



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIĞIR VE KOYUN ATIKLARINDA *BRUCELLA* CİNSİ
MİKROORGANİZMALARIN BAKTERİYOLOJİK TANISI**

Esra BÜYÜKCANGAZ

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2007



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİĞİR VE KOYUN ATIKLARINDA *BRUCELLA* CİNSİ
MİKROORGANİZMALARIN BAKTERİYOLOJİK TANISI

Esra BÜYÜKCANGAZ

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Ayşin ŞEN

Bursa-2007

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
GEREÇ.....	32
Saha Örnekleri	32
Standart <i>Brucella</i> suşları	32
Tbilisi Fajı	33
Besiyerleri	33
SDA (Serum Dekstroz Agar)	33
Brucella Selektif Besiyeri	33
Gliserinli Brucella Broth (Sıvı Gliserinli Besiyeri)	34
Boya İçeren Besiyerleri.....	34
Tiyonin’li besiyeri.....	34
Bazik Fuksin’li Besiyeri	34
Safranin-O’lu Besiyeri	35
Antibiyotik İçeren Besiyerleri.....	35
Streptomisinli Besiyeri.....	35
Penisilinli Besiyeri	35
Peptonlu Tuzlu Su	36
Akriflavin Solüsyonu	36
Biyokimyasal Testler.....	36
Katalaz Testi.....	36
Üreaz Testi (Christensen’s Metodu)	37
Oksidaz Testi (Kovak’s Modifikasyonu)	37
Karbondioksitli Etüv	37
Stereomikroskop.....	37
Vorteks	37
Ultratüraks.....	37
YÖNTEM.....	38

Direkt Mikroskopik Muayene	38
<i>Brucella</i> İzolasyon Yöntemi.....	38
Organ Homojenatlarının Hazırlanması	38
İzolasyon	38
İdentifikasyon Yöntemleri.....	39
Cins düzeyinde İdentifikasyon	39
Bireysel Morfoloji	39
Koloni Morfolojisi	39
Polivalan <i>Brucella</i> Antiserumu ile Aglütinasyon	40
Akriflavin ile Aglütinasyon Özelliği	40
Biyokimyasal Testler.....	40
Katalaz Testi	40
Üreaz Testi (Christensen's Metodu).....	40
Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)	41
Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon.....	41
Karbondioksit (CO ₂) Gereksinimi	41
Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi	42
Tbilisi Fajı ile Lizis.....	42
Tbilisi Fajının Rutin Test Dilüsyonunun (RTD) Saptanması.....	42
Tbilisi Fajı ile Lizis	43
Boyalı Besiyerinde Üreme Durumu	43
Tiyonin Varlığında Üreme	43
Bazik Fuksin Varlığında Üreme.....	43
Safranin -O Varlığında Üreme	44
Antibiyotikli Besiyerinde Üreme Durumu	44
Penisilinli Besiyerinde Üreme.....	44
Streptomisinli Besiyerinde Üreme	44
İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme	45
A ve M Monospesifik Anti-Serumlarla Aglütinasyon	45
BULGULAR	46
Etkenin İzolasyon ve İdentifikasyonu	46
Akriflavin ile Aglütinasyon	46
Biyokimyasal Testler.....	47
Katalaz Testi	47

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)	47
Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu).....	47
Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları.....	47
Karbondiyoksit (CO ₂) Gereksinimi	47
Hidrojen Sülfür (H ₂ S) üretimi.....	48
Tbilisi Fajı ile Lizis:.....	48
Boyalı Besiyerlerinde Üreme	48
Tiyonin varlığında üreme.....	48
Bazik Fuksin varlığında üreme	49
Safranin -O varlığında üreme	49
Antibiyotikli Besiyerinde Üreme	49
Penisilinli Besiyerinde Üreme	49
Streptomisinli Besiyerinde Üreme	49
İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme.....	50
A ve M Mono spesifik Anti serumlarla Aglütinasyon	50
İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları Sonuçları.....	51
TARTIŞMA ve SONUÇ	59
KAYNAKLAR.....	64
TEŞEKKÜR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ÖZET

Bu çalışmada Bursa ili ve çevresindeki koyun ve sığır atıklarından *Brucella* cinsi bakterilerin izolasyon ve identifikasyonu yapılarak tür ve biyotip düzeyinde etken tanımlanması amaçlandı. Yenişehir, İnegöl, Gönen, Mustafakemalpaşa, Karacabey, İznik, Manyas, Susurluk ilçeleri ile Bursa merkezden alınan toplam 62 adet koyun ve 41 adet sığıra ait aborte fetus materyali değerlendirildi. İzolasyon amacıyla Kanlı Agar ve *Brucella* Selektif Agar'a aborte fetüslerin abomasum içeriği ve iç organlarından hazırlanan homojenatlar iokule edildi. Besiyerleri, 37° C'de, aerob ve %5 CO₂ içeren etüvde 3- 8 gün inkübe edildi. Şüpheli kolonilerin poliklonal A+M *Brucella* anti-serumlarıyla aglütinasyon özellikleri incelendi. Aglütinasyon gösteren izolatlar *Brucella* spp. yönünden pozitif olarak değerlendirildi. 23 adet (% 37.09) koyun ve 8 adet (% 19.5) de sığırlardan olmak üzere toplam 31 adet (%30) izolat *Brucella* spp. olarak tanımlandı. İzolatların biyotip düzeyinde identifikasyonları amacıyla akriflavin reaksiyonu, karbondioksit (CO₂) gereksinimi, hidrojen sülfür (H₂S) oluşturma özelliği, fajlarla lizis, boya ve antibiyotik içeren besiyerlerinde üreme durumu ile A ve M monospesifik anti-serumlarla aglütinasyon özellikleri incelendi. Koyun izolatlarından 5 adet (% 21.73) *B. melitensis* biyotip 1, 1 adet (% 4.34) *B. melitensis* biyotip 2 ve 16 adet (% 69.56) *B. melitensis* biyotip 3 identifiye edilirken, bir adet izolat H₂ S üretimi nedeniyle atipik *B. melitensis* olarak değerlendirildi. Sığırlardan elde edilen 8 adet *Brucella* spp. izolatının 7 adedi (% 87.5) *B. abortus* biyotip 3 ve 1 adedi (% 12.5) de *B. melitensis* biyotip 3 olarak identifiye edildi. Buna göre Bursa ve çevresinde koyunlarda *B. melitensis* biyotip 3 ve sığırlarda da *B. abortus* biyotip 3 'ün predominant olduğu tespit edildi. İzolatların hiçbirinin *B. melitensis* Rev1 veya *B. abortus* S19 aşısı suşu olmadığı ve bölgede aşılardan kaynaklanan atık olgularının bulunmadığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler: *Brucella* spp, sığır, koyun, abortus, biyotiplendirme.

SUMMARY

ISOLATION OF *BRUCELLA* SPP. FROM CATTLE AND SHEEP ABORTIONS IN TURKEY

The aim of this study was to isolate *Brucella* and identify species and biovars from aborted fetuses of cattle and sheep in Bursa province. Sixty two sheep and 41 cattle aborted fetuses were evaluated for this purpose. Abomasum content and homogenates from internal organs of the aborted fetuses were inoculated into Blood Agar and Brucella Selective Agar and incubated at 37 °C, in an aerobic environment and 5 % CO₂ content in incubator, for 3- 8 days. Agglutination properties of suspect colonies (with A+M Brucella polyclonal antisera) were examined. Isolates showing agglutination properties were considered to be an *Brucella* spp. A total of 31 *Brucella* spp., of which 23 (37.09 %) are of ovine and 8 (19.5 %) of bovine origin was isolated. For the purpose of biovar identification of the isolates acriflavin reaction, CO₂ requirement, H₂S production, lysis by phages, growth on dyes, agglutination in A+M polyclonal antisera were used. Out of ovine isolates, five (21.73 %), one (4.34 %), and sixteen (69.56 %) were identified as *B. melitensis* biovar 1, biovar 2, and biovar 3, respectively. However, one isolate showing H₂ S positive was diagnosed as atypical *B. melitensis*. Seven (87. 5 %) of 8 bovine isolates were identified as *B. abortus* biovar 3 and one (12. 5 %) was *B. melitensis* biovar 3. According to the findings, *B. melitensis* biovar 3 in sheep and *B. abortus* biovar 3 in cattle were found to be the predominant biovars. The isolates were neither *B. melitensis* Rev 1 nor *B. abortus* S19 and no abortus case due to *Brucella* vaccination was observed in the region.

Key Words: *Brucella* spp., cattle, sheep, abortus, biotyping.

GİRİŞ

Brucellosis, insan ve hayvan sağlığı açısından, Akdeniz Zoonoz Kontrol Programı (MZCP)'na bağlı ülkelerin çoğunluğunda sağlık ve sosyo-ekonomik etkileri yönünden hala önde gelen zoonozlardan biri olmaya devam etmektedir (1, 2). Hastalık hayvanlarda abortuslar, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı, infertilite, veteriner ve aşılama masrafları nedeniyle hayvansal üretimde kayıplara neden olurken, infekte hayvanlarla direkt temas veya kontamine süt ve süt ürünlerinin tketimeyle de önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Ayrıca hastalık hayvan ve hayvan ürünlerinin ticaretine engel teşkil etmekte ve özellikle çoğunluğu kırsal kesimde bulunan ve kısıtlı imkanlara sahip bir sektörü temsil eden hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişmesini etkilemektedir. Halk arasında Peynir Hastalığı olarak da bilinen infeksiyonun insanlara bulaşması ve yaygınlığı yerel yemek alışkanlıklarına, süt ve süt mamllerini işleme yöntemlerine, sosyal örf ve adetlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Dünya Sağlık rgt (WHO) verilerine göre insanlarda dünya genelinde her yıl 500.000, Avrupa'da ise 10.000- 20.000 Brucellosis vakasına rastlanılmaktadır (3). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de insanlarda Brucellosis hastalığına sıklıkla rastlanılmaktadır. Köse ve arkadaşları (4) tarafından yapılan bir çalışmada İzmir bölgesindeki hastaların kanından izole edilen 11 adet *Brucella* spp. suşu biyotiplendirilmiş ve bunun sonucunda 10 adedinin *Brucella melitensis* biyotip 3 ve 1 adet suşun ise *B. melitensis* biyotip 1 olduğu belirlenmiştir. Bursa bölgesinde yapılan başka bir çalışmada insanlardan alınan 58 adet *Brucella* spp. izolatının tümünün *B.melitensis* olduğu saptanmıştır (5). İnsanlarda brucellosisin önlenmesi, hastalığın hayvanlarda kontrol ve eradikasyonuna bağlıdır (6).

Brucellosis'in önlenmesi ve kontrol stratejisi, infeksiyonun patogenezi ve epidemiyolojisine dayanmaktadır. Kuzey Avrupa, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda'da yıllar süren yoğun çabalarla hayvanlarda brucellosis eradike edilmiştir. Buna karşın hastalık Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan lkelerinde Afrika ve Latin Amerika'da insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir (3). Koyunlarda brucellosis infeksiyonuna dünyanın pek çok bölgesinde rastlanılmaktadır. Benkirane (7), koyun ve keçi brucellosisinin dünyadaki durumunu değerlendirmiş ve etkenin, Okyanusya dışında bütün kıtalarda yaygın olduğunu belirtmiştir. Güney Afrika lkelerinden Etyopya ve Kenya'dan hastalık bildirilmiştir. Asya'da ise hastalık Hindistan, Pakistan,

Bangladeş'te endemik olmasına karşın Güney Batı Asya'da yer alan Malezya ve Tayland'da sporadik olarak görülmektedir. Moğolistan ile eski Sovyetler Birliği ülkelerinde infeksiyon endemik seyretmektedir. Latin Amerika ülkelerinden Meksika, Peru ve Arjantin'de koyun ve keçi brucellosisi bulunmakla beraber bildirilen rapor sayısı azdır (7, 8). Avrupa'da ise Belçika, Danimarka, Finlandiya, Almanya, İrlanda, Lüksemburg, Hollanda, İngiltere ve İsveç hastalıktan ari durumdadır (7, 9, 10). Bunun yanında Fransa, İtalya, İspanya, Portekiz ve Yunanistan'da eradikasyon amacıyla yapılan çalışmalara rağmen başarılı olunamamıştır. Hastalık Batı Asya ve Güney Afrika'da endemik seyretmektedir. Tunus, Lübnan, Mısır, Ürdün, Irak, Filistin, Türkiye, İran, Suudi Arabistan, Kuveyt ve Umman'da serolojik ve bakteriyolojik çalışmalarla etkenin koyun ve keçilerdeki yaygınlığı tespit edilmiştir. Buna göre Akdeniz ve Arap ülkelerinde *B. melitensis* biyotip 3 yaygın iken, Orta Doğu'da biyotip 1 ve 2'nin predominant olduğu belirtilmiştir (6- 8).

Sığırlarda brucellosis'in etkeni olan *B. abortus* ise tüm dünyada yaygınlığını sürdürmektedir. Avrupa'da Fransa, İtalya, Yunanistan, Polonya, Portekiz ve İrlanda'da etkene rastlanılmakla beraber, Almanya, Finlandiya, Lüksemburg, İsveç, Hollanda ve İngiltere'de hastalık görülmemektedir (6, 9). Güneybatı Asya'da yer alan Sri Lanka, Tayland, Malezya'da sığırlarda brucellosis görülmektedir. Moğolistan, Kore, Kuveyt ve Türkiye'de ise hastalık endemik seyretmektedir (6). Çin, Bangladeş, Hindistan'da hastalık görülmektedir. Orta Doğu'da ise Afganistan, Irak ve İran da hastalık bulunmasına rağmen İsrail'de bildirilmemiştir. Amerika kıtasında sığır brucellosisi endemik seyrederek ve Kanada dışında hemen her ülkeyi etkilemektedir. Okyanusya'da, Avustralya ve Yeni Zelanda *B. abortus*'tan ari bölgelerdir (3, 6).

Ülkemizde sığır ve koyunlarda en önemli atık etkeni olan *Brucella* spp. serolojik olarak birçok çalışmada tespit edilmiş ve endemik olduğu verilerle saptanmıştır (11- 14). İyisan ve arkadaşları (15) tarafından Türkiye genelinde yapılan son serosurvey çalışmasında Brucellosis prevalansı sığırlarda % 1.43 ve koyunlarda %1.97 olarak tespit edilmiştir. Ünver ve arkadaşları (16) tarafından, Kars Bölgesinde moleküler düzeyde yapılan bir çalışmada 62 adet atık sığır fetusu polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği ile incelenmiş ve 37 adedinden (%59. 7) *Brucella* spp. izole edilmiştir. 37 adet örneğin 32 adedine yapılan PCR sonucunda 27 adedinin pozitiflik gösterdiği saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise Kars bölgesinde 37 adet atık koyun fetusundan elde edilen *B. melitensis* izolatlarının IS711 geni kullanılarak moleküler karakterizasyonunu yapılmış, bunun sonucunda izolatların 14'ünün *B. melitensis* olarak

tanımlanmıştır (17). İlhan ve arkadaşları (18), Van Bölgesinde atık yapmış koyunların süt ve aborte fetus mide içeriğinde *B. melitensis*' in varlığını bakteriyolojik yöntemler ve PCR ile araştırmıştır. Bu amaçla 102 adet süt ve 135 adet atık fetus örneği çalışılmıştır. Araştırma sonucunda sütlerin 8 (%7. 8)' inden, mide içeriklerin ise 26 (%19. 2)' sından *B. melitensis* biyotip 3 izole etmişlerdir.

Ülkemizde de en önemli zoonozlardan biri olan Brucellosis'in sürü ve bölge bazında epidemiyolojik verilerinin izlenmesi, hastalığın proflaksisinde büyük bir önem taşımaktadır. Buna karşın ülkemizde *Brucella* spp.'nin varlığına ve özellikle biyotiplendirilmesine yönelik çalışmalar sınırlıdır. Çalışmamızda Bursa ve çevresinde sığır ve koyunlardan elde edilen aborte fetuslardan, *Brucella* spp.'nin prevalansı ve biyovar dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Etkenin, bakteriyolojik izolasyonu ve identifikasyonu halen Gold Standard yöntem olarak kabul edilmektedir (19). Çalışmamızda, izolasyon ve biyotiplendirme amacıyla bakteriyolojik yöntemler kullanılmıştır. Bölgemizdeki sığır ve koyun atıklarında Brucellosis'in payının ortaya çıkarılması, etkenin biyotip dağılımının belirlenmesi ve aşı suşlarının abortus olguları ile ilişkisinin tanımlanması, Brucellosis'in eradikasyon çalışmalarında önemlidir. Ayrıca bazı biyotiplerin zamanla kaybolması, yeni varyantların ve atipik suşların ortaya çıkması yönünden *Brucella* tür ve biyotiplerinin periyodik olarak saptanması gerekmektedir. Bu yönüyle çalışmamız ülke çapında oluşturulması planlanan *Brucella* spp. biyotip haritasına veri kaynağı niteliğindedir.

GENEL BİLGİLER

Brucellosis; sığır, koyun, keçi, domuz, gibi evcil hayvanlar ile deniz memelileri, ren geyikleri ve sincaplara kadar değişen hayvan türlerinde özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertilitelere neden olan kronik, bulaşıcı ve nekrotik özellikte zoonoz bir hastalıktır (20- 25). Hastalık yavru atma, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı, infertilite, veteriner hekimlik ve aşılama giderleri nedeniyle hayvansal üretimde kayıplara neden olurken, infekte hayvanlarla doğrudan temas, infeksiyöz aerosollerin inhalasyonu ve özellikle kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketimiyle de önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır.

İlk olarak Hipokrat tarafından benzer semptomlarla tanımlanan hastalık, modern çağda ilk kez Sir David Bruce tarafından Malta adasında, dalgalı seyirli ateş gösteren bir İngiliz askerinin dalağından izole edilmiştir. Etken “*Micrococcus melitensis*” olarak adlandırılmıştır (26, 27). Capasso (28), Roma imparatorluğu döneminden beri süregeldiği tahmin edilen bu hastalığa ilişkin lezyonları, aynı dönemden kalma insan iskeletinde saptamış ve ayrıca elektron mikroskop yardımıyla fosilleşmiş peynirde bulunan *Brucella* ile morfolojik yapısı benzeyen kokoid yapıdaki mikroorganizmaları tanımlamıştır (29). Ülkemizde etken ilk olarak Kural ve Akalın tarafından 1915’de bir askerden izole edilmiştir. İlk izolasyon çalışmaları ise sığırlarda 1931 yılında Berke tarafından, koyunlarda ise 1944 yılında Aktan ve Köyoğlu tarafından yürütülmüştür. İlk olarak serolojik tanı 1943 yılında Golem tarafından yapılmıştır (20).

Brucellosis, insan ve hayvanlarda *Brucella* genusunun üyelerinden, birbirine benzer özellikte hastalık oluşturan etkenlerin tümünü kapsayan bir terim olması nedeniyle Malta ateşi, Akdeniz ateşi, dalgalı humma, Bang’s hastalığı gibi bölgesel olan, çeşitli semptomları içeren ve hayvan hastalığı olan diğer adlandırmaların yerini almıştır (20- 29). Evans’dan beri çalışılan ve bu hastalıkların hepsiyle ilişkide olan bakterilerin sınıflandırılması Meyer ve Shaw (30) tarafından 1920 yılında yapılmıştır. Dokuz yıl sonra Huddleson (31), etkeni domuzlardan izole ederek yeni bir tür olan *Brucella suis*’i tanımlanmıştır. Buddle (32) 1956’da *Brucella ovis*’i tanımlayana kadar genus stabil olarak kalmış ve bunu izleyen yıllarda Stoenner ve Lackman (33) çöl faresinde (*Neotomae lepida*) *Brucella neotomae*’yı tanımlamışlardır. Carmichael ve Bruner (34) 1968’de *Brucella*

canis'i bulmuşlardır. Bu altı tür genellikle klasik türler olarak refere edilmiştir ancak taksonomik yeri tartışmalı olan deniz memelisi izolatlarının da bu listeye eklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (35- 37).

Günümüze değin, *Brucella* genusu içerisinde altı tür tanımlanmıştır: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae*. Bu sınıflandırmada daha çok etkenin patojenitesi ve sırasıyla koyun ve keçi, sığır, domuz, koç, köpek ve çöl faresi olmak üzere konakçı duyarlılığı baz alınmaktadır (38). Üç önemli tür olan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* konakçılarında abortus ve infertiliteye neden olurken, aynı zamanda büyük oranda ekonomik kayba da neden olmaktadır. *B. ovis* ve *B. canis* sırasıyla koçlarda ve köpeklerde epididimitis ile karakterizedir. *B. neotomae* ile ilgili tek suş çöl farelerinden rapor edilmiştir. 1990'lardan günümüze ayı balığı, yunus, balina gibi pek çok farklı deniz memelilerinden çeşitli *Brucella* suşları izole edilmektedir. (35- 37, 39- 44). Deniz memelilerinden alınan *Brucella* izolatları, fenotipik ve moleküler karakteristikleri açısından daha önceki altı *Brucella* türünden farklıdır (37, 41, 45- 49). Konakçı seçimi ve moleküler yapıları dikkate alınarak yapılan araştırma sonuçlarına göre yüzgeç ayaklılar ve deniz memelilerinden *B. pinnipedia* ve *B. cetaceae* olmak üzere iki yeni *Brucella* izolatı elde edilmiş ve bu yeni türlerin *Brucella* genusu içine girmeleri önerilmiştir (37, 47).

Brucella genusu, filogenetik olarak *Rhizobiaceae* grubu bakterileri içerisinde yer almaktadır (50). DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda, şimdiye kadar bilinen altı *Brucella* suşu ile (51- 54) son zamanlarda izole edilen deniz memelisi türlerinin arasında da % 90'ın üzerinde homoloji olduğunu belirlenmiştir (47). Bu nedenle *Brucella* genusunun tek bir tür olan *B. melitensis* olarak anılması ve diğer türlerin de onun biyovarları olarak düşünülmesi önerilmektedir (53, 54). Patogenezi ve her bir türün konakçı seçim özelliğine uygun olarak, *Brucella* genusu altı tür içerisinde sınıflandırılmaktadır. Altı *Brucella* türünü ayırt eden dış membran proteinleri ve bunların biyovarlarının bir kısmı Viscanio (55) tarafından tanımlanmıştır. Genomun moleküler ağırlığı 2.37×10^9 dalton ve G+C oranı % 58- 59 olarak saptanmıştır (6).

Brucella'nın diğer bakterilerle olan filogenetik ilişkisi rRNA sekans analizi ile açıklanmıştır. Opportunistik infeksiyonlardan sorumlu çevresel bakteri olan '*Orchobacterium anthropi*', bilinen en yakın türdür (57). Çoklu replikonlara sahip α -2-*Proteobacterium*'lardan *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* ve *Rhizobium* aynı grupta olmalarına karşın, *Brucella* ile daha az yakınlık göstermektedirler. *Bartonella* grubu ise *Brucella* ile rRNA bazında affinite gösterirken, DNA bazında benzerlik göstermemektedir (58). Diğer benzerlikler, hücre membranında lipid kompozisyonu ve hücre içi gelişim ile

ilişkilidir. Genusun lipid kompozisyonu konusunda yapılan çalışmalarda Thiele ve arkadaşları (59) tarafından etkenin bitki patojenleri veya embosimbiyostlarla yakın ilişkide olabileceği ortaya konulmuştur. Etkenin doku tropizmi, virulensi ile eritritol arasındaki ilişkisi 1965’de Keppie ve Smith (60) tarafından tanımlanmıştır. Elberg grubu (61) tarafından *Brucella*’nın demir metabolizması tartışılmıştır. Smith, *B. abortus*’un trofobalastlara intraselüler lokalizasyon karakteristiğini son yüzyılın başında gözlemlemesine rağmen, *Brucella*’nın intraselüler varlığına ilişkin bulgular ancak son yıllarda açıklanabilmiştir (52).

Verger ve arkadaşları (53) tarafından yüksek düzeyde DNA homolojisi gösteren *Brucella*’ların monospesifik bir genus olduğu ve tüm tiplerinin *B. melitensis*’in biyovarları olduğu öne sürülmüşse de, genusun eski sınıflandırması (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* ve *B. canis*) günümüzde geçerliliğini korumaktadır. İlk dört tür smooth formda iken, *B. ovis* ve *B. canis*’in yalnızca rough formu görülmüştür. *B. melitensis* için 3 (1- 3), *B. abortus* için 7 (1- 6 ve 9) ve *B. suis* için 5 (1- 5) tane biyovar belirlenmiştir (19).

Pulsed Field Gel Elektroforez (PFGE) kullanımı, *Brucella* genusunu içindeki çeşitliliğin belirlenmesinde yol gösterici olmuştur. Allerdet-Servent ve arkadaşları (62) 1988’de tüm DNA’ın *XbaI* ile kesilmesiyle, PFGE sonrasında 5 farklı fragment deseni olduğunu ortaya koymuşlar ve 5 *Brucella* türünün her birini test etmiş (*B. neotomae* bu çalışmaya dahil edilmemiştir) ancak bu yöntemle biyovarları birbirinden ayıramamışlardır. Tiplendirme amacıyla tüm genoma uygulandığında; restriksiyon endonükleaz analizinin başarısız olduğu (63), ancak restriksiyon analizi sonrasında seçilmiş sekansların PCR ile amplifikasyonunun, *omp2*, *dnaK*, *htr* ve *ery* genlerindeki polimorfizm varlığını belirleyebildiği görülmüştür (64, 65). Dış membran proteini (Outer Membrane Protein-OMP) *omp2* geninin, biyovarların ayırımında kullanılan ve tiplendirme yöntemlerinden biri olan boya duyarlılığını belirlediği ve bu nedenle taksonomik açıdan önemli olduğu bildirilmektedir (66). Yakın ilişkili *omp2a* ve *omp2b* genlerinin *Brucella* spp.’nin 36 kd’lık major dış membran proteinini kodladığı, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) şablonlarına ilişkin çalışmalarla belirlenmiş ve altı *Brucella* türünün tip suşlarının bu yöntemle ayırabileceği bulunmuştur (62). Son yıllarda Cloecart ve arkadaşları (67), daha fazla sayıda restriksiyon enzimi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) kullanarak *Brucella* türlerini belirlemiş ve *Brucella*’nın 25 kDa’luk major OMP’ini kodlayan *omp25*, *omp2a* ve *omp2b* genleri için suş spesifik marker geliştirmişlerdir (68, 69). *B. melitensis*’de dış membran

proteinini kodlayan *Omp31* geni ile de, *Brucella* üyelerinin ayırımının sağlanabildiği bildirilmiştir. PCR-RFLP desenleri ve Southern Blot Hibridizasyon kombinasyonu kullanılarak, *B. suis* biyovar 1, 3, 4, 5 ile karışabilme olasılığı olan *B. neotomae* dışındaki türler de bu yöntemle ayrılabilir (70). *B. abortus* S19 suşunun 'ery' geninde 7. 2 kb'lık delesyon bulunmaktadır. Suşun eritritol sensitivitesi ve attenuasyonundaki en önemli faktörün bu özellik olduğu bildirilmiştir (65). *B. melitensis*'deki *dnaK* geninin *EcoRV* ile iki fragmana ayrıldığı bildirilmiş ve bunun dışındaki bütün *Brucella* türlerinin tek fragman oluşturduğu belirlenmiştir. *B. melitensis* 16 M'in, *PacI*, *XoI*, *SpeI* ve *XbaI* fragmanlarının Southern Blot Hibridizasyonu ile restriksiyon haritası çıkarılmış ve 2100 ve 1150 kb'lık iki replikon varlığı belirlenmiştir (69). Başka bir çalışmada ise 3100 kb büyüklüğünde tek replikon içeren *B. suis* biyovar 3 dışında diğer altı *Brucella* türü ve biyovolarında 2 adet replikon bulunmuştur. Bu iki replikonun, bakterinin yaşamsal önemi olan genlerini içerdiği tespit edilmiş olup bir megaplasmid ve bir kromozom olarak değerlendirilmemiş, bunun yerine iki bağımsız kromozom oldukları düşünülmüştür. Yine aynı araştırmacılar tarafından altı adet referans suşta kromozomların varlığı araştırılmıştır (71). Araştırmalar sonucunda *Brucella* genomunun 2. 1 ve 1. 5 mbp'lık iki adet kromozom içerdiği belirlenmiştir. Her replikonun yaşamsal önemdeki metabolik ve replikatif fonksiyonları olduğu, bu nedenle bu parçaların plazmidten çok, kromozom oldukları sonucuna varılmıştır (72, 73). *Brucella*'da doğal plazmidler saptanmamıştır, buna rağmen elektroporasyon ve konjugatif transfer sonrası geniş konakçı plazmidleri ile transformasyon şekillenmektedir (73). *B. melitensis* 16 M fiziksel haritasıyla karşılaştırıldığında özellikle küçük kromozom içerisinde olmak üzere, suşlar arasında farklılıklar bulunduğu belirtilmiştir. *Brucella* spp'nin 1- 34 kb arasında küçük insersiyon ve delesyonları içerdiği ve bu durumun *Brucella*'nın konakçılara adaptasyonunda önem taşıdığı vurgulanmaktadır. *B. ovis*'e spesifik 21 kb'lık bir fragman ile *B. abortus* 544'ün küçük kromozomunda 640 kb'lık bir farklılık olduğu saptanmış, 640 kb'lık farklılık *B. abortus* biyovar 1- 2- 3 ve 4 'de belirlenmesine rağmen diğer biyovarlarda bulunmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte *B. abortus*'taki inversiyon, etkenin ilk dört biyovarının üremesinde karbondioksit gereksinimi olması ile açıklanmıştır (69). Deniz memeli izolatları ile altı klasik *Brucella* suşunun genomik DNA'ları *XbaI* ile kesilerek PFGE profilleri elde edilmiştir (74).

Brucella'lar kokobasil veya kısa çomakçıklar olup 0. 6- 1. 5 µm uzunlukta ve 0. 5- 0. 7µm genişliktedirler. *Brucella* morfolojisi eski kültürler dışında oldukça kalıcı özellik gösterir, eski kültürlerde pleomorfik formlar oluşturabilirler. *Brucella*'lar hareketsizdir,

spor, flagella, pilus ve gerçek kapsül oluşturmazlar. Gram negatifler ve genellikle boyanmada bipolarite göstermezler. Gerçekte asit-fast değildirler, ancak zayıf asitlerle dekoloryasyona dirençlidirler. Bu durum Brucellosis'in mikroskopik tanısında kullanılan Stamp boyamada etkenin hücreler içinde kırmızı renkli görünmesine yol açar. Etkenin üremesi için optimum pH, 6.6 ile 7.4 arasında olup en uygun pH'ın 6.8 olduğu belirtilmiştir. *Brucella* spp. için optimum üreme ısısı; 36- 38 °C' olmasına rağmen, çoğu suş 20- 40 °C arasında üreyebilmektedir. *Brucella* spp. aerobik olmakla birlikte, özellikle ilk izolasyonda bazı suşların gelişimleri için %5- 10 CO₂ içeren atmosfere gereksinim duymaktadırlar. *B.melitensis* sıradan bir katı kültürde CO₂ ve serum gerektirmeksizin 37 °C'de aerobik koşullarda izole edilmektedir. *B. abortus*'un ise ilk dört biyovarı ve *B. ovis* karbondioksit gereksinim gösterirler. Bu özelliğin ilk izolasyonda değerlendirilmesi önemlidir aksi halde biyovarların kısa sürede karbondioksitten bağımsız muttant geliştirmeleri olasıdır. *Brucella*'lar; biotin, tiamin ve nikotinamide de gereksinim duymaktadırlar. Gelişimleri serum veya kanla artmakta, haemin (V faktörü) ve nikotinamid-adenin- dinükleotid (X-faktörü) gerekli olmamaktadır. Çoğu *Brucella* suşu, safra tuzları, tellürit veya selenit içeren besiyerlerinde inhibe olmaktadır (19). Etkenin üretilmesinde kullanılan besiyerleri çeşitlidir (8, 19, 21, 22, 75). Saha örneklerinden çok fazla sayıda kontaminant üremesi nedeniyle izolasyon amacıyla selektif besiyeri tercih edilmektedir. Farrell's besiyeri (76) sığırlarda *B. abortus*'un izolasyonu için geliştirilmiş olmakla birlikte, *B. melitensis*'in izolasyonunda da tercih edilebileceği bildirilmiştir (19). Ancak nalidixic acid ve bacitracin'in *B. melitensis*'in bazı suşlarında inhibitör etki yaratabileceği bilinmektedir (77). Bu nedenle, doğal infekte koyunlarda Farrell's besiyerinin sensitivitesi, ondan daha az selektif olduğu saptanan Thayer- Martin's modifiye besiyerinden daha düşük olabilmektedir (78). İzolasyon şansını arttırmak amacıyla, etkenin özellikle ilk izolasyonunda Serum Dekstroz Agar, Albimi *Brucella* Agar veya Kanlı Agar kullanılmalıdır (19). Farrell's ve Modifiye Thayer-Martin's besiyerinin beraber kullanımıyla da bakteriyolojik tanının sensitivitesinin önemli ölçüde yükseldiği bildirilmiştir (77). Hornsby ve arkadaşları (79) tarafından yapılan bir çalışmada, Rifampin *Brucella* Medium (RBM), Malaşit Green *Brucella* Medium (MGB) ile % 5 sığır serumu katılmış Tyrtose Agar'ın kombinasyonunun *B. abortus* RB51 aşısı suşundan kaynaklanan infeksiyonları ayırabildiği bildirilmiştir.

Sıvı besiyerinde gelişim, kuvvetlice karıştırılmadığı sürece genellikle zayıf olmaktadır. Nötral pH sağlanarak, sürekli ve güçlü aerasyon ile önüne geçilebilse de statik sıvı besiyerinde *Brucella* spp.'nin gelişimi, smooth fazdaki kültürlerin dissosiyasyonu ile

sonuçlanmaktadır (19). Yarı katı besiyerinde, karbondioksit bağımsız *Brucella* suşları yüzeyin altından tabanın birkaç mm. üzerine doğru uniform bir turbidite oluştururlarken, karbondioksit bağımlı suşlar, besiyerinin yüzeyinden birkaç milimetre aşağıda bir disk oluşturarak gelişim göstermektedirler (80). Uygun katı besiyerinde *Brucella* kolonileri 2 günlük inkübasyon sonrasında görülebilir duruma gelmektedirler. Koloniler maksimum büyüklüğe 5- 7 gün içinde erişirler ve bu süre sonunda 1- 2 mm çapta, smooth, saydam ve bal rengi konveks *Brucella* kolonileri oluşur. Kolonilere üstten bakıldığında konveks olup, parlak beyaz görünürler. Daha sonra koloniler genişlemekte ve daha koyu hale gelmektedirler (23). Smooth (S) *Brucella* spp. kültürleri, özellikle *B. melitensis* kültürü, subkültürlerinde rough (R) formuna veya kimi zamanda mukoid (M) formuna dissosiyeye olmaya eğilimlidirler. Sonrasında koloniler daha az saydam, daha fazla granuler, donuk yüzeyli (R) veya yapışkan tekstürde (M), yansıyan ışıktaki mat beyazdan kahverengiye doğru değişen koloni rengi oluşturmaktadırlar. S, R ve M formları arasında dissosiyeye olmuş kültürlerde intermediate formlar şekillenmektedir. Koloni morfolojisinde, genelde virulensdeki değişiklikler, serolojik özellikleri ve faj sensitivitesine bağlı olarak değişimler görülebilmektedir (80).

Brucella spp.'nin metabolizması oksidatif olup, kültürleri karbonhidrat içeren besiyerinde asitleşme özelliği göstermemektedir. *Brucella* spp. katalaz ve genellikle oksidaz pozitif özellikte olup, *B. ovis* ve *B. canis* dışındakiler nitratı nitrite indirgemektedirler. *B. melitensis*, H₂S üretmemektedir, buna karşın *B. abortus* H₂S pozitifdir. Üreaz aktivitesi hızlıdan yavaş doğru değişebilmektedir. Triptofandan indol üretimi ve glukozdan asetil metil karbinol üretimi olmamaktadır (8, 19, 23, 75).

Tüm smooth *Brucella* suşları poliklonal antiserumlarla aglütinasyon testlerinde birbirleriyle tam bir kros reaksiyon göstermelerine karşın non-smooth varyantlarla kros reaksiyon oluşturmamaktadırlar. Non-smooth kolonilerle kros reaksiyonlar absorbe edilmemiş anti-R serumu kullanılarak aglütinasyon testleriyle gösterilebilmektedir. Lipopolisakkaritler (LPS), uygun koloni fazında aglütinasyonla ilişkili büyük yüzey antijenleri barındırmaktadırlar. Smooth lipopolisakkarit (S-LPS) molekülleri ile smooth *Brucella* suşları arasında farklı oranlarda dağılımlar gösteren A ve M antijenlerini içermektedirler. Monospesifik A ve M antiserumunun kullanımıyla, türlerin biyotiplerinin ayrımı önem taşımaktadır (19).

Smooth *Brucella* suşları ile *E.coli* O:116, O:157, Kaufmann-White'ın *Salmonella* grubu N (O:30), *Pseudomonas multophila*, *Vibrio cholera* ve özellikle *Yersinia enterocolitica* O: 9 gibi çeşitli Gram negatif bakteriler arasında serolojik olarak kros

reaksiyonlar olduğu bilinmektedir. Bu organizmalar, tanı testlerinde *Brucella* spp.'nin S-LPS antijenleriyle kros reaksiyon vererek yanlış pozitifiteye neden olmaktadır (21, 23).

Brucella familyası tarafından litik olarak kırktan fazla *Brucella* fajı tanımlanmıştır. Tüm fajlar *Brucella* genusu için spesifik olup, diğer bakteriler için de aktif olup olmadığı bildirilmemiştir. *Brucella* fajları ile lizisin, *Brucella* spp.'nin identifikasyonunda ve genus düzeyinde ayırımında kullanışlı bir test olduğu bildirilmiştir. *Brucella* tiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan fajlar; Tbilisi (*Tb*), Weybridge (*Wb*), Izatnagar₁, (*Iz₁*) ve R/C' dir. İlk üç faj, smooth *Brucella* suşlarının ayırımında da kullanılmaktadır. R/C ise *B. ovis* ve *B. canis* için litik özelliktedir (19, 21- 23).

Biyotipler arasında farklılık göstermesine rağmen, tiyonin ve bazik fuksin (20µg/ml) boyalarına karşı duyarlılık, *Brucella* spp.'nin rutin tiplendirme testlerinden biridir. *B. melitensis* ve *B. abortus*, her iki boyanın da varlığında gelişebilmektedir (19, 21).

İlk izolasyonda, *Brucella* genusu in vitro olarak genellikle gentamicin, tetracycline ve rifampicine'e duyarlıdır. Çoğu suşlar ampisillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, erithromycin, kanamycin, novobiocin, spectinomycin'e de duyarlı olsalar da, duyarlılık derecesi; türe, biyovara ve suşa göre değişmektedir. Çoğu suşlar, β-laktamazlara, cephalosporinlere, polimiksin, nalidixic acid, amphotericin B, bacitracin, cycloheximide, clindamycin, lincomycin, nystatin ve vancomycin'e direnç göstermektedirler. Penicilin, sığırların immunizasyonunda kullanılan aşı suşlarından *B. abortus* S 19'un ve streptomycin ise koyun ve keçilerin aşılmasında kullanılan *B. melitensis* Rev 1 suşunun, saha suşlarından rutin ayırımında kullanılmaktadır (8, 75, 80).

Sporsuz, patojenik diğer bakterilerle karşılaştırıldığında, uygun koşullarda *Brucella*'nın, memeli konakçısının dışında, yaşama yeteneği yüksektir. Pastörizasyon ısısında etken, 5- 15 saniye içerisinde inaktive olurken, 0° C 'de 18 ay yaşayabilmektedir. İnsanlarda en önemli bulaşma kaynağı olan peynirlerde ise etkenin ömrü 4 günden 6 aya kadar değişmektedir (80, 81).

Brucella'nın bulaşmasındaki başlıca kaynaklar, doğum veya abort yapmış hayvanların plasenta, fetal veya vaginal sıvılarıdır. Doğum veya abort sırasında çok fazla miktarda mikroorganizma saçılımı şekillenmektedir (20- 23). Keçilerde organizmanın atılması iki veya üç ay sürmekte ve atılan mikroorganizma miktarı fazla olmaktadır. Koyunlarda ise, etkenin atılımı keçilere göre daha kısa süreli olmakta ve 3 hafta kadar sürmektedir (80). *Brucella*'nın saçılımı ayrıca meme sekresyonu veya semen ile de olabilmektedir. Etken üreme organlarından, lenf yumrularından ve bazen de artrit oluşumu sonucunda eklem sıvısından izole edilmektedir (19). Kalıcı infeksiyonlarda, meme bezleri ve supramammar

lenf yumruları, laktasyonda sürekli ve dalgalı seyirli organizma saçılımının en önemli kaynağıdır. Bu durum insan ve diğer hayvanlara önemli bir bulaşma kaynağı oluşturmaktadır (20- 23).

Hayvanlar doğrudan infekte aerosoller veya etkenle bulaşık materyallerin solunum, sindirim, konjunktiva yolu ile alımı sonucu infekte hale gelmektedirler. İnfeksiyonun diğer bulaşma yolu ise *Brucella*'dan ari hayvanların otladığı meralara infekte hayvanların karışması veya materyaller ile gübrelerin kontamine olmasıdır. Su ile bulaşma çok az görülmekte olup, yalnızca kısa mesafelerde olasıdır. Erkeklerde, üreme organlarına lokalizasyon genellikle *Brucella*'nın semen ile saçılımıyla sonuçlanmaktadır. Buna rağmen doğal çiftleşme kullanıldığında infekte erkeklerin duyarlı dişilere bulaştırma riskinin düşük olduğu bildirilmiştir. Buna karşın infekte donörlerden alınan spermalar suni tohumlama ile bulaşma riskini taşımaktadır (23).

Köpeklerin, brucellosis'in mekanik ve biyolojik vektörü olduğu bildirilmiştir. İnfekte ahırlarla temas halindeki köpekler bu etkenle infekte olmakta, ancak infeksiyonu hızlıca elimine etmektedirler. Bununla birlikte kediler ve vahşi karnivorlar, tilki ve kurtlar da, fetus ve fetal membranlar gibi infekte materyalleri dışarıya taşımaları nedeniyle mekanik yayıcıdır (82). İnfekte koyun ve keçilerin olmadığı yerlerde, sığırlarda *B. melitensis* kaynaklı bir infeksiyon olduğu bildirilmemiştir.

Laktasyonda, organizmanın sütle sürekli veya intermitten saçılımı meme bezlerinin kalıcı infeksiyonu ile ilişkilidir (80). Sütte atılan *Brucella* sayısı oransal olarak düşük olsa da kuzulara, buzağılara ve dolaylı olarak da sağım yapan kişinin eline bulaşması açısından önemlidir. Sığırlarda da etkenin memeye kolonizasyonu sık görülmekte ve sütle saçılımı uzun zaman almaktadır. Keçilerde ise infeksiyon genellikle kısa sürmekteyse de, bazen de kalıcı olabildiği bildirilmiştir. Genellikle aşılı hayvanlarda, infeksiyon kısa sürmektedir. Sütle mikroorganizma saçılımı ile karakterize persistent infeksiyon durumunda, etkenin atılımı iki veya daha sonraki laktasyonlarda da sürebilmektedir (82).

Brucellosis'de dişilerden bulaşmada yavruların az bir kısmı, uterus yoluyla infekte olmakta, çoğu yavru ise infeksiyonu süt ve kolostrum ile almaktadır. Bu hayvanlar, etkeni lenf yumrularına gastro-intestinal yolla drene etmekte ve feçesle saçabilmektedirler. Kuzu ve buzağılar seksüel olgunluğa ulaşınca tamamen duyarlı hale gelmektedirler. Gebelikte beraber riskin en üst düzeye geldiği bildirilmektedir (20- 23).

Koyunlarda ise ırk duyarlılığı infeksiyonun bulaşması ve seyirinde önemli olmaktadır (83). Corbel (38) tarafından; koyunlarda sütçü ırkların, etçi ırklara göre etkene daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Malta ve Güney Amerika koyun ırkları etkene nispeten

dirençli iken, Güneybatı Asya ve Akdeniz’de yaşayan kalın kuyruklu ırklar enfeksiyona çok duyarlıdır. Bu bölgelerdeki brucellosis probleminin koyun kaynaklı olduğu, buna karşın Latin Amerika’da ise *B. melitensis*’in yayılmasında keçilerin daha etkin olduğu belirtilmektedir. Hayvanların davranışları da *Brucella*’nın bulaşmasında etkili olmaktadır. Koyunlar kuzulama döneminde bir arada bulunurlarken, keçiler böyle bir davranış sergilememektedirler. Çiftleştirme sistemleri de çevresel etkenler gibi enfeksiyonun yayılmasında önemli olabilmektedir. Karanlık ve kapalı yerlerde yavrulama, açık ve kuru havadakine göre bulaşmada daha etkilidir (83).

B. abortus, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. canis* gibi türler vahşi hayvanlarda da brucellosis’in kaynağıdır (84). *B. neotomae* yalnızca, Amerika Birleşik Devletleri’nde farelerden (*Neotoma lepida*) izole edilmiştir (33) ve diğer hayvanlarda da patojen olup olmadığına ilişkin bir bilgi bulunmamaktadır. *B. ovis* ve *B. neotomae*, insanlarda hastalığa neden olmamaktadırlar (20, 21, 38). *B. abortus* ve *B. ovis*, dünyanın hemen her bölgesinde, özellikle vahşi hayvanlardan izole edilmiştir (6, 84). Bizon (*Bison bison*), boynuzlu geyik (*cervus elephus*), vahşi domuz (*sus scrofa*), Avrupa vahşi tavşanı (*Lepus capensis*), tilki (*Vulpes vulpes*), Afrika bufalosu (*Syncerus caffer*), Güney Afrika geyiği (*Taurotragus oryx*), Orta Afrika antilobu (*Kobus elipsiprymnus*), ren geyiği (*Rengifer tarandus tarandus*) ve Kuzey Amerika Ren geyiği (*Rengifer tarandus groenlandicus*) *Brucella* spp. ile enfekte olabilmektedir. *B. melitensis* vahşi doğada çok az görülse de, yakın zamanda Avrupa Apler’inde iki farklı türdeki dağ keçisinden izole edilmiştir (85, 86). Sığırlarda brucellosis’in baskın olduğu dönemlerde, vahşi hayvanlarda da kısmen geyiklerde seropozitiflik saptanmıştır (86). Buna bağlı olarak enfeksiyonun kendini sınırlayıcı olduğu veya sadece sığırlar arasında yayıldığı düşünülmüştür. Brucellosis eradikasyon programında başarı sağlamış ülkelerde bile, vahşi doğada hayvanlar arasında *B. abortus* rezervuarları olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’ndeki geyik ve bizonlar, *B. abortus* rezervuarıdır (87). Güney Afrika’da bulunan Afrika bufalosundan % 23’lük seropozitivite elde edilmiş olmasına karşın, *B. abortus* için rezervuar olmadığı düşünülmektedir. Güney Afrika’da hipopotam, zebra, antilop, impala, geyik gibi türlerin ise sığır brucellosis’indeki epidemiyolojik önemleri yok denecek kadar azdır (88).

B. suis biovar 1, 2 ve 3, tüm dünyada halen yaygın biçimde görülmektedir. Enfeksiyon Güney Amerika ve Güneydoğu Asya dışındaki ülkelerde evcil domuzlarda yüzyıllardır eradike edilmiş durumdadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde ve Avustralya (*B. suis* biyovar 1- 3) ile Avrupa’daki yaban domuzlarında (*B. suis* biyovar 2) etkene yalnızca sınırlı sayıda rastlanılmaktadır. *B. suis* biyovar 2; biyovar 1 ve 3’ten sadece Avrupa’da

bulunmasıyla ayrılmakta olup, bu biyovar aynı zamanda Avrupa yabani tavşanını infekte ederek hayvanın, etkenin taşınmasında rezervuar olmasına da neden olmaktadır. *B. suis* biyovar 2 infeksiyonu insanda nadiren hastalık oluşturabilmektedir. 1994 yılında, Belçika’da yaban domuzlarında *B. suis* biyovar 2 salgını tanımlanmıştır. Hayvanlarda bakteriyolojik olarak etken saptanmasına karşın patolojik lezyon genel anlamda şekillenmemektedir. Bunun nedeni tam olarak tanımlanamasa da *B. suis* biyovar 2’nin yaban domuzlarında, evcil domuzlara göre daha az patojen olduğu veya infeksiyonun ekolojisi ile ilgili olduğu düşünülmüştür. Vahşi domuzlarda *B. suis* infeksiyonu Hawaii, Amerika Birleşik Devletleri’nin güneydoğu bölgesi, Avustralya’nın Queensland bölgesinden bildirilmiştir. Vahşi domuz ihracatındaki artış nedeniyle pek çok insan hastalık riski altındadır. 1983’te bir domuz yetiştiricisinde *B. suis* biyovar 1 infeksiyonu belirlenmiştir (87).

Kuzey Kutbu, Sibirya, Kanada ve Alaska’daki ren geyiklerinde *B. suis* biyovar 4 infeksiyonu önemli bir zoonozdur. Bu infeksiyon, ayrıca musları ve kimi zaman da çeşitli karnivorları infekte etmektedir. Ancak son serolojik araştırmalarda, Norveç’in kuzeyinde Finmark Bölgesinin ren geyiklerinde Brucellosis’e rastlanmadığı bildirilmiştir (89). *B. suis* biyovar 4 ile infekte ren geyiklerindeki etkenin sığırlara bulaşması sonucu hastalık şekillenmektedir, ancak patogenesisine ilişkin daha çok çalışma yapılması gerektiği bildirilmiştir (90).

B. melitensis küçük ruminantlar ve dolayısıyla insanlar için oldukça önemli bir zoonoz olma özelliği gösterse de, ilginç olarak, vahşi yaşamda *B. abortus* ve *B. suis*’den daha sınırlı yayılım göstermektedir. Yayılım gösterdiği vahşi hayvan türleri, Fransa ve İtalya Alp’lerinde yaşayan dağ keçileridir. Bu türlerde; orşitis, epididimitis, poliartiritis, körlük ve nörolojik semptomlara rastlanırken, abort rapor edilmemiştir. Bu türlerin evcil hayvanlarda rezervuar olabileceği ile ilgili veri bulunmamaktadır (85, 86, 91). Suudi Arabistan, Kuveyt, Umman, Irak, İran, Sudan, Mısır, Libya, Somali’de koyun ve keçilerle temasta olan tek hörgüçlü develerde *B. melitensis* infeksiyonuna rastlanmıştır. Etken, develerin sütünden izole edilmiştir ve bu durum halk sağlığı açısından önemli bir problem olarak tanımlanmıştır. Güney Afrika’da da lamalar ve deve türlerinden etken izole edilmiştir (82). Mısır’da ayrıca bufalo, at ve domuzda da aynı hastalık rapor edilmiştir. Açıkta yetiştirilen domuzlar *B. melitensis* infeksiyonuna duyarlıdır.

İlk olarak 1994’te İskoçya sahillerindeki fok ve yunuslar ile dar burunlu yunusun aborte fetusundan *Brucella* spp. izole edilmiş ve böylece etkenin deniz memelilerinde de infeksiyon yaptığı belirlenmiştir (92). Ewalt ve arkadaşları (39) aborte yunus fetusundan

Brucella spp. identifiye etmişlerdir. 1990'larda Avrupa ve Güney Amerika'daki okyanuslarda araştırılan yüzgeç ayaklılar ve deniz memelilerinden, bakteriyolojik ve genetik olarak, klasik altı brucella tipinden farklı olan yeni suşlar identifiye edilmiştir (35, 48). Etkenler *B. cetacea* ve *B. pinnipediae* olarak adlandırılmıştır (41). Ardından Kuzey ve Güney Yarımkürede farklı deniz memelilerinden alınan serum örneklerinde *Brucella* antikorları aranmış ve yumuşakçalar ile deniz memelilerinde *Brucella* antikorlarına rastlanmıştır (93, 94). İnfeksiyon deniz memelilerinde de diğer hayvanlarda olduğu gibi veneral, kongenital olarak veya yeni doğanların sütle beslenmesi ile yayılmaktadır. Bu türlerde infeksiyon abortla seyretmektedir. *Brucella* spp.'nin, deniz memelilerinde reproduktivite bozukluklarına yol açan en önemli etkenlerden biri olması nedeniyle, bu türlerin popülasyon dinamiğinde de oldukça önemli rolü olduğunu belirtilmiştir (95). Etkenin deniz memelilerindeki patolojisi henüz net olmamakla birlikte, İskoçya sahillerinde 3 yunusta meningoencephalitis görülmüş ve beyinlerinden de *Brucella* spp. izole edilmiştir (94).

Kuzey Kutbu'ndaki kutup ayıları (*Ursus maritimus*), deniz besin zincirinin en önemli tüketicisi olup, foklar kutup ayısının en önemli besin kaynağıdır. Bu bölgedeki foklarda *Brucella* antiserumları bulunmuştur (95). Yine bu bölgedeki 297 kutup ayısından alınan plasma örneklerinin % 5.4'ünde *Brucella* antikoru rastlanmasına karşın bugüne kadar kutup ayılarında *Brucella* kaynaklı bir infeksiyon bildirilmemiştir. Deniz ürünleri gıda zincirindeki *Brucella* kaynağını, çok sayıdaki serolojik ve kültür pozitif deniz memelisi oluşturmaktadır. Son deneysel çalışmalarda Nil pisi balığında, *B. melitensis* biyovar 3'ün iç organlardan izole edilebildiği ve bu balıkların *Brucella* infeksiyonuna duyarlı oldukları bildirilmiştir (96).

Brucellosis tüm dünyada ve ülkemizde sıklıkla görülen önemli bir zoonozdur. Bu amaçla ülkemizde olduğu gibi, *Brucella* prevalansının yüksek olduğu diğer ülkelerde de kontrol ve eradikasyon programları uygulanmaktadır. Bu bağlamda Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü'nün koordinatörlüğünde ilki 1989 yılında ülke çapında yapılan sero surveyde, bölgelere göre değişen %0- 10 oranındaki brucellosis prevalansı, sığırlarda %3.56, koyunlarda %1.26 olarak, 1990 yılında ise sığırlarda %1.2, koyunlarda %2.08 olarak saptanmıştır. 1991 yılında yapılan sero surveyde ise toplam 7812 sığır kan serumunda seroprevalans %1.01 iken, 11.112 koyun kan serumunda ise seroprevalansın da %1.83 olduğu belirlenmiştir. 2000 yılında yapılan son sero-surveyde 79 ilden alınan 34.458 adet sığır ve 30.433 adet koyun olmak üzere 64.891 adet kan serumu materyal

olarak kullanılmış ve Türkiye genelinde sığırlarda brucella prevalansı %1.43, koyunlarda %1.97 olarak saptanmıştır (15).

Sığır brusellozu 175 ülkeden 120'sinde görülmektedir. Bunlardan 33 ülkede hastalık bulunmamakta, geriye kalan 22 tanesinde de yeterli veri bulunmamaktadır (81, Tablo 1).

Tablo 1: 1986 Kıtalara göre Brusellosis Dağılımı (81)

Kıta	Brucellosis Tanımlanmış Ülke Sayısı	Brucellosis Tanımlanmamış Ülke Sayısı	Yeterli Veri Bulunmayan Ülke Sayısı	Toplam
Afrika	42	4	8	54
Amerika	26	7	4	37
Asya	27	6	9	42
Avrupa	18	12	0	30
Okyanusya	6	4	1	11
Rusya	1	-	-	1
Toplam	120	33	22	175

Animal Brucellosis 1990 (81)

Avusturya, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Macaristan, İzlanda, Lüksemburg, Moldova, Hollanda, İsveç, İsviçre ve İngiltere Brucellosis yönünden aridir. Bununla birlikte, *B. melitensis* enfeksiyonu Balkanlarda Makedonya ve Yunanistan'da oldukça önemli bir enfeksiyondur. Yunanistan'da *B. melitensis*'in yanısıra *B. abortus* da önem arz etmektedir. Hastalık *B. suis* biyovar 2 ile birlikte Yugoslavya'nın bazı bölgelerinde endemik durumdadır. Hırvatistan'da da *B. melitensis* enfeksiyonuna koyun, keçi ve insanlarda sıklıkla rastlanılmaktadır. Bulgaristan'da ise *Brucella*'dan kaynaklanan bir sorun yaşanmamaktadır (10). Avrupa birliğine üye ülkeler içinde *B. melitensis*'ten arı olanlar şunlardır: Belçika, Danimarka, Finlandiya, Almanya, İrlanda, Lüksemburg, Hollanda, İsveç, İngiltere, Fransa'nın 17 bölgesi, İspanya'nın 2 bölgesi (Tablo 2).

Tablo 2: Avrupa’da Hayvanlarda Brucellosis (3)

Ülke	<i>B. abortus</i> Sığır	<i>B. melitensis</i> Koyun / Keçi	<i>B. suis</i> Domuz	<i>B. ovis</i> Koç
Belçika	+	-	-	-
Bulgaristan	-	-	+	+
Fransa	+	++	?	+
Almanya	+	-	?	+
Yunanistan	+	++	VB	VB
İrlanda	+	-	-	-
İtalya	+	+	-	VB
Polonya	+	+	-	+
Romanya	-	-	+	-
Rusya	++	++	+	+
Yugoslavya	+	+	+	-
İspanya	+	+	-	+
Çekoslovakya	-	-	?	-

FAO-WHO-OİE Animal Health Year Books, 1994-1995 (3)

- (-) Bulunmamaktadır.
- (+) Sporadik olarak bulunmaktadır.
- (++) Yüksek insidenste bulunmaktadır.
- (?) Kesin olmayan rakamlar.
- (VB) Veri bulunmamaktadır.

Asya kıtasında Bahreyn, Kıbrıs, Japonya, Malezya (Sabah), Filipinler ve Singapur 4 *Brucella* türünden ari durumdadır. Türkiye ve Kuveyt, *B. abortus* ve *B. melitensis* yoğunluğu açısından dikkat çekici durumdadır. Çin'den tüm *Brucella* türleri bildirilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3: Asya'da Hayvanlarda Brucellosis (3)

Ülke	<i>B. abortus</i> Sığır	<i>B. melitensis</i> Koyun / Keçi	<i>B. suis</i> Domuz	<i>B. ovis</i> Koç
Türkiye	++	++	-	VB
İsrail	-	+	-	-
Çin	+	+	+	+
Afganistan	+	+	VB	VB
İran	+	+	-	-
İrak	+	+	VB	VB
Kuveyt	++	++	-	-
Umman	++	VB	VB	VB
BAE	-	+	-	+
Hong Kong	VB	VB	?	VB
Tayland	+	-	+	-
Malezya	+	-	?	-
Endonezya	+	VB	+	+

FAO-WHO-OİE Animal Health Year Books, 1994-1995 (3)

- (-) Bulunmamaktadır.
- (+) Sporadik olarak bulunmaktadır.
- (++) Yüksek insidenste bulunmaktadır.
- (?) Kesin olmayan rakamlar.
- (VB) Veri bulunmamaktadır.

Amerika kıtasında Barbados, Falkland Adaları, Surinam dört brucella türünden ari durumdadır. Kıtadaki *B. abortus* insidensi diğer türlere oranla daha yüksek olmasının yanında *B. suis* enfeksiyonu varlığı da sıklıkla bildirilmektedir (Tablo 4).

Tablo 4: Amerika Kıtasında Hayvanlarda Brucellosis (3)

Ülke	<i>B. abortus</i> Sığır	<i>B. melitensis</i> Koyun / Keçi	<i>B. suis</i> Domuz	<i>B. ovis</i> Koç
ABD	+		+	+
Venezuela	++	-	++	?
Arjantin	++	-	+	++
Brezilya	++	-	+	-
Şili	++	-	-	+
Jamaika	+	-	-	-
Peru	++	VB	VB	++
Meksika	+	+	VB	-
Kanada	-	-	-	+
Küba	?	-	++	-
Dominik	++	-	+	-
Haiti	+	-	-	-
Bolivya	++	+	+	VB

FAO-WHO-OİE Animal Health Year Books, 1994-1995 (3)

- (-) Bulunmamaktadır.
- (+) Sporadik olarak bulunmaktadır.
- (++) Yüksek insidenste bulunmaktadır.
- (?) Kesin olmayan rakamlar.
- (VB) Veri bulunmamaktadır.

Avustralya kıtasında *B. ovis* infeksiyonları bildirilmektedir. Vanuatu dört brucella türünden ari durumdadır (Tablo 5).

Tablo 5: Okyanusya'da Hayvanlarda Brucellosis (3)

<i>Ülke</i>	<i>B. abortus</i> Sığır	<i>B. melitensis</i> Koyun / Keçi	<i>B. suis</i> Domuz	<i>B. ovis</i> Koç
Avustralya	-	-	(+)	+
Yeni Zelanda	-	-	-	++
Vanuatu	-	-	-	-
Yeni Kaledonya	-	-	-	-

FAO-WHO-OİE Animal Health Year Books, 1994-1995 (3)

- (-) Bulunmamaktadır.
- (+) Sporadik olarak bulunmaktadır.
- (++) Yüksek insidenste bulunmaktadır.
- (?) Kesin olmayan rakamlar.
- (VB) Veri bulunmamaktadır.

Afrika kıtasında Gambiya, Mali, Moritanya dört *Brucella* türünden ari durumdadır. *B. abortus* ve *B. melitensis* yaygın olarak görülmektedir (Tablo 6).

Tablo 6: Afrika'da Hayvanlarda Brucellosis (3)

Ülke	<i>B. abortus</i> Sığır	<i>B. melitensis</i> Koyun / Keçi	<i>B. suis</i> Domuz	<i>B. ovis</i> Koç
Mısır	+	+	VB	-
Kenya	+	+	VB	VB
Güney Afrika	++	+	-	+
Afrika Cumhuri.	++	VB	+	VB
Libya	+	+	-	-
Mozambik	++	+	++	+
Zimbabve	+	+	-	+
Tunus	+	++	-	-
Sudan	++	+	-	-
Namibya	+	-	-	?
Nijerya	++	+	+	VB
Fas	+	?	-	-
Nijer	+	+	VB	+

FAO-WHO-OİE Animal Health Year Books, 1994-1995 (3)

- (-) Bulunmamaktadır.
- (+) Sporadik olarak bulunmaktadır.
- (++) Yüksek insidenste bulunmaktadır.
- (?) Kesin olmayan rakamlar.
- (VB) Veri bulunmamaktadır.

Koyun keçi Brucellosis'i tüm dünyada görülmekte ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde endemik seyretmektedir (3, 6- 8). İnfeksiyon, koyunlarda, endemik olarak Akdeniz bölgesinde, özellikle kuzey ve batı kıyıları ile Orta Asya'ya ve güneyde de Arap Yarımadası ile batıda Moğolistan'a kadar uzanan bir bölgede görülmektedir. Özellikle Meksika, Peru ve Kuzey Arjantin gibi Latin Amerika'nın bazı bölgeleri de infeksiyondan önemli düzeyde etkilenmiştir. Bu hastalık Hindistan ve Afrika'da da görülmektedir. Bununla birlikte Kuzey Amerika (Meksika dışında), Kuzey Avrupa, Güneydoğu Asya, Avusturalya ve Yeni Zelanda hastalıktan ari kabul edilmektedirler (6). *B. melitensis* insan Brucellosis vakalarından en fazla sorumlu olan tür olarak görülmekte (8) ve OIE raporlarına göre ülkelerin sosyo-ekonomik yapılarına bağlı olarak farklı oranlarda değişim göstermektedirler (97).

B.melitensis'in üç biyovarı içinde Akdeniz ülkeleri ve Orta Doğu'da biyovar 3 baskın iken, Latin Amerika'da ise biyovar 1'in baskın olduğu görülmektedir. Biyovar 1 ve 2 bazı Güney Avrupa ülkelerinde rapor edilmektedir. *B. melitensis* biyovar 3 sıklıkla Mısır, Ürdün, İsrail, Tunus ve Türkiye'den izole edilmiştir. *B.melitensis* biyovar 2; Türkiye, Suudi Arabistan ve biyovar 1 ise Libya, Umman ve İsrail'den rapor edilmiştir. *B. abortus* biyovar 1 Mısır'dan, biyovar 2 İran'dan, biyovar 3 İran ve Türkiye'den, biyovar 6 ise Sudan'dan rapor edilmiştir. İnsan brucellosisi açısından en yüksek insidansa sahip ülkeler Suudi Arabistan, İran, Filistin, Suriye, Ürdün ve Umman'dır. Bahreyn'de hiçbir hastalık vakasına rastlanmamıştır. Çoğu insan vakaları, *B. melitensis* ve kısmen biyovar 3 kaynaklıdır. Ancak *B. abortus* gittikçe artan vakadan sorumlu olmaktadır. 1995 yılında Yemen'de 330 vakanın 7'sinden *B. melitensis* sorumlu iken, 45'inden *B. abortus* identifiye edilmiştir (98).

Ülkemizde de sığır, koyun ve keçiler ile insanlarda brucellosis vakalarına sıklıkla rastlanılmaktadır (99- 102). Sığırlardan alınan örneklerde Bursa ve çevresinde saptanan prevalansın %0- 1 arasında olduğu, İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan Ankara, Kayseri ve Malatya'da ise %1- 3 oranında seropozitivite bulunduğu saptanmış, prevalansın Eskişehir ve Sivas'da %5- 10'un üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Kars ve Erzurum illerinde *Brucella* prevalansının sığırlarda %10'un üzerinde olduğu buna karşın Van, Mardin, Samsun, Ordu ve Giresun'da da etkene karşı seropozitiviteye rastlanılmadığı bildirilmiştir. Koyunlardaki seropozitivite Bursa ve çevresinde %0- 1 arasında olduğu, Ankara ve çevresi ile Antalya ve çevresindeki illerde % 5-10'un üzerine çıktığı tespit edilmiştir. Adana, Gaziantep, Van, Ağrı ile Bartın'dan Artvin'e kadar ilerleyen Karadeniz Bölge sınırı içinde yer alan illerde, koyunlarda *Brucella* seropozitivitesi görülmediği, buna karşın Kars ilinde

koyunlarda seropozitivite'nin %15 olduğu belirtilmiştir (15). Erdenliğ ve Şen (99) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden elde edilmiş 78 adet *Brucella* izolatının 69 adedinin (%88.5) *B. melitensis* biyotip 3 ve 9'unun (%11.5) *B. melitensis* biyotip 1 olduğunu belirtmişlerdir. Güler ve arkadaşları (100) tarafından yapılan başka bir çalışmada Türkiye'de infeksiyöz nitelikteki koyun atıklarının en önemli nedeninin bakteriyolojik ve serolojik bulgularla brucellosis olduğu ve bunu Campylobacteriosis'in takip ettiği belirtilmiştir. 1982- 1986 yılları arasında Yılmaz ve arkadaşları (101) tarafından yapılan bir çalışmada Ankara bölgesinden elde edilen koyun ve keçi atık fetuslarından %18.52 oranında *Brucella* spp. izole edilmiş, 4658 adet koyun kan serumundan da %13.89 oranında *Brucella* açısından seropozitivite elde edilmiştir. 1993-1997 yılları arasında ise Karaman ve arkadaşları (102) 297 adet koyun ftusunu mikrobiyolojik açıdan incelenmiş ve bunların 100 adedinde (%33. 7) *Brucella* spp.'ye rastlamışlardır. Aynı çalışmada 34 ilden, toplam 12199 adet koyundan alınan kan serumları, serum tp aglütinasyon (SAT) ve komplement fiksasyon (CF) testleriyle incelenmiş, bunun sonucunda koyunlarda 1909 adet (%15. 6) kan serumunun Brucellosis yönünden seropozitiflik gösterdiği tespit edilmiştir. Kuzey Anadolu Bölgesinde yapılan başka bir çalışmada ise 96 adet koyun ve 119 adet sığır aborte fetus materyali incelenmiş ve sırasıyla % 32 ve % 41.66 oranında *Brucella* spp. identifiye edilmiştir (103). Gürtürk ve arkadaşları (104) Van ve çevresinde yaptıkları bir araştırmada, bölgedeki 10 adet sürüden sağlanan koyunlara ait toplam 104 adet kan serumunu Rose Bengal Pleyt Aglütinasyon Testi (RBPT) ile incelenmiş ve %23. 1 oranında *Brucella* spp. antikoru saptamışlardır. 1980'den günümüze değin rakamlar incelendiğinde *Brucella* infeksiyon oranında herhangi bir azalma görülmemektedir. Brucellosis aşılmasının başladığı 1984 yılından sonraki birkaç yılda bir azalmanın olduğu fakat 1992 yılından itibaren tekrar bir artış yaşandığı belirtilmektedir (100).

Brucella'lar, retiküloendotelyal sistemin fakültatif intraselüler bakterileridirler. Etkenin virulensi, türlerine, suşlarına ve infekte ettiği inokulumun miktarına bağlı olarak değişmektedir. Konakçı duyarlılığı da gebelik durumuna göre değişkenlik göstermektedir. Organizma vücuda girdiği zaman, konakçının makrofajları ve T lenfositleri ile karşılaşmakta, etken hücresel savunma mekanizması ile elimine edilmeye çalışılmaktadır. Hücresel immunitenin en çok kullanılan mekanizmaları lenfosit stimülasyonu, gecikmiş tipte hipersensitivite, ve - interferon oluşumudur. Hücresel immunit, humoral tepki gibi hızlı biçimde ve birkaç hafta içinde oluşmamakta, tepkinin değişken ve belirlenmesi g olabildiği bildirilmektedir. Bakterinin vücuda ilk giriş yeri orofarinksin muköz

membranları, üst solunum yolları veya konjunktivadır. Bundan başka dişi veya erkeğin genital kanalı ve mukoz membranlarından da bulaşma şekillenmektedir. Vücuda girmeyi başaran etken, konağın hücresele yanıtı ile karşılaşmasına rağmen en yakın lenf yumrusuna ulaşabilmektedir. Ardından konakçının makrofajları ve T lenfositleri yoluyla sellüler savunma mekanizması devreye girmektedir. *Brucella* ile infeksiyon genellikle hem humoral hem de hücresele tepki ile sonuçlanmaktadır. İmmun tepkilerin kapsamı ve süresi, infekte eden suşun virulensi, infekte inokülümün büyüklüğü, gebelik, konakçının seksüel ve immün durumu gibi çeşitli etmenlere bağlı olmaktadır (8, 75, 82). Bunu izleyen zamanda spesifik antikor oluşumu ile humoral immün yanıt şekillenmektedir. İnfekte olan ruminantın türüne, yaşına, konakçının immunitesine, gebelik durumuna ve yayılma gösteren *Brucella spp.*'nin virulensi ile sayısına bağlı olarak hastalık oluşmaktadır. Bakteri, vücut savunmasını yenersen genellikle bakteriyemi gerçekleşmektedir. Doğal infeksiyonu izleyen 2- 4 hafta sonrasında farklı oranlarda belirlenebilen serolojik tepki oluşmaktadır. Bakteriyemi 10- 20. günden sonra kanda 30 günden 2 aya kadar çeşitli tanı testleriyle belirlenebilmektedir (105- 107). Eğer hayvan gebeyse, bakteriyemi, başlıca uterusun invazyonu ile gerçekleşmektedir. Aynı zamanda infeksiyon çeşitli lenf yumrularına ve organlara, sıklıkla da meme ve dalağa yerleşmektedir. *Brucella* ile infekte hayvanlarda klinik semptomlar çeşitlilik göstermektedir. En önemli semptomlardan biri abortustur veya hastalık döllenmeye rağmen düşük doğum oranı ile nitelendirilir. Abortus genelde gebeliğin son iki ayında ortaya çıkmakta, bunu doğum sonrasında bazen fetal membranların retensiyonu izlemektedir. Erkeklerde, etken epididimis, testis ve aksesuar seks organlarında lokalize olmakta, bakteri semende bulunabilmektedir. Bu durum daha sonra infertiliteye neden olarak, akut epididimitis ve orşitisle sonuçlanmaktadır. Her iki cinsiyette de artritis görülebilmektedir. *B. melitensis* infeksiyonlarında klinik görünüm hangi suşla infekte olduğuna bağlı olarak değişiklik gösterir. İnfeksiyona yakalanan gebe hayvanlar genelde önce abortus yaparlar, eğer etken tarafından uterusun reinvazyonu şekillenirse sonraki gebeliklerde membran ve sıvılarla infeksiyonu saçabilirler. Gebe olmayan hayvanların ise az sayıdaki mikroorganizmaya maruz kalma sonucunda infeksiyonun kendini sınırlaması, immunize olma veya latent infeksiyon taşıyıcısı haline gelebilmeleri olasıdır (108). İnfekte hayvanlarda *Brucella spp.*, üreme organları, meme, suprammammar lenf yumruları gibi lenfoid organlara ve kimi zaman da eklemler ve sinoviyal membranlara yerleşerek organlarda granülomatöz enflamasyonlu lezyonlar oluşturmaktadır. Oluşan lezyonlar patognomonik değildir. Nekrotize plasentitis, palpe edilebilir testiküler değişiklikler, nekrotize orşitis ve epididimitis sonrasında oluşan

granuloma, nekrotize seminal vaskülit ve prostatitis ortaya çıkabilmektedir. Akut mastitiste palpe edilebilir yumrularla, sulu veya pıhtılı süt oluşumu görülmektedir. Patolojik olarak genellikle normal görünmesine rağmen kimi aborte fetuslarda, vücut boşluklarında kanlı sıvı birikimi, dalak ve karaciğerde büyüme oluşabilmektedir. İnfekte fetal membranlarda kısmi ya da bütünsel değişiklikler oluşmaktadır. Nekrotik kotiledonlar kan kırmızısı rengini kaybederek kalınlaşmakta ve donuk gri renk almaktadırlar (20- 23, 38)

Brucella'nın yerleştiği bölgeye bağlı olarak orşitis, epididimitis, hygroma, arthritus, metrit, subklinik mastitis şekillenebilmektedir. Birçok hayvan asemptomatik taşıyıcı ve potansiyel yayıcı haline gelmektedir. Doğumunun sonuna doğru infekte olan dişilerde abortus şekillenmeyebilir. Hastalığın ikinci fazı, *Brucella*'nın eliminasyonu ile sonuçlanabileceği gibi, persistent infeksiyon oluşumu sonucunda etkenin süt veya genital akıntılarla sürekli ya da dalgalı organizma saçması ile de karakterize olabilir. Hayvanlar genellikle gebeliğin 3. yarısında abort yapmakta, ancak etken uterusu invaze olursa daha sonraki gebeliklerde yavru membranları ve sıvıları ile saçılma şekillenmektedir. Bunun yanında gebeliğin tamamlanabilmesi de olasıdır (38).

B. melitensis'de oluşan immuntolerans nedeniyle latent infeksiyon riski büyük oranda artarak, teşhis edilemeyen immun yanıt oluşmakta ve infeksiyon kalıcı duruma gelmektedir. Latent *B. melitensis* infeksiyonunun gerçek oluşum mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. *B. melitensis* ile bir kez infekte olmuş birey, reinfeksiyona karşı direnç geliştirmektedir (105- 107). Araştırmacılar, immun direncin 8- 9 aylık süre sonrasında düşmeye başladığı ancak gebelikte infeksiyondan 2 yıl sonra da sürdüğünü ve deneysel infeksiyondan sonra uzun süren immunité şekillendiğini rapor etmişlerdir (80). Gebe uterusun invazyonu sonrasında fazla miktarda ve kalıcı antikor oluşumu şekillenebilmekte, diğer yandan antikor yanıtı abort veya doğum sonrasında da ortaya çıkabilmektedir. Laktasyondaki memenin invazyonu, uterus invazyonuna oranla daha az immun tepkiye neden olmaktadır. Lenf yumrularında lokalizasyon, immun yanıtın gelişmesini tetiklemektedir. Oluşan IgG, IgM'ye göre daha kalıcıdır. Her iki izotip de infeksiyonun kronik aşamalarında düşmeye başlamaktadır. Serolojik tepki geçici olup, kimi zaman genç ve seksüel gelişmesini tamamlamamış hayvanlarda fark edilmeyebilir.

B. melitensis Rev 1 aşısı suşu genç hayvanlarda subkutan yolla tam doz halinde uygulandığında aglütinasyon testinde uzun süren serolojik tepki oluşturmaktadır. Aynı durum *B. abortus* S19 aşısı suşunda da görülmektedir. Serolojik testlerde saha suşları ile aşısı

suşları arasında infeksiyon ile aşılama antikorlarını ayırabilecek testler geliştirilmektedir (8, 80, 105, 106).

Brucella genusunun üyeleri, WHO laboratuvarı biyogüvenlik el kitabına göre Risk grubu 3 olarak sınıflandırılmışlardır. Çalışan için yüksek risk içeren etken, toplum için daha düşük risk içermektedir. *B. ovis*'in insan için patojenik olmadığı kabul edilmektedir, ancak diğer bazı *Brucella* genusu üyelerinin laboratuvarında çalışılması sırasında hem bireysel hem toplum açısından yüksek oranda güvenlik önlemleri alınmalıdır. *B. melitensis* ve *B. suis* insanlar için en patojen türlerdir, risk düzeyi organizmanın virulensi ile bağlantılı olmasının yanında maruz kalınan materyaldeki mikroorganizma yükü ile de ilişkilidir (19). Fötal membranlar, sıvılar ve dokular gibi abortus materyalleri, gramında 10^3 ' ten fazla *Brucella* spp. içerirler iken, lenf nodülleri ve süt örnekleri nispeten daha az mikroorganizma ile yüklüdürler (108) .

İnsanlar, *Brucella* spp. ile aksidental olarak infekte olup, her zaman *Brucella* infeksiyonunun son noktadaki konakçısıdır. İnsanlarda brucellosisin gerçek insidensi bilinmemektedir. İnsanlarda brucellosis, bireysel bir hastalık olmasının yanında halk sağlığını da olumsuz yönde etkileyen bir infeksiyondur. Bireysel infeksiyonlarda öncelikli risk grubunu veteriner hekimler, laboratuvar teknisyenleri ve hayvan bakıcıları oluşturmaktadırlar (109- 110). Koyunlarda kırkım sırasında ortaya çıkan ham yün, çalışanlar için potansiyel infeksiyon kaynağıdır (20- 23, 38). İnsan infeksiyonunun primer bulaşma yolu deri- mukoz membranlar ve taze hayvansal ürünlerin yenmesi ile direkt veya indirekt kontaklıdır. İnfekte sütlerin pastörizasyon yapılmadan peynir, tereyağı ve krema yapımında kullanılması nedeniyle etken halk sağlığı açısından risk taşımaktadır. Etken kontamine süt içinde 10 gün, beyaz beynirde 2 ay ve tereyağı içinde 4 ay canlılığını korumaktadır (24, 25, 81). İnsanlardaki brucellosis prevalansının mevsimsel olduğu, hayvanlardaki doğum döneminin hemen sonrasında pik düzeye çıktığı bildirilmektedir. İnsanlar *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*'e karşı duyarlı olup, 8- 20 günlük inkübasyon periyodu sonrasında değişik formlarda seyreden hastalık başlamaktadır. Genellikle, seksüel olgunluğa erişmiş bireylerde ve özellikle de hamilelikte duyarlılık artmaktadır. Aseptomatik form yaygındır ve sorumlu olan tip genellikle *B. abortus*'tur (26, 27, 29). Hastalığın akut formu baş ağrısı, kas ve eklem ağrıları, genellikle gece olan dalgalı ateş ve terlemeler ile kendini göstermektedir. Bazen brucellosis bulguları tek bir sistem veya organ ile sınırlı kalmaktadır. Akut infeksiyon veya sınırlı brucellosis olgularında, sistemik hastalığın diğer bulgularının olmadığı durumlar 'komplikasyon' olarak tanımlanmaktadır. En sık rastlanan tutulumlar spondilit, özellikle diz, dirsek ve kalça ekleminde periferik

artrit veya epididimo-orşittir. Bununla beraber sinir sistemi, genito-üriner sistem ile karaciğer-dalاک tutulumları ve kardiovasküler komplikasyonlar da oluşabilmektedir. Brucellosis “kronik” bir infeksiyon olarak tanımlanmakta, eğer bir veya daha fazla form içerirse, altı ay veya daha uzun bir periyotta tekrarlayıcı ya da kalıcı özellik göstermektedir (111- 112).

Norveçte fok ve bazı balina türlerinin tüketilmesi gelenektir ve bu türlerin hepsinde *Brucella* spp. bulunmuştur. Ancak Norveç’te şimdiye kadar hiçbir insanda infeksiyona rastlanmamıştır. Sadece bir laboratuvar çalışanı deniz memeli orjinli *Brucella* spp. etkeni ile infekte olmuştur. Bu durum deniz memelilerindeki *Brucella* spp.’nin insanlar için de patojen olabildiğini göstermektedir (113).

Türkiye’de insanlarda yapılan bir çalışmada Anadolu’nun Batısı ve Güney Doğu’undaki kırsal bölgede *Brucella* prevalansı serolojik yöntemlerle çalışılmış ve batıdaki prevalansın, Güneydoğu Anadolu’ya kıyasla çok daha düşük olduğu saptanmıştır (114). Yine İzmir bölgesinde yapılan başka bir çalışmada insan kan kültürlerinden elde edilen 11 adet *Brucella* izolatının 10 adedinden *B. melitensis* biyotip 3 ve 1 tanesinden de *B. melitensis* biyotip 1 izole edilmiştir (115). Bu bakımdan Türkiye genelinde hayvanlardan izole edilen *Brucella* türleri ile insanlardan izole edilenler arasında tam bir korelasyon olduğu saptanmıştır. İnsanlarda brucellosisten korunma, hayvan infeksiyonlarının kontrol altına alınması ile mümkündür (3, 6, 109, 116).

Brucella spp.’nin tanısı direkt ve indirekt olmak üzere iki kısımda incelenir. Direkt tanı bakteriyolojik ve moleküler tanı başlığı altında iki kısma ayrılır. Alton (19), hayvanlarda brucellosisin tanısında en gerçekçi yolun etkenin izolasyonu olduğunu açıklamıştır. Etkenin mikroskopik tanısı, vajinal smearın ve ayrıca plasenta veya aborte fetus iç organlarının Stamp’s Modifiye Ziehl-Neelsen Metoduna göre boyanması ile konabilir. Ancak, morfolojik olarak etkene benzeyen *Brucella ovis*, *Chlamidia psittaci* ve *Coxiella burnetii* gibi mikroorganizmalar tanıda yanıltıcı olabilirler. Sürü bazında değerlendirmelerde süt örnekleri ve vaginal svaplar koyun ve keçilerde *B. melitensis*’in izolasyonu için en iyi örnekler olarak kabul edilmektedirler (83). Nekropsi yapılan hayvanlarda ise dalak, iliak, meme ve prefemolar lenf yumruları izolasyon için en iyi örnekleme yerleri olarak belirlenmişlerdir (19, 80, 83). Saha örneklerinden etkenin izolasyonu çok sayıda kontaminant bulunması nedeniyle güç olduğu ve izolasyon şansını arttırmak amacıyla selektif besiyerlerinin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (19, 76, 78, 80). *Brucella* spp.’nin izolasyon ve identifikasyonunda kullanılan besiyerlerinin üç başlıkta toplanabileceği belirtilmiştir. Buna göre 1. *Brucella*’nın izolasyonunda

yararlanılanlar, 2. Kùltürlerin korunması ve identifikasyon gibi laboratuvar manipùlasyonunda kullanılanlar, 3. Dignostik reagentler ve aşıların hazırlanmasında kullanılanlar (19). Kan kùltürünün dışında *Brucella*'ların ilk izolasyonunda solid besiyeri kullanımı, dissosiasyonun engellenmesi ve *Brucella* kolonilerinin tanımlanabilmesine olanak sağlaması bakımından önerilmektedir (8, 75). Laboratuvar manùplasyonlarında kullanılmak üzere katı besiyerine ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. *B. abortus* biyovar 2 ve *B. ovis* gibi bazı suşlar üremeleri için seruma ihtiyaç duymaları sebebiyle, kùltür besiyerinin hazırlanmasında buna dikkat edilmelidir. Bazal media, Bacto-Tryptose, Tryptic Soy gibi agarlarla hazırlanarak, %2- 5 oranında sığır veya at serumu ilave edilmesi gerektiği bildirilmiştir. Kullanılan serum *Brucella* antikoru içermemelidir ve filtrelenerek sterilize edilmiş olmasının önemli olduğu belirtilmektedir. Bu şekilde hazırlanan Serum Dekstroz Agar, *Brucella*'nın biyotiplendirilmesinde kullanılan besiyerlerinden biridir. Selektif besiyeri olarak cycloheximide, bacitracin, polymyxine B sulphate, vancomycin, nalidixic acid, nystatin içeren Kuzdas ve Morse besiyeri ile Farrell's besiyerlerinin tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir (19).

Hornitzky ve Searson (117), 1986'da yaptıkları çalışmada, bakteriyolojinin spesifik bir yöntem olmasının yanında, sensitivitesinin örneğin yapısı (fötal organlar, fötal membranlar, lenf nodùlleri), aynı hayvandan alınan materyal sayısı, örnekteki *Brucella* sayısı ve canlılığı ile bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir. Saha örneklerinden bakteriyolojik tanı zaman alıcı olmasının yanında, dokulardaki *Brucella* sayısı az miktarda ise etken saptanamayabilmektedir. Brucellosisin tanısında PCR teknikleri, bakterinin canlı olmadığı, örneklerin miktarının az olduğu veya örneklerin kontamine olduğu durumlarda *Brucella* ile infekte hayvanların saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir (118). Bununla beraber klinik ve sahadan örnekleme ile ilgili çalışmalar azdır (119- 122), ve bugüne kadar her türlü biyolojik örnekte sensitiflikte klasik bakteriyolojinin yerini tutan hiçbir teknik tanımlanmamıştır (118). Çeşitli yazarlar saf kùltürden PCR ile *Brucella* DNA'sının deteksiyonunun sensitivitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (118, 123- 125). İnsanlarda ve hayvanlarda brucellosisin tanısı amacı ile 1987 yılından bu yana çeşitli PCR-tabanlı tanı teknikleri geliştirilmektedir. (106, 118, 123- 125). Brucellosis'in teşhisinde moleküler tanı yöntemleri farklı uygulama alanlarına sahiptir. Bu alanlardan en önemlisi saha örneklerinden *Brucella* spp.'nin ortaya konulmasıdır (119- 122). Serolojik ve bakteriyolojik tanı yöntemleri ile karşılaşılan sensitivite, spesifite, zaman alıcı olması ve sağlık riski taşıması gibi sorunlar, PCR tabanlı tanı yöntemleri ile özölmeye çalışılmaktadır. Cortez ve arkadaşları (121), sığır abortlarında brucellosis'in direkt

tanısında PCR tekniğinin kullanımını incelemişlerdir. Araştırmacılar atık sığır fetuslerinde *Brucella* spp.'nin varlığını ortaya koymak amacıyla *B. abortus*'un immunojenik 31 Kda proteinini kodlayan genine ait genus spesifik primerleri kullanmışlardır. PCR'ın yanı sıra bakteriyel kültür incelemesinin de yapıldığı çalışma sonucunda, genus spesifik PCR tekniğinin atık fetus örneklerinden brucellosisin direkt tanısı amacıyla güvenle kullanılabilceği ve sonuçlarının bakteriyel kültür sonuçları ile uyumlu olduğu bildirilmiştir. Benzer diğeri bir çalışma Güler ve arkadaşları (126) tarafından yapılmış ve koyun atıklarında PCR tekniği ile brucellosis'in tür spesifik tanısının mümkün olduğu ve bakteriyolojik kültür sonuçları ile paralel sonuçların elde edildiği bildirilmiştir.

Saha örneklerinde PCR tekniği ile cins ve tür düzeyi yanı sıra biyotip düzeyinde de *Brucella* spp. identifikasyonu yapılmaktadır. PCR-RFLP ve Southern Blot Hibridizasyon, DNA polimorfizminin tespitiyle *Brucella* türlerinin ve biyovaryolarını ayırımında kullanılmıştır (127- 128). Automated Multiplex Oligonucleotide Synthesizer- PCR (AMOS PCR) tekniği ile biyotip düzeyinde yapılan incelemeler sonucu saha örneklerinden elde edilen izolatların aşu suşlu veya saha suşlu oldukları ortaya konulmaktadır (129).

Smooth *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*) ile ilgili olarak, brucellosisin tanısında kullanılacak antijenin karakteristik yapısı ve doğasının nasıl olacağına ilişkin bir ortak bilimsel düşünce bulunmamaktadır. Rose Bengal Pleyt Aglütinasyon (RBPT) ve CF testleri serolojik tanıda en yaygın olarak kullanılan testlerdir (130- 131). Bu testler Avrupa Birliğinde üyelerinde de resmi prosedürde uygulanan testlerdir. (80). Her iki testte de kullanılan antijen suspansiyonu (tüm hücreler) *B. abortus* biyovar 1 (A-dominant suştur) ile yapılmıştır ve ancak teorik olarak M-dominant suşlardan kaynaklanan infeksiyonların (*B. melitensis* biyovar 1, *B. abortus* biyovar 4, 5, 9 ve *B. suis* biyovar 5) atlanmasına neden olabilmektedir (107, 132). Ancak yapılan son çalışmalarda *B. abortus* biyovar 1 ile hazırlanan (A dominant) klasik RB antijeninin, M dominant *B. melitensis* biyovar 1 ile infekte olan koyun popülasyonlarında tanıda yeterli olduğu ortaya çıkmıştır (80).

Bakterinin dış membranı, *Brucella*'ya karşı humoral yanıtta sorumlu ana antijenleri içermektedir (133). Diğeri Gram negatif bakteriler gibi, smooth yapıdaki *Brucella* spp.'nin dış membranı da fosfolipid, protein ve smooth lipopolisakaridleri (S-LPS) kapsamaktadır. S-lipopolisakaritler immunodominant antijenlerdir. RBPT, CF ve hatta Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gibi çoğu serolojik test, bu antijenin taranmasına karşı geliştirilmiş testlerdir. *B. abortus* biyovar 1 (A-dominant) düşük frekanslı α -1-3 bağılı 4,6-dideoxy-4 formamido-D-mannopyranoside rezidüsüne sahiptir. Bunun tersi olarak da *B. melitensis* biyovar 1'in (M-dominant) O zinciri de 1 α -1,3 ve 4 α -

1,2 olmak üzere tekrarlayan pentasakkarid ünitelerine sahiptir. Sonuç olarak A ve M antijenik karakterleri, α -1,3 bağlı residülerin frekans çeşitliliğinde, O polisakkaride bağlı olarak değişmektedir (132). M dominant *B. melitensis* biyovar 1 gibi infeksiyonların taranmasında, A dominant suşlardan yapılan antijenlerin büyük sensitivite gösterdikleri bildirilmiştir (107, 132). *B. melitensis* biyovar 1 ile infekte olan koyunlarda hem *B. melitensis* 16 M hem de *B. abortus* 2308 (biyovar 1-A dominant)' e ait ham LPS ekstraktları indirekt ELISA'ya eşit oranda duyarlıdır (80). Farklı serolojik testler için tür spesifik tanısal antijenlerin pratik anlamda kullanılması için ileriye yönelik araştırmalara gereksinim olduğu bildirilmiştir (130, 132). Poliklonal antikorlarla test edildiğinde, *Brucella* türleri arasında sitoplazmik proteinlerin immunoelektroforetik şablonunda küçük farklılıklar bulunmaktadır (129, 130). *Brucella*'nın sitoplazmik antijenleri tür için spesifiktir. Bu durum, *Brucella* S-LPS 'leri ile kros reaksiyon veren *Yersinia enterocolitica* O:9 gibi etkenlerin ayırımında kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (134). *Brucella*'nın bu sitoplazmik antijenleri koyun ve keçilerdeki *Brucella* infeksiyonunun alerjik teşhisinde başarıyla kullanılmıştır.

Dünyada ve Türkiye'de hayvanlarda brucellosisten korunma aşılama ile yapılmaktadır. Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 1983 yılında hazırlanan resmi olarak 1984 yılında yürürlüğe konulan "Türkiye Brucellosis Mücadele Projesi" ile Türkiye 5 bölgeye ayrılmış, 4- 8 aylık dana ve 3- 8 aylık kuzu ve oğlakların hepsinin aşılama bölgelere göre aşamalı olarak başlatılmıştır. Yalnızca genç hayvanların aşılama ile tüm popülasyonda immunité oluşması uzun yıllar alacağından mücadelenin başlangıcında daha kısa sürede ve etkili bir bağışıklık amacıyla genç ve erginlerin birlikte aşılama önerilmektedir. Bu nedenle 1991 yılından itibaren hastalık mihraklarında ergin hayvanların azaltılmış dozla aşılama uygulaması yine bu proje içinde başlatılmıştır. Brusellosise karşı kullanılan aşılama ülkemizde Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na bağlı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde üretilmektedir. Koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev 1, sığırlarda *B. abortus* S19 aşısı kullanılmaktadır. Genç ve ergin hayvanlarda birbirinden farklı sayıda bakteri içeren aşılama kullanılmaktadır. Koyunlarda kullanılan Genç Rev 1 aşısı; *B. melitensis* Rev 1, suşundan hazırlanan canlı, attenué, liyofilize bir aşıdır. Aşı 100 doz olarak üretilmektedir ve her bir doz aşısı $1-3 \times 10^9$ adet *Brucella* hücresi içermektedir. Aşı 3- 8 aylık dişi ve erkek, kuzu ve oğlaklara 1 ml deri altı yolla uygulanmakta ancak gebe hayvanlarda abortlar meydana getirmesi sebebiyle ergin hayvanlara uygulanmamaktadır. Aşı, yaşam boyu süren yeterli bir koruma sağlamaktadır. Ergin aşısı da *B. melitensis* Rev 1 suşundan hazırlanmaktadır ve canlı, attenué, liyofilize

bir aşıdır. Aşı 100 doz olarak üretilmekte ve her bir doz aşı $5-10 \times 10^4$ adet *Brucella* hücresi içermektedir. Aşı 8 aylıktan büyük ergin dişi koyun ve keçilere 12 ay ara ile iki defa olmak üzere, 1 ml olarak deri altı yolla uygulanmaktadır. Aşı, erkek hayvanlara uygulanmamaktadır. *Brucella* spp. ile infekte olduğu laboratuvar raporu ile tespit edilen ve atıkların seyrettiği sürülerde gebelik dönemine bakılmaksızın tüm ergin dişi hayvanlar hemen aşılanmaktadır. İkinci yıl aşının daha güvenli bir dönem olan gebeliğin son ayı veya laktasyon döneminde yapılması önerilmektedir. Sığırlarda ise, S19 aşısı, *B. abortus* S19 suşundan hazırlanan canlı, attenuue, liyofilize bir aşıdır. Her bir doz aşı $40-120 \times 10^9$ adet *Brucella* hücresi içermekte, 4- 8 aylık dişi danalara 4 ml deri altı yolla uygulanmaktadır. Aşı, en az yedi yıl koruma sağlamaktadır. S19 ergin aşısı, *B. abortus* S19 suşundan hazırlanan canlı, attenuue, liyofilize bir aşıdır. Her bir doz aşı $1-3 \times 10^9$ adet *Brucella* hücresi içermekte ve 8 aylıktan büyük dişi sığırlara 1 ml deri altı yolla uygulanmaktadır. *Brucella* spp. ile infekte olduğu laboratuvar raporu ile tespit edilen ve atıkların seyrettiği sürülerde gebelik dönemine bakılmaksızın tüm ergin dişi hayvanlar hemen aşılanmaktadır. İkinci yıl aşının daha güvenli bir dönem olan gebeliğin son ayı veya laktasyon döneminde yapılması önerilmektedir. *B. abortus* S19, sığırlarda *B. abortus* infeksiyonuna ve *B. melitensis* Rev 1'de koyun ve keçilerde *B. melitensis* ve *B. ovis* infeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadırlar (135- 137). Ancak her iki aşının da gebe hayvanlara uygulanması halinde abortlara neden olması ve insanlara aşılama esnasında bulaşma riski bulunması gibi olumsuz yönleri de bulunmaktadır. Aşılama sonrası oluşan aglütinojen antikorlar nedeniyle, serolojik testlerle aşı ile infekte hayvanlar birbirinden ayırlanamamaktadır. Kompetatif ELISA ve Floresans Polarizasyon Testi (FPA) gibi primer bağlanma testleri ile aşı ile hastalıktan kaynaklanan antikorlar ayrılabilir (105, 106). *B. melitensis* infeksiyonunun yaygın olduğu ülkelerde, sığırların da bu etken ile infekte olabildiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu koşullardaki hayvanlara düşük dozlarda uygulanan *B. abortus* S19 aşısına göre *B. melitensis* Rev 1 aşısının, eşit veya daha fazla oranda koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlara rağmen, *B. melitensis* Rev 1 aşısının sığırlarda kullanımı kısıtlıdır (9, 136, 137).

Canlı attenuue, smooth *B. suis* 2 (S2) aşısı, Çin'de üretilmiş olup, ülkede hayvanların aşılanmasında kullanılmıştır. S2 aşısı, koyun ve keçilerin içme suyu ile aşılanmasına da olanak sağlamaktadır. Virulensi, *B. abortus* S 19 ile aynıdır ve kararlı bir suş olmasının yanında sığırlara ve gebe koyunlara yapılan aşılama sonucunda iyi bir korunma sağlandığı belirtilmiştir (137, 138). *B. melitensis* Rev 1 aşısının, hayvanlardaki Brucellosis infeksiyonlarına karşı en etkili aşı suşu olduğu bildirilmektedir. (137).

İnsanlarda korunmada *B.melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* S 19, hastalığa neden olabilmekte ve bu nedenle insanlarda aşılama için uygun olmadığı bildirilmektedir. Rusya ve Çin’de *B.abortus* 19 BA ve *B.melitensis* 104 M suşları insan korunmasında denemiş ve aşılarda etkinliğinin sınırlı olduğu bildirilmiştir. Schuring ve arkadaşları (139) tarafından, hayvanlarda ilk olarak 1991 yılında canlı attenuue, kararlı, rifampin- resistant mutant, virulent rough *Brucella* 2308 suşundan, RB51 aşısı kullanılmıştır. Bu aşı koçlarda *B. ovis*’ e karşı koruma sağlayamazken, *B. melitensis* ve *B. suis*’in rough suşlarıyla yeni aşı seçenekleri aranmaktadır (140). Yeni aşılama yaklaşımlarından diğeri ise; etkenin tanı antijenlerinin identifikasyonu ve buna karşılık gelen genin silinmesiyle elde edilen canlı attenuue smooth *Brucella* suşlarının kullanılmasıdır. Bu mutantlar yeni tanı testlerindeki hedef proteinlere karşı antikor yanıtı oluşturmayacaklardır. Canlı attenuue aşılara alternatif olarak sadece koruyucu antijenleri içeren subunit aşılar geliştirilmesi önerilmiştir. Subunit aşı, Smooth *Brucella* spp’e karşı korumada O-PS ve S-LPS kombinasyonu veya L7/L12 ribozomal proteinleri ile konjuge ve *B. ovis*’e karşı korunmada ise *Omp31* ile R-LPS komplekslerini içermelidir. Plasmid DNA ile DNA aşılamanın *Mycobacterium* gibi intraselüler bakterilerde koruyucu immunitiyi tetiklediği bildirilmiştir, L7/L12 DNA aşılarının da *Brucella* spp.’ye karşı etkinliği denenmekte olduğu bilinmektedir. *HSP 62* geninin, tüm *Brucella* türlerine karşı koruyucu etkili olduğu saptanmıştır. Ölü aşılar ve non-replikatif canlı ve ışınlanmış aşılarda, canlı aşı kadar koruyucu olmadığı açıklanmıştır (137).

Hastalığın sürü bazında taramalarında serolojik testler kullanılmakla beraber, gerek hastalığın epidemiyolojik verilerinin izlenmesi ve gerekse eradikasyon programlarının oluşturulması için etkenin bakteriyolojik olarak izolasyon ve identifikasyonu gereklidir (8, 19, 80, 83). Çalışmamızda Bursa ve çevresinden elde edilen koyun ve sığır atık fetuslarının *Brucella* spp. açısından bakteriyolojik olarak identifikasyonu ve biyotiplendirilmesi amaçlanmıştır. Bu yönüyle çalışmamız Marmara Bölgesi’ndeki koyun ve sığır atıklarında *Brucella* spp’ nin payını belirlemekle birlikte, bölgemizdeki biyotiplerin dağılımını açıklamaktadır. Brucellosis ile mücadelede eradikasyon programlarının başarısı, hastalığın bölgedeki prevalansının bilinmesi ve takip edilmesi ile mümkündür.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Saha Örnekleri

Bursa ve çevresinde büyükbaş ve küçükbaş hayvancılık yapan işletmelerde atık yapan 62 adet koyun ve 41 adet sığırdan elde edilen toplam 103 adet aborte fetus materyali ile bunlara ait plasental kotiledonlar, fetal akciğer ve karaciğer, börek, dalak ve kalp ile abomasum içeriği *Brucella* spp. izolasyonu amacı ile kullanıldı.

Standart *Brucella* suşları

<i>B.abortus</i> 544	Biyotip 1	(ATCC 23 448)
<i>B.abortus</i> 86 / 8 / 59	Biyotip 2	(ATCC 23 449)
<i>B. abortus</i> Tulya	Biyotip 3	(ATCC 23 450)
<i>B.melitensis</i> 16 M	Biyotip 1	(ATCC 23 456)
<i>B.melitensis</i> 63 / 9	Biyotip 2	(ATCC 23 457)
<i>B.melitensis</i> Ether	Biyotip 3	(ATCC 23 458)
<i>B.suis</i> 1330	Biyotip 1	(ATCC 23 444)
<i>B.canis</i> RM6 / 66		(ATCC 23 365)
<i>B.ovis</i> 63 / 290		(ATCC 25 840)
<i>B.melitensis</i> Rev 1		
<i>B.abortus</i> S19		

Testlerde kullanılan referans suşlar, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşılı ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı'ndan sağlandı.

Tbilisi Fajı

Brucella abortus'un identifikasyonunda kullanılan Tbilisi fajı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı'ndan sağlandı.

***Brucella* Antiserumları**

A ve M monospesifik antiserumları ile A+M *Brucella* antiserumu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü *Brucella* Aşıları ve Biyolojik Madde Üretim Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Besiyerleri

SDA (Serum Dekstroz Agar)

Tryptone Soy Agar (Oxoid- CM 0131) hazırlandı, otoklavda sterilizasyonu sonrasında 56 °C'ye kadar soğutularak içine %5- 10 oranında steril buzağı serumu (Biochrom, United Kingdom) ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde steril dekstroz (Merck-1.08337.0250) solüsyonu ilave edildi.

***Brucella* Selektif Besiyeri**

Brucella Medium Base (Oxoid, CM0169) içine *Brucella* Selective Supplement (Oxoid-SR 083A) katılarak saha örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu için kullanıldı.

Kanlı Agar

Blood Agar Base No: 2 (Oxoid, CM 0271) içine % 5-10 oranında steril defibrine koyun kanı katılarak saha örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu için kullanıldı.

Gliserinli Brucella Broth (Sıvı Gliserinli Besiyeri)

Brucella Broth (Difco, No: 87576JC) içine % 15 oranında gliserin katılarak *Brucella* spp. izolatlarının saklanması için kullanıldı.

Boya İçeren Besiyerleri

Tiyonin'li besiyeri

Tiyonin (Sigma T- 3387)'in distile suda % 0.2' lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C'ye kadar soğutuldu. İçine son konsantrasyonu % 5-10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. Besiyeri içine tiyoninin stok solüsyonundan 5 ml (% 0.5) eklenerek 1/50.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü.

Bazik Fuksin'li Besiyeri

Bazik Fuksin (Sigma / Aldrich B-0904) 'in distile suda % 0.2'lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat boyunca bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C' ye kadar soğutuldu ve içine son konsantrasyonu % 5- 10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. Besiyeri içine bazik fuksinin stok

solüsyonundan 5 ml (% 0.5) ilave edilerek 1/50.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü.

Safranin-O'lu Besiyeri

Safranin O (Sigma S 2255)' nun distile suda % 0.5'lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C' ye kadar soğutuldu ardından içine son konsantrasyonu % 5-10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. SDA besiyerine Safranin-O stok solüsyonundan 10 ml (% 0.5) ilave edilerek 1/10.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü.

Antibiyotik İçeren Besiyerleri

Streptomisinli Besiyeri

SDA'ya son konsantrasyonu 2.5 µg/ml olacak şekilde streptomisin (Sigma S 6501) katılarak hazırlandı.

Penisilinli Besiyeri

SDA'ya son konsantrasyonu 5 İÜ/ml olacak şekilde Penisilin (Benzylpenicillin 1.000.000, PEN-B, Sigma) katılarak hazırlandı.

İ-eritritol'lü Besiyeri

İ-eritritol (Sigma E-7500, meso-eritritol, 25 gr,) ün distile suda % 1'lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C' ye kadar soğutuldu ve ardından içine son konsantrasyonu % 5- 10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. SDA besiyerine İ-eritritol stok solüsyonundan 50 ml (% 1) ilave edilerek son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü.

Peptonlu Tuzlu Su

Bakteri ve fajların hazırlanması ile tüm dilüsyonlarda bu solüsyon kullanıldı.

Pepton	(Sigma- P6463)	10 gr.
Sodyum Klorür (NaCl)	(Merck- 1.06404.1000)	5 gr.
Distile su (pH 7.0-7.2)		1 lt.

Akriflavin Solüsyonu

Nötral akriflavin (Euflavine, Sigma A 8126)'in distile suda 1/1000'lik solüsyonu her test için günlük olarak hazırlandı.

Biyokimyasal Testler

Katalaz Testi

% 35'lik Hidrojen peroksit, katalaz testi için kullanıldı.

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)

%40'lık Üre (Oxoid-SR020K) solusyonu, etkenin üreaz aktivitesinin ölçülmesinde kullanıldı.

Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)

Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Identification Sticks Oxidase (Oxoid - BR64A) kullanıldı.

Cihazlar

Karbondioksitli Etüv: Shel-Lab Model 2300, USA.

Stereomikroskop: Olympus SZ61, Binoküler, USA.

Vorteks: IKA Vortex Tube Shaker, Model 312 12 24, GERMANY.

Ultraturraks: MICCRA D- 15, 1520 Watt, 8.800-33.600 rpm., GERMANY.

.

YÖNTEM

Direkt Mikroskopik Muayene

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi ve Tarım İl Kontrol Müdürlüğü'ne getirilen, ayrıca Bursa ili ile çevre il ve ilçelerdeki sığır ve koyun atık vakalarından elde edilen Brucellosis yönünden şüpheli 62 adet koyun ve 41 adet sığırlara ait toplam 103 adet aborte fetusun laboratuarda aseptik şartlarda otopsileri yapıldı. Fötal akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, dalak ve mide içeriğinden sürme preperat hazırlanarak Modifiye Ziehl-Neelsen tekniğiyle boyandı ve mavi zemin üzerinde kırmızı kokobasiller arandı (19, 21).

Brucella İzolasyon Yöntemi

Organ Homojenatlarının Hazırlanması

Kontaminasyonları engellemek amacıyla fötal karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbrek etanole batırılıp ateşten geçirildi. Dokular steril makas ve pens yardımıyla 50 ml'lik steril santrifüj şişelerine küçük parçalar halinde aktarıldı ve üzerine 10 katlı steril FTS ilave edilerek ultratüraks yardımıyla homojenize edildi ve suspansiyon şeklinde organ homojenatı hazırlandı (19).

İzolasyon

Organ homojenatlarının içine steril svap daldırılarak Brucella Selektif Agar ve Kanlı Agar yüzeyine ekimler yapıldı. Mide içeriğinden yapılan ekimler için abomasum duvarı kızgın spatülle dağıldı ve içerik steril enjektör yardımıyla çekilerek Brucella Selektif Agar ve Kanlı Agar yüzeyine birkaç damla bırakılmak suretiyle steril öze ile yayılması

sağlandı. Hazırlanan homojenat ve mide içerikleri CO₂ gereksiniminin belirlenmesi amacıyla iki ayrı petriye inoküle edildi. Her iki grup da 37°C'lik etüvde, 3-8 gün inkübe edildiler. İlk gruptaki petrilere aerobik ortamda inkübe edilirlerken, diğer grup petrilere %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Her iki grup da etüvde en az 4 gün bekletildi. Ayrıca tür ve biyotip tanısında kontrol amaçlı kullanılan standart suşların SDA petrilere ekimleri de steril svap yardımıyla yapıldı. Standart suşlar ekim sonrasında en az 4 gün CO₂'li ortamda inkübe edildiler. Tipik *Brucella* spp. morfolojisine sahip koloniler SDA'ya ekim yapılarak uygun koşullarda inkübe edildi. Söz konusu izolatların tür ve biyotip tayinleri standart yöntemlere göre yapıldı (19, 21).

İdentifikasyon Yöntemleri

Cins düzeyinde İdentifikasyon

Bireysel Morfoloji

İnkübasyon süresi sonunda yüzeyinde gelişen kolonilerden Gram boyama metoduyla bakterilerin bireysel morfolojileri incelendi. Gram negatif, kokobasil görünümünde olanlar *Brucella* spp. açısından değerlendirmeye alındı (19, 21)

Koloni Morfolojisi

Şüpheli koloniler, koloni morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla 45°'lik oblik ışıktaki stereomikroskopta incelendi (19).

Polivalan *Brucella* Antiserumu ile Aglütinasyon

Şüpheli kolonilere polivalan (A+M) anti-*Brucella* serumu ile lam aglütinasyon testi uygulandı. Polivalan antiserum ile aglütinasyon vermeyen Rough formundaki *Brucella canis*, kontrol olarak kullanıldı (19).

Akriflavin ile Aglütinasyon Özelliği

Fizyolojik tuzlu su ile suspanse edilen izolatlardan birer damla temiz bir lam üzerine aktarıldı. Üzerine bir damla akriflavin solüsyonu konularak tahta bir çubukla karıştırıldı. Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak Rough koloni yapısı gösteren *B.ovis* 63/290 ve smooth koloni yapısı gösteren *B.melitensis* 16 M kullanıldı (19).

Biyokimyasal Testler

Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine % 35'lik Hidrojen Peroksit'ten 25µl konularak, taze katı kültürden alınan *Brucella* spp. kolonileri ile tahta çubuk yardımıyla karıştırıldı. Testte kontrol olarak kullanılan katalaz negatif özellikte olan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suşu kullanıldı (19).

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)

Besiyeri hazırlanması amacıyla % 40'luk Üre (Oxoid-SR020K) solüsyonu kullanıldı. Steril tüplere paylaştırılan yarı-katı besiyeri içine şüpheli izolatların öze yardımıyla ekimleri yapıldı. Besiyerinin sarı olan renginin pembeye dönüşmesi pozitif olarak

değerlendirildi. Testte kontrol olarak üreaz aktivitesi açısından negatif özellik gösteren *B. ovis* suşu kullanıldı (23).

Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)

Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Identification Sticks Oxidase (Oxoid - BR64A) kullanıldı. Taze hazırlanmış *Brucella* spp. kültüründen bir öze dolusu alınarak, 22 °C 'deki oksidaz çubuğuna değdirildi. Reaksiyonun oluşması için 2 dakika beklendi ve oksidaz çubuğunun ucundaki eflatun bölgenin mor renge dönüşmesi, pozitif olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak oksidaz negatif özellikteki *B. ovis* suşu kullanıldı (19).

Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon

Brucella spp. izolatlarının tür ve biyotip düzeyinde identifikasyonları amacıyla aşağıda belirtilen testler kullanıldı (19, 21).

Karbondioksit (CO₂) Gereksinimi

B. abortus'un bazı biyotipleri ve *B. ovis* ilk izolasyonda % 5-10 CO₂'ye ihtiyaç duyarlar. Örneklerden ikişer adet *Brucella* Selektif Besiyeri ve Kanlı Agar yüzeyine homojenat ve mide içeriği ayrı ayrı olmak üzere ekim yapıldı. Petrilerin bir grubu %5-10 CO₂ içeren ortamda inkübe edilirken, diğer grubu ise aerobik şartlarda bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin %5-10 CO₂'li ve aerobik ortamda üreme durumu değerlendirildi.

Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

İzolatların H₂S üretim özellikleri kurşun asetat strip metodu ile incelendi. Daha önce SDA besiyerinde üretilmiş olan her bir *Brucella* spp. izolatından iğne uçlu öze yardımıyla tek bir koloni alınarak yatık SDA tüplerine ekimi yapıldı. Şerit şeklinde kesilen ve kurşun asetat emdirilen kağıtlar sterilize edilerek test için kullanıldı. Kağıtlar, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Tüpler %5-10 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca kurşun asetatlı kağıtlar her gün değiştirildi. Süre sonunda kağıtlarda siyahlaşma olması H₂S üretimi açısından pozitif kabul edildi. Testte kontrol suşu olarak H₂S pozitif olan *B.abortus* 544 suşu ve H₂S negatif olan *B. melitensis* 16M suşu kullanıldı.

Tbilisi Fajı ile Lizis

Tbilisi Fajının Rutin Test Dilüsyonunun (RTD) Saptanması

Tbilisi fajının rutin test dilüsyonunun saptanması amacıyla fajın konakçı suşu olan *B. abortus* 544'ün SDA besiyerine ekimi yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında oluşan koloniler, peptonlu tuzlu su ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve Mac Farland No: 4'e göre yaklaşık 10⁹ / ml olacak şekilde suspansiyon hazırlandı. Bakteri suspansiyonunun SDA besiyerine homojen bir şekilde ekimi yapıldı ve petrilerin yüzeylerinin kuruması beklendi. Fajın lizis oluşturduğu dilüsyonu tespit etmek amacıyla peptonlu tuzlu suda 1'er ml oranında aktarılmak suretiyle 10⁻¹'den 10⁻⁵ 'e kadar on katlı dilüsyonları yapıldı. Kuruyan SDA petrilerinin alt yüzeylerine bir cam kalemiyle fajların dilüsyonları yazıldı. Fajların her bir dilüsyonundan SDA petrilerindeki ilgili yüzeye steril ve ayrı pipet uçları kullanılarak 20'şer µl damlatıldı. Petri, yüzeyinin kurumasını takiben % 5-10 CO₂'li etüvde, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek faj dilüsyonu fajın RTD olarak saptandı (19)

Tbilisi Fajı ile Lizis

Her SDA besiyerine 4 izolat olacak şekilde birbirine paralel yatay şeritler halinde ekim yapıldı. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svap yardımıyla gerçekleşti. Ekim sonrasında hattın orta kısmına gelecek şekilde, daha önce RTD 'da hazırlanmış olan Tbilisi fajından 50 µl damlatıldı. Tüm izolatlar aynı işlem uygulandı. Faj solüsyonunun emilmesi beklenerek petriyerler 37 °C'de %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. Sonuçlar lizis durumuna göre belirlendi. Tbilisi fajı ile lize olan *B. abortus* 544 suşu kontrol olarak kullanıldı (19).

Boyalı Besiyerinde Üreme Durumu

Tiyonin Varlığında Üreme

İzolatlar tiyonin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel yatay şeritler halinde inoküle edildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla, her petriye dört adet izolat inoküle edilecek şekilde yapıldı. Petriyerler 37 °C'de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben tiyoninli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak tiyoninli besiyerinde üreme göstermeyen *B. abortus* 544 suşu kullanıldı (19).

Bazik Fuksin Varlığında Üreme

İzolatlar bazik fuksin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel yatay şeritler halinde inoküle edildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petriye dört adet izolat olacak şekilde yapıldı. Petriyerler 37 °C'de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben bazik fuksinli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak bazik fuksinli besiyerinde üremeyen *B. abortus* 86/8/59 suşu kullanıldı (19).

Safranin –O Varlığında Üreme

İzolatlar safranin-O (1/10.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel yatay şeritler halinde inoküle edildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petriye dört adet izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C’de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben safranin-O içeren besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak safranin –O içeren besiyerinde üremeyen *B. suis* 1330 suşu kullanıldı (19).

Antibiyotikli Besiyerinde Üreme Durumu

Penisilinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen sığır orijinli izolatların, aşı suşu olan *B. abortus* S19’dan ayrımı amacıyla, tüm izolatlar 5 IU/ml penisilin içeren SDA besiyerine inoküle edildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel yatay şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C’de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. Sığır orijinli izolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben penisilinli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak penisilinli besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 suşu kullanıldı (19).

Streptomisinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen koyun orijinli izolatların aşı suşu olan *B. melitensis* Rev 1’den ayrımı amacıyla streptomisin (2.5 µg/ml) içeren besiyerine ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel yatay şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C’de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben streptomisinli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak streptomycin içeren besiyerinde üremeyen *B. melitensis* 16M suşu ile üreme özelliği gösteren *B. melitensis* Rev 1 kullanıldı (19).

İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen sığır orijinli izolatların *B. abortus* S19 suşundan ayrımı amacıyla i-erithritol (1 µg/ml) içeren SDA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel yatay şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C'de, %5-10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 5-6 günlük inkübasyon süresini takiben i-eritritol içeren besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak i-erithritol içeren besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 suşu kullanıldı (19).

A ve M Monospesifik Anti-Serumlarla Aglütinasyon

Testi yapılacak her izolatın bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25 ml fizyolojik tuzlu su içinde suspanse edildi. Temiz bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlarından birer damla konuldu ve üzerlerine yine birer damla olacak şekilde incelenecek izolatın suspansiyonundan eklenerek ağaç bir kürdanla karıştırıldı. Reaksiyon sonucu birkaç dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre değerlendirildi. Testte kontrol olarak sadece A anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 63/9 ve sadece M anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 16M ile her ikisi ile de aglütine olan *B. melitensis* Ether ve hiçbirisi ile aglütine olmayan *B. ovis* 63/290 kullanıldı (19).

BULGULAR

Etkenin İzolasyon ve İdentifikasyonu

Hazırlanan organ homojenatından ve mide içeriğinden Kanlı Agar ve Brucella Selektif Agar'a yapılan ekimlerin ardından inkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin morfolojileri incelendi. Stereomikroskop altında yapılan incelemeler sonrasında smooth, şeffaf, şebnem tanesi görünümünde morfoloji gösteren kolonilerden yapılan Gram boyamada, Gram negatif kokobasiller görüldü. İncelenen toplam 103 adet atık örneğinin 31 (%30) tanesinde *Brucella* spp. yönünden şüpheli koloniler tespit edildi. Sığır orijinli toplam 41 atık fetus materyalinin 8 (%19. 5) adedinde ve koyun orijinli toplam 62 atık fetus materyalinin 23 (% 37) adedinde *Brucella* spp. yönünden şüpheli koloniler saptandı.

Polivalan *Brucella* Antiserumuyla Aglütinasyon

Polivalan (A+M) anti-*Brucella* serumu ile lam aglütinasyon testi sonucunda *Brucella* spp. yönünden şüpheli 31 adet izolata ait kolonilerin tümünün aglütinasyon gösterdikleri belirlendi.

Akriflavin ile Aglütinasyon

Nötral akriflavin ile muamele edilen toplam 31 adet izolata hepsi homojen bir suspansiyon oluşturarak hiçbiri aglütinasyon göstermedi. Çalışılan bütün izolatların smooth yapıda olduğu tespit edildi. Testte kontrol olarak kullanılan ve rough koloni yapısına sahip *B. ovis* 63/290, akriflavin ile aglütinasyon verirken, smooth koloni yapısına sahip *B. melitensis* 16 M aglütine olmadı.

Biyokimyasal Testler

Katalaz Testi

Brucella spp. yönünden şüpheli kolonilere uygulanan katalaz testi sonucunda, hepsinde köpüklenmenin şekillendiği ve katalaz pozitif özellikte oldukları tespit edildi. Kontrol olarak kullanılan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, katalaz testinde negatif özellik gösterdi.

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)

Bir günlük inkübasyon sonrasında bütün besiyerlerinin renginde pembe renge dönüşüm şekillendi. Testte kontrol olarak kullanılan *B. ovis* üreaz aktivitesi açısından negatif özellik gösterdi.

Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)

İncelenen 31 adet izolat, oksidaz çubuğunun ucundaki eflatun bölgeyi, mor renge dönüştürdü. Testte kontrol olarak kullanılan *B. ovis* oksidaz yönünden negatif özellik gösterdi.

Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları

Karbondioksit (CO₂) Gereksinimi

İlk izolasyonda örneklerin ekim yapıldığı petrilerin bir grubu 37 °C % 5-10 CO₂ içeren ortamda inkübe edilirken, diğer grubu ise aerobik şartlarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda sığır orjinli 15, 35, 52, 53, 60, 80 ve 89 no'lu izolatlar olmak

üzere toplam 7 adet izolatin ilk izolasyonunda %5-10 CO₂'li ortama gereksinim duydukları tespit edildi. Diğer tüm izolatların hem aerobik hem de %5-10 CO₂'li ortamda üreme gösterdikleri saptandı. Testte kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu sadece %5-10 CO₂'li ortamda üredi (Tablo 7)

Hidrojen Sülfür (H₂S) üretimi

Dört günlük inkübasyon süresi sonunda sığır orjinli 15, 35, 52, 53, 60, 80, 89 ve koyun orjinli 27 no'lu izolatlara ait kurşun asetatlı kağıtlarda siyahlaşma görüldü ve H₂S üretimi için pozitif kabul edildi. Testte kontrol suşu olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu H₂S pozitif iken, *B. melitensis* 16 M H₂S negatif olarak saptandı (Tablo 7, Şekil 1).

Tbilisi Fajı ile Lizis:

Tbilisi fajının konakçısı olan *B.abortus* 544'in SDA besiyerine ekimi yapıldı ve inkübasyon süresi sonunda damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek faj dilüsyonu 10⁻² olarak tespit edildi. Dört günlük inkübasyon süresi sonunda sığır orjinli 15, 35, 52, 53, 60, 80 ve 89 no'lu izolatlar ile kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu'nun Tbilisi fajı (10⁻² RTD) ile lize olduğu saptandı. Diğer izolatlar Tbilisi fajının RTD'da lizis göstermedi (Tablo 7, Şekil 2).

Boyalı Besiyerlerinde Üreme

Tiyonin varlığında üreme

Tiyonin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan toplam 31 adet izolatin tümü dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu üreme göstermedi (Tablo 7, Şekil 3).

Bazik Fuksin varlığında üreme

Bazik fuksin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan toplam 31 adet izolatin tümü dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 86/8/59 üreme göstermedi (Tablo 7, Şekil 4)

Safranin –O varlığında üreme

Safranin-O (1/10.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan toplam 31 adet izolatin tümü, dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. suis* 1330 suşu üreme göstermedi (Tablo 7, Şekil 5).

Antibiyotikli Besiyerinde Üreme

Penisilinli Besiyerinde Üreme

Penisilin (5 IU/ ml) içeren SDA besiyerine ekimleri yapılan sığır orijinli toplam 7 adet izolat inkübasyon süresi sonunda üreme gösterdiği tespit edildi. Testte kontrol amacıyla kullanılan mutant aşı suşu *B. abortus* S19 besiyerinde üremedi (Tablo 7, Şekil 6).

Streptomisinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen koyun orijinli toplam 23 adet izolatin hiçbiri streptomisinli besiyerinde üreme göstermezken, kontrol olarak kullanılan *B.melitensis* Rev 1 suşu'nun ürediği görüldü (Tablo 7, Şekil 7).

İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme

İnkübasyon süresi sonunda i-eritritol içeren besiyerinde tüm izolatlar üreme göstermesine karşın, kontrol amacıyla kullanılan *B. abortus* S19 i-eritritol içeren besiyerinde üremedi (Tablo 7, Şekil 8).

A ve M Mono spesifik Anti serumlarla Aglütinasyon

Çalışmada incelenen koyun orijinli 3, 11, 12, 23, 27, 28, 30, 38, 42, 43, 46, 50, 54, 95, 102, 103 ve 104 no'lu izolatlar ile sığır orijinli 59 no'lu izolat *Brucella* A ve M monospesifik antiserumları ile aglütinasyon gösterdi ve *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır. 59 numaralı izolat sığır orijinli olmasına rağmen tanımlamada *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır. Sadece *Brucella* A antiserumu ile aglütinasyon gösteren sığır orijinli 15, 35, 52, 53, 60, 80, 89 no'lu izolatlar, *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır. Sadece M antiserumu ile aglütinasyon gösteren 22, 41, 61, 62, 63 no'lu izolatlar ise *B. melitensis* biyotip 1 olarak değerlendirildi. Geriye kalan 58 no'lu koyun orijinli bir izolat ise *Brucella* A antiserumu ile aglütine olurken, M antiserumu ile reaksiyon vermedi ve *B. melitensis* biyotip 2 olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* 63/9 sadece A-antiserumu, *B. melitensis* biyotip 16M sadece M antiserumu ve *B. melitensis* Ether ise A ve M antiserumlarının her ikisi ile de aglütinasyon gösterdi. Sığır izolatlarının kontrolü amacıyla kullanılan *B. abortus* 544, *B. abortus* 86 / 8 / 59 ve *B. abortus* Tulya suşları ise A antiserumuyla aglütine olurken, M antiserumu ile reaksiyon vermediler. Rough koloni yapısına sahip *B. ovis* 63/290 ise hiçbir anti-serumla aglütine olmadı.

İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları Sonuçları

Sığır ve koyun atıklarından elde edilen toplam 31 adet *Brucella* spp. izolatının biyotip dağılımları Tablo 7’de gösterilmektedir. Buna göre 23 adet koyun izolatının 5 adedi *B. melitensis* biyotip 1, 1 adedi *B. melitensis* biyotip 2 ve 16 adedi *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır. 1 adet izolatın ise (No: 27) H₂S yönünden pozitifite göstermesi nedeniyle Atipik özellikte *B. melitensis* biyotip 3 olduğu belirlendi. Sığırlardan elde edilen 8 adet *Brucella* spp. izolatının 7 adedi *B. abortus* biyotip 3 ve 1 adedi de *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır. Koyun ve sığır izolatlarının hiçbirinden *B. melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* S19 aşısı suşları tanımlanmadı.

İzolatların Bursa ve çevresindeki dağılımları Tablo 8 ve Şekil 9’da açıklanmaktadır. Buna göre koyunlardan elde edilen on bir adet izolat Bursa merkezinden olmak üzere, iki adet Yenişehir, üç adet Mustafakemalpaşa ile birer adet Büyükorhan, İznik, İnegöl ve Mudanya ilçelerinden elde edilen örneklerden izole edildiler. Diğer koyun izolatları ise birer adet olacak şekilde, çevre illerden biri olan Balıkesir’in ilçeleri Gönen, Manyas ve Edremit’ten elde edildiler. Sığır izolatlarının dört adedi Bursa merkezden olmak üzere, iki adedi Mustafakemalpaşa’dan alınan örneklerden izole edildi. Balıkesir’in Gönen ve Edremit ilçelerinde ise birer adet *Brucella* spp. izolatı saptandı.

Koyunlardan elde edilen izolatlardan, Bursa merkez ilçeden *B. melitensis*’in her üç biyotipi de izole edildi. İnegöl, Mudanya, Manyas, Mustafakemalpaşa, Gönen ve Yenişehir’den *B. melitensis* biyotip 3 tanımlanırken, Büyükorhan ve Susurluk’tan elde edilen izolatlarda *B. melitensis* biyotip 1 tespit edildi. Yenişehir’den alınan koyun izolatlarının bir adedinden de atipik *B. melitensis* biyotip 3 tanımlanmıştır.

Bursa merkez, Mustafakemalpaşa, Edremit’te sığırlardan alınan atık örneklerinden *B. abortus* biyotip 3 ve Gönen bölgesinden elde edilen izolattan ise *B. melitensis* biyotip 3 tanımlanmıştır.

Tablo 7: İzolatların antibiyotik, boya ve i- eritritol katkılı besiyerlerinde üreme durumu, biyokimyasal aktiviteleri, fajlarla lizis ve antiserumlarla aglütinasyon özellikleri

Sayı	İzolat No	Hayvan Türü	Koloni Tipi	Oksidaz	Katalaz	Üre	Akriflavin	H ₂ S	Bazik Fuksin	Tiyonin	Safranin O	Streptomisin	Penisilin	i- eritritol	Tbilisi fajı ile lizis	Anti -A	Anti-M	Anti- A+M	Sonuç
1	3	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
2	11	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
3	12	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biy.otip 3
4	15	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biy.otip 3
5	22	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
6	23	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
7	27	K	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>Atipik B. melitensis</i>
8	28	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
9	30	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
10	35	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B. abortus</i> biyotip 3
11	38	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
12	41	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
13	42	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
14	43	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
15	46	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
16	50	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
17	52	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biyotip 3
18	53	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biyotip 3
19	54	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
20	58	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 2
21	59	S	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
22	60	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biyotip 3
23	61	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
24	62	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
25	63	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
26	80	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biyotip 3
27	89	S	Smooth	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>B.abortus</i> biyotip 3
28	95	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
29	102	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
30	103	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
31	104	K	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

* K: Koyun S: Sığır

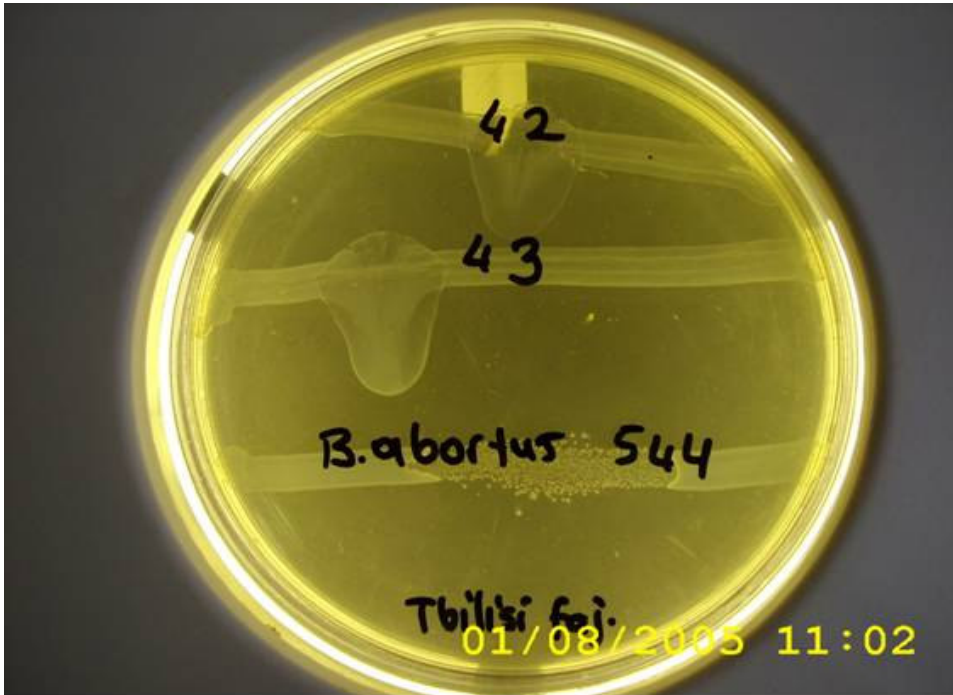
Tablo 8. *Brucella* spp. izole edilen atık vakalarının Bursa ili ve çevre illerdeki dağılımı

Örnek No	Örneklerin Gönderildiği İl-İlçe	Hayvanın Türü	Sonuç
1	Yenişehir-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
2	Mustafakemalpaşa-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
3	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
4	Merkez-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
5	Büyük Orhan-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 1
6	Gönen-Balıkesir	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
7	Yenişehir-Bursa	Koyun	Atipik <i>B.melitensis</i>
8	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
9	İznik-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
10	Merkez-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
11	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
12	Osmangazi-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 1
13	İnegöl-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
14	Manyas-Balıkesir	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
15	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
16	Mustafakemalpaşa-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
17	Merkez-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
18	Mustafakemalpaşa-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
19	Mustafakemalpaşa-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
20	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 2
21	Gönen-Balıkesir	Sığır	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
22	Merkez-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
23	Susurluk-Balıkesir	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 1
24	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 1
25	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 1
26	Mustafakemalpaşa-Bursa	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
27	Edremit - Balıkesir	Sığır	<i>B.abortus</i> biyotip 3
28	Mudanya-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
29	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
30	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3
31	Merkez-Bursa	Koyun	<i>B.melitensis</i> biyotip 3



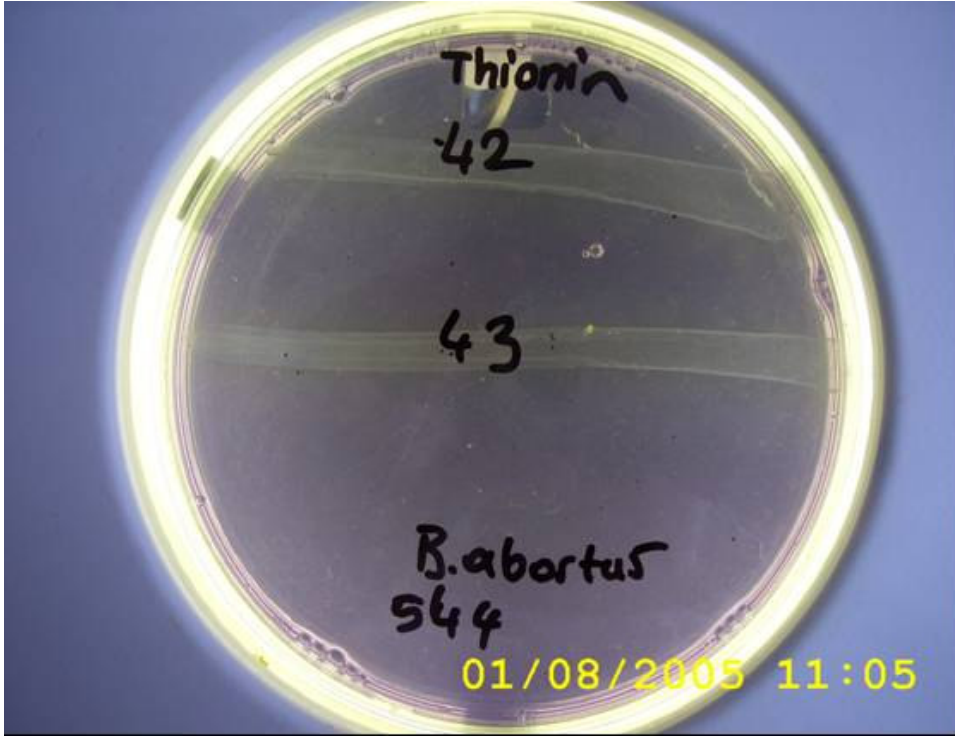
Şekil- 1: İzolatların H₂S üretimi

* 22, 23, 28 no'lu izolatlar H₂S negatif, 27'no'lu izolat H₂S pozitifdir.



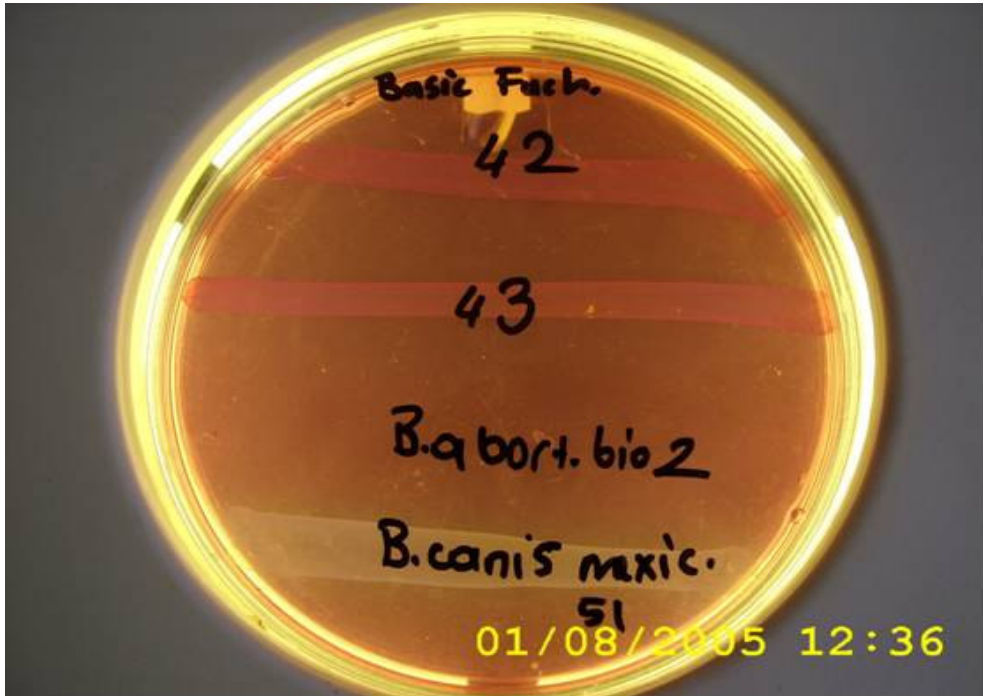
Şekil- 2: İzolatların Tbilisi fajı ile lizis özellikleri

* *B.abortus* 544 Tbilisi fajı ile lize olurken, 42 ve 43 no'lu izolatlar lizis göstermedi.



Şekil- 3: İzolatların tiyonin'li besiyerinde üreme özellikleri

* 42 ve 43 no'lu izolatlar tiyoninli besiyerinde ürerlerken, kontrol olarak kullanılan *B.abortus* 544 şusu üremedi



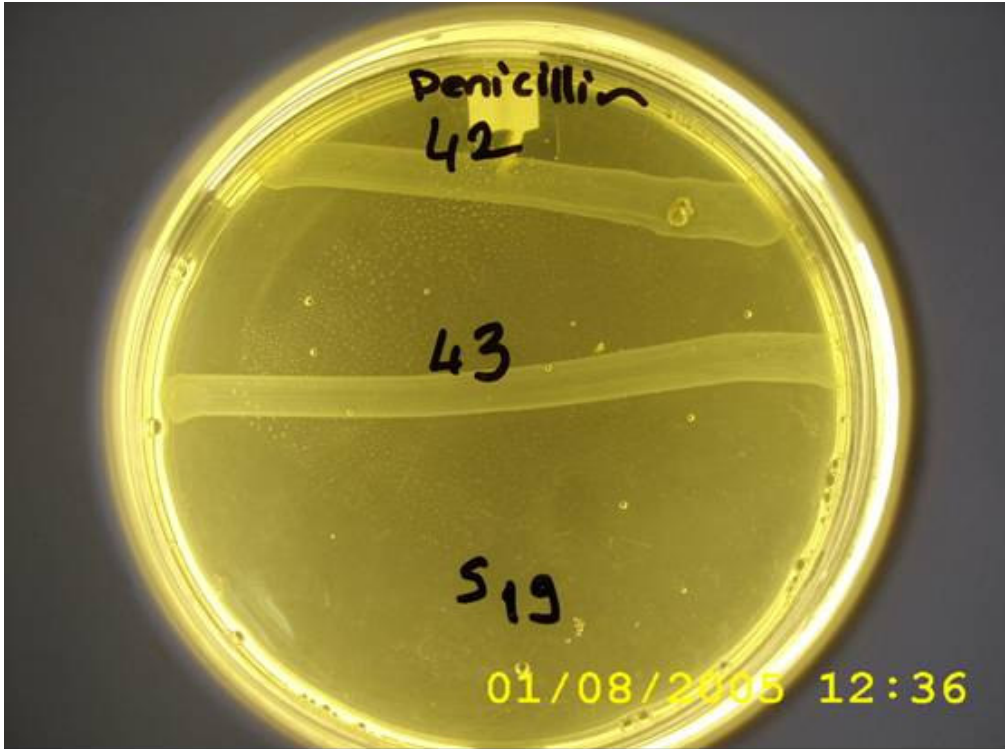
Şekil- 4: Bazik fuksin varlığında üreme

* Bütün izolatlar ve kontrol olarak kullanılan *B.canis* bazik fuksin varlığında üreme gösterirlerken, *B.abortus* 86/8/59 üremedi.



Şekil - 5: Safranin-O Varlığında üreme

* Bütün izolatlar safranin varlığında üreme gösterirlerken kontrol olarak kullanılan *B.suis* 1330 üremedi.



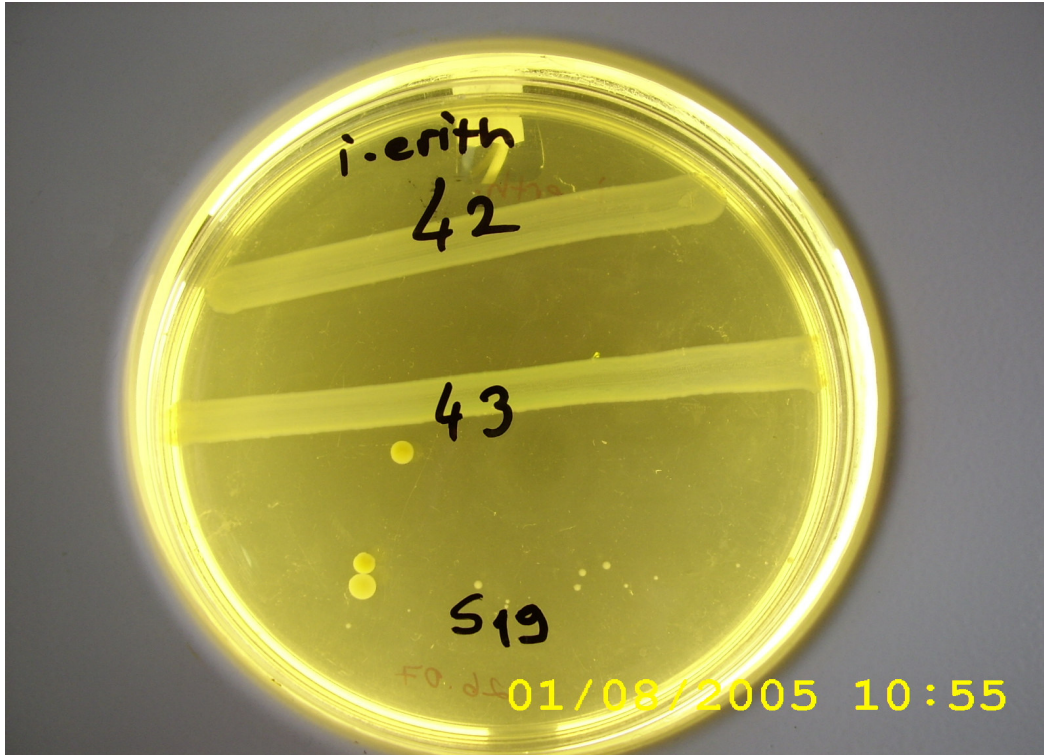
Şekil- 6: Penisilin varlığında üreme

* Tüm izolatlar penisilin varlığında üreme gösterirlerken, aşı suşu olan *B.abortus* S19 üremedi



Şekil - 7: Streptomisin varlığında üreme

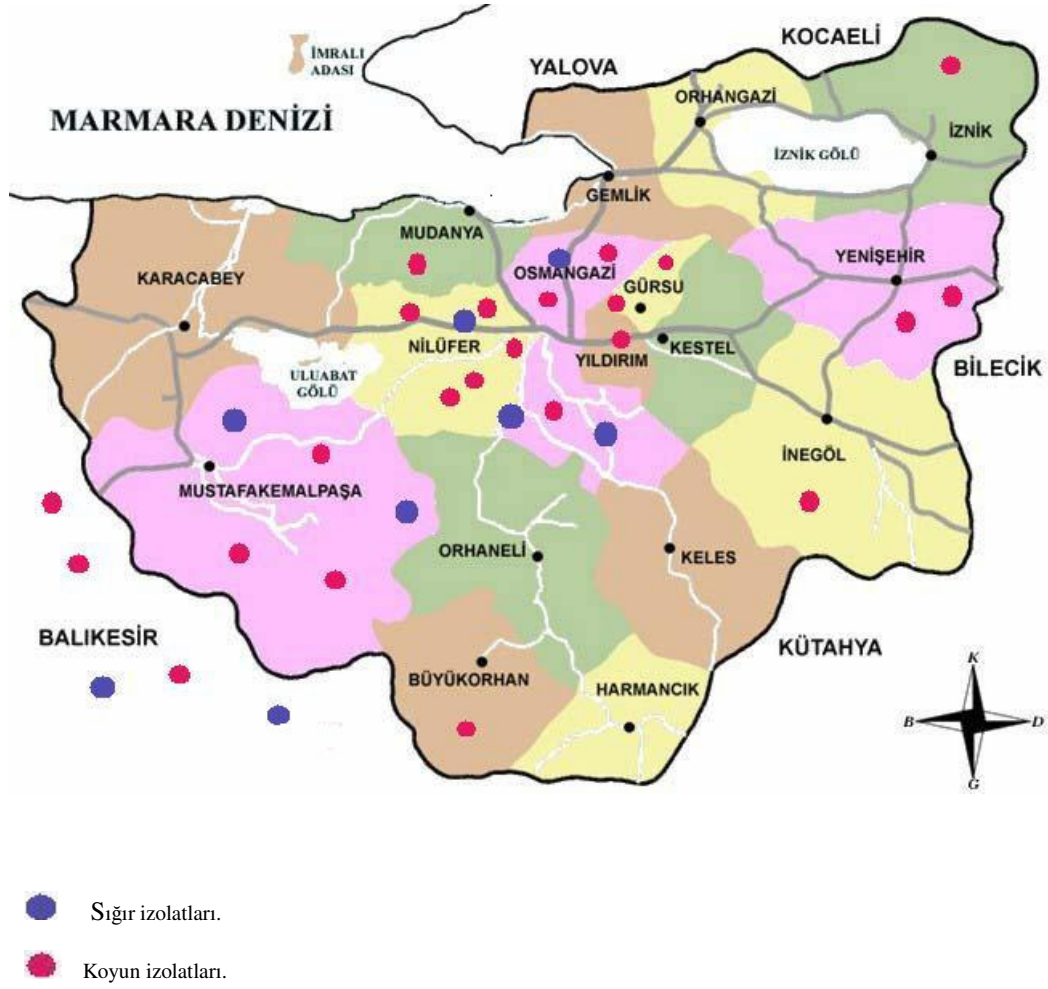
* Hiçbir koyun izolatu streptomisin varlığında üremezken, aşı suşu olan *B.melitensis* Rev 1 üredi



Şekil - 8: İ-eritritol varlığında üreme

* Tüm izolatlar i-eritritol varlığında ürerlerken, *B.abortus* S19 üremedi.

Şekil - 9: Çalışmada elde edilen sığır ve koyun *Brucella* izolasyonlarının yerleri



TARTIŞMA ve SONUÇ

Brucellosis; zoonoz bir hastalık olması, etkilediği konakçı çeşitliliği, sayısı ve Türkiye ile dünya hayvancılığına verdiği büyük ekonomik kayıp nedenleri ile kontrol altında tutulması gereken bir hastalıktır. Epidemiyolojik verilerle bölgesel olarak hastalığın izlenmesi ve hastalık odaklarının tespiti, brucellosis ile mücadelede önemlidir (7). Bu nedenle çalışmamızda Bursa ve çevresindeki koyun ve sığırlarda görülen abortus olgularında, *Brucella* spp.'nin payının ve biyotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sığırlarda brucellosis' in, dünyanın birçok ülkesinde yaygın olduğu rapor edilmiştir (9, 10, 98). Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ülkeleri, Avustralya ve Yeni Zelanda'da yıllar süren yoğun çabalarla brucellosis büyük ölçüde eradike edilmiştir. Buna karşın Güney Avrupa ülkelerinde özellikle Akdeniz bölgesi, Orta Doğu ve Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Hint Yarımadası, Orta ve Güney Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir (3). *B. abortus* infeksiyonu, tüm dünyada yaygın olmasına karşın, biyotip dağılımı ülkeden ülkeye farklılık gösterebilmektedir. Buna göre, Avrupa'da tüm eradikasyon önlemlerine karşın *B. abortus* biyotip 1- 5 ve 9 yaygındır (81). İran'da sığırlardan alınan süt örneklerinden elde edilen 397 adet *Brucella* izolatının, 356 adedi *B. abortus* biyovar 3, 40 adedi *B. abortus* biyovar 9 ve 1 adedi biyovar 2 olarak tespit edilmiştir. Mısır'da 1999 yılında yapılan bir çalışmada sığır ve mandalarda *B. abortus* biyovar 1 tespit edilmiştir. Türkiye'de ise sığırlarda *B. abortus* biyovar 3 en prevalant biyovardır. Bunu sırasıyla 1, 2, 4 ve 6 izlemektedir (98). Ülkemizde brucellosisin serolojik survey çalışmaları geniş ölçüde yapılmasına karşın etkenin varlığına ve tiplendirilmesine yönelik çalışmalar oldukça yetersizdir (141- 143).

Çalışmamızda kullanılan ve sığırlara ait olan 41 adet aborte fetus materyalinin 8 (% 19. 5) adedinden *Brucella* spp. izole edilmiştir. İzole edilen 8 adet *Brucella* spp. izolatının 7 adedi (%87. 5) *B. abortus*, 1 adedi (%12. 5) *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Yapılan biyotiplendirme testleri sonucunda *B. abortus* suşlarının tümü biyotip 3 olarak saptanmıştır. Marmara Bölgesindeki *B. abortus* biyotip dağılımı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Türkiye genelindeki verilerden elde edilen sonuçlara göre *B. abortus* biyotip 3 predominant olarak nitelendirilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucunda sığırlarda brucellosis olgularında Bursa ve çevresindeki baskın biyotipin *B. abortus* biyotip 3 olduğu

ve bunun da Türkiye genelindeki biyotip dağılımı ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir (98).

B. melitensis, koyun ve keçi brucellosisinin en sık rastlanan nedenidir. Bu hayvanlarda *B. abortus* kaynaklı sporadik infeksiyonlara da rastlanmasına karşın klinik hastalık nadir gözlemlenmektedir (8, 80). *B. melitensis* Akdeniz Bölgesinde endemiktir ve dünyanın tüm bölgelerinde yaygın olarak görülür. Hastalık, Batı Asya, Afrika'nın bir bölümü ve Latin Amerika ülkeleri'nde en önemli sorunlardan biri olma özelliğini sürdürmektedir. Meksika dışında Kuzey Amerika ve Güney Doğu Asya, Kuzey Avrupa, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın *B. melitensis*'ten arı olduğu kabul edilmektedir (8).

Orta Doğu, Akdeniz ülkeleri ile Arap Yarımadası'ndaki ülkeler (3, 7, 144) ile Mısır, Sudan, Türkiye ve Morokko'da *B. melitensis* biyovar 3'ün predominant olduğu bildirilmektedir. Filistin, Ürdün, Libya ve Suriye'de ise biyotip 1'in baskın olduğu ancak biyotip 2'nin de görüldüğü saptanmıştır. Latin Amerika'da ise biyovar 1'e daha sık rastlanılmaktadır. Biyotip 1 ve 2, bazı Güney Avrupa ülkelerinden bildirilmiştir (7). Avrupa'da İspanya, Malta ve Portekiz'de *B. melitensis* biyotip 1 yaygın iken İtalya ve Yunanistan'da ise biyotip 2 predominant suştur. Bununla beraber Yunanistan'da ve Fransa'da biyotip 3'e de rastlanılmaktadır. Orta Asya'da *B. melitensis* biyotip 1 ve 2 görülmekte iken Arap yarımadasında ise her üç biyotip de bulunmaktadır (144). Türkiye'de ise yapılan çalışmalarda koyunlarda *B. melitensis* biyotip 3'ün predominant olduğu ve bunu *B. melitensis* biyotip 1'in izlediği bildirilmektedir (17, 18, 100, 102, 103, 143, 145, 146).

Çalışmamızda 62 adet aborte koyun fetusu incelenmiş, bunlardan 23 adedinden (% 37) *Brucella* spp. izole edilmiştir. Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda 16 adet (% 69.56) izolatın *B. melitensis* biyotip 3, 5 adet (% 21.73) izolatın *B. melitensis* biyotip 1 ve bir adet (% 4.34) izolatın ise *B. melitensis* biyotip 2 olduğu bulunmuştur. Ülkemizde koyun ve keçi izolatlarının tiplendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar sınırlı olup, *B. melitensis* biyotip 2 predominant tür olarak bildirilmektedir. Koyunlarda rastlanan diğer türün ise *B. melitensis* biyotip 1 olduğu belirtilmiştir (98). Buna karşın Erdenliç ve Şen (99) koyunlarda yaptıkları bir çalışmada Türkiye'de çeşitli bölgelerden elde edilmiş 78 adet *Brucella melitensis* izolatını biyotip düzeyinde identifiye etmiş ve bunların 69 adedinin (%88.5) *B. melitensis* biyotip 3 ve 9'unun (%11.5) *B. melitensis* biyotip 1 olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar koyun izolatlarından *B. melitensis* biyotip 2 identifiye etmemişlerdir. Yaptığımız çalışmada 58 no'lu koyun izolatından *B. melitensis*

biyotip 2 identifiye edilmiştir. Çalışmamız bu yönüyle Marmara Bölgesinde *B. melitensis* biyotip 2'nin varlığını bildirmektedir.

Brucella spp. standard biyotiplendirme şemalarına göre biyotiplendirilmelerine karşın (19, 21- 23), bu şemalara uyum göstermeyen atipik suşların varlığı bildirilmektedir (147- 151). H₂S ve CO₂ üretiminden sorumlu olan genlerin mutasyonları sonucunda atipik olarak değerlendirilen *Brucella* izolatlarına rastlanılmaktadır (19, 152, 153). Bu çalışmada atık koyun fetusundan izole edilen bir adet izolatın (27 no'lu izolat), *B. melitensis* genusuna ait özellikleri taşıdığı, ancak H₂S üretimi yönünden pozitif olduğu tespit edilmiştir. Konfirmasyon amacıyla aynı test dört kez tekrar edilmiş, buna karşın izolatın özelliğinde değişiklik kaydedilmemiştir. *B. melitensis* biyotip 3'e ait bulunan izolat "Atipik *B.melitensis*" olarak tanımlanmıştır. Corbel (151), 1980- 1986 yılları arasında farklı ülkelere ait 500 adet *B.melitensis* izolatını biyotiplendirmiş; bu izolatların 29 adedinin bazik fuksinde üremesine karşın tiyoninde üremediği ve bu nedenle standard biyotiplendirme şemasına uygunluk göstermediğini bildirmiş ve biyotiplerin belirlenmesine yönelik kriterlerin tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Banai ve arkadaşları (147), ise iki yıllık süreçte elde ettikleri *B. melitensis* izolatlarını konvansiyonel biyotiplendirme testleri ile karakterize etmişler ve penisilin ile bazik fuksin ve tiyonine duyarlı atipik suşların varlığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar atipik suşların yeni bir taksonomik grup oluşturmadıklarını ancak *Brucella* spp. dış membran proteinlerindeki (OMP₂) yapısal değişiklikler sonucu yeni varyantların oluşabileceğini ve bu varyantların atipik suşların varlığından sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir. *B. melitensis* atipik suşlarının varlığı, genellikle boyalar ve antibiyotiklere olan duyarlılıklarındaki farklı özelliklerden kaynaklanırken, (147, 149, 151) bu çalışmada izole edilen *B. melitensis* atipik suşunun H₂S üretimi yönünden farklılık göstermesi ilginçtir.

Sığırlarda brucellosis, daha çok *B. abortus*, az sıklıkla *B. melitensis* ve nadiren *B. suis*'den kaynaklanan bir enfeksiyondur (6, 19, 23, 75). Sığır ve koyun yetiştiriciliğinin birarada yapılması, *B. abortus* ve *B. melitensis*'in kendi konakçısı dışındaki konakçılarda da yayılmasına neden olabilmektedir (75). Güney Avrupa ülkeleri, İsrail, Kuveyt ve Suudi Arabistan'da sığırlarda *B. melitensis*'ten kaynaklanan enfeksiyonlar bildirilmektedir (6). Çalışmamızda da, Balıkesir ili, Gönen ilçesinden elde edilen bir adet sığır izolatı (59 no'lu) *B. melitensis* biyotip 3 olarak identifiye edilmiştir. Refai (98), Suudi Arabistan'da son 10 yılda koyun, keçi, deve ve sığırlardan izole edilen tüm brucella izolatlarının, *B. melitensis* biyotip 2 olarak identifiye edildiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, *B. melitensis*'in Güney Avrupa'da sığırlardan düzenli olarak izole edildiğini ve Avrupa Birliğine üye

devletler tarafından *B. abortus*'un yerini aldığını belirtmektedirler (9). Benzer bir tablo olarak Güney Amerika ülkelerinden Brezilya, Kolombiya'da, sığırlarda *B. suis* biyotip 1' den kaynaklanan infeksiyonların yaşandığı bildirilmektedir. İnfeksiyonun insanlara bulaşmasında sığırların payının domuzlardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (6). Godfroid ve arkadaşları (9), *B. melitensis*'in sığırlarda; koyun ve keçi rezervuarlarından bulaşma olmaksızın sığırdan sığıra bulaşabileceği ve bunun sonucunda kalıcı bir infeksiyon yaratabileceği konusunun önemi üzerine durmaktadırlar. Bununla birlikte sığırlarda *B. melitensis* ile infeksiyon sonrasında immün yanıtın nasıl geliştiği tam olarak bilinmemektedir. *B. melitensis* ile infekte bir sığırdan *B. abortus* S19 veya RB51 aşılarının ne denli koruduğu ve sığırlarda *B. melitensis* Rev 1 aşısının güvenliği konuları göz önünde bulundurulmalıdır. Araştırmacılar, şimdilik sığırlarda *B. melitensis* infeksiyonu ile ilgili yeterli bilgiye sahip olunmadığı, yalnızca serolojik test performansları ile ilgili yorum yapılabileceğini, sığırlarda *B. melitensis*'in insidensi ve prevalansı hakkında doğrulayıcı çalışmaların en kısa zamanda yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Gebe hayvanların subkutan yolla aşılama sonucu *B. melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* S 19 aşıları hayvanlarda atıklara neden olabilmektedir (137, 154- 157). Subkutan aşılama oranla konjunktival yolla aşılama hayvanlarda daha az sayıda abortuslara neden olmaktadır, buna rağmen atık yapan hayvanlarda abortus sonrasında aşı suşunun saçılımı olabilmektedir. Aşılamanın yapıldığı gebelik dönemi de, abortus şekillenmesi açısından önemlidir. Gebeliğinin son ayında aşılama hayvanlara göre ilk 2 ayı içinde aşılama, abortus yönünden daha büyük risk taşımaktadırlar (156, 157). Çalışmamız sonucunda izolatların hiç birinde aşı suşu olan *B. melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* S 19'a rastlanılmadı. Çalışmada incelenen sığır ve koyunların aşıları olup olmadıkları konusunda net bir bilgi olmamasıyla beraber Bursa ve çevresinde koyun ve sığır atıklarında *Brucella* spp. aşısının rolü olmadığı tespit edildi.

Bu çalışmada Bursa ve çevresinden elde edilen koyun ve sığır atıklarında *Brucella* spp.'nin varlığı araştırıldı. *Brucella* spp.'nin sığırlardaki ve koyunlardaki abortus olgularındaki payının sırasıyla %19.5 ve %37 olduğu belirlenerek, koyun atıklarındaki *Brucella* spp.'nin payının sığır atıklarındakine oranla yaklaşık iki katı olduğu dikkati çekmektedir. Oranlar değerlendirilirken Bursa ve çevresindeki büyükbaş hayvan işletmelerinin son yıllardaki modernizasyon çalışmaları ve barındırılan hayvanların *B. abortus* S19 aşısı ile aşılama sonucunda atık olgularındaki *Brucella* spp.'nin payının değişmesi beklenebileceği gibi, sığır brucellosisinin belirlendiği mihraklarda devlet tarafından ihbarı zorunlu olması ve hasta hayvanların tazminatlı olarak kesime sevk edilme

zorunluluğu nedeniyle atık olgularının ihbar edilmemiş olma olasılığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Koyunlarda brucellosis'in toplam atık olgularındaki % 37'lik payı yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. Oldukça önemli zoonoz bir hastalık olan brucellosisin, atık vakaları arasındaki prevalansının yüksekliği nedeniyle koyun abortuslarında ve dolayısıyla popülasyon dinamiğindeki payı dikkate alınmalıdır.

Brucella spp. biyotiplendirme çalışmaları sonucunda, ülkemiz genelinde olduğu gibi Bursa ili ve çevresinde de koyunlarda *B. melitensis* biyotip 3'ün predominant olduğu saptanmıştır. Coğrafik konum dikkate alındığında, çalışmamız Güneydoğu Avrupa'ya yakın bir bölgede yapılmış olmasına karşın bu ülkelerde predominant olan *B. melitensis* biyotip 1 ve 2'nin yerine Ortadoğu ve Güney Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi *B. melitensis* biyotip 3 predominant olarak saptanmıştır. Bu durum, ülkemize Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden yapılan kontrolsüz hayvan nakillerinin biyotip dağılımında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Brucellosis'in ülke çapında izlenmesi, eradikasyon programlarının oluşturulması amacıyla *Brucella* spp.'nin prevalansının belirlenmesi önemlidir. Diğer yandan *Brucella* spp.'nin bazı biyotiplerinin zamanla kaybolduğu, yeni varyant ve atipik suşların ortaya çıktığı bilinmektedir. Gerçek hastalık odaklarının belirlenmesi ve yeni varyant suşların izlenmesi açasından biyotiplerin saptanması oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu yönüyle çalışmamamız eradikasyon programlarının düzenlenmesine ve ülke çapında oluşturulması planlanan *Brucella* spp. biyotip haritasına veri kaynağı niteliğindedir. Ancak bu verilerin ülkemiz izolalarının moleküler karakterizasyonuna yönelik yapılacak çalışmalar ile de desteklenmesi büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. ANONİM. WHO, Third Workshop on Human and Animal Brucellosis Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries. WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre, Athens, Greece, 1998.
2. SIMOS E, PAPADOPULOS G. Akdeniz ve Arap Yarımadası Ülkelerinde Brusellozisin Hali hazır Durumu. Uluslararası Brusellozis Sempozyumu, İstanbul, sayfa: 65- 68, 1989.
3. ANONİM. FAO / OIE / WHO Animal Health Yearbook 1995- 1997, FAO Animal Production and Health Series, FAO, Rome, Italy, 1997.
4. KÖSE Ş, KILIÇ S, ÖZBEL Y. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in İzmir, Turkey. Journal of Basic Microbiology, 45: 323- 327, 2005.
5. GEDİKOĞLU S, HELVACI S, ÖZAKIN C, GÖKIRMAK F, KILIÇTURGAY K. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 730 and BACTEC 9120 systems. European Journal of Epidemiology, 12: 649- 650, 1996.
6. CORBEL MJ. Brucellosis an Overview. 1.st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, page 213- 221, 1997.
7. BENKİRANE, A. Ovine and Caprine Brucellosis: World Distribution and Control / Eradication Strategies in West Asia / North Africa Region. Small Ruminant Research, 62: 19- 25, 2006.
8. ANONİM. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, OIE Technical Report Series, 5th edition. Paris 2004, Chapter 2.4.2. Caprine and Ovine Brucellosis http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00069.htm
9. GODFROID, J, KASBOHRER, A 2002: Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Veterinary Microbiology, 90: 135- 145.
10. TALESKI, V, ZERVA, L, KANTARDJIEV, T, CVETNIC, Z, ERSKI-BILJIC, M, NIKOLOVSKI, B, BOSNJAKOVSKI, J, KATALINIC-JANKOVIC, V, PANTELIADOU, A, STOJKOSKI, S, KIRANDZISKI, T: An overview of the epidemiology and epizootiology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. Veterinary Microbiology, 90: 147- 155, 2002.
11. GÜRTÜRK K, ALAN M, BOYNUKARA B, SOLMAZ H. Van ve yöresinde koyun ve sığır brusellozisinin insidensi üzerinde sero-epidemiolojik araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 5: 121- 125, 1994.
12. KENAR B. Konya, Niğde, Nevşehir ve Kayseri illerinde koyun ve sığır brusellozisinin sero-survey epidemiyolojik araştırması, Veterinarium, 1: 34- 37, 1990.
13. İNCİ A, AYDIN N, BABÜR C, CAM Y, AKDOĞAN C, KUZAN S. Kayseri yöresinde sığır ve koyunlarda Toksoplazmozis ve Brusellozis üzerine sero-epidemiolojik araştırmalar, Ulusal Sığır ve Koyun Yavru Atma Sempozyumu, Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, İstanbul, 1998.
14. FİDANCI H A, AKIN S, ALABAY M, GÜVENER N C. Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorları saptamada ELISA ve diğer serolojik testlerin karşılaştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42, 553- 557, 1995.

15. İYİSAN AS, AKMAZ Ö, DÜZGÜN SG, ERSOY Y, ESKİİZMİRLİLER S, GÜLER L, GÜNDÜZ K, IŞIK N, İÇYERİOĞLU AK, KALENDER H, KARAMAN Z, KÜÇÜKAYAN U, ÖZCAN C, SEYİTOĞLU Ş, TUNA İ, TUNCA T, ÜSTÜNAKIN K, YURTALAN S. Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda Brucellosis’in Seroepidemiolojisi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 31: 21- 75, 2000.
16. ÜNVER A, ERDOĞAN HM, ATABAY Hİ, ŞAHİN M, GÜNEŞ V, ÇİTİL M, GÖKÇE Hİ. Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. Kafkas Üniversitesi Vetereiner Fakültesi Dergisi, 2: 121- 127, 2006.
17. ÜNVER A, ERDOĞAN HM, ATABAY HI, ŞAHİN M, ÇELEBİ O. Isolation, identification and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars, Turkey. Revue de Medecine Veterinaire, 157: 42- 46, 2006.
18. İLHAN Z, SOLMAZ H, AKSAKAL A, GÜLHAN T, EKİN İH, BOYNUKARA B. Atık yapmış koyunların süt ve atık fetus mide içeriklerinde *Brucella melitensis*’in kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenmesi. II. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 2006.
19. ALTON, GG, JONES LM, ANGUS RD, VERGER JM. Techniques for the brucellosis laboratory, INRA, Paris, page 13- 61, 1988.
20. AYDIN N. Brucella İnfeksiyonları. Editörler: ARDA M, MİNBAŞ A, AYDIN N, AKAY Ö, İZGÜR M, LEOĞLU N, KAHRAMAN M, ILGAZ A, DİKER S. Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar, 4.baskı, Medisan Yayınları, Ankara, sayfa 110- 124, 1997.
21. TIMONEY JF, GILLESPIE JH, SCOTT FW, BARLOUGH JE. Hagan and Bruner’s Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8 th edition, Cornell University Press, London, page 135- 152, 1988.
22. QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, first publishing, Blackwell Science, Cornwall, page 162- 167, 2002.
23. QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY BK, CARTER GR. Clinical Veterinary Microbiology, Mosby, Edinburgh, page 261- 267, 2000.
24. KILIÇTUGAY K, GÖKIRMAK F, TÖRE O, GEDİKOĞLU S, GÖRAL G, HELVACI S. Klinik Mikrobiyoloji. Editör: KILIÇTUGAY K, Güneş Yayınevi Nobel Tıp Kitabevi, Yenileştirilmiş 2.basım, 1994.
25. BİLGEHAN H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları, Aerob Gram olumsuz küçük basiller, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. Brucella, sayfa 186- 200, 1994.
26. MATTHEW L, LIM MD, LELAND S, RICKMAN MD. Brucellosis. Infectious Diseases in Clinical Practice. 12: 7- 14, 2004.
27. CUTLER SJ, WHATMORE AM, COMMANDER NJ. Brucellosis-new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology, 98: 1270 -1281, 2005.
28. CAPASSO L. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. Journal of Infection, 45: 122- 127, 2002.
29. GODFROID J, CLOECKAERT A, LIAUTARD JP, KOHLER S, FRETIN D, WALRAVENS K, GARIN-BASTUJI B, LETESSON JJ. From the Discovery of the Malta fever’s agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has cotinuously been a re-emerging zoonosis. Veterinary Record, 36: 313- 326, 2005.

30. MEYER, K, SHAW E.B. A comparison of the morphological cultural and biochemical characteristics of *B.abortus* and *B.melitensis*. Journal of Infectious Disease, 27: 173- 184, 1920.
31. HUDDLESON IF. The differentiation of the species in the genus *Brucella*. East Lansing. Michigan, Agricultural Experimental Station, Michigan University, 1929.
32. BUDDLE MB. Studies on *B.ovis*, a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. Journal of Hygen, 54: 351- 364. 1956
33. STOENNER HG, LACKMAN DB. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotomae lepida* Thomas American Journal of Veterinary Research, 18: 947- 951, 1957.
34. CARMICHAEL LE, BRUNER DW. Characteristics of a newly- recognised species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. Cornell University of Veterinary Medicine, 48: 579- 592, 1968.
35. ROSS HM, JAHANS KL, MAC MILLAN AP, REID RJ, THOMPSON PM, FOSTER G. *Brucella* species infection in sea-mammals. Veterinary Record, 138- 359, 1994.
36. FOSTER G, JAHANS KL, REID RJ, ROSS HM. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. Veterinary Record, 138: 583- 586, 1996.
37. JAHANS KL, FOSTER G, BROUGHTON ES. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Veterinary Microbiology, 57: 373- 382, 1997.
38. CORBEL MJ, BRINLEY-MORGAN WJ. Genus *Brucella* Meyer and Shaw, 1920, 173 AL p.377-388, Editor: KRIEG NR, HOLT JG, Bergeys Manuel of systematic bacteriology, vol 1. The Williams & Wilkins Co.Baltimore, Md., 1984.
39. EWALT DR, PAYEUR JB, MARTIN MB, CUMMINGS DR, MILLER WG. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Turciops truncatus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6: 448- 452, 1994.
40. GARNER MM, LAMBOURN DM, JEFFRIES SJ, HALL PB, RHYAN JC, EWLAT DR, POLZIN LM, CHEVILLE NF. Evidence of *Brucella* Infection in *Parafilaroides* lungworms in a specific harbour seal (*Phoca vitulina richardsi*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9: 298- 303, 1997.
41. CLAVAREAU C, WELLEMANS V, WALRAVENS K, TRYLAD M, VERGER JM, GRAYON M, CLOECKAERT A, LETESSON JJ, GODFROID J. Phenotypic and molecular characterisation of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology 144: 3267- 3273, 1998.
42. FOSTER G, MAC MILLAN AP, GODFROID J, HOWIE F, ROSS HM., CLOECKAERT A, REID RJ, BREW S, PATTERSON IAP. A review of *Brucella* spp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. Veterinary Microbiology, 90: 563- 580, 2002.
43. GONZALES L, PATTERSON IA, REID RJ, FOSTER G, BARBEREAN M, BLASCO JM, KENNEDY S, HOWIE FE, GODFROID J, MAC MILLAN AP, SCHOCK A, BUXTON D. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* spp. in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). Journal of Comparative Pathology, 126: 147- 152, 2002.
44. WATSON CR, HANNA R, PORTER R, MC CONNELL W, GRAHAM DA, KENNEDY S, MC DOWELL SWJ. Isolation of *Brucella* species from common seals in Northern Ireland. Veterinary Record, 153: 155- 156, 2003.
45. BRICKER BJ. Characterisation of the three ribosomal RNA operons *rrnA*, *rrnB* and *rrnC*, from *Brucella melitensis*. Gene, 255: 117- 126, 2000.

46. CLOECKAERT A, GRAYON M, GREPINET O. An IS711 element downstream of the *bp 26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7: 835- 839, 2000.
47. VERGER JM, GRAYON M, CLOECKAERT A, LEFEVRE M, AGERON E, GRIMONT F. Clasification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Research Microbiology* 151: 797-799, 2000.
48. CLOECKAERT A, VERGER JM, GRAYON M, PAQUET JY, GARIN-BASTUJI B, FOSTER G, GODFROID J. Species classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphysim at the *omp2* locus. *Microbes and Infection*, 3: 729- 738, 2001.
49. CLOECKAERT A, GRAYON M, GREPINET O, SIDI BOUMEDINE K. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of spesific PCR identification tests. *Microbes and Infection*, 5: 593- 602, 2003.
50. YANAGI M, YAMASATO K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16 srRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Letter*, 107:115- 120, 1993.
51. HOYER BH, MC CULLOUGH NB. Polynucleotid homologies of *Brucella* deoksiribonucleic acids. *Journal of Bacteriology*, 95: 444- 448, 1968.
52. SMITH LD, FICHT TA. Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reews in Microbiology*, 17: 209- 230, 1990.
53. VERGER JM, GRIMONT F, GRIMONT PAD, GRAYON M. *Brucella a* monospesific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35: 292- 295, 1985.
54. VERGER JM, GRIMONT F, GRIMONT PAD, GRAYON M. Taxonomy of the genus *Brucella*, *Annales de L Institut Pasteur Microbiology*, 138: 235- 238, 1987.
55. VISCANIO N, CLOECKAERT A, VERGER JM, GRAYON M, FERNANDEZ-LAGO L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes and Infection*, 2: 1089- 1100, 2000.
56. DE LEY J, MANNHEIM W, SEGERS P, LIEVENS A. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighbourhood of *Brucella* and CDC Group, *Vd.Int.J.Syst.Bacteriol.* 37:35- 42, 1987.
57. CIESLAK TJ, ROBB ML, DRABICK CJ, FISHER GW. Catheter –associated sepsis caused by “*Orchobactrum anthropi*” : report of a case and review of relaed non fermentative bacteria. *Clinical of Infectious Disease*, 14: 902-907, 1992.
58. RELMAN DA, LEPP PW, SADLER KN, SCHMIDT TM. Phylogenetic relationship among the agent of bacillary angiomatosis. *Bartonella baciliformis* and other alpha-proteobacteria. *Molecular Microbiology*, 6: 1801- 1807, 1992.
59. THIELE OW, BUSSE D, HOFFMANN K. Die “freien” Lipide aus *Brucella abortus* Bang. 4. Die Natur der Phosphatide und ihre Fettsaurezusammensetzu ng. *European Journal of Biochemistry*, 5: 513- 519, 1968.
60. KEPPIE J, SMITH H. 1965, The role of erithritol in the tissue localization of the *Brucellae*. *Br.J.Exp. Pathol.* 46: 104- 108.
61. WARING WS, ELBERG SS, SCHNEIDER P, GREEN W. The role of iron in the biology of *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 66: 82- 89, 1953.
62. ALLARDET-SERVENT A, BOURG G, RAMUZ M, BELLIS M, ROIZES G. DNA polymorphysim in strains of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 170: 4603- 4607, 1988.

63. O'HARA MJ, COLLINS DM, LISLE GW. Restriction endonuclease analysis of *Brucella ovis* and other *Brucella* species. *Veterinary Microbiology*, 10: 425- 429, 1985.
64. CELLER MFM, TEYSSIER J, NICOLAS M, LIAUTARD JB, MARTI J, SRIWIDADA J. Cloning and characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein DnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 8036- 8042, 1992.
65. SANGARI FJ, GARCÍA-LOBO JM, AGUERO J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiology Letters* 121: 337- 342, 1994.
66. DOUGLAS JT, ROSENBERG EY, NIKAIKO H, VERSTREATE DR, WINTER AJ. Porins of *Brucella* species. *Infection and Immunity*, 44: 16- 21, 1984.
67. CLOECKAERT A, VERGER JM, GRAYON M, GREPINET O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, 141: 2111- 2121, 1995.
68. CLOECKAERT A, SALIH ALJ, DEBARRH H, ZYGMUNT MS, DUBRAY G. Polymorphism at the DnaK locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species specific marker. *Journal of Medical Microbiology*, 45: 200- 213, 1996.
69. MICHAUX-CHARACHON S, BOURG G, JUMAS BİLAK E, GUIGUE-TALET P, ALLERDET –SERVENT, O'CALLAGHAN D, RAMUZ M. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 179: 3244- 3249, 1997.
70. LOPEZ GONI I, MORIYON I. *Brucella*, *Molecular and Cellular Biology*, Edited by: LOPEZ GONI I, MORIYON I. Horizon Bioscience, Norfolk, England, 2004.
71. MICHAUX S, PAILLISON J, CARLES-NURIT MJ, BOURG G, ALLARDENT SERVENT A, RAMUZ M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16 M genome. *Journal of Bacteriology*, 175: 701- 705, 1993.
72. JUMAS-BITLAK E, MAUGARD C, MICHAUX-CHARACON S, ALLERDENT-SERVENT A, PERRIN A, O'CALLAGHAN D. Study of the organization of the genomes of *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and *Agrobacterium tumefaciens* by insertion of a unique restriction site. *Microbiology*, 141: 2425- 2432, 1995.
73. RIGBY CE, FRASER ADE. Plasmid transfer and plasmid mediated genetic Exchange in *Brucella abortus*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53:326- 330, 1989.
74. JENSEN AE, CHEVILLE NF, THOEN CO, MAC MILLAN AP, MILLER. Genomic fingerprinting an development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*, 11: 152- 157, 1999.
75. ANONİM. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Chapter 2.3.1. Bovine Brucellosis. OIE Technical Report Series, 5th edition. Paris, 2004.
76. FARREL ID, The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research of Veterinary Science* 16: 280- 286, 1974.
77. MARIN CM, JIMENES DE BAGUES MP, BARBERAN M, BLASCO JM. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*, 138: 409- 411, 1996.
78. MARIN CM, ALABART JL, BLASCO JM. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 426- 428, 1996.

79. HORNSBY RL, JENSEN AE, OLSEN S, THOEN CO. Selective Media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinary Microbiology*, 73: 51- 60, 2000.
80. ANONIM. European Commission Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, SANCO.C.2/ AH/ R23/ 2001, Brucellosis in Sheep and Goats (*Brucella melitensis*), 2001.
81. NIELSEN K, DUNCAN JR. *Animal Brucellosis*, CRC press, 1990
82. GRILLO MJ, BARBERAN M, BLASCO JM, Transmission of *Brucella melitensis* from sheep and lambs. *Veterinary Record*, 140: 602- 605, 1997
83. ALTON GG, *Brucella melitensis*. In: “Animal Brucellosis”. (Nielsen K, Duncan JR, eds) CRC press, Boston, 383- 409, 1990.
84. RHAYAN J.C. Brucellosis in terrestrial wildlife and marine mammals. In emerging diseases of animals (K.BROWN, C:BOLIN eds..) ASM Pres, Washington DC, 161- 184, 2000.
85. FERROGLIO E, TOLARI F, BOLLO E, BASSANO B. Isolation of *Brucella melitensis* from Alpine Ibex . *Journal of Wildlife Disease*, 34: 400- 402, 1998.
86. FERROGLIO E, ROSSI L, GENNERO S. Lung tissue extract as an alternative to serum for surveillance for brucellosis in chamois. *Prevention in Veterinary Medicine*, 43: 117- 122, 2000.
87. GODFROID J. Brucellosis in wildlife. *Review of Science and Technology of International Epizootics*, 21: 277- 286, 2002.
88. HERR S, MARSHALL C. Brucellosis in free-living African Buffalo (*Syncerus caffer*): a serological survey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 48: 133- 134, 1981.
89. ASBAKK K, STUEN S, HANSEN H, FORBES L. A serological survey for Brucellosis in reindeer in Finmark country, Northern Norway. *Rangifer*, 19: 19- 24, 1999.
90. FORBES LEB, TESSARO SV. Transmission of brucellosis from reindeer to cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association* 203: 289- 294, 1993.
91. GARIN-BASTUJI B, OUDAR J, RICHARD Y, GASTELLU J. Isolation of *Brucella melitensis* biovar 3 from a chamois (*rupicapra rupicapra*) in the southern French Alps. *Journal of Wildlife Disease*, 26: 116- 118, 1990.
92. MILLER WG, ADAMS LG, FICHT TA, CHEVÏLLE NF, PAYEUR JP, HARLEY DR, HOUSE C, RIDGWAY SH. *Brucella* induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medical* 30: 100- 110, 1999.
93. VAN BRESSERN MF, VAN WAEREBEEK, RAGA JA, GODFOID L, BREW S, MAC MILLAN A. Serological evidence for enzootic *Brucella* spp. infection in Peruvian dusky dolphins and Burmeister’s porpoises and in four other small odontocets from the South Pacific and Mediterranean Sea. *Veterinary Record*, 148: 657- 661, 2000.
94. JEPSON PD, BREW S, MAC MILLAN AP, BAKER JR, BARNETT J, KIRKWOOD JK, KUIEN T, ROBERTSON IR, SIMPSON VR. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. *Veterinary Record*, 141: 513- 515, 1997.
95. TRYLAND M, KLEIVANE L, ALFREDSON A, KJELD M, ARNASON A, GODFROID J. Evidence of *Brucella* spp. in marine mammals in the North Atlantic Ocean and Barents sea. *Veterinary Record*, 144: 588- 592, 1999.
96. SALEM SF, MOHSEN A. Brucellosis in fish. *Veterinary Medicine (Praha)* 42: 5- 7, 1997.

97. PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, CHRISTOU L, TSIANOS EV. The New Global Map of Human Brucellosis, *Lancet Infectious Diseases*, 6: 91- 99, 2006.
98. REFAI M. Incidence and control of brucellosis in the Near East Region. *Veterinary Microbiology*, 90: 81- 110, 2002.
99. ERDENLİĞ S, ŞEN A. Koyun atıklarından *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31, 31-42, 2000.
100. GÜLER L, GÜNDÜZ K, BAYSAL T. Konya Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsüne getirilen koyun atık materyallerinin bakteriyolojik ve serolojik muayene sonuçlarının değerlendirilmesi. *Veterinarium*, 9: 3- 10, 1998.
101. YILMAZ S. Koyun ve keçilerde enfeksiyöz abortuslar. Koyun ve Yetiştiriciliği Hastalıkları Sempozyumu, 11- 12 Mayıs, Konya.
102. KARAMAN Z, KÜÇÜKAYAN U. 1993- 1997 Yılları İçinde Enstitümüze Gönderilen Atık Yapan Koyun Kan Serumları ve Materyallerinin Serolojik ve Mikrobiyolojik Yoklama Sonuçları, *Etlık Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 11: 1- 2, 2000.
103. SAĞLAM Y, TÜRKÜANIT SS, TAŞTAN R, BOZOĞLU H, OTLU S. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden incelenmesi, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2: 133-145, 1998.
104. GÜRTÜRK K, SOLMAZ H, EKİN İH, AKSAKAL A, GÜLHAN T. Van Yöresinde Yavru atan Koyunlarda Bakteriyolojik ve Serolojik İncelemeler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2: 19- 22, 2000.
105. NIELSEN K. Diagnosis of brucellosis by serology, *Veterinary Microbiology*, 90: 447- 459, 2002.
106. GARIN-BASTUJI B, BLASCO JM, MARIN C, ALBERT D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*, 62: 63- 70, 2006.
107. MAC MILLAN A. Conventional serological Tests. In: *Animal Brucellosis*, (Nielsen K, Duncan JR, eds) CRC Pres Inc., Boca Raton, 153-198, 1990.
108. ALEXANDER B, SCHNURRENBERGER PR, BROWN RR. Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows, *Veterinary Record*, 23: 500. 1981.
109. THAKUR SD, KUMAR R, THAPLİYAL DC. Human brucellosis: review of an under –diagnosed animal transmitted disease, *Journal of Communicable Disease*, 34: 287- 301, 2002.
110. NOVIELLO S, GALLO R, KELLY M, LIMBERGER RJ, DEANGELIS K, CAIN L, WALLANCE B, DUMAS N. Laboratuary acquired Brucellosis. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 1848- 1850, 2004.
111. PAPPAS, G., AKRİDİTİS, N., BOSİLKOVSKI M. & TSİANOS E.: Brucellosis. *The New England Journal of Medicine*, 352: 2325- 2336, 2005.
112. DOGANAY M, AYGEN B. Human Brucellosis; An Overview, *International Journal of Infectious Disease*, 7: 173- 182, 2003.
113. BREW SD, PERRET LL, STACK JA, MAC MILLAN AP, STAUNTON NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Veterinary Record*, 144: 483, 1999.
114. KÖSE S, SMITS HL, ABDOEL TH, ÖZBEL Y. Prevalance of *Brucella* antibodies in rural and suburban communities in three provinces of Turkey: Need for improved diagnosis and prevention. *Journal of Infection*, 53, 308-314, 2006.

115. KÖSE S, KILIÇ S, ÖZBEL Y. Identification of *Brucella* species from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 323- 327, 2005.
116. ANONİM. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th report, World Health Organization, Geneva, 132 pp., 1986.
117. HORNITZKY M, SEARSON J, The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle. *Australian Veterinary Journal* 63: 172- 174, 1986,
118. BRICKER BJ. PCR as a Diagnostic Tool for Brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90: 435- 446, 2002.
119. ROMEO C, PARDO M, GRILLO MJ, DIAZ R, BLASCO JM, LOPEZ-GONI I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 3198- 3200, 1995.
120. RIJPEMS NP, JANNES G, VAN ASBROECK M, ROSSAU R, HERMAN LMF, Indirect detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridisation with 16s-23s rRNA spacer probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1683- 1688, 1996.
121. CORTEZ A, SCARCELLI E, SOARES RM, HEINEMANN MB, SAKAMOTO SM, GENOVEZ ME, FERREIRA F, RICHTZENHAIN LJ, Detection of *Brucella* DNA from Aborted Bovine Foetuses by Polymerase Chain Reaction, *Australian Veterinary Journal*, 79: 7, 500- 501, 2001.
122. LEAL-KLEVEZAS DS, MARTINEZ-VAZQUEZ IO, LOPEZ MERINO A, MARTINEZ-SORIANO JP. Single step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 3087- 3090, 1995.
123. FEKETE A, BANTLE JA, HALLING SM, SANBORN MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 216- 227, 1990.
124. FEKETE A, BANTLE JA, HALLING SM, SANBORN MR. Rapid sensitive detection of *Brucella abortus* by polymerase chain reaction without extraction of DNA. *Biotechnology Techniques*, 4: 31- 34, 1990.
125. BAILY GG, KRAHM JB, DRASAR BS, STOCKER NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 271- 275, 1992.
126. GÜLER L, GÜNDÜZ K, OK Ü. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Bacteriological Culture for The Diagnosis of Sheep Brucellosis Using Aborted Fetus Samples. *Veterinary Microbiology*, 93: 53- 61, 2003.
127. DA COSTA M, GUILLOU JP, GARIN-BASTUJI B, THIEBAUD M, DUBRAY G. Specificity of six gene sequences for the detection genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal of Applied Bacteriology* 81: 267- 275, 1996.
128. FEKETE A, BANTLE JA, HALLING SM, STICH RW. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *Journal of Bacteriology*, 174: 7778- 7783, 1992.
129. EWALT DR, BRICKER BJ, Validation of Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51, *Journal of Clinical Microbiology*, 8: 3085- 3086, 2000.

130. FARINA R. Current serological methods in *Brucella melitensis* diagnosis. In: *Brucella melitensis* (Plompet M, Verger JM., eds) Marnitus Nijhoff Publication., Dordrecht, 139- 146, 1985.
131. ANONİM. Diagnosis in individual animals. AVIS-Brucellosis, <http://www.fao.org/AG/aga/AGAH/EMPRES/GEMP/avis/B103-brucellosis/mod0/0320-diagnosis-individual.html>, 2007.
132. DOUGLAS JT, PALMER DA, Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1353- 1356, 1988.
133. DIAZ R, JONES LM, LEONG D, WILSON JB, Surface antigens of smooth brucella. *Journal of Bacteriology*, 96: 893- 901, 1968
134. DIAZ APARICIO E, ARAGON V, MARIN C, ALONSO B, FONT M, MORENO E, PEREZ S, BLASCO JM, DIAZ R, MORIYON I, Comparative analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep and goats. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 3136- 3141, 1993.
135. DIAZ R, JONES LM, WILSON JB. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 93: 1262- 1268, 1967.
136. DIAZ R, JONES LM, WILSON JB. Antigenic relationship of the gram negative organism causing canine abortion to smooth and rough *Brucellae*. *Journal of Bacteriology*, 95: 618- 624, 1968.
137. ANONİM. Joint FAO / WHO Expert Committee, The Development of new improved brucellosis vaccine, WHO/EMC/ZDI/98.14: 1997.
138. VERGER JM, GRAYON M, ZUNDEL E, LECHOPÏER P AND OLÏVER-BERNARDÏN V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 1995, 13: 191- 196.
139. SCHURÏG GG, ROOP RM, BAGCHÏ T, BOYLE S, BUHRMAN D AND SRÏRANGANATHAN N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 28: 171- 188, 1991.
140. WÏNTER AJ, SCHURÏG GG, BOYLE SM, SRÏRANGANATHAN N, BEVÏNS JS, ENRÏGHT FM, ELZER PH AND KOPEC JD. Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *American Journal of Veterinary Research*, , 57: 677- 683, 1996.
141. DOĞUER M. Türkiye’de izole edilen *Brucella* suşlarının identifikasyonları. *Etlik Veteriner Bakterioloji Enstitüsü Dergisi*, 3: 155- 188, 1961.
142. ATEŐOĐLU A. Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’ne 1993- 1997 yılları arasında Marmara bölgesinden getirilen koyun-keçi ve sığır atık materyallerinin bakteriyolojik yönden incelenmesi, Ulusal Sığır ve Koyun Yavru Atma Sempozyumu, 06- 08 Ekim 1998, Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü, İstanbul, 1998.
143. AYDIN M, ARDA M, AKAY Ö, İZGÜR M, AYHAN H, ESENDAL Ö, AYDIN F. Atık fetuslardan izole edilen *Brucella* suşlarının Ko-Aglütinasyon testi ile identifikasyonları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2: 348- 358, 1990.
144. CORBEL MJ. Brucellosis: Epidemiology and Prevalence worldwide. *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*, Edited by YOUNG EJ, CORBEL MJ, CRC Press, Inc., Boca Raton. Florida, USA, 25- 40, 1989.

- 145.ÖZER H, GÜÇLÜ HB, DUMANLI N, BOSTANCIOĞLU H, AKIŞ C. Doğu Anadolu'da bazı illerde koyun abortusları üzerine patolojik ve bakteriyolojik incelemeler. Fırat üniversitesi Dergisi 1: 33- 39, 1990.
- 146.KIRAN MM, GÜLER L, KÜÇÜKAYAN U, BAYSAL T, GÜNDÜZ K, GÖZÜN H, KUYUCUOĞLU Ö. Konya yöresinde koyun abortusları üzerinde patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2: 109-128, 1997.
- 147.BANAI, M, MEYER, I, COHEN, A. Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. Journal of Clinical Microbiology, 28: 1057- 1059, 1990.
- 148.GARCIA, MM, BROOKS, BW, RUCKERBAUER, GM, RİGBY, CE, FORBES, LB. Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. Canadian Journal of Veterinary Research, 52: 338- 342, 1988.
- 149.LUCERO, NE, AYALA, SM, ESCOBAR, GI, GRAYON, M, JACQUES, I. A new variant of *Brucella melitensis*. Clinical Microbiology and Infection, 12: 593-596, 2006.
- 150.EWALT, DR, FORBES, LB: Atypical isolates of *Brucella abortus* from Canada and the United States characterized as dye sensitive with M antigen dominant. Journal Clinical Microbiology, 25: 698- 701, 1987.
- 151.CORBEL, M.J: Identification of dye sensitive strains of *Brucella melitensis*. Journal of Clinical Microbiology, 29: 1066- 1068, 1991.
- 152.MEYER ME. Evolutionary Development and Taxonomy of the genus *Brucella*. Advances in Brucellosis Research, 1st edition, Edited by ADAMS LG. Texas A&M University Pres, Collage Station, TX, USA, 12- 35, 1990.
- 153.MOREIRA-JACOB M. In Vitro Species (or type) transformation among strains of *Brucella*, Nature, 197: 406, 1963.
- 154.ALTON G, ELBERG S, Rev 1 *B.melitensis* vaccine: a review of ten years of study. Veterinary Bulletein, 37: 793- 800, 1967.
- 155.ELBERG SS. Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968- 1980. Veterinay Bulletein, 51: 67- 73, 1981.
- 156.JIMENEZ DE BAGUES MP, MARIN CM, BARBERAN M, BLASCO JM. Responces of ewes to *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine administrated by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. Annual Record of Veterinarie, 20: 205- 213, 1989.
- 157.MINAS A. Control and Eradication of Brucellosis in Small Ruminants. Small Ruminant Research, 62: 101- 107, 2006.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve yazım aşamasında bana zaman ayıran, yardım ve desteklerini esirgemeyen, danışman hocam Prof. Dr. Sayın Aşşın ŞEN'e, tezimin biyotiplendirme ile birlikte her aşamasında yanımda olan Pendik Veteriner Araştırma ve Kontrol Enstitüsü, Brucella Laboratuvarı Müdürü Dr. Sayın Sevil ERDENLİĞ'e, atık fetusların temin edilmesinde çok büyük katkıları olan Tarım Bakanlığı İl Kontrol Müdürlüğü Laboratuvarı Veteriner Hekimleri'ne ve tezimin deneysel aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndaki değerli hocalarım ve arkadaşlarıma en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her durumda yanımda olan sevgili eşim, anneciğim ve babacığıma, uslu durarak tezimin yazımında beni üzmeyen 4 aylık kızım canım Asya'ma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

01. 01. 1977 tarihinde Bursa'da doğdum. İlkokul öğrenimimi Setbaşı İlkokulu'nda, hazırlık sınıfı ve ortaokul öğrenimimi Özel İhsan Çizakça Lisesi'nde, lise öğrenimimi ise Bursa Yıldırım Beyazıd Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitimime başladım ve 2000 yılında mezun oldum. 2001 yılı'nda Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime ve 2002 yılında da Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.