

Tıbbi Mikrobiyoloji: Teori, Metodoloji ve Uygulama

Editör
Prof. Dr. Metin Doğan

Tıbbi Mikrobiyoloji: Teori, Metodoloji ve Uygulama

Editör

Prof. Dr. Metin Doğan

İmtiyaz Sahibi
Platanus Publishing®

Editör
Prof. Dr. Metin Doğan

Kapak & Mizanpaj & Sosyal Medya
Platanus Yayın Grubu

Birinci Basım
Ekim, 2025

Yayımcı Sertifika No
45813

ISBN
978-625-6517-41-7

©copyright
Bu kitabın yayım hakkı Platanus Publishing'e aittir. Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin alınmadan hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Adres: Natoyolu Cad. Fahri Korutürk Mah. 157/B, 06480, Mamak,
Ankara, Türkiye.

Telefon: +90 312 390 1 118
web: www.platanuspublishing.com
e-mail: platanuskita@gmail.com



Platanus Publishing®

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1.....	5
<i>Tıbbi Mikrobiyolojide Dijitalleşme</i>	
Burcu Güner Giray	
BÖLÜM 2.....	17
<i>Bruselloz: Laboratuvar Test Yöntemleri</i>	
Halime Dağgez	
BÖLÜM 3.....	39
<i>The Oral Microbiome in Systemic Health: Periodontitis and Breast Cancer Connection</i>	
Banu Can	



BÖLÜM 1

Tıbbi Mikrobiyolojide Dijitalleşme

Burcu Gürer Giray¹

Giriş

Hayatımızı şekillendiren teknolojik gelişmeler, önümüzdeki yıllarda kendi kendini geliştiren algoritmalar (Orozco-Beltrán, vd.,2022), akıllı telefon teknolojileri (Herrera Montano, vd., 2022) ve sürücüsüz araçlara [Amukele, vd., 2017] kadar daha çok çeşitlenerek sağlık hizmetleri alanında da büyük beklentiler oluşturacaktır. Sağlık hizmetleri alanındaki dijitalleşme beklentisi, verilen hizmetin kalitesini artırma ile birlikte düşük maliyetli hizmet verebilme arayışını da getirmektedir (Giebel, vd., 2023). Bu durum yüksek kalitede hizmet veren laboratuvarlarda mikrobiyolojik tanının, klinik müdahaleye etkisinin izlenebilmesi ve belgelenebilmesinde oldukça önemlidir. Sürece bağlı olarak prognozun öngörülmesi ve tedavi sürecinde oluşan endikasyonların iyileştirilmesinde de makine öğrenim algoritmalarının kullanılmasına yönelik talepleri artıracaktır (Dolen, vd., 2017). Teknolojik gelişmelerle birlikte, dijitalleşmenin sağlık hizmetleriyle ilişkili süreçlere ve hizmetin kalitesindeki iyileştirmelere hangi düzeyde katkı sağlayacağı standardize edilen süreçlerle takip edilmelidir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında dijitalleşmenin sağlanabilmesi için bilgi birikimi, alt yapı ve veri akış idaresini içeren dijital temel tıp bilimlerinde uzmanlık alanlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Dijital tıbbi mikrobiyoloji, halk sağlığı ve patojen sürveyasında da önemli ölçüde algıları değiştirecektir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarının dijital kapasitede gelişmesi, orada hizmet veren tıbbi mikrobiyoloji uzmanının dijital verileri değerlendirebilir olmasına bağlıdır (Basak, vd., 2019). Bu bağlamda dijital veri değerlendiren tıbbi mikrobiyoloji laboratuvar uzmanı, tanı ve tedavide dijital veri kalitesini arttıracak böylece sağlık hizmet maliyetlerinin azaltılmasını destekleyebilecekleri fırsata sahip olacaklardır (Gruson, Helleputte, Rousseau, & Gruson., 2019).

Dijitalleşmenin Tıbbi Mikrobiyolojik Tanı Süreçlerine Sunduğu Fırsatlar

Tıbbi mikrobiyolojik tanıda bilgi-akış döngüsü, preanalitik süreç, analitik süreç ve postanalitik süreç olmak üzere üç aşamadan oluşur (Haller, 2007). Preanalitik süreç, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına örnek gönderimi ve örneğin hazırlık aşamalarını kapsar. Sürecin en önemli kısmı hasta örneğine, klinik tanıya destek olacak şekilde, uygun olan laboratuvar test işlemlerinin gerçekleştirilmesidir. Preanalitik süreçteki dijital çözümler akıllı telefon

¹ Doç. Dr., Yalova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD
0000-0003-3165-8924

uygulamalarından sohbet robotlarına kadar geniş bir yelpazeye yayılmaktadır. Sohbet robotu gibi etkileşimli dijital araçlar tekrarlayan ve rutin sorular için hasta özelliklerinin benzer olduğu durumlarda ilk başvuru kaynağı olabilir ve daha önce talep edilmiş laboratuvar testlerini önererek süreci yönlendirebilir. Covid-19 pandemisi sürecinde SARS-CoV-2'ye maruz kaldığını bildiren hastalarda viral tanıyı desteklemek ve hastaya hızlı müdahaleyi önermek amacıyla sohbet robotları sahada aktif olarak kullanılmıştır (Verroken, Despas, Rodriguez-Villalobos, & Laterre, 2019). Bu sohbet robotları Sars-CoV-2 tanı testi için örnek alımından doğru taşıma kabına, test sonucu için bekleme süresinden test maliyeti gibi konulara hastalara öneri ve bilgi sunmuştur. Dijital araçlar başka kullanıcıların tecrübelerinden de faydalanarak yapılarını geliştirmektedir (Smith & Kirby, 2020). Analitik süreç, test performansı ve veri üretimi aşamalarından oluşmaktadır. Örneğin, otomatize mikroskop sistemleri, pozitif kan kültürlerinden elde edilen preparatların yüksek çözünürlüklü görüntülerini almayı sağlar ve Gram boyama sonuçlarını yüksek duyarlılık ve özgüllükle sınıflandırabilmektedir (Linares, vd.,2019). Akıllı telefonlar mikroskopi verilerinin görüntü analizinde kullanılabilmektedir. (Croxatto, Prod'Hom, Faverjon, Rochais & Greub, 2016). Otomatik petri kabı kültür okuma sistemleri benzer şekilde örüntü tanıma prensibiyle çalışır ve agar yüzeyindeki bakteri üremesini güvenilir şekilde tanımlayarak kültür plakalarının ön taramasında kullanılabilmektedir [Croxatto, 2017; Smith, Richmond, Brennan-Krohn, Elliott & Kirby, 2017]. Bu tür otomatik petri kabı kültür sistemleri, Avrupa'daki birçok laboratuvarında aktif kullanılmakta olup devam eden otomasyon sürecinin bir parçasıdır. Disk difüzyon ve gradient difüzyon yöntemi (E-Test) ile antibiyotik duyarlılık testlerinin yorumlanmaları da otomatize sistemlerle yapılabilmektedir (Strauss, Zoabi, Sagas, Reznik-Gitlitz & Colodner, 2020). Günümüzde hastane laboratuvarlarında enfeksiyon etkeninin tanımlanmasında kütle spektrometresine dayalı çalışan (MALDI-TOF) sistemler kullanılmaktadır. Makine öğrenimine dayalı algoritmalar, kütle spektral profillerini antibiyotik direnci gibi belirli klinik fenotipler ile ilişkilendirebilmektedir (Weis, Jutzeler & Borgwardt, 2020). Post analitik aşama, veri görselleştirme, iletişim ve klinik karar verme süreçlerinden oluşur. Antibiyotik yönetimi gibi karmaşık uygulamalar için geliştirilen klinik karar destek sistemleri bu aşamada yer almaktadır. Hastaya ait yaş, cinsiyet gibi bilgiler ve yatırıldığı klinik servis temel alınarak, tedavi daha da özelleştirilmektedir (Beaudoin, Kabanza, Nault & Valiquette 2016). Makine öğrenimine dayalı klinik karar destek sistemlerinin, yakın gelecekte, belirli hasta gruplarına göre uyarlanmış deneysel antibiyotik tedavisine ilişkin otomatik geri bildirim sağlayacağı öngörülmektedir (Komorowski, 2020). Enfeksiyon süresince laboratuvar parametreleri hızla değişebileceği için, zamana yayılmış veriler bu tür algoritmaların tahmin değerleri üzerinde önemli bir etki yaratır ve bu durumda hastalığın seyri boyunca

hastayı gözlemleyen süreçlerinin olması gerekmektedir. Makine öğrenimi algoritmaları ayrıca hastaya ait veri akışını izleyebilmektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde hastalardan kaydedilen fizyolojik parametrelerin sepsis (van Wyk, vd., 2019) veya menenjit (Rhoads, vd.,2014) öngörüsünde önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Tıbbi Mikrobiyolojik Tanıda Dijitalleşmenin Getirdiği Sorunlar

Mikrobiyolojide dijitalleşmeye yönelik beklentiler ne kadar yüksek olursa olsun, eleştirel bakış açısı korunarak beraberinde gelen zorluklar dikkatle irdelenmelidir. Laboratuvarlarda verilerin toplanması, veride kalite kontrolü ve doğru bilgi akışı, verinin güvenilirliği ve korunması ile bilginin yönetilerek raporlanması ve hitamında takip edilebilmesi büyük veri çalışmalarındaki en sorunlu basamakları oluşturur. Bu büyük verinin işlenmesi aşamaları tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarındaki iş akışlarına hakimiyet ile yönetilebilir (Doyle, vd.,2001). Ancak bilgisayar teknolojilerinin hızla gelişmesi ve veri depolama olanaklarının artması, mikrobiyologlar için tıbbi yollarla fazlalaşan veri miktarında büyük bir artış şeklinde zorluklar oluşturacaktır. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında, kütle spektrum analizleri, fotoğraflanmış mikroskopi preparatları, agar plak görüntüleri (tele-bakteriyoloji), sekanslama verileri (mikrobiyal genomik, mikrobiyota analizi), gerçek zamanlı PCR sonuçları ve serolojik test verileri gibi rutin tanı testlerinin verilerinde fazla miktarda birikim gözlemlenmektedir. Her gün gigabaytlarca veri üretilmekte ve bunlar kalite kontrol, akreditasyon, yasal zorunluluklar ve araştırma amaçlı olarak saklanmaktadır. Ancak bu veri miktarındaki hızlı artış nedeniyle, kısa süre içinde insanların en önemli ve en alakalı bilgileri açıkça görmesi ve birbirine bağlaması neredeyse imkânsız hâle gelecektir. Büyük ve doğrulanmamış veri yığınları, özellikle kritik sonuçların, telefon ile sepsis vakalarının bildirimi gibi, doğrudan klinisyene iletilmesi gerekliliğini getirmektedir (Wang, 2019). Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki ham verinin doğrulanarak bilgiye dönüşümü sürecini kolaylaştırmak için de dijital yetkinlikler gerekmektedir (Meng, vd., 2020). Hızla yaklaşan bu dev bilgi dalgası ile başa çıkma konusunda doktorlar, hemşireler, laboratuvar uzmanları ve bilgi teknolojileri uzmanları zorluklarla karşılaşacaktır. Buna bağlı olarak yeni iletişim ve görselleştirme stratejileri büyük önem taşımaktadır ve laboratuvarlar ile klinikler arasındaki arayüzün gelişerek bu sürece uyum sağlaması gerekmektedir. Örneğin, gösterge panelleri en kritik klinik bilgileri özetleyerek karmaşık verilerin iletimini kolaylaştırabilir veya otomatik uyarı sistemlerine ait pencere bildirimleri, belirli hasta gruplarında kritik sonuçları hedefli bir biçimde gösterebilir (Buckley, vd., 2018). Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan panel PCR testleri enfeksiyon etkenlerinin tanıya giden yolda dijitalleşmesinin güzel bir uyarlaması olarak düşünülebilir. Önümüzdeki yıllarda bu süreç moleküler tanı ile metagenomik

uygulamalara doğru evrilecektir (Miller, Chiu, Rodino, Miller, 2020). Bu nedenle, veriler yalnızca patojene ilişkin değil, aynı zamanda konak (hasta) genetik bilgilerini de içerecek şekilde daha karmaşık hâle gelecektir. Bu sebep ile klinik açıdan anlamlı olan patojenlerin doğru biçimde tanımlanması ve antimikrobiyal direnç mekanizmalarının hangi patojenler ile ilişkili olduğunu bilmek kritik öneme sahiptir (Brito, Alm, 2016). Direnç genleri ve bakteri türlerinden oluşan sonsuz bir liste sunmak, düşüncesizce antibiyotik kullanımına yol açabilir ve gerçek enfeksiyon etkenini gölgeleyebileceği unutulmamalıdır. Dijitalleşme yolunda yazılım algoritmaları, kronik ve akut enfeksiyon hastalıklarında bakteriyel ağlar içerisinde anibiyotik direnç genlerini organizmayı taksonomik birimler ile ilişkilendirerek tanımlayabilmeli ve uzun genom dizilemelerinin gerçekleştirilmesine kolaylık sağlayabilmelidir (Wood, vd., 2020).

Gelecek yıllarda metabolomik, proteomik ve transkriptomik analizler laboratuvar sonuçlarında yerini almaya başlayacaktır. Veri miktarındaki hızlı artış ve buna bağlı ortaya çıkan sorunların yanı sıra, yeni teknolojilerin rutin çalışmalara dahil edilmesi laboratuvar personeli açısından oldukça köklü yenilikler oluşturacaktır. Farklı bilgi düzeylerinde laboratuvar çalışmaları gerçekleştiren çalışanlara yeni tekniklerin aktarılması, dijitalleşmeye bağlı beklentileri ve kaygıları yönetebilmek için önem taşımaktadır (Bouzillé, vd.,2018).

Laboratuvarda kültür plaklarının geleneksel yöntemler ile okunması veya mikroskopi gibi klasik görevlerin önümüzdeki yıllarda giderek ortadan kalkması beklenirken, bu alanlar tıbbi mikrobiyologlar için veri işleme, tanı, araştırma ve Ar-Ge'ye yönelik analiz gibi laboratuvar dışı görevleri ile doldurulacaktır. Bu doğrultuda, tıbbi mikrobiyologlardan laboratuvar teknisyenlerine kadar tüm laboratuvar personelinin eğitim portföyü, tıbbi mikrobiyolojinin dijitalleşmesinin gerekliliklerine uyum sağlayacak şekilde yeniden yapılandırılmalıdır.

Veri Yapısı, Birlikte Çalışabilirlik ve Yasal Çerçeve

Makine öğrenim algoritmaları, büyük, yapılandırılmış, birlikte çalışabilir ve birbirine bağlı veri kümelerine ihtiyaç duyar. Sağlık verilerinin uluslararası düzeyde kabul gören tanımlar ile standartlaştırılıp etiketlenmesi gerekmektedir (Gansel, Mary, van Belkum, 2019). Bu süreçte ortak bir terminoloji kullanılarak verilerin yapılandırılması ve veri modeli içindeki değişkenler arasındaki ilişkilerin tespit edilmesi gerekmektedir (Tsao, vd., 2017). Örneğin, antibiyotik duyarlılık testleri birçok farklı teknik yöntem ile gerçekleştirilebilir ve bu yöntemlerin duyarlılıkları, doğrulukları ve hata paylarını yorumlama rehberleri değişkenlik gösterebilir. Ortak terminoloji kullanımı ile tanı yöntemlerinin makineler tarafından okunabilir biçimde tanımlanması sağlanarak farklı veri setleri arasındaki sonuçların karşılaştırılması kolaylaşmış olacaktır. Veri

güvenliği, veri koruması ve veri setlerinin sürüm takibi, verilerin yapılandırılması ve birlikte çalışabilirlik için büyük önem taşımaktadır. Kritik sağlık verileri, kodlanarak aktarılmalı ve bu süreçte şifrelenmelidir (Desjardins, VD.,2020). Veri güvenliğinin ihlali ise büyük sorunlar yaratabileceği için belirli veri güvenliği standartlarının oluşturulması gerekmektedir (Jiang, Bai, 2020). Günümüzde veri güvenliği ihlali sebebiyle hastanelerde yaşanan sorunların neredeyse %70'i, kimlik hırsızlığı dolayısıyla finansal içerikli hassas bilgilere yönelik gerçekleştirilmektedir (Bhattacharya, Singh, Hossain, 2019). Veri tabanlarının güncellenmesi ve düzenlenmesi yüksek maliyetli olup bu süreç, bir veri tabanının kalitesiyle doğrudan ilişkili son derece kritik bir unsurdur (Johnson, vd., 2016). Kullanılan sürüm hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olmadan, yalnızca kategorik eğilimleri karşılaştırmak, hatalı yorumlamalara sebep olma riski taşır. Bu nedenle, veri tabanlarındaki değişikliklerin açık bir şekilde belgelenmesi ve izlenmesi gerekmektedir. Ham verilerin saklanması, yaygın ve karmaşık sürüm takibinden kaçınmanın bir yolu olarak düşünülebilir. Fakat ham verilerin saklanması da yüksek depolama alanı gereksinimi, veri formatlarında zaman içindeki değişiklikler açısından daha fazla sorumluluk üstlenme gerekliliği gibi kendine özgü zorlukları beraberinde getirecektir.

Verilerin toplanması, analizi ve paylaşımı, yasal gerekliliklere uygun olarak yapılmalıdır. Bu nedenle sağlık alanında bir çalışma gerçekleştirilirken etik değerlendirme ve hasta onamı (örneğin, çalışmaya özgü onam veya genel onam aracılığıyla) zorunludur (Jackson, Gardy, Shadiloo, Silva, 2019). Toplanan verilerin kullanılabilir hâle gelebilmesi için bu etik kuralların evrimi kaçınılmaz görünmektedir ve bu durum, beraberinde çok sayıda yeni etik soruyu da gündeme getirecektir. Araştırma/sürveyans ile veri koruma arasındaki arayüz, ek zorluklar oluşturmaktadır (Staley, vd., 2019). Büyük veri setlerinin merkezler arasında paylaşılacak olması durumunda, etik kurullar genellikle veri aktarımı ve kullanım anlaşması kapsamında ayrıntılı bir veri yönetim planı talep etmektedir. Bu tür durumlarda, veri toplama, saklama, erişim hakları ve koruma yöntemleri ile görev ve sorumluluklar, yayınlar ve fikri mülkiyet haklarını düzenleyen bir işbirliği ya da konsorsiyum anlaşması yapılması da sıklıkla önerilmektedir. (Baştanlar, Özuysal, 2013).

Sonuç

Sağlık hizmetlerinin dijitalleşmesindeki gelişmelerin gelecekte daha da hız kazanması beklenmektedir. Yapay zeka ile ilişkili makine öğrenimi, tıbbi mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları verileri dâhil olmak üzere, sağlıkla ilişkili verileri işleme biçimimizi köklü biçimde değiştirmektedir. Büyük olasılıkla, hasta bireylerde birbirine bağlı veri kümelerini içeren "nesnelerin interneti" ortamından, vücuda yerleştirilen cihazlar aracılığıyla sağlıklı dönemlerde dahi ayrıntılı sağlık verisi sağlayan "vücutların interneti" ortamına

geçiş yaşanacaktır. Ayrıca, metagenomik gibi moleküler tanı teknolojilerindeki gelişmeler, veri karmaşıklığını önemli ölçüde artıracaktır. Güncel eğilimler, önümüzdeki on yıl içerisinde laboratuvar tanı yöntemlerinin öneminin daha da artacağını göstermektedir. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları için artık veri yönetim süreçlerini ve mevcut altyapılarını ve özellikle veri depolama ve aktarma iş akışlarını değerlendirme dönemidir. Dijitalleşme ve yapay zekadaki ilerlemeleri öngörülerek kapsamlı kavramsal yaklaşımlar geliştirilmelidir.

Kaynakça

- Amukele, T. K., Hernandez, J., Snozek, C. L., Wyatt, R. G., Douglas, M., Amini, R., & Street, J. (2017). Drone transport of chemistry and hematology samples over long distances. *American journal of clinical pathology*, 148(5), 427-435.
- Basak, S. C., Majumdar, S., Nandy, A., Roy, P., Dutta, T., Vracko, M., & Bhattacharjee, A. K. (2019). Computer-assisted and data driven approaches for surveillance, drug discovery, and vaccine design for the Zika virus. *Pharmaceuticals*, 12(4), 157.
- Baştanlar, Y., & Özuysal, M. (2013). Introduction to machine learning. *miRNomics: MicroRNA biology and computational analysis*, 105-128.
- Beaudoin, M., Kabanza, F., Nault, V., & Valiquette, L. (2016). Evaluation of a machine learning capability for a clinical decision support system to enhance antimicrobial stewardship programs. *Artificial intelligence in medicine*, 68, 29-36.
- Bhattacharya, S., Singh, A., & Hossain, M. M. (2019). Strengthening public health surveillance through blockchain technology. *AIMS public health*, 6(3), 326.
- Brito, I. L., & Alm, E. J. (2016). Tracking strains in the microbiome: insights from metagenomics and models. *Frontiers in Microbiology*, 7, 712.
- Bouzillé, G., Poirier, C., Campillo-Gimenez, B., Aubert, M. L., Chabot, M., Chazard, E., ... & Cuggia, M. (2018). Leveraging hospital big data to monitor flu epidemics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 154, 153-160.
- Buckley, M. S., Rasmussen, J. R., Bikin, D. S., Richards, E. C., Berry, A. J., Culver, M. A., ... & Kane-Gill, S. L. (2018). Trigger alerts associated with laboratory abnormalities on identifying potentially preventable adverse drug events in the intensive care unit and general ward. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(4), 207-217.
- Croxatto, A., Prod'Hom, G., Faverjon, F., Rochais, Y., & Greub, G. (2016). Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose?. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), 217-235.
- Croxatto, A., Marcelpoil, R., Orny, C., Morel, D., Prod'hom, G., & Greub, G. (2017). Towards automated detection, semi-quantification and identification of microbial growth in clinical bacteriology: a proof of concept. *biomedical journal*, 40(6), 317-328.
- Desjardins, B., Mirsky, Y., Ortiz, M. P., Glozman, Z., Tarbox, L., Horn, R., & Horii, S. C. (2020). DICOM images have been hacked! Now what?. *American Journal of Roentgenology*, 214(4), 727-735.

- Dolen, V., Bahk, K., Carroll, K. C., Klugman, K., Ledebor, N. A., & Miller, M. B. (2017). Changing diagnostic paradigms for microbiology: report on an American Academy of Microbiology colloquium held in Washington, DC, from 17 to 18 October 2016.
- Doyle, P., Lane, J. I., Theeuwes, J. J., & Zayatz, L. V. (2001). Confidentiality, disclosure, and data acces: theory and practical applications for statistical agencies.
- Gansel, X., Mary, M., & van Belkum, A. (2019). Semantic data interoperability, digital medicine, and e-health in infectious disease management: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(6), 1023-1034.
- Giebel, G. D., Speckemeier, C., Abels, C., Plescher, F., Borchers, K., Wasem, J., ... & Neusser, S. (2023). Problems and barriers related to the use of digital health applications: scoping review. *Journal of Medical Internet Research*, 25, e43808..
- Gruson, D., Helleputte, T., Rousseau, P., & Gruson, D. (2019). Data science, artificial intelligence, and machine learning: opportunities for laboratory medicine and the value of positive regulation. *Clinical biochemistry*, 69, 1-7.
- Haller, B. L. (2007). Resident training in microbiology. *Clinics in laboratory medicine*, 27(2), 369-380..
- Herrera Montano, I., Pérez Pacho, J., Gracia Villar, S., Aparicio Obregón, S., Brenosa Martinez, J. M., & de la Torre Díez, I. (2022). Descriptive Analysis of Mobile Apps for Management of COVID-19 in Spain and Development of an Innovate App in that field. *Scientific Reports*, 12(1), 17875.
- Jackson, C., Gardy, J. L., Shadiloo, H. C., & Silva, D. S. (2019). Trust and the ethical challenges in the use of whole genome sequencing for tuberculosis surveillance: a qualitative study of stakeholder perspectives. *BMC Medical Ethics*, 20(1), 43.
- Jiang, J., & Bai, G. (2020). Types of information compromised in breaches of protected health information. *Annals of Internal Medicine*, 172(2), 159-160.
- Johnson, A. E., Pollard, T. J., Shen, L., Lehman, L. W. H., Feng, M., Ghassemi, M., ... & Mark, R. G. (2016). MIMIC-III, a freely accessible critical care database. *Scientific data*, 3(1), 1-9.
- Komorowski, M. (2020). Clinical management of sepsis can be improved by artificial intelligence: yes. *Intensive care medicine*, 46(2), 375-377.
- Linares, M., Postigo, M., Cuadrado, D., Ortiz-Ruiz, A., Gil-Casanova, S., Vladimirov, A., ... & Luengo-Oroz, M. (2019). Collaborative intelligence and

- gamification for on-line malaria species differentiation. *Malaria Journal*, 18(1), 21.
- Meng, Y., Zhang, Y., Wang, S., Wu, S., Zhou, H., Ke, C., ... & Rainey, J. J. (2020). Lessons learned in the development of a web-based surveillance reporting system and dashboard to monitor acute febrile illnesses in Guangdong and Yunnan Provinces, China, 2017-2019. *Health security*, 18(S1), S-14.
- Miller, S., Chiu, C., Rodino, K. G., & Miller, M. B. (2020). Point-counterpoint: should we be performing metagenomic next-generation sequencing for infectious disease diagnosis in the clinical laboratory?. *Journal of clinical microbiology*, 58(3), 10-1128.
- Orozco-Beltrán, D., Morales, C., Artola-Menéndez, S., Brotons, C., Carrascosa, S., González, C., ... & Fernández, G. (2022). Effects of a digital patient empowerment and communication tool on metabolic control in people with type 2 diabetes: The DeMpower multicenter ambispective study. *JMIR diabetes*, 7(4), e40377.
- Rhoads, D. D., Sintchenko, V., Rauch, C. A., & Pantanowitz, L. (2014). Clinical microbiology informatics. *Clinical microbiology reviews*, 27(4), 1025-1047
- Smith, K. P., Richmond, D. L., Brennan-Krohn, T., Elliott, H. L., & Kirby, J. E. (2017). Development of MAST: a microscopy-based antimicrobial susceptibility testing platform. *SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences Innovation*, 22(6), 662-674.
- Smith, K. P., & Kirby, J. E. (2020). Image analysis and artificial intelligence in infectious disease diagnostics. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(10), 1318-1323.
- Staley, J., Mazloom, R., Lowe, P., Newsum, C. T., Jaber-Douraki, M., Riviere, J., & Wyckoff, G. J. (2019). Novel data sharing agreement to accelerate big data translational research projects in the one health sphere. *Topics in Companion Animal Medicine*, 37, 100367.
- Strauss, M., Zoabi, K., Sagas, D., Reznik-Gitlitz, B., & Colodner, R. (2020). Evaluation of Bio-Rad® discs for antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion and the ADAGIO™ system for the automatic reading and interpretation of results. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(2), 375-384.
- Tsao, H. M., Chang, C. M., Chuang, J. H., Liu, D. P., Pan, M. L., & Wang, D. W. (2017). Toward automatic reporting of infectious diseases. In *MEDINFO 2017: Precision Healthcare through Informatics* (pp. 808-812). IOS Press.
- van Wyk, F., Khojandi, A., Mohammed, A., Begoli, E., Davis, R. L., & Kamaleswaran, R. (2019). A minimal set of physiomarkers in continuous

- high frequency data streams predict adult sepsis onset earlier. *International journal of medical informatics*, 122, 55-62.
- Verroken, A., Despas, N., Rodriguez-Villalobos, H., & Laterre, P. F. (2019). The impact of a rapid molecular identification test on positive blood cultures from critically ill with bacteremia: a pre-post intervention study. *PLoS One*, 14(9), e0223122.
- Wang, X., Williams, C., Liu, Z. H., & Croghan, J. (2019). Big data management challenges in health research—a literature review. *Briefings in bioinformatics*, 20(1), 156-167.
- Weis, C. V., Jutzeler, C. R., & Borgwardt, K. (2020). Machine learning for microbial identification and antimicrobial susceptibility testing on MALDI-TOF mass spectra: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(10), 1310-1317.
- Wood, R. L., Jensen, T., Wadsworth, C., Clement, M., Nagpal, P., & Pitt, W. G. (2020). Analysis of identification method for bacterial species and antibiotic resistance genes using optical data from DNA oligomers. *Frontiers in Microbiology*, 11, 257.



BÖLÜM 2

Bruselloz: Laboratuvar Test Yöntemleri

Halime Dağgez¹

Bruselloz, sıklıkla hayvanlardan geçen yaygın bir zoonotik enfeksiyon olup, endemik bölgelerde ciddi halk sağlığı sorunlarına sebep olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre en çok ihmal edilen yedi hastalıktan biridir ve halen küresel önemini korumaktadır (1,2). Hayvancılık ve gıda işletmeciliğinde yeterli olmayan hijyen önlemleri hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Hayvansal ürünlerin tüketimi asıl bulaş yolu olsa da enfekte hayvanların vücut sıvı ve salgılarıyla temas mesleki ve halk sağlığı sorunlarına sebep olmaktadır. Bununla beraber enfeksiyöz dozun çok düşük olması (10-100 bakteri), basil içeren aerosoller ile kolay yayılabilmesi kaynaklı laboratuvar içi bulaş görülebilmekte ve aynı sebeplerle biyoterörizm ajanları listesinde yer almaktadır (3). Ülkemizde brucella tüm komşularında olduğu gibi endemiktir. Özellikle Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgesinde daha sık görülmekte olup hastalığın bildirimi ülkemizde zorunludur. Buna rağmen bildirilen vaka sayılarının beklenenden önemli ölçüde az olduğu tahmin edilmektedir (4,5). Brucella prevalansı sosyoekonomik durum, coğrafi konum ve hayvancılık uygulamaları etkili rol almaktadır.

GENEL BİLGİLER

Brucella cinsi uzun yıllar 6 tür olarak sınıflandırılmış, moleküler genetik çalışmaların artması ve gelişmesiyle tür sayısı artmış, konakçı tip tercihi ve filo genetik özelliklerine göre farklı sınıflara ayrılmıştır. Yeni araştırılmalarda deniz memelilerinde, tarla faresi, babun, tilki gibi hayvanlarda da farklı tür *brucella* izole edilmiştir. Her *brucella* türünün de aynı zamanda çeşitli biyovarlara ayrıldığı gösterilmiştir (6). Bununla beraber insanlarda en sık *B. melitensis* (koyun ve keçiler), *B. abortus* (sığır), *B. suis* (domuzlar), *B. canis* (köpekler) ve nadiren *B. inopinata* kaynaklı enfeksiyonlar görülür. Son zamanlarda *B. ceti*, *B. Pinnipedialis* (deniz memelisi kaynaklı) türlerinde de nadir insan enfeksiyonları bildirilmiştir (7-11).

Brucella türleri, küçük boyutlu olup (0.5–0.7 × 0.6–1.5 µm) hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, zorunlu aerob ve bazı türlerinde (*B. abortus* ve *B. suis*) CO₂ desteğine ihtiyaç duyan gram-negatif kokobasillerdir. Karbonhidratları fermente etmezler. Oksidaz, katalaz ve üreaz pozitiflerler. Retiküloendotelial sistem

¹ Uzm. Dr., Malatya Yeşilyurt Hasan Çalık Devlet Hastanesi, Tınni Mikrobiyoloji,
ORCID: 0000-0002-6777-6730

içerisinde fakültatif hücre içi parazit olarak bulunurlar (9-11). Brucella ekzotoksinler, sitolizinler ve ekzoenzimler gibi klasik virülans faktörlerden yoksundur. Patogenezinde hücre içi parazit olmaları önemlidir ve bağışıklık kaçışında, kronik enfeksiyonları oluşturmada etkilidir. Asıl olarak fagositozu inhibe eder, bakterisidal aktiviteyi azaltır, endotoksik reaksiyonları azaltır ve antijen sunumunu engeller (6,10).

Brucella kliniği çok değişkenlik göstermekle beraber akut veya subakut başlayan, devamlı, aralıklı veya düzensiz, değişken süreli ateş, gece terlemeleri, halsizlik, myalji, eklem ağrısı ile karakterize sistemik hastalık oluşturur. Genel semptomlardan fokal organ tutulumu ile seyreden hastalığa kadar değişik klinik oluştururlar. Retiküloendotelyal tutulumla bağlı hepatosplenomegali, lenfadenopati bulguları, osteolojik patolojiler, epidimoorşit, üveit gibi semptomlara sebep olabilir. Kuluçka süresi 15 gün ile 6 ay arasında değişmekte olup 1 yıldan uzun sürerse kronikleşir (6,12,13).

TANI

BRUSELLOZ OLGU TANIMI

Tanı, takip ve enfeksiyon sürveyanında kullanılması önerilen olgu tanımları ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı, WHO ve Amerikan hastalık kontrol ve önleme merkezi (CDC) tarafından yapılmıştır (1,12,13). Ülkemizde önerilen olgu tanımları ve klinik brucella tanımları **Tablo 1** de gösterilmiştir. CDC'ye göre kesin vaka tanımının ilki klinik örnekten Brucella *spp.* kültürü ve tanımlaması, ikincisi ise sadece klinik vaka tanımına uyan ve Brucella *spp.*'nin klinik örneklerden izole edilmesi veya iki hafta ve üzeri arayla alınmış akut/ konvelesan serum örneklerinde brucella antikor testlerinde dört ve daha fazla katlık artış olması şeklindedir (12).

Tablo 1: Bruselloz olgu tanımları (5,13)

Vaka Türü	Tanım / Ölçüt
Klinik Tanımlama*	Akut ya da sinsi başlangıçlı, devamlı veya düzensiz ateş ile sayılacak olan klinik bulgulardan en az biri: yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı, baş ağrısı, yoğun gece terlemesi, yaygın kas ve eklem ağrıları
Epidemiyolojik Kriter	Hayvancılıkla uğraşma, mesleki temas (örneğin laboratuvarında çalışma), enfekte hayvan ürünlerinin (özellikle taze süt / süt ürünleri) tüketimi

Destekleyici Laboratuvar Kriteri	Serum örneklerinde RB testi ile antikor pozitifliği**
Doğrulatory Laboratuvar Kriterleri	- Klinik örneklerden insanlarda patojen Brucella tür izolasyonu - Daha önce tedavi almamış vakada tek serum örneğinde STA ile antikor titresinin $\geq 1/160$ olması - En az iki hafta arayla alınan çift serum örneğinde STA titrelerinde ≥ 4 kat artış - Klinik örneklerden insanda patojen Brucella tür nükleik asid izolasyonu
Şüpheli Vaka	Tanımlanmamıştır
Olası Vaka	Klinik tanı ölçütlerine uyan ve epidemiyolojik veya destekleyici laboratuvar kriterlerinden en az biriyle uyumlu vaka
Kesin Vaka	Klinik tanı ölçütlerine uyan ve doğrulatory laboratuvar kriterlerinden en az biriyle doğrulanmış vaka

RB: Rose-Bengal Testi, STA: Serum Tüp Aglutinasyon testi

*: Hastalık çeşitli organlarda lokal hastalık şeklinde görülebilir.

** : RB test negatifliği tanı ekartasyonunda yeterli değil

LABORATUVAR TANI TESTLERİ

İnsanlarda görülen brusellozun tanımlanması, hastalıkla ilişkili semptomların değişkenliği ve spesifik olmaması nedeniyle büyük ölçüde bakterinin klinik örneklerden izolasyonu ve serolojik testlerle antikor yanıtının gösterilmesi gibi mikrobiyolojik analize dayanmaktadır. Klinik benzerlikten ötürü sıtma, tifo, tüberküloz, septik artrit, endokardit, pnömoni, romatolojik hastalıklar, malignensiler, mantar enfeksiyonları ve psikiyatrik bozukluklar dahil olmak üzere diğer bulaşıcı/bulaşıcı olmayan hastalıkların ayırıcı tanısı gerekir (14). Brusellozun laboratuvar tanısında kültür, serolojik testler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Kesin tanıda mikrobiyolojik incelemelerin önemli ve esas olması nedeniyle enfeksiyonun kontrol altına alınmasında laboratuvara büyük iş düşmektedir.

KÜLTÜR

Bakteri başlıca kan ve kemik iliği kültürleri olmak üzere BOS, eklem sıvısı, apse içeriği gibi birçok klinik örneğin kültürlerinden de izole edilebilir. Kültür halen altın standarttır ve izole edildiğinde tanı koydurucudur. Ancak duyarlılık hastalığın evresi, kullanılan besiyeri sisteminin türü, öncesinde antibiyotik kullanımı varlığı gibi faktörlerden etkilenir (6,11,13,14,15). Kültürde üreme gözlenmemesi hastalığın dışlanması için yeterli değildir. *Brucella* türlerinin üreme dinamiği dikkate alındığında kan kültürlerinden izolasyon süresi uzamakta 6 haftaya kadar gecikebilmektedir. Kan kültür pozitiflik oranı %10-%90 arasında değişkenlik gösterir. Bu oran hastalık ilerledikçe giderek düşer, kronik enfeksiyonda, fokal veya komplike vakalarda %5-20 kadar daha geriler. Kemik iliği kültüründen izolasyon kan kültürlerine göre daha yüksek olmasına rağmen örneğin alınmasının zahmetli ve zor olması nedeniyle tercih edilmez. Kültür için kullanılan birçok sistem mevcut olup avantaj ve dezavantajları mevcuttur. En yüksek oranlar otomatize kan kültürü sistem sonuçlarında sağlanmış olup otomatize sisteme sahip olmayan laboratuvarlara Lizis-santrifügasyon yöntemi önerilmektedir (14-16). *Brucella*'nın kültüründe farklı teknikler kullanılabilir. Manuel monofazik kültürlerde, klasik olarak kan örnekleri şişelere ekilerek 35°C'de inkübe edilir, ancak mikroorganizmanın yavaş üreme özelliği nedeniyle, işaretlenmemiş şişelerin 5-7 gün içinde erken atılması tanısal duyarlılığı azaltır (16,17). Şüpheli durumlarda şişelerin daha uzun süre bekletilmesi ve kör alt kültürlerin yapılması önerilmektedir (17,18). Bifazik kültür sistemlerinden olan Ruiz-Castañeda yönteminde şişe dibinde katı faz mevcuttur. Bu sayede tekrarlanan alt kültür gereksinimini azaltılarak hem iş yükünü hem de laboratuvar kaynaklı bruselloz riski azaltılmıştır (19). Farklı tipte geliştirilen bifazik besiyerlerinde TUMS besiyeri, üreaz aktivitesine bağlı pH değişimi sayesinde *Brucella* tanısını hızlandırmıştır (20). Hemolin (BioMérieux, Fransa) besiyerinde yapılan çalışmada ortalama beş günlük bir tespit süresi bildirmesine rağmen 2 hafta sonrasında da üreme tespit edilmiştir (21). Lizis-bazlı kültür sistemleri, fagosite edilmiş *Brucella*'nın makrofaj, lökosit ve lenfositlerden serbest bırakılmasını sağlayarak izolasyon olasılığını artırmaktadır (22). Son yıllarda kullanılan otomatik kan kültürü sistemleri (ör. BACTEC, BacT/ALERT), CO₂ üretimini izleyen modern teknolojileri sayesinde tespit süresini kısaltmış, duyarlılığı artırmış ve laboratuvar güvenliğini iyileştirmiştir (23-25).

Brucella'nın hematojen yayılımı sonucunda bakteriler uzak organlara ulaşarak fokal enfeksiyonlara neden olabilir. Bu nedenle kemik iliği, genital eksüdalar, kemik dokusu, sinovyal sıvı aspiratları ve BOS gibi çeşitli biyolojik örnekler organizmanın saptanmasında kültüre edilebilir (24,25). *Brucella* spp içerdği düşünülen klinik örnekler en az BGD2 laboratuvar koşullarında sınıf-IIA biyogüvenlik kabini içinde standart güvenlik önlemleri dahilinde çalışılmalıdır. Kültürlerde *Brucella* üremesi halinde işlemlere BGD3 laboratuvarlarda devam edilmelidir. (3,12,13).

Üretilen brucella türleri çeşitli yöntemle tiplendirilebilir. Morfolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılabildiği gibi serolojik ve moleküler yöntemlerde kullanılır. **Tablo 2'**de bazı türlerin ayrımında kullanılan fenotipik testler görülmektedir. Brucella kan, çikolata ve BCYE (buffered-charcoal-yeast extract agar) besiyerlerinde ürer, ancak MacConkey agarda gelişmez. İzolasyon için seçici ortam gerekmez ve plaklar, 35°C'de %5-10 CO2 ile zenginleştirilmiş atmosferde 14 güne kadar inkübe edilmelidir. Brucella'nın tanımlanması, Gram boyası ile mikroskopide kümelenmiş, soluk boyanan Gram negatif çok küçük kokobasillerin görülmesine; pozitif oksidaz, katalaz ve üreaz aktivitelerine; şeker fermentasyonunun olmamasına, H₂S üretimine; tiyonin ve bazik fuksin varlığında büyüme yetisine; oksidatif metabolik test sonuçlarına ve hareketlilik eksikliğine dayanır (6,10).

Tablo 2: Brucella ayrımında kullanılan fenotipik testler

Özellikler	B. Melitensis	B. Abortus	B. Suis	B. Canis	Deniz Türleri
Fuksin Varlığında Üreme	Evet	Evet	Hayır	Değişken	Evet
Tiyonin Varlığında Üreme	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet
Safranin Varlığında Üreme	Evet	Evet	Hayır	Hayır	Evet
H₂S Üretimi	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Faj Varlığında Üreme					
Tb	Hayır	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Wb	Hayır	Evet	Evet	Hayır	Evet
Iz	Evet	Evet	Evet	Hayır	Evet
R/C	Hayır	Evet	Hayır	Evet	Hayır

Tanımlamada API 20 NE[®] (bioMerieux) gibi ticari olarak temin edilebilen biyokimyasal testler kullanıldığında *Brucella spp* *Psychrobacter* veya

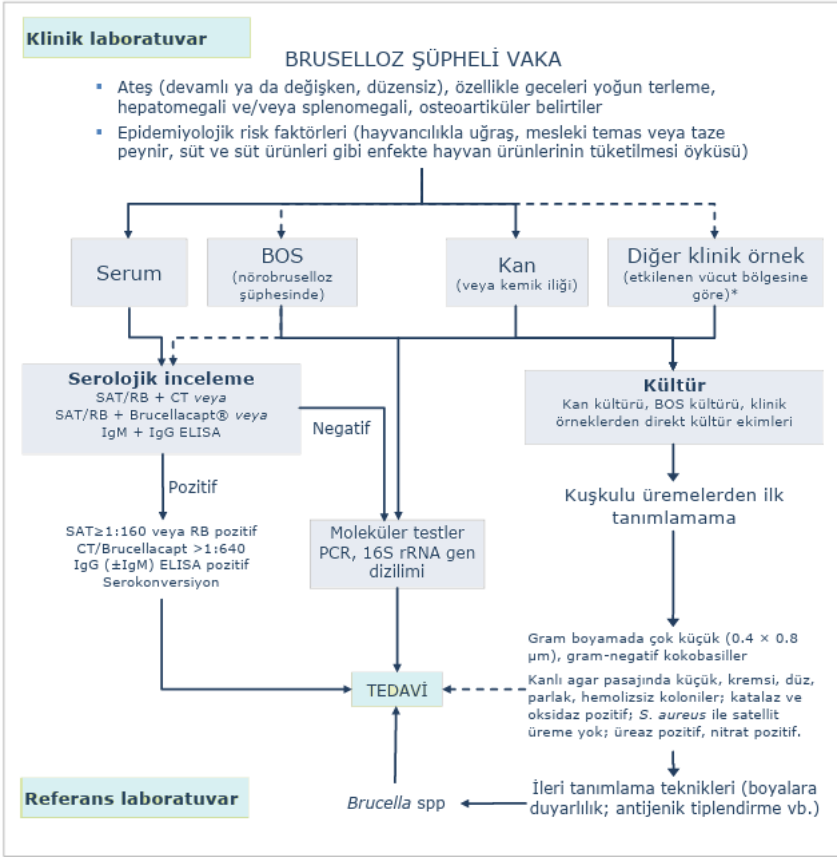
Ochrobactrum türünde bakteriler olarak yanlış tanımlanabilir (26). Micronaut™ brucella tür ve biyovaryantlarının tanımlanmasında 93 farklı substrat kullanan yarı otomatize bir sistemdir. Özellikle atipik suşlar düşünüldüğünde tüp testlerinin yerine veya tamamlayıcı olarak kullanılabilir (27). Tür tanımlamada geleneksel fenotipik yöntemlerin yanı sıra, doğruluğu bazen çelişkili olsa da Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF) teknolojisi ile de gerçekleştirilebilir (28-30).

Gram negatif bakteri identifikasyonunda kullanılan ticari hazır kitlerin Brucella türlerini tanımlamada hatalı olabileceği akılda tutulmalıdır. Vitek-2 otomatize sistemlerinde gram negatif tanımlama kartına ek oksidaz testi uygulanarak *B. melitensis*'in tanımlandığı bildirilmiştir (31,32).

SEROLOJİK TESTLER

Brucellanın kültüründeki zorluklar ve klinik hastaların hepsinde üretilmemesi gibi nedenlerle tanıda serolojik testler ön plana çıkmaktadır. Düşük maliyet, kullanım kolaylığı ve yüksek negatif öngörü değerine sahip olmaları nedeniyle endemik ve düşük-orta gelirli ülkelerde halen brusellozun teşhisi için ana tanı yöntemleridir. Tanı, takip ve tedavi etkinliği, relaps gibi durumlarda da kullanılır. Buna rağmen serolojik testler; enfeksiyonun erken evrelerinde yeterli antikor yanıtının oluşmamasına bağlı yalancı negatiflikler, brucella test antijenlerinin bazı farklı tür bakterilerle aynı olması nedeniyle oluşmuş IgM yanıtında çapraz reaksiyonların görülmesine bağlı yanlış pozitiflikler, prezon fenomen olarak bilinen antikor miktarının fazla olması ve özgül olmayan serum faktörlerine bağlı düşük titrelerde aglütinasyon görülmemesine bağlı yanlış negatiflikler, testlerde kullanılan antijen türüne bağlı *B. canis* enfeksiyonunun atlanması ve inkomplet antikorlar nedeniyle aglütinasyonun gözlenememesine bağlı yalancı negatiflik olması gibi sorunları barındırır (14,33). Bu sebeple çoğu zaman tanıda tek bir test yeterli olmayıp birlikte kullanılması gerekmektedir. Ülkemizde sağlık bakanlığının önerdiği tanı algoritması **Şekil 1** de görülmektedir (13).

Şekil 1: Brucella tanı algoritması (13)

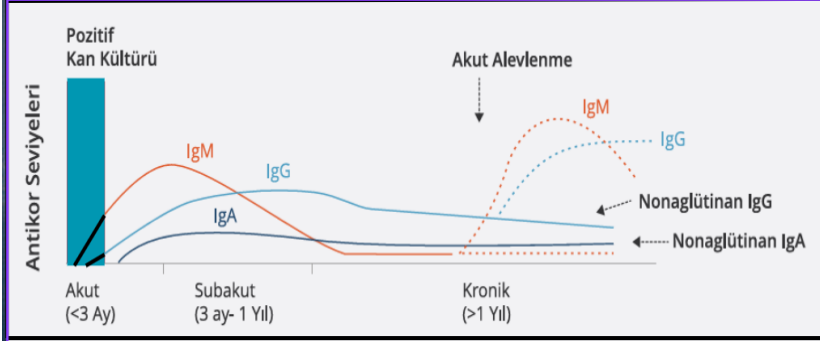


SAT, serum aglütinasyon testi; RB, Rose-Bengal (test); CT, Coombs test

* karaciğer, lenf nodu gibi dokulardan biyopsi materyali, apse aspiratı, daha az sıklıkla periton sıvısı, plevral sıvı, sinoviyal sıvı ve diğer normalde steril vücut sıvıları

Brucella ile temastan sonra klinik evre ve hastalığın fokal ya da sistemik seyirli olmasına göre antikor düzeyleri değişkenlik gösterir. Her insanda immün yanıtta farklılıklar olsa da genel olarak bruselloz enfeksiyonunun ilk haftasında IgM, sonraki ikinci haftada IgG ve takiben IgA yanıtı gelişir. Erken dönemde antikorları hepsinin titreleri artarak yaklaşık dördüncü haftada pik seviyelerine ulaşır. Uzayan olgularda esas olarak IgG ve IgA yanıtı vardır ve IgM konsantrasyonları giderek azalır. Bununla beraber tamamen iyileşmiş olguların %20-25'inde kür sonrası ilk yılda bile IgM antikorları belirlenmiştir. İlerleyen süreçte non-aglütinan (inkomplet) antikor dediğimiz antijenle tam olarak aglütinasyon oluşturmayan ve birçoğunun IgG (G1, G2) ve IgA tipinde olduğu antikorlar daha fazla hale gelerek serolojik testlerin yalancı negatifliğine yol açabilir. **Şekil 2** de brucelloz enfeksiyonu sırasında antikor düzeyleri görülmektedir (13,14).

Şekil 2: Brucelloz enfeksiyon seyrinde antikor seviyeleri (12)



Birçok Gram-negatif bakteri gibi *Brucella* suşları da hücre duvar bütünlüğünü korumak için gerekli olan lipopolisakkarit (LPS) üretirler. *B. ovis* ve *B. canis* hariç Polisakkarit O-zinciri, çekirdek ve lipit A'dan oluşan düz bir LPS'ye (S-LPS) sahiptirler. *Brucella* O-polisakkaritinin immünodominant epitopu *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella urbana* group N, *Vibrio cholerae* O1, *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O:157, *Escherichia hermanni*, ve *Stenotrophomonas maltophilia* ile benzediğinden dolayı testlerde çapraz reaksiyonlara sebep olarak testlerin özgüllüğünü düşürebilir (26).

Rose Bengal Testi

Bu test hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir plak aglütinasyon testidir ve bu durum tarama testi olarak kullanılmasını uygun kılar. *B. abortus* S99 veya S1119.3 suşlarının asit tampondaki (ph:3.65) süspansiyonu antijen olarak kullanılır. Lam veya kart üzerinde serum ile karşılatırıldığında 4 dakika içinde aglütinasyon varlığı pozitifdir. Asidik ortam IgG1 ve blokan IgA antikorlarının da reaksiyona katılmasını artırırken IgM aglütinasyonunu azaltır. Bu durum hem aglütinan hem de nonaglütinan antikorların tespit edilmesini sağlar. Çapraz reaksiyonlar IgM kaynaklı olduğu için asidik ortam yalancı pozitiflikleri azaltır. DSÖ pozitif sonuçların diğer testlerle doğrulanmasını önermektedir. Testin duyarlılığı yüksek (>90), özgüllüğü ise %75–91 arasındadır (1,13,14,34)

Serum Aütinasyon Testi

Serum aglütinasyon testinin (SAT), Wrigth testi, tüp aglütinasyon testi gibi isimleri de vardır. *B. abortus* S kökenlerinin (S99/S1119-3) ısı ile öldürülmüş fenollü tam hücre süspansiyonları antijen olarak kullanılır. Bu test tanıda referans yöntem olup IgM, IgG ve IgA sınıfı antikorları da belirler. Test nötral PH'da yapıldığı için IgM'leri daha çok tespit eder. Testin duyarlılığı %92 özgüllüğü ise %100'dür (35,36).

Test; hasta serumunun 1/10-1/2560 aralığında dilüsyonları üzerine antijen eklenerek, 37C'de 24 saat inkübasyon sonrası aglütinasyon varlığı değerlendirilmesi ile yapılır. Değerlendirmede dipte düğme tarzı çöküntü görülmesi veya 1/160 dilüsyona kadar dantela şeklinde aglütinasyon varlığı negatif olarak değerlendirilir. Testte total antikorların titresi belirlendiği için IgG ve IgM ayrımı yapılamadığından, test sonucu pozitif bulunduğunda akut enfeksiyon ayrımı için 2-merkaptotanol testi veya ELISA testi yapılmalıdır. Test sonucunda tek serum örneğinde $\geq 1/160$ titreler kliniğe akut brüceloz lehine pozitif olarak bildirilir. Düşük titrelerde görülen aglütinasyonlarda hastalığın yeni başlamış olabileceği akılda tutularak 10-14 gün sonrasında örnek tekrarlanmalıdır. Çift serum örneğinin incelemesinde ≥ 4 kat titre artışı veya serokonversiyon varlığında akut brüceloz için kesin tanı ölçütüdür. Tek bir serum örneğindeki 1/160 ve üzeri titre epidemiyolojik temas öyküsü ve klinik hastalık varlığında akut/aktif brücelozla uyumludur. Tüm bunlara rağmen yalancı negatif ve pozitif sonuçlar tanıyı güçleştirmektedir. Negatif sonuca rağmen klinik brüceloz şüphesi olan hastalarda çoğunluğunun IgG (IgG1 ve IgG2) ve IgA yapısındaki antikorlardan oluşan blokan antikor varlığı veya prozon fenomeni akılda tutulmalıdır. Blokan antikor varlığı düşünüldüğünde ELISA veya Coombs testi yapılmalıdır. Prozon fenomeni daha çok subakut ve kronik olgularda daha az da akut evrede de görülebilir. Hasta serumunun daha ileri titrasyonu yapılarak çözümlenebilir (14,16,32,36)

Brüceloz tanısında tek bir testin yeterli duyarlılık ve özgüllük sağlamadığı, farklı testlerin birlikte kullanımının tanısal doğruluğu artırdığı bildirilmektedir. Loubet ve ark., serolojik ve moleküler testlerin kombinasyonunun, özellikle akut olgularda tanısal performansı anlamlı ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir (37). Benzer şekilde, Xu ve ark. serolojik testlerin klinik örneklerde etkinliğini değerlendirerek, farklı antijenik hedeflerin bir arada kullanılmasının tanı başarısını artırdığını vurgulamıştır (38). Mohseni ve ark. ise ELISA, PCR ve serum aglütinasyon testlerini karşılaştırmış ve ELISA'nın yüksek duyarlılık, PCR'ın ise özgüllük açısından üstün olduğunu bildirmiştir (39). Bu veriler, brüceloz tanısında çoklu test yaklaşımlarının tek başına kullanılan yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar sunduğunu ortaya koymaktadır.

Merkaptan Bazlı Testler

Akut brüceloz tanısı, prognozun değerlendirilmesi ve hastalık evresinin saptanmasında kullanılır. Tüp aglütinasyon testinden farklı olarak hasta serumu SF ile değil merkaptan/redüktan (2-ME ve dithiothreitol) maddeler ile dilüe edilir. Böylece IgM tipi antikorlar aglütinasyon yeteneğini kaybederken ortamdaki IgG etkilenmeden kalır. Titrasyonla kronik ve akut enfeksiyon ayrımına katkı sağlanır (40,41).

Coombs Testi (Anti-human Globulin Test)

Komplike ve kronik olgularda blokan antikor varlığı, agammaglobulinemi veya prozon varlığında STA testi yalancı negatiflik gösterebilir. Test prosedüründe standart tüp aglütinasyon yapıldıktan sonra aglütinasyon veren tüpler çalışmadan çıkarılır. Diğer tüpler santrifüj edilerek SF ile yıkama işlemi uygulanarak üç kez tekrarlanır. Coombs serumu eklendikten sonra 24 saat inkübe edilerek değerlendirilir. Tanısal titre konusu netlik kazanmasa da bazı kimisinde SAT titresinin iki katı ($\geq 1:320$), kimisinde ise SAT ile elde edilen titre değerinde en az 4 kat artış olmasını CT için anlamlı olarak kabul edilmiştir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %92-%100'dür. CT titreleri akut brucellozda SAT titrelerinden 4-16 kat, tedavi almamış kronik brucelloz da ise 16-256 kat daha yüksektir (13,14,40,42).

Brucella Coombs Jel Test

Klasik Brucella Coombs testinin jel teknolojisiyle geliştirilmiş hızlı bir versiyonu olan brucella coombs jel testte mikrokolonlara jel matrisi içerisine Coombs antikorları yerleştirilmiştir. Basit ve hızlı bir aglütinasyon testidir ve santrifüj sonrası jel içinde çizgi şeklinde aglütinasyonun zonu gözlenmesi esasına dayanır. Antikorların yokluğunda, Brucella antijeni jel kart sisteminin dibinde çöker. Yaklaşık 15–20 dakika içinde sonuç verir. Yapılan birçok çalışmada duyarlılık 95-98, özgüllük 94-97 arasında değişmektedir. Rose-Bengal, STA ve ELISA testleriyle yüksek oranda korelasyon saptanmış özellikle düşük titreli serumlarda klasik testlerden daha duyarlı sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle kronik ve düşük antikor düzeyli olgularda diğer testleri tamamlayıcı niteliktedir ve laboratuvar tanısında güçlü bir alternatif olarak önerilmektedir (43-49).

İmmuncapture Aglütinasyon Test

Brucellacapt test (Viracell, İspanya) anti-insan immüoglobulinleri ile kaplanmış mikrotitre kuyucuklarından oluşur. Kalifiye laboratuvar personeli veya ek bileşenler gerektirmez ve sonuçlar 24 saat sonra okunur. Antijen olarak *B. abortus* suşu kullanılan test asidik ortamda çalışmaktadır. Aglütine olan ve olmayan inkomplet antikorları da tespit eder. Seyreltilmiş hasta serumu ve antijeni kuyucuklara eklenir ve şeritler 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Kuyucukların dibinde merkezi bir çöküntü olması negatif olarak yorumlanır. Klasik serolojik yöntemlere alternatif modern bir tanı yaklaşımı sunan Brucellacapt test, pratiktir ve yüksek özgüllük ve duyarlılıktadır. Tanıda STA testi ile Brucellacapt kullanımı yararlıdır (11,14,50).

Elisa testi

Hastalığın tanı, evrelemesinde ve takibinde oldukça yararlı olan test, yüksek duyarlılık ve özgüllükle 4-6 saat içinde ve kantitatif olarak saptayabilmektedir.

Yöntem ile total antikorlar saptanabileceği gibi tek tek immungloblinlerin titreleride çalışılabilir. Çalışmalarda ticari ELISA IgM testinin düşük duyarlılıkta olduğunu, ELISA testlerinin konvansiyonel testlere üstünlüğünün olmadığını belirtmişlerdir (41). ELISA özellikle nörobruselloz dan kuşkulandığında BOS incelemesinde tanıya yardımcıdır. ELISA yeterli sayıda numune biriktiğinde çalışılan bir test olduğu için sürveyansta tercih edilmektedir. Özgüllüğün düşük olmasına bağlı ortaya çıkabilecek yalancı pozitif sonuçlar nedeniyle CDC aglütinasyon temelli olmayan testlerin bruselloz doğrulanmasında kullanılmamasını önermektedir(12,13,14,41) .

Lateral flow test

Brusellaya özgül IgG ve IgM antikorlarını tespit eden immünokromatografik bir yöntemdir. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan testin sonuçları SAT ile uyumludur. Testin çalışılması kolaydır ve sonuçlanması hızlıdır (51,52).

MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Her türü doku ya da örnekle çalışılabilmesi, hızlı olmaları ve asemptomatik hastalarda bile sonuç vermeleri moleküler yöntemleri avantaj kılma da uzmanlık gerektirmeleri yüksek maliyetli olmaları nedeniyle uygulanabilirlikleri kısıtlıdır. Ayrıca kronik hastalarda ve antibiyotik alan hastalarda bakteri yükünün azalması nedeniyle *Brucella* DNA'sının elde edilmesi zorlaşmaktadır. DNA tespit edilse bile yaşayan bakteriyi direk göstermediği için tanıyı destekleyicidir. Bu testlerin duyarlılığı %50-%100 arasında değişmektedir. Bu değişkenlikte kullanılan DNA izolasyon yöntemleri, test edilen materyalin cinsi, kullanılan gen bölgesi gibi birçok etken sorumludur. Son yıllarda yapılan çalışmalar PCR yöntemlerinin tanı ve tedavi takibinde yararlı olduğunu göstermektedir. Akut hastalıkta *Brucella* DNA'sı tespiti neredeyse kesinken, antibiyotik tedavisiyle birlikte DNA düzeyleri düşmekte fakat asemptomatik hastalarda düşük seviyede kalabilmektedir. Ancak, tedavi başarısı veya nüksü belirlemede kesin kriterler yoktur.

Kantitatif gerçek zamanlı PCR, özellikle klasik yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda tanıda değerli olup, aktif ve eski enfeksiyonları ayırt etmede yardımcıdır. Klinik yanıt her zaman patojenin tamamen temizlendiğini göstermez. Klinik iyileşmeden sonra bile uzun süre saptanabilen DNA nedeniyle tedavi sonrası alınan sonuçlar her zaman nüks anlamına gelmez. Gerçek zamanlı PCR'ın duyarlılığı yüksek olsa da, nüks ve kronik ayırımında tek başına yeterli değildir (26).

Klinik örneklerde PCR ile *Brucella* DNA belirlenmesi, CDC tarafından önerilen olası laboratuvar tanı ölçütü arasında yer almaktadır (12). Klasik PCR 'da çeşitli gen hedefleri kullanılabilir. Bunlardan 16S rRNA çapraz reaksiyonlar sonucu yanlış pozitiflikler verebilmektedir. IS711 dizisi kullanımlarında da bazı suşların dizi varyasyonları veya yokluğu nedeniyle doğru tartışmaya açıktır

(53). Bu nedenle *omp2*, *omp31*, *recA* geni, 26-kDa'luk periplazmik proteini kodlayan *omp28/bp26* geni, RNA Polimeraz Beta Alt Birimi (*rpoB*) ve 31-kDa'luk hücre yüzey proteinini kodlayan *bcs31* gibi genlerde PCR da kullanılmaktadır. İmmünojenik membran proteinini kodlayan *bcs31* geninin tutarlılığı ve bağışıklık tepkisi nedeniyle tanı için en sık kullanılan gen olmuştur (54,55,56).

Real-time PCR, multiplex PCR, nested PCR, PCR-enzyme immunoassay (PCR-EIA) ve loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kullanılan diğer moleküler yöntemlerdir. PCR restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi (RFLP) ve *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* PCR (AMOS-PCR), *Brucella* DNA'sını tanımlamada diğer önemli duyarlılık sağlayan PCR tabanlı moleküler yaklaşımlardır. *Brucella* türlerini ayırt etmek amacıyla, IS711 bölgesinde görülen polimorfizm temel alınarak AMOS-PCR adlı ilk tür-özgü multiplex PCR geliştirilmiştir (57). Ayrıca, izotermal amplifikasyon (LAMP) yönteminin klinik örneklerden *Brucella* tespiti için hızlı, doğrudan ve güvenilir bir tanı yöntemi olduğu görülmektedir (58).

DİĞER TEKNİKLER

Hızlı Dikey Akış Teknolojisi (RVFT)

Brucella antikorlarını tespit eden çiçek benzeri indirgeyici madde olarak β -siklodekstrin içeren altın nanopartiküller ve gümüş biriktirme esasına dayanan hızlı dikey akış teknolojisi (RVFT), geliştirilen yöntemlerdendir. Lateral akış testlerinde karşılaşılan yanlış negatif sonuç sorununu etkin şekilde önlemekle beraber kullanımı pratik olup, çıplak gözle 5-6 dakika içinde sonuç alınabilmektedir. Tespit sınırı 4 IU/mL'dir. Yöntemin hassasiyetini artırmak için bruselloz antikorlarının tespitinde LPS'den yararlanılmış, tam kan ve diğer biyolojik örneklerle de kullanılabilmesini sağlayan çok amaçlı bir tampon içermektedir (59,60).

Kuantum Nokta Tabanlı İmmünokromatografik Test Şeridi

Bruselloz antikorlarının sahada hızlı tespiti amacıyla Quantum Dot (QD) tabanlı immünokromatografik bir sistem geliştirilmiştir. Test şeridinin duyarlılığı %98,53, özgüllüğü %93,57 ve standart aglütinasyon testiyle korelasyon oranı %96,98 olarak rapor edilmiştir (61).

CRISPR/CAST

Brucella nükleik asidini hızlı bir şekilde tespit edebilen bir CRISPR/CAST (CRISPR/Cas12a Test şeridi) temelli test planlanan bir çalışmada; CRISPR/Cas12a sistemini, rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RPA) ve yanak akış okuma ile birleştirilmiştir. Testte *B. melitensis* üzerinde *bp26* genini seçilerek izotermal sıcaklık koşullarında test edilmiş ve 30 dakika içinde 10

kopya/µl hassasiyetle tamamlanabilmiş. Yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekliliğine rağmen yüksek hassasiyeti ile umut vadetmektedir (62). Yine yakın zamanlı bir çalışmada *Brucella* BCSP31 genine dayalı nükleik asit tespiti için CRISPR/cas13a destekli CRISPR RNA (crRNA) ve RAA primerleri tasarlanmıştır; floresan tespit yöntemi ve bir kağıt şerit tespit yöntemi ile entegre edilmiştir. Tanıda potansiyel uygulanabilirliği gösterilmiştir (63)

Kolloidal Altın İmmünokromatografik Test

Brucella tespitinde kullanılmak üzere LPS'ye yüksek afinite ve diğer bakterilerle sınırlı çapraz reaksiyon gösteren bir monoklonal antikor olan LPS-6B5 üretilmiştir. Kültürlenmiş *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'i tespit etmede yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren bir kolloidal altın immünokromatografik test (GICA) olarak kullanıma sunulmuştur. Farklı çalışmalarla desteklenerek geliştirilmesi gerekmektedir (64).

Proteomiks

Günümüzde proteomik teknolojiler, düzenleyici sistemlerin mikrobiyal protein kompozisyonu üzerindeki etkilerini belirlemede önemli bir postgenomik yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Mikrobiyal fizyoloji, gen ekspresyonu ve bakteri-konak hücre etkileşimlerinin incelenmesinde etkili bir araç sunar. LC-MS tabanlı proteomik teknolojisi ise özellikle *Brucella* tanısında yaygın olarak kullanılmakta ve bu alanda katkı sağlamaktadır (65).

Yeni teknolojilerle *brucella* türleri üzerindeki çalışmalar *Brucella*'nın immünodominant proteinlerinin tespitinde, virülans ve konak yanıtını anlamada büyük katkı sağlamaktadır. Büyük çoğunluğunun dış zar veya periplazmik proteinlerin oluşturduğu tanımlanan proteinlerden bazıları BAB1-1885, *Brucella* protein26 (BP26), Cu-Zn süperoksit dismutaz (SodC), Leu/Ile/Val bağlayıcı aile proteini, VirB12, Serin proteaz, ikiz arginin, bakteriyoferritin (Bfr), tiamin taşıyıcı bağlayıcı protein, İstila proteini B (InvB), *Brucella* lumazin sentaz (BLS), malat dehidrogenaz (Mdh) ve Aldehit dehidrogenazdır. VirB12, rekombinant BP26 ve BLS gibi proteinlerle yapılan bazı çalışmalarda brusellozun tanısında çapraz reaksiyon vermeden, hızlı, yüksek doğruluk ve spesifitede sonuç vereceğini göstermiştir (66,67).

KAYNAKLAR

- World Health Organization. (2014). The control of neglected zoonotic diseases: Report of the fourth international meeting held at WHO headquarters, Geneva, Switzerland, 19–20 November 2014. Geneva: World Health Organization. Retrieved January 5, 2021
- Franc, K. A., Krecek, R. C., Hasler, B. N., & Gamboa, A. M. A. (2018). Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: A call for interdisciplinary action. *BMC Public Health*, 18(1), 125.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2014). Ulusal mikrobiyoloji standartları: Laboratuvar güvenliği rehberi (Sağlık Bakanlığı Yayın No. 937). Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. ISBN: 978-975-590-487-0
- Bruselloz İstatistik verileri. Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı. Bruselloz Vakalarının Yıllara Göre Dağılımı (2008-2024)
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Zoonotik ve Vektörel Hastalıklar Dairesi Başkanlığı. (2024). Türkiye’de bruselloz mevcut durum raporu [Current situation report of brucellosis in Türkiye] (Sağlık Bakanlığı Yayın No. 1290). Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı. ISBN: 978-975-590-651-5
- Qureshi, K. A., Parvez, A., Fahmy, N. A., Abdel Hady, B. H., Kumar, S., Ganguly, A., Atiya, A., Elhassan, G. O., Alfadly, S. O., Parkkila, S., & Aspatwar, A. (2023). Brucellosis: epidemiology, pathogenesis, diagnosis and treatment-a comprehensive review. *Annals of medicine*, 55(2), 2295398.
- Hahn, M. M., Vergnaud, G., Scholz, H. C., & Köhler, S. (2019). Taxonomic organization of the family Brucellaceae based on a genome-based reclassification. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3083. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03083>
- Whatmore, A. M., Koylass, M. S., Muchowski, J., Edwards-Smallbone, J., Gopaul, K. K., & Perrett, L. L. (2016). *Brucella* taxonomy and evolution. *BMC Microbiology*, 16, 71.
- Al Dahouk, S., Köhler, S., & Scholz, H. C. (2022). The retrospective on atypical *Brucella* species leads to novel species description and elucidation of *Brucella* evolution. *Microorganisms*, 10(4), 813.
- Ghssein G, Ezzeddine Z, Tokajian S, Khoury CA, Kobeissy H, Ibrahim JN, Iskandar C, Hassan HF. Brucellosis: Bacteriology, pathogenesis, epidemiology and role of the metallophores in virulence: a review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025 Jul 8;15:1621230. doi: 10.3389/fcimb.2025.1621230.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). *Brucella* species. In S. Baron (Ed.), *Medical microbiology* (4th ed.). Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Brucellosis reference guide: Exposures, testing, and prevention*. U.S. Department of Health and Human Services. <https://www.cdc.gov/brucellosis/media/pdfs/brucellosis-reference-guide.pdf>
- T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı. (2014). *Ulusal mikrobiyoloji standartları: Bulaşıcı hastalıklar laboratuvar tanı rehberi* (Sağlık Bakanlığı Yayın No. 934). Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. ISBN: 978-975-590-489-4
- Şimşek-Yavuz S, Özger S, Benli A, et al. [The Turkish Clinical Microbiology and Infectious Diseases Society (KLİMİK) evidence-based guideline for the diagnosis and treatment of brucellosis, 2023]. *Klinik Derg.* 2023;36(2):86-123. Turkish.
- Yagupsky P. (1999). Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3437–3442.
- Di Bonaventura, G., Angeletti, S., Ianni, A., Petitti, T., & Gherardi, G. (2021). Microbiological Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis: An Overview. *Pathogens*, 10(12), 1623.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., & Tsianos, E. (2005). Brucellosis. *The New England journal of medicine*, 352(22), 2325–2336.
- Mangalgi, S., & Sajjan, A. (2014). Comparison of three blood culture techniques in the diagnosis of human brucellosis. *Journal of laboratory physicians*, 6(1), 14–17.
- Ruiz Castaneda M. (1961). Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bulletin of the World Health Organization*, 24(1), 73–84.
- Fatollahzadeh B, Maleknejad P, Hejazi M, Pyri H. Development and evaluation of TUMS medium, a novel biphasic culture medium for isolation of *Brucella* spp. from patients. *Iran J Microbiol.* 1;1(2):21-25.
- Ruiz, J., Lorente, I., Pérez, J., Simarro, E., & Martínez-Campos, L. (1997). Diagnosis of brucellosis by using blood cultures. *Journal of clinical microbiology*, 35(9), 2417–2418.
- Mantur, B. G., & Mangalgi, S. S. (2004). Evaluation of conventional castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis. *Journal of clinical microbiology*, 42(9), 4327–4328.

- Sagi, M., Nesher, L., & Yagupsky, P. (2017). The Bactec FX Blood Culture System Detects *Brucella melitensis* Bacteremia in Adult Patients within the Routine 1-Week Incubation Period. *Journal of clinical microbiology*, 55(3), 942–946.
- Yagupsky, P. (2015). Blood cultures for the diagnosis of human brucellosis. In M. M. Baddour (Ed.), *Updates on brucellosis* (pp. 45–60). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/61143>
- Akcam, F. Z., Yayli, G., Uskun, E., Kaya, O., & Demir, C. (2006). Evaluation of the Bactec microbial detection system for culturing miscellaneous sterile body fluids. *Research in microbiology*, 157(5), 433–436.
- Al Dahouk, S., & Nöckler, K. (2011). Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(7), 833–845.
- Al Dahouk, S., Scholz, H.C., Tomaso, H. et al. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiol* 10, 269 (2010).
- Karger, A., Melzer, F., Timke, M., Bettin, B., Kostrzewa, M., Nöckler, K., Hohmann, A., Tomaso, H., Neubauer, H., & Al Dahouk, S. (2013). Interlaboratory comparison of intact-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry results for identification and differentiation of *Brucella* spp. *Journal of clinical microbiology*, 51(9), 3123–3126.
- Nyvang Hartmeyer, G., Kvistholm Jensen, A., Böcher, S., Damkjaer Bartels, M., Pedersen, M., Engell Clausen, M., Abdul-Redha, R., Dargis, R., Schouenborg, P., Højlyng, N., Kemp, M., & Christensen, J. J. (2010). Mass spectrometry: pneumococcal meningitis verified and *Brucella* species identified in less than half an hour. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 42(9), 716–718.
- Wareth G, Pletz MW, Neubauer H, Murugaiyan J. Proteomics of *Brucella*: Technologies and Their Applications for Basic Research and Medical Microbiology. *Microorganisms*. 2020 May 20;8(5):766. doi: 10.3390/microorganisms8050766. PMID: 32443785; PMCID: PMC7285364.
- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clinical laboratory*, 49(9-10), 487–505.
- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., & Frangoulidis, D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clinical laboratory*, 49(11-12), 577–589.

- Alişkan H. Kültür ve serolojik yöntemlerin insan brucellozu tanısındaki değeri [The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis]. *Mikrobiyol Bul.* 2008 Jan;42(1):185-95. Turkish. PMID: 18444578.
- Ruiz-Mesa, J. D., Sánchez-Gonzalez, J., Reguera, J. M., Martín, L., Lopez-Palmero, S., & Colmenero, J. D. (2005). Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(3), 221–225.
- Guerrier, G., Daronat, J. M., Morisse, L., Yvon, J. F., & Pappas, G. (2011). Epidemiological and clinical aspects of human *Brucella suis* infection in Polynesia. *Epidemiology and infection*, 139(10), 1621–1625.
- Galińska, E. M., & Zagórski, J. (2013). Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 20(2), 233–238.
- Loubet P, Magnan C, Salipante F, Pastre T, Kerié A, O'Callaghan D, Sotto A, Lavigne JP. Diagnosis of brucellosis: Combining tests to improve performance. *PLoS Negl Trop Dis.* 2024 Sep 5;18(9):e0012442. doi: 10.1371/journal.pntd.0012442. PMID: 39236075; PMCID: PMC11407618.
- Xu N, Qu C, Sai L, Wen S, Yang L, Wang S, Yang H, Liu H, Wang G. Evaluating the efficacy of serological testing of clinical specimens collected from patients with suspected brucellosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Feb 21;17(2):e0011131. doi: 10.1371/journal.pntd.0011131. PMID: 36802393; PMCID: PMC9942959.
- Mohseni K, Mirnejad R, Piranfar V, Mirkalantari S. A Comparative Evaluation of ELISA, PCR, and Serum Agglutination Tests For Diagnosis of *Brucella* Using Human Serum. *Iran J Pathol.* 2017 Fall;12(4):371-376. Epub 2017 Oct 1. PMID: 29563933; PMCID: PMC5844682.
- Kılıç, S. (2012). Mikrobiyolojik tanı [Microbiological diagnosis]. *Türkiye Klinikleri Journal of Infectious Diseases-Special Topics*, 5(1), 46–66
- Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Nov 13;33(1):e00073-19. doi: 10.1128/CMR.00073-19. PMID: 31722888; PMCID: PMC6860005.
- Marrodan, T., Nenova-Poliakova, R., Rubio, M., Ariza, J., Clavijo, E., Smits, H. L., & Diaz, R. (2001). Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *Journal of medical microbiology*, 50(8), 663–666.

- Evaluation of a New and Rapid Serologic Test for Detecting Brucellosis: Brucella Coombs Gel Test. Hanci H, Igan H, Uyanik MH. *Pak J Biol Sci.* 2017;20(2):108-112. doi: 10.3923/pjbs.2017.108.112. PMID: 29023001
- Comparison of a New and Rapid Method: Brucella Coombs Gel Test With Other Diagnostic Tests. Kalem F, Ergün AG, Durmaz S, Doğan M, Ertuğrul Ö, Gündem S. *J Clin Lab Anal.* 2016 Sep;30(5):756-9. doi: 10.1002/jcla.21934 Epub 2016 Mar 17. PMID: 26990900
- Comparison of a Novel Test (ODAK Brucella Coombs Gel Test) with Commonly Used Serological Tests in Human Brucellosis. Borsa BA, Aldag ME, Yilmaz M, Dalar ZG, Ozalp VC. *Clin Lab.* 2016 Sep 1;62(9):1671-1674. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.160120. PMID: 28164569
- Comparison of a new and rapid method, Brucella Coombs gel test with the other methods in the serological diagnosis of brucellosis. İrvem A, Yücel FM, Aksaray S, Bor E. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Apr;49(2):181-7. doi: 10.5578/mb.8881. PMID: 26167818
- Comparison of standard agglutination tests, enzyme immunoassay, and Coombs gel test used in laboratory diagnosis of human brucellosis. Koçman EE, Erensoy MS, Taşbakan M, Çiçeklioğlu M. *Turk J Med Sci.* 2018 Feb 23;48(1):62-67. doi: 10.3906/sag-1707-122.
- Comparative Analysis of Pediatric Patients with Different Involvements of Brucellosis. Deniz M, Şenol H, Parlak K, Kabar F. *Am J Trop Med Hyg.* 2024 May 14;111(2):305-311. doi: 10.4269/ajtmh.23-0586. Print 2024 Aug 7. PMID: 38740020
- Evaluation of risk factors for the development of bacteremia and complications in patients with brucellosis: Is it possible to predict the clinical course? Kuruoglu T, Sensoy L, Atilla A, Temocin F, Gur D, Tanyel E. *J Infect Dev Ctries.* 2023 Sep 30;17(9):1277-1284. doi: 10.3855/jidc.18164 PMID: 37824349
- Orduña A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Dueñas A, Cuervo M, Abad R, Hernández B, Lorenzo B, Bratos MA, Torres AR. 2000. Evaluation of an Immunocapture-Agglutination Test (Brucellacapt) for Serodiagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol* 38: <https://doi.org/10.1128/jcm.38.11.4000-4005.2000>
- Irmak, H., Buzgan, T., Evirgen, O., Akdeniz, H., Demiroz, A. P., Abdoel, T. H., & Smits, H. L. (2004). Use of the Brucella IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(6), 688–694.
- Smits, H. L., Abdoel, T. H., Solera, J., Clavijo, E., & Diaz, R. (2003). Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral

- flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10(6), 1141–1146.
- Dağlar, D. E., & Baysan, B. Ö. (2014). İnsanda Brusella Enfeksiyonlarının Tanısında Kullanılan Tanı Yöntemleri. *Annals of Health Sciences Research*, 3(2), 46-48)
- Baddour, M. M., & Alkhalifa, D. H. (2008). Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Canadian journal of microbiology*, 54(5), 352–357.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., & López-Goñi, I. (1995). Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 33(3), 615–617.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M. S., Poliak, S., & Garin-Bastuji, B. (2009). Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Veterinary microbiology*, 137(1-2), 156–164.
- Elrashedy, A., Gaafer, M., Mousa, W., Nayel, M., Salama, A., Zaghawa, A., Elsify, A. and Dawood, A. S. 2022. Immune response and recent advances in diagnosis and control of brucellosis. *Ger. J. Vet. Res.* 2 (1): 10-24.
- Moeini-Zanjani, A., Pournajaf, A., Ferdosi-Shahandashti, E. et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and conventional PCR tests for diagnosis of common *Brucella* species. *BMC Res Notes* 13, 533 (2020).
- Elrashedy A., Gaafar M., Mousa W., Nayel M., Salama A., Zaghawa A., et al. (2022). Immune response and recent advances in diagnosis and control of brucellosis. *Ger J. Vet. Res.* 2, 10–24. doi: 10.51585/gjvr.2022.1.0033
- Fang, A., Feng, D., Luo, X., & Shi, F. (2022). Gold Nanoparticles Prepared with Cyclodextrin Applied to Rapid Vertical Flow Technology for the Detection of Brucellosis. *Biosensors*, 12(7), 531.
- Li G, Rong Z, Wang S, Zhao H, Piao D, Yang X, et al. (2020) Rapid detection of brucellosis using a quantum dot-based immunochromatographic test strip. *PLoS Negl Trop Dis* 14(9): e0008557.
- Abdhalhim Abuawad, Yaqoub Ashhab, Andreas Offenhäusser & Hans-Joachim Krause. (2023) DNA Sensor for the Detection of *Brucella* spp. Based on Magnetic Nanoparticle Markers. *International Journal of Molecular Sciences* 24:24, pages 17272.
- Liu H, Xu L, Xiu Y, Ta N, Xu Q, Fan Y, Li K, Zhao H, Piao D, Ren F, Jiang H. A CRISPR/cas13a-assisted precise and portable test for *Brucella* nucleic acid detection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2025 Mar 21;15:1545953. doi: 10.3389/fcimb.2025.1545953. PMID: 40191137; PMCID: PMC11968652.

- Wu Q, Guo X, Huang Q, Xie Y, Guo L, Yang X, Sun M, Yin D. Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detecting the smooth Brucella. *Sci Rep.* 2024 Oct 23;14(1):25068. doi: 10.1038/s41598-024-76026-4. PMID: 39443541; PMCID: PMC11500340.
- Wareth G, Pletz MW, Neubauer H, Murugaiyan J. Proteomics of Brucella: Technologies and Their Applications for Basic Research and Medical Microbiology. *Microorganisms.* 2020 May 20;8(5):766. doi: 10.3390/microorganisms8050766. PMID: 32443785; PMCID: PMC7285364.
- Tian, M., Song, M., Yin, Y., Lian, Z., Li, Z., Hu, H., Guan, X., Cai, Y., Ding, C., Wang, S., Li, T., Qi, J., & Yu, S. (2020). Characterization of the main immunogenic proteins in Brucella infection for their application in diagnosis of brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 70, 101462.
- Elrashedy A., Gaafar M., Mousa W., Nayel M., Salama A., Zaghawa A., et al. (2022). Immune response and recent advances in diagnosis and control of brucellosis. *Ger J. Vet. Res.* 2, 10–24. doi: 10.51585/gjvr.2022.1.0033



BÖLÜM 3

The Oral Microbiome in Systemic Health: Periodontitis and Breast Cancer Connection

Banu Can¹

Structure of the Oral Microbiome

The oral cavity harbors one of the richest and most diverse microbial communities in the human body. In addition to more than 700 bacterial species, this ecosystem includes fungi, viruses, and protozoa that colonize distinct ecological niches such as dental plaque, the tongue, buccal mucosa, palates, and tonsils. Oral microbial dysbiosis refers to the disruption of the balance between beneficial and pathogenic microorganisms. The equilibrium of the oral microbiome is critical not only for oral but also for systemic health (1). When this balance is disturbed, increasing evidence suggests that microbial dysbiosis is associated with systemic inflammatory diseases and malignancies. This condition may contribute to the development of breast cancer through the following mechanisms (2, 3):

- **Chronic inflammation:** Microbial dysbiosis can increase the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), leading to DNA damage and genetic instability.
- **Bacterial toxins:** Toxins produced by certain periodontal bacteria may disrupt cell cycle regulation and promote malignant transformation.
- **Metabolic alterations:** Metabolic products of oral pathogens can create acidic and hypoxic conditions within the tumor microenvironment, thereby fostering cancer cell growth.

Periodontal Microorganisms in Disease

Periodontitis is a chronic, multifactorial inflammatory disease associated with dental plaque biofilm, leading to persistent and destructive inflammatory responses (4). The global prevalence of periodontitis is estimated at 45–50%, with the most severe form affecting 11.2% of the world's population, ranking it as the sixth most common human disease (5).

Periodontal diseases are initiated by dysbiotic microbial biofilms that trigger the host immune response and progress through chronic inflammation. Several microbial complexes play critical roles in this process (6,7):

¹ Dr., Department of Microbiology, Dental Faculty, Marmara University, Istanbul-Turkey; orcid.org/0000-0002-9577-0352

Table 1. Key microbial complexes associated with periodontal diseases

Microbial Complex	Representative Species	Clinical Role
Red complex	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	Strongly associated with advanced periodontitis
Orange complex	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i>	Critical in disease progression and biofilm bridging
Early colonizers	<i>Streptococcus</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp.	Initiation of biofilm and facilitation of pathogen adhesion
Emerging pathogens	<i>Filifactor alocis</i> , <i>Selenomonas</i> spp.	Detected in severe and refractory cases

Systemic Effects of Periodontal Pathogens

Periodontal pathogens can disseminate into the systemic circulation through various mechanisms. These are summarized in Table 2 (8):

Table 2. Mechanisms explaining the relationship between periodontal infections and systemic diseases

Mechanism	Description	Systemic Effects	Associated Periodontal Pathogens
Metastatic Infection (Bacteremia)	Periodontal pathogens entering the bloodstream	Colonization of distant tissues, local infection	<i>P. gingivalis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>T. denticola</i>
Metastatic Injury (Toxin Release)	Release of bacterial toxins into systemic circulation	Tissue damage and cellular dysfunction in distant organs	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i>
Metastatic Inflammation	Release of pro-inflammatory cytokines into circulation	Systemic inflammation, oxidative stress, tissue damage	All periodontal pathogens
Immune Modulation	Alteration of the host immune response	Disruption of immune surveillance, abnormal immune activation	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. forsythia</i>
Genetic/Epigenetic Alterations	Modification of genetic material in host cells	Changes in gene expression, disrupted cell signaling	<i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i>
Oxidative Stress	Increased production of ROS and RNS	DNA damage, cellular aging, modulation of apoptosis	<i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i>

Periodontitis and Cancer

Over the past decade, numerous research efforts have focused on understanding the impact of oral microbial burden on an individual’s overall systemic health. Many studies (9–11) have specifically addressed the association between chronic gingival inflammation and the development of breast cancer.

Epidemiological data demonstrate that periodontitis may increase the risk of several types of cancer. The strongest associations have been observed with cancers of the oral cavity, gastrointestinal tract, lungs, hematopoietic tissues, and breast cancer (12).

Table 3. Epidemiological associations between periodontitis and cancers

Cancer Type	Mechanistic Explanation
Oral cavity cancers	Direct microbial access and chronic local inflammation
Colorectal cancer	Translocation of <i>Fusobacterium nucleatum</i> into colorectal tissue
Pancreatic cancer	Systemic inflammation and microbial dissemination
Lung cancer	Aspiration of oral pathogens into the lungs
Hematopoietic malignancy	Chronic systemic inflammatory environment
Breast cancer	Oral microbial dysbiosis, systemic inflammation, hormonal modulation

Studies have shown that periodontal pathogens such as *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* are linked to systemic complications (6). Moreover, the microbial community context is relevant to oncopathogenicity, as *P. gingivalis* and *F. nucleatum* consortia have been demonstrated to act synergistically in vivo in oral cancer models (7).

Periodontitis and Breast Cancer

Epidemiological Evidence

Breast cancer is the most common malignant tumor among women, accounting for 30% of all cases and 15% of cancer-related deaths in 2021 (13). Disruptions in the oral microbiome may be associated with breast cancer risk factors (14). In animal experimental models, *Fusobacterium nucleatum* originating from the oral cavity can disseminate via the bloodstream to breast tumors, where it accelerates tumor growth and supports metastatic progression (15).

Meta-analyses have shown that women with periodontitis have approximately a 20–30% increased risk of developing breast cancer. Furthermore, a dose–

response relationship has been reported, indicating that the severity of periodontal disease correlates with an elevated breast cancer risk (16).

Microbial Mechanisms in Breast Cancer

Table 4. Periodontal microorganisms associated with breast cancer

Pathogen	Mechanism in Breast Cancer
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Activates the E-cadherin/ β -catenin signaling pathway via FadA adhesin; facilitates immune evasion
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Induces epithelial–mesenchymal transition (EMT); increases metastatic potential
<i>Treponema denticola</i>	Activates matrix metalloproteinases (MMPs) through protease activity; promotes invasion

Potential Molecular Mechanisms in the Breast Cancer–Periodontitis Relationship

- **Toll-like receptor (TLR) activation:** Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of periodontal microorganisms can activate TLRs, inducing the production of pro-inflammatory cytokines and triggering NF- κ B signaling.
- **Estrogen metabolism:** Periodontal bacteria may influence estrogen metabolism, thereby increasing breast cancer risk. *P. gingivalis* and *P. intermedia*, for example, produce enzymes capable of metabolizing estradiol.
- **Matrix metalloproteinases (MMPs):** MMPs produced during periodontitis contribute to extracellular matrix degradation, thereby facilitating tumor invasion and metastasis.
- **MicroRNAs (miRNAs):** Periodontal infection can alter the expression of cancer-associated miRNAs, leading to the downregulation of tumor suppressor genes and upregulation of oncogenes (17, 18).

Confounding Factors and Limitations

Clarifying the causal relationship between periodontitis and breast cancer is challenging due to several shared risk factors, such as smoking, alcohol consumption, obesity, dietary habits, and a sedentary lifestyle. Additionally, methodological limitations—including variations in the definition of periodontal disease, small sample sizes, and retrospective study designs—further complicate interpretation (19).

Although associations between microbial or salivary biomarkers and both diseases suggest a potential causal link, some studies do not support a direct

relationship between periodontitis and breast cancer (14, 20). This raises the possibility that the observed correlation may be coincidental or confounded by unknown variables. Furthermore, causal inference cannot be established from observational studies alone. Many patients with periodontitis also suffer from multiple systemic conditions, and some breast cancer patients present with common comorbidities such as diabetes (21, 22, 23) and cardiovascular disease (24, 25, 26). These shared inflammatory pathways may therefore underlie the apparent association between periodontitis and breast cancer.

Clinical Applications

Maintaining periodontal health may serve as a complementary approach in cancer prevention strategies. For women at risk of breast cancer, strategies to preserve and improve periodontal health may include:

- Regular periodontal examinations and professional dental cleanings
- Promotion of optimal oral hygiene practices
- Early diagnosis and treatment of periodontal diseases
- Controlled use of antimicrobial mouth rinses
- Patient education regarding the relationship between systemic and periodontal health

However, it remains unclear whether periodontal therapy reduces the incidence of breast cancer or improves prognosis. Therefore, prospective interventional studies are required (19).

Table 5. Future directions in periodontitis–breast cancer research

Research Focus	Rationale
Prospective cohort studies	To provide clearer evidence of causality
Standardized periodontal diagnostics	To ensure comparability across studies
Microbiome biomarker discovery	For early detection and risk stratification
Periodontal therapy trials	To evaluate preventive and prognostic benefits
Molecular pathway investigations	To identify therapeutic targets (e.g., TLRs, miRNAs)

Methodological Trends and Future Perspectives: Strategies to Improve Research on the Periodontitis–Breast Cancer Association

To overcome the methodological limitations encountered in investigating the relationship between periodontitis and breast cancer, the scientific community has been developing increasingly sophisticated approaches. Contemporary research paradigms, multidisciplinary collaborations, and technological

advancements now make it possible to achieve more reliable and comprehensive results.

Advanced statistical modeling techniques—particularly propensity score matching and structural equation modeling—enable more precise control of confounding factors. These approaches help disentangle the effects of shared risk factors such as smoking, alcohol consumption, obesity, and lifestyle habits on both periodontitis and breast cancer, thereby clarifying the direct associations.

The integration of big data analytics and artificial intelligence algorithms has further expanded research capacity. By leveraging large-scale electronic health records, these methods overcome sample size limitations of classical epidemiological studies, enabling stronger statistical analyses and the detection of unexpected associations.

Progress in biomarker research is also enhancing our understanding of molecular connections between periodontitis and breast cancer. Next-generation sequencing, metabolomic profiling, and proteomic approaches allow for detailed characterization of mechanisms such as oral microorganism translocation to breast tissue and modulation of inflammatory responses at the molecular level (27–30).

International consortia and multicenter collaborations employing standardized protocols and diagnostic criteria have created opportunities to study larger and more diverse populations. Such cooperation enhances the generalizability of findings and permits evaluation of the consistency of associations across different ethnic and geographical groups (31).

Emerging perspectives in microbial ecology further encourage a shift from pathogen-specific to community-level analyses. Focusing on microbial dysbiosis and immune modulation, rather than individual species alone, provides a more holistic understanding of the mechanisms underlying the periodontitis–breast cancer link.

Increasing collaboration across scientific and clinical disciplines—including periodontology, oncology, immunology, and epidemiology—has fostered the design of more comprehensive research frameworks. This multidisciplinary approach allows for a deeper exploration of complex disease mechanisms and the development of more clinically meaningful recommendations.

Looking forward, genetic modification technologies such as CRISPR-Cas9 may enable precise investigation of the role of periodontal microorganisms in carcinogenesis. In addition, novel in vitro models and organoid systems may provide physiologically relevant platforms for studying host–microbe interactions in the context of cancer.

In conclusion, the methodological challenges inherent in exploring the relationship between periodontitis and breast cancer are increasingly being addressed through technological progress, cross-disciplinary collaborations, and advanced analytic strategies. These developments not only deepen scientific understanding but also lay the groundwork for new preventive and therapeutic strategies targeting both diseases. Improved knowledge of the interactions between oral health and systemic diseases underscores the importance of integrated healthcare approaches and highlights the value of interdisciplinary cooperation (32).

Conclusion

Periodontal pathogens and dysbiosis can contribute to systemic inflammation and carcinogenesis, thereby playing a role in breast cancer. Current evidence suggests that maintaining periodontal health is critical not only for oral well-being but also for oncological risk management. In this context, collaboration between dentistry and oncology is of great importance for the development of both preventive strategies and novel therapeutic approaches.

References

1. Könönen, E., Gursoy, M., & Gursoy, U. K. (2019). Periodontitis: A multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *Journal of Clinical Medicine*, 8(8), 1135.
2. Isola, G., Polizzi, A., Alibrandi, A., Indelicato, F., & Ferlito, S. (2020). Analysis of Endothelin-1 concentrations in individuals with periodontitis. *Scientific Reports*, 10(1), 1652.
3. Graves, D. T., Corrêa, J. D., & Silva, T. A. (2019). The oral microbiota is modified by systemic diseases. *Journal of Dental Research*, 98(2), 148-156.
4. Genco, R. J., & Sanz, M. (2020). Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontology 2000*, 83(1), 7-13.
5. Kassebaum, N. J., Smith, A. G., Bernabé, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., ... & GBD 2015 Oral Health Collaborators. (2017). Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: A systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of Dental Research*, 96(4), 380-387.
6. Hajishengallis, G. (2022). Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. *Periodontology 2000*, 89(1), 9-18.
7. Lamont, R. J., Fitzsimonds, Z. R., Wang, H., & Gao, S. (2022). Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral and orodigestive squamous cell carcinoma. *Periodontology 2000*, 89(1), 154-165.
8. Seymour, G. J., Ford, P. J., Cullinan, M. P., Leishman, S., & Yamazaki, K. (2007). Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(Suppl. 4), 3-10.
9. Chang, J. S., Tsai, C. R., Chen, L. T., & Shan, Y. S. (2016). Investigating the association between periodontal disease and risk of pancreatic cancer. *Pancreas*, 45(1), 134-141.
10. Mai, X., Genco, R. J., LaMonte, M. J., Hovey, K. M., Freudenheim, J. L., Andrews, C. A., & Wactawski-Wende, J. (2016). Periodontal pathogens and risk of incident cancer in postmenopausal females: The Buffalo OsteoPerio study. *Journal of Periodontology*, 87(3), 257-267.
11. Moraes, R. C. D., Dias, F. L., Figueredo, C. M. D. S., & Fischer, R. G. (2016). Association between chronic periodontitis and oral/oropharyngeal cancer. *Brazilian Dental Journal*, 27(3), 261-266.

12. Nwizu, N. N., Marshall, J. R., Moysich, K., Genco, R. J., Hovey, K. M., Mai, X., ... & Wactawski-Wende, J. (2017). Periodontal disease and incident cancer risk among postmenopausal women: Results from the Women's Health Initiative observational cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 26(8), 1255-1265.
13. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7-33.
14. Parida, S., & Sharma, D. (2020). Microbial alterations and risk factors of breast cancer: Connections and mechanistic insights. *Cells*, 9(5), 1091. <https://doi.org/10.3390/cells9051091>
15. Alon-Maimon, T., Mandelboim, O., & Bachrach, G. (2022). *Fusobacterium nucleatum* and cancer. *Periodontology* 2000, 89(1), 166-180. <https://doi.org/10.1111/prd.12426>
16. Sfreddo, C. S., Maier, J., De David, S. C., Susin, C., & Moreira, C. H. C. (2017). Periodontitis and breast cancer: A case-control study. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 45(6), 545-551.
17. Ślędziewski, T. K., & Glińska, K. (2015). Proinflammatory cytokines in periodontal diseases and certain systemic disorders. *Przegląd Lekarski*, 72(7), 354-357.
18. Mohangi, G. U., Singh-Rambirich, S., & Volchansky, A. (2013). Periodontal disease: Mechanisms of infection and inflammation and possible impact on miscellaneous systemic diseases and conditions. *South African Dental Journal*, 68(10), 462-467.
19. Shao, J., Wu, L., Leng, W. D., Fang, C., Zhu, Y. J., Jin, Y. H., & Zeng, X. T. (2018). Periodontal disease and breast cancer: A meta-analysis of 173,162 participants. *Frontiers in Oncology*, 8, 601.
20. López-Jornet, P., Aznar, C., Ceron, J., & Asta, T. (2021). Salivary biomarkers in breast cancer: A cross-sectional study. *Supportive Care in Cancer*, 29(2), 889-896.
21. Miller, B., Chalfant, H., Thomas, A., Wellberg, E., Henson, C., McNally, M. W., ... & McNally, L. R. (2021). Diabetes, obesity, and inflammation: Impact on clinical and radiographic features of breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2757. <https://doi.org/10.3390/ijms22052757>
22. Sanz, M., Ceriello, A., Buysschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., ... & Wimmer, G. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of

- Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2), 138-149.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>
23. Wu, C. Z., Yuan, Y. H., Liu, H. H., Li, S. S., Zhang, B. W., Chen, W., ... & Li, L. J. (2020). Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*, 20(1), 204.
 24. Herrera, D., Molina, A., Buhlin, K., & Klinge, B. (2020). Periodontal diseases and association with atherosclerotic disease. *Periodontology 2000*, 83(1), 66-89.
 25. Sanz, M., Marco del Castillo, A., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D'Aiuto, F., Boucharde, P., ... & Wimmer, G. (2020). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(3), 268-288.
 26. Mehta, L. S., Watson, K. E., Barac, A., Beckie, T. M., Bittner, V., Cruz-Flores, S., ... & Volgman, A. S. (2018). Cardiovascular disease and breast cancer: Where these entities intersect: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 137(8), e30-e66.
 27. Wang, J., & Jia, H. (2016). Metagenome-wide association studies: Fine-tuning the microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 508-522.
 28. Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669-685.
 29. Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J., & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, 35(9), 833-844.
 30. Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., ... & Ojcius, D. M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*, 42(1), 27-35.
 31. Hieken, T. J., Chen, J., Hoskin, T. L., Walther-Antonio, M., Johnson, S., Ramaker, S., ... & Degnim, A. C. (2016). The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease. *Scientific Reports*, 6(1), 30751.
 32. Le Cao, K. A., Gonzalez, I., & Dejean, S. (2009). integrOmics: An R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics*, 25(21), 2855-2856.