ve tiyoinin, 2.5 µg/mL streptomisin ve 5 IU penisilin/mL ilave edilen dört ayrı serum dekstroz besiyerinde üreme testleri kullanıldı.

Bulgular

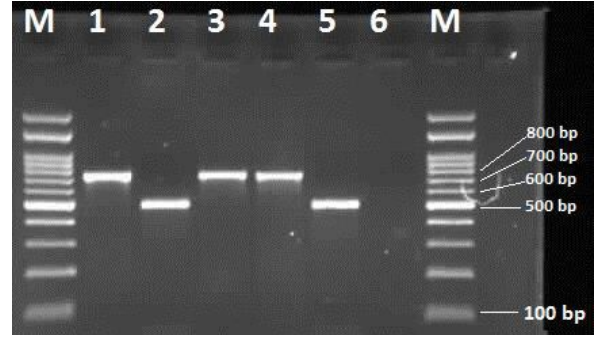
Fenotipik testlerle *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları

Çalışmada incelenen 100 adet çiğ inek sütü örneğinin biri (%1) *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolat fenotipik testlerle *B. abortus* biyotip 1 olarak tanımlandı (Tablo 2, Tablo 3). İncelenen 100 adet taze peynir örneğinin ikisi (%2) *Brucella* spp. yönünden pozitif bulundu. Bu izolatların her ikisi de fenotipik testlerle *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Salamura peynir örneklerinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi (Tablo 2, Tablo 3). İzolatların fenotipik özellikleri ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 2'de verilmiştir.

Brucella spp.'nin AMOS-PCR ile identifikasyon sonuçları

Sütten izole edilen ve fenotipik testlerle tanımlanan bir adet *B. abortus* izolatı için AMOS-PCR sonucunda 498 bp'de bant belirlendi. AMOS-PCR analizi *B. abortus*'un 1, 2 ve 4 biyotiplerini (498 bp) saptamaktadır. Bu izolat *B. abortus* biyotip 1, 2 ve 4 pozitif olarak saptandı (Şekil 1).

Taze peynir örneğinden izole edilen ve fenotipik testlerle tanımlanan 2 adet *B. melitensis* izolatı için, AMOS-PCR analizi sonucunda 731 bp'de bant belirlendi. AMOS-PCR, *B. melitensis*'in 3 biyotipini de saptamakta olup bu izolatlar moleküler analizle *B. melitensis* biyotip 1, 2 ve 3 pozitif olarak saptandı (Şekil 1). Böylece fenotipik testler ile tanımlanan izolatlar moleküler analiz ile de doğrulandı.



Şekil 1. *Brucella* spp. izolatlarına ait AMOS-PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez (%1.5) görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder, 1: Pozitif Kontrol *B. melitensis* (731 bp) 2: Pozitif kontrol *B. abortus* (498 bp), 3-4: *B. melitensis* (taze peynir izolatı) 5: *B. abortus* (süt izolatı), 6: Negatif kontrol, steril distile su.

Aşı suşu ve saha suşlarının fenotipik testlerle ayırımı

Çalışmada elde edilen hem *B. abortus* hem de *B. melitensis* izolatlarının fenotipik testler sonucunda aşı suşu olmadıkları saptandı.

Tablo 2. Tanımlanan *Brucella* spp. izolatlarının fenotipik test sonuçları

Tür	Kaynak	Biyotip	CO ₂ ihtiyacı	H ₂ S üretimi	Üreaz aktivitesi	Boyalarda Üreme			Aglütinasyon		Tb fajı ile lizis (RTD)	
						Thionin			Anti A			Anti M
						a	b	c	b	c		
<i>B. abortus</i>	Süt	1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. melitensis</i>	Taze peynir	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

a: 1/25000 b: 1/50000 c: 1/100000

A: Monospesifik abortus antiserumu

M: Monospesifik melitensis antiserumu

RTD: Rutin test dilasyonu

Tablo 3. Süt ve peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyon ve identifikasyon sonuçları

Kaynak	Örnek sayısı	<i>Brucella</i> spp. pozitif örnek sayısı	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>
Süt	100	1	+	-
Taze peynir	100	2	-	+
Salamura peynir	100	-	-	-

Tartışma ve Sonuç

Brucella etkenlerinin insanlara bulaşmasında, infekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin çiğ olarak tüketilmesi, özellikle çiğ süttten yapılan ve olgunlaşmadan tüketime sunulan taze beyaz peynirlerin önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir. Yurdumuzun çeşitli bölgelerinde süt örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu ve identifikasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda *Brucella* spp. izolasyon oranlarının %0 (30,31,52) ile %25 (3,10,14,17,22,23,25,32) arasında olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada Kayseri çevresinde pazar, market ve şarküteriye satışı sunulan çiğ inek süt örneklerinden %1 oranında *Brucella* spp. izolasyonu yapılmış ve bu izolat *B. abortus* biyotip 1 olarak fenotipik ve moleküler yöntemle tanımlanmıştır.

Elde edilen izolasyon oranı yukarıda bildirilen araştırmacıların (3,10,14,17,22,23,25,30,31,32,52) sonuçları ile kıyaslandığında bazı araştırmacılar (10,30,31,52) yüksek, bazı araştırmacıların (14,17,22,23,32) sonuçlarından ise düşük olduğu görülmektedir.

İzolasyon oranlarındaki bu farklılık; süt örneklerinin brusellozisi ya da bu enfeksiyonu geçiren hayvanlardan alınmasına ve süttün içerdiği bakteri sayısına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Keza, çalışmamızda kullanılan süt örnekleri direkt olarak hayvanlardan alınmamış olup bir tankta ya da bir kapta toplanmış olan farklı hayvanların sütlarini içeren ve satışı sunulan sütlardan alınmışlardır. Bu sebeple etkenin süt içerisinde dilüe olması durumu da göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca anılan çalışmalarda; etkenin izolasyonunda kullanılan besiyerleri, kullanılan üreme koşulları ve etkenin fenotipik tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal aktivitelerin değerlendirilmesi (subjektif olması) gibi faktörlerin de bu sonuçlara etkili olduğu düşünülmektedir. Bunlara ek olarak ülkelerin *Brucella* eradikasyon programı için uygulamaya koydukları aşılama programları da göz önünde bulundurulmalıdır.

Dünyanın birçok yerinde yapılan çalışmaların ise daha çok seropozitif hayvanlardan alınan süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik olduğu görülmektedir (2,27,34,35,38,43,48,60). Yapılan bu çalışmalarda seropozitif hayvanlara ait süt örneklerinde *Brucella* spp. izolasyon oranlarının yüksek olması; etkenin enfekte ve hastalığı geçiren hayvanların %80'inde lenf no-

düllerine kolonize olması ve laktasyon boyunca kronik ya da aralıklı olarak etkenin sütle saçılmasına bağlıdır (26).

Koyun ve keçiler *B. melitensis*'in, sığırlar ise *B. abortus*'un ana konakçılarıdır. Infekte hayvanların sütları ile yüksek miktarda ve uzun süre saçılması *Brucella* etkenlerini içeren ve pastörize edilmeyen sütlardan hazırlanan ürünlerin tüketimi insanlar için enfeksiyon kaynağını oluşturur. Bu çalışmada, 100 taze peynir örneğinden ikisi (%2) *Brucella* spp. yönünden pozitif olarak belirlendi. Bu izolatların fenotipik testlerle identifikasyonunda *B. melitensis* biyotip 3 olduğu saptandı ve moleküler yöntem ile de *B. melitensis* (biyotip 1,2 ve 3) olduğu doğrulandı. Yüz adet salamura peynir örneğinden ise *Brucella* spp. izole edilemedi.

Ülkemizin farklı bölgelerinde çeşitli peynir örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda etkenin izole edilemediği bildirilmiştir (9,25,30,40,46,47,52-54,59). Diğer ülkelerde konu ile ilgili yapılan çalışmalarda ülkemizdeki çalışmalara benzer olarak *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadığı bildirilmiştir (20,37). Bu çalışmalarda, *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamasının nedeni; alınan peynir örneklerinin yapıldığı süttün kaynağı, etkenin süttteki kontaminasyon seviyesi, peynir üretim süreçlerindeki değişiklikler, üretim şartları, peynirin olgunlaşma süresine bağlı olabilir. Ayrıca alınan peynir numunesinde rastgele örnekleme yapıldığı için bakterinin bu kısımlarda bulunmaması da başka bir faktör olarak düşünülebilir.

Gerek Türkiye'de (6-8,13,23,28,29,36,39,41,44,50,55) ve gerekse diğer ülkelerde (1,4,5) çeşitli peynir örneklerinden *Brucella* spp.'nin saptandığı çalışmalarda *Brucella* spp. izolasyon oranları %2-20.5 arasında farklılık göstermektedir. Çalışmamızda taze peynir örneklerinden %2 oranında *B. melitensis* izole edilmiştir. Çalışmamızın bulguları Eren (23), Akbarmehr (5), ve Patır ve Dinçoğlu (41)'nin bulguları ile uyumlu iken diğer çalışmalarda (6-8,13,28,29,36,39,44,50,55) bulgularımızdan daha yüksek izolasyon oranları bildirilmiştir. Yüksek izolasyon oranları, peynir yapımında çok miktarda etken içeren sütların hammadde olarak kullanılmasına bağlı olabilir. Şöyle ki; Ülkemizde yöresel taze peynir yapımı çoğunlukla çiğ süttün 32-35°C'lere kadar ısıtılıp ve mayalanması ile sağlanır. Peynirin bu şekilde yapılması insanlar açısından gerek damak tadı gerekse maddi açıdan (ısıtma maliyeti, peynir ran-

dımanı) tercih nedenidir. Yüksek düzeyde *Brucella* spp. içeren sütler, yeterli ısıl işleme tabi tutulmadığı için peynirde *Brucella* spp.'nin kaynağını oluşturmaktadır. Hasta hayvanların bulunduğu bölgelerde sütle bakteri saçılımı yüksek olabileceği için analiz edilen peynir örneklerinde *Brucella* spp. varlığı da o oranda artabilmektedir. Yine peynir örneklerinin rastgele alınması, kullanılan izolasyon yöntemleri, peynirlerin olgunlaşma süreleri gibi faktörlerde bu izolasyon oranları üzerinde etkilidir. Ayrıca bildirilen çalışmalarda peynir örneklerinden *B. melitensis*'in daha yüksek oranda izole edildiği görülmekte olup bu çalışmada da taze peynir örneklerinden elde edilen iki izolat *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada salamura peynirlerden *Brucella* spp. izolasyonu yapılamamıştır. Salamura peynirde *Brucella* spp. izolasyonuna yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışma ile uyumlu olarak Ataş ve ark. (8) market ve şarküterilerden alınan 120 adet salamura beyaz peynir örneğinde *Brucella* spp. izole edemediklerini bildirmişlerdir. *Brucella* etkenlerinin %20 tuz içeren salamurada çiğ süttten yapılmış peynirde 35-40 gün (12°C'de) yaşayabildiği rapor edilmiştir (42). Salamura peynirde, peynir içerisine homojen tuz geçişinin sağlanması ve peynirin salamura içerisinde kalış süresi gibi faktörlerin de *Brucella* spp. izolasyonunda etkili olduğu düşünülmektedir.

Türk Gıda Kodeksinde çiğ süttten yapılan peynirde koagülaz pozitif stafilkokların varlığı ve çiğ süt veya pastörizasyondan daha az sıcaklık uygulanmış süttten üretilen tereyağ ve krema için *E. coli* varlığı ile ilgili düzenleme mevcut olmasına rağmen peynirlerde *Brucella* bakterilerinin varlığının araştırılmasına ilişkin herhangi bir düzenleme bulunmamaktadır. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No:2015/6) (51) incelendiğinde piyasaya sürülen peynirlerin *Brucella* etkenleri yönünden kontrolü ile ilgili bilgilerin yetersiz olduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen *Brucella* izolasyon oranları literatür verileri ile kıyaslandığında düşük olmasına rağmen etkeni içeren bu süt ve peynirlerin tüketiminin halk sağlığı açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir. Çiğ süt ve peynirlerin tüketimden önce *Brucella* spp. içermemesi konusunda yeterli yasal düzenlemelerin yapılmasının bu tip peynirler ile bulaşmalarını azaltacağı kanısını güçlendirmektedir.

Kaynaklar

1. Abbas BA, Talei AB. Isolation, identification and biotyping of *Brucella* spp. from milk product at Basrah province. Bas J Vet Res 2010; 9(1): 152-62.
2. Abdalla A, Hamid ME. Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. Trop Anim Health Prod 2012; 44(6): 1151-5.
3. Abdelkareem AA, İkiz S, Ak S. Trakya yöresinde yetiştirilen sığırların sütlerinden *Brucella* türlerinin varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılması olarak araştırılması. İstanbul Üniv Vet Fak Derg 2011; 37(1): 23-33.
4. Acedo E, Diaz ME, Leon AB. Incidence of *Brucella* spp. in raw milk and fresh regional cheese. Alimentaria 1997; 281: 57-60.
5. Akbarmehr J. The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. Afr J Microbiol Res 2011; 5(12): 1500-3.
6. Akcan AS. Burdur yöresinde tüketime sunulan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. varlığı, Yüksek Lisans tezi, Selçuk Üniv Sağlık Bil Ens, Konya 2009; p. 46.
7. Alim A, Tomul DZ. Sivas il merkezindeki semt pazarlarında satılan taze peynirlerin *Brucella* yönünden araştırılması. Mikrobiyol Bul 2005; 39(2): 219-23.
8. Ataş M, Poyraz Ö, Alim A, Ataş AD, Çelik A. Sivas il merkezinde satışa sunulan taze ve salamura beyaz peynirlerin *Brucella* bakterileri yönünden incelenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg 2007; 64(2): 9-14.
9. Ayaz Y. Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde brucellosis etmenlerinin araştırılması. Etlik Vet Mikrob Enst Derg 1986; 5: 109-16.
10. Aydın E. Süt ve süt ürünlerinde *Brucella* cinsi bakterilerin araştırılması, Yüksek Lisans tezi, Mersin Üniv Sağlık Bil Ens, Mersin 2007; p. 75.
11. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İkinci Baskı. İzmir: Barış Yayınları, 1995; p. 478.
12. Bricker, BJ, Halling, SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32(11): 2660-6.
13. Buğdaycı K. Kayseri ilinde çiğ sütlerden ya-

- pılan taze beyaz peynirlerde *Brucella* spp. aranması, Doktora tezi, İstanbul Üniv Sağ Bil Ens, İstanbul 2003.
14. Büyük F, Şahin M. Kars yöresinde atık yapan ineklerin çeşitli örneklerinden *Brucella* etkenlerinin kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve olguların epidemiyolojik analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011; 17 (5): 809-16.
 15. CFSPH, The Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, 2009, Brucellosis in Marine Mammals, http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_marine.pdf, Erişim tarihi: 28.11.2016.
 16. Cloeckert A, Zygmunt MS. *Brucella*, Labbe RG, Garcia S. eds. In: Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition. United Kingdom: Wiley-Blackwell Publishing, 2013; p. 215.
 17. Çelebi Ö. Kars yöresinde atık yapmış inek sürülerinden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması, Doktora tezi, Kafkas Üniv Sağ Bil Ens, Kars 2009; p. 67.
 18. Çelebi S, Hacımustafaođlu MK. Brucellozis-Derleme. J Curr Pediatr 2004; 2: 39-43.
 19. Çelebi S. Brusellozun epidemiyolojisi. Ankem Derg 2003; 17(3): 340-3.
 20. Di Giannatale E, Alessiani A, Prencipe V, Matteucci O, Persiani T, Zilli K, Migliorati G. Polymerase chain reaction and bacteriological comparative analysis of raw milk samples and buffalo mozzarella produced and marketed in Caserta in the Campania region of Italy. Vet Ital 2009; 45(3): 437-42.
 21. Erdenliğ Gürbilek S, Baklan EA, Aksoy HY. Türkiye'de 2007 ve 2008 yılları arasında izole edilen brusella suşlarının identifikasyonu ve faj duyarlılıklarının saptanması. Harran Üniv Vet Fak Derg 2014; 3(2): 67-72.
 22. Erdenliğ Gürbilek S, Tel OY, Keskin O. Brusellozis şüpheli sürülerdeki ineklerden alınan klinik örneklerden *Brucella* spp tanısı için PCR ve bakteriyolojik kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. Harran Üniv Vet Fak Derg 2015; 4(2): 48-52.
 23. Eren E. Afyon bölgesinde toplanan süt ve peynir örneklerinden *Brucella* türlerinin saptanması, Yüksek Lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniv Sağ Bil Ens, Afyon 2004; p. 8.
 24. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. Future Microbiol 2010; 5(6): 859-66.
 25. Gülbaz G. Kars yöresinde satışa sunulan çiğ süt, peynir ve tereyağında *Brucella* türlerinin izolasyonu identifikasyonu ve moleküler tekniklerle belirlenmesi, Doktora tezi, Kafkas Üniv Sağ Bil Ens, Kars 2011; p. 72.
 26. Hamdy MER, Amin AS. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. Vet J 2002; 163(3): 299-305.
 27. Ibrahim AK, AbdelAll AA, Amin AS. Long-term diagnostic studies for detection of *Brucella* spp. in milk samples. Glob Vet 2012; 8 (1): 54-61.
 28. Kalender H, Özcan C, Arslan N. Taze tulum peynirlerinden *Brucella* izolasyonu. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31(3-4): 184-6.
 29. Kara R, Akkaya L. Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses in Afyonkarahisar, Turkey. Br J Dairy Sci 2013; 3(1): 5-8.
 30. Karadal F, Ertas Onmaz N, Bağcı C, Yıldırım Y, Al S, Abay S. Niđe ilinde satışa sunulan koyun-keçi sütü ve peynirlerinde *Brucella melitensis* ve biyotiplerinin araştırılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2016; 13(2): 101-8.
 31. Kasımoğlu A. Determination of *Brucella* spp. in raw milk and Turkish white cheese in Kırıkkale. Dtsch Tierarztl Wochenschr 2002; 109(7): 324-6.
 32. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sen B. Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. J Dairy Sci 2016; 99(5): 3351-7.
 33. Kılıç S. Bruselloz: Mikrobiyolojik tanı. Türkiye Klinikleri, J Infect Dis-Special Topics 2012; 5(1): 46-66.
 34. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV. Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. Braz J Vet Res Anim Sci 2000; 37 (6): 444-8.
 35. Maymona AM, Mohamed TS, Abdulwahab YA, Musa TM, Phenotypic characterization of *Brucella melitensis* isolated from livestock in Abu Dhabi Emirate. Afr J Microbiol Res 2014; 8(39): 3523-8.
 36. Mert A. Ankara yöresinde pazarlanan taze peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerine araştırmalar, Doktora tezi, Ankara Üniv Sağ

- Bil Ens, Ankara 1984.
37. Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. 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). Braz J Microbiol 2007; 38 (1):17-22.
 38. Mugizi D.R, Muradrasoli, S, Boqvist, S, Eru-me, J, Nasinyama, GW, Waiswa C, Mboowa, G, Klint M, Magnusson U. Isolation and molecular characterization of *Brucella* isolates in cattle milk in Uganda. BioMed Res Int 2015: 1-9.
 39. Namin AS. İstanbul'da bazı semt pazarlarından toplanan beyaz peynir örneklerinde *Brucella* bakterilerinin aranması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv Sağlık Bil Ens, İstanbul 1990.
 40. Parlakgöl D. *Brucella* ve *Listeria* bakterilerini peynirden ayırabilmek için balıklı besiyerinin geliştirilmesi ve İstanbul'da satılan peynirlerde bu bakterilerin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1993; 23(4) :239-43.
 41. Patır B, Dinçoğlu HA. Elazığ'da tüketime sunulan taze beyaz peynirler ile tulum peynirlerinde *Brucella* spp'nin varlığı üzerine araştırmalar. FÜ Sağlık Bil Vet Derg 2001;15(1): 15-22.
 42. Plommet M, Fensterbank R, Vassal L, Aulclair J, Mocquot G, Vachot JC, Courault M, Musset D. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheese made from naturally infected cow's milk Le Lait, INRA 1988; 68 (2): 115-20.
 43. Rodríguez-Hidalgo RI, Contreras-Zamora J, Benitez Ortiz W, Guerrero-Viracocha K, Salcan-Guaman H, Minda E, Ron Garrido L. Circulating strains of *Brucella abortus* in cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador. Front Public Health 2015; 3: 1-5.
 44. Sancak YC, Boynukara B, Yardımcı H. Van otlu peynirlerinde *Brucella*'ların varlığı ve dayanma süresinin saptanması. Veterinarium 1993; 4(1): 1-3.
 45. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(4): 801-8.
 46. Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzza A, Fenizia D. Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J Dairy Res 1999; 66(2): 313-7.
 47. Sert S, Kıvanç M. Erzurum piyasasında tüketime sunulan beyaz peynirlerin hijyenik kaliteleri üzerine bir araştırma. Atatürk Üniv Zir Fak Derg 1984; 15(3-4): 79-89.
 48. Shahzad A, Qurban A, Falk M, lahtasham K, Shamim A, Heinrich N, Syed MJ. Isolation and identification of bovine *Brucella* isolates from Pakistan by biochemical tests and PCR. Trop Anim Health Prod 2014; 46: 73-8.
 49. Terzi G, Büyüktanır Ö, Genç O, Gücükoğlu A, Yurdusev N. Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 2010; 16 (Suppl-A): 47-52.
 50. Tunçbilek M. Ankara piyasasında satılan taze beyaz peynirlerin brucellosis riski yönünden incelenmesi, Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 1992; p. 42.
 51. Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=9.5.20523&MevzuatIlski=0&sourceXmlSearch=peynir>, Erişim tarihi: 08.12.2016.
 52. Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y. Burdur bölgesinden toplanan süt ve peynirlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden incelenmesi. Tübitak VHAK-100-V-007 Burdur Tübitak Araştırma Projesi 2001; 1-36.
 53. Urçar S. Erzurum ili piyasasında tüketime sunulan bazı peynirlerde *Brucella* spp. varlığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniv Sağlık Bil Ens, Erzurum 2011; p. 25.
 54. Urhan G. Ankara'da çeşitli kaynaklardan satın alınan beyaz peynirlerin mikrobiyolojik kalite kontrolü üzerinde araştırmalar, Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniv Sağlık Bil Ens, Ankara 2012; p. 48.
 55. Ünel S, Williams CF, Stableforth AW. Balıkesir bölgesinde süt krema imalathane ve köylü beyaz peynirlerinde *Brucella melitensis*'in kalma süresi. Pendik Mikrob Enst Derg 1968; 2: 67.
 56. Whatmore AM, Davison N, Cloeckert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perret

- LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz EC, Dick Jr EJ, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch N. *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.). Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64:4120-8.
57. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9(6): 1168-84.
58. Yamazhan T. Epidemiyoloji. Derleme. Türkiye Klinikleri J Infect Dis-Special Topics 2012; 5(1): 11-4.
59. Yıldırıncı G. İstanbul piyasasında satışı sunulan tulum peynirlerinde *Brucella* etkenlerinin mevcudiyeti üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, İstanbul Üniv Sağ Bil Ens, İstanbul 1993.
60. Zowghi E, Ebadi A, Mohseni B. Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1990; 9(4): 1175-8.

Sorumlu Yazar:

Doç. Dr. Seçil ABAY
Erciyes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
38039 Melikgazi/KAYSERİ
E-posta: sabay@erciyes.edu.tr
Tel: 0 352 207 66 66/29912