

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERIA GRUBUNA
AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ
SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN
BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA
POTANSİYEL UYGULANABİRLİĞİ YÖNÜNDEN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Bu tez, HÜBAK tarafından 16148 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2017

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ'ın hazırladığı '*Brucella* ve alfa-*Proteobacteria* grubuna ait bazı bakteri cinsleri arasındaki serolojik çapraz reaksiyonların brusellozun serolojik tanısında potansiyel uygulanabilirliği yönünden araştırılması', konulu çalışma 05.09.2017 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Mikrobiyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Oktay KESKİN

Harran Üniversitesi

Başkan



Doç.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK
(DANIŞMAN)

Harran Üniversitesi

ÜYE



Doç. Dr. Neval Berrin ARSERİM

Dicle Üniversitesi

ÜYE



11/09/2017



Prof.Dr. Mustafa DENİZ

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez danıőmanım sayın Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e, Anabilim Dalı Başkanım sayın Prof. Dr. Oktay KESKİN'e ve değerli bilgilerini benimle paylaőan Doç. Dr. Osman Yaşar TEL'e teşekkür ederim.

Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ

2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. <i>Brucella</i> Cinsi Bakteriler.....	2
2.2. <i>Brucella</i> 'nın Antijenik Özellikleri.....	5
2.3. <i>Ochrobactrum</i> spp.....	8
2.4. <i>Rhizobium</i> spp.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Gereç.....	14
3.1.1. Antijen Hazırlanmasında Kullanılan Besiyeri ve Solüsyonlar.....	14
3.1.2. Bakteriyel Suşlar.....	15
3.1.3. Serum Örnekleri.....	15
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Antijen Üretimi.....	15
3.2.2. İndirekt ELISA.....	16
3.2.3. Sensitivite ve Spesifisite Saptanması.....	17
4. BULGULAR.....	18

5. TARTIŞMA	24
6. SONUÇ.....	26
7. KAYNAKLAR.....	27
8. EKLER.....	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 1.** *O. intermedium* bakterisinden hazırlanan antijen ile kaplı ELISA pleytinde *Brucella*-infekte ve sağlıklı koyun serumlarının verdiği reaksiyon.....19
- Şekil 2.** *Brucella abortus* S99 ham LPS antijeninin optimum dilüsyonunun saptanmasında *Brucella* pozitif serumla karşılıklı titrasyonu (Checkerboard).....21
- Şekil 3.** *Rhizobium tropici* ham LPS antijeninin optimum dilüsyonunun saptanmasında *Brucella* pozitif serumla karşılıklı titrasyonu (Checkerboard).....22

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. Her bir antijen türünün her bir konakçıda oluşturmuş olduğu serolojik yanıtın OD ortalaması alınarak gösterilmesi.....	18
Tablo 2. Koyun brusellozunun tanısında bazı <i>Alpha-Proteobacteria</i> ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı.....	20
Tablo 3. İnsan brusellozunun tanısında bazı <i>Alpha-Proteobacteria</i> ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı.....	20
Tablo 4. Sığır brusellozunun tanısında bazı <i>Alpha-Proteobacteria</i> ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı.....	22
Tablo 5. Köpek brusellozunun tanısında bazı <i>Alpha-Proteobacteria</i> ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı.....	23

KISALTMALAR VE SİMGELER

ATCC	:American Type Culture Collection
BOS	:Beyin Omirilik Sıvısı
ELISA	:Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
LPS	:Lipopolisakkarit
NH	:Natif Hapten
NTCC	:National Collection of Type Cultures
OMP	:Outer Membrane Proteins
Poly B	:Polisakkarit B
RBPT	:Rose Bengal Pleyt Test
R	:Rough
R-LPS	:Rough Lipopolisakkarit
SAT	:Serum Tüp Aglitünasyon
S	:Smooth
S-LPS	:Smooth Lipopolisakkarit
WHO	:World Health Organisation
rRNA	:Ribozomal RNA

ÖZET

BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERIA GRUBUNA AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA POTANSİYEL UYGULANABİRLİĞİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ

Mikrobiyoloji, Yüksek Lisans Tezi

Bruselloz insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyon yapan, insanlarda kamu sağlığını tehdit eden ve hayvancılık endüstrisine ekonomik anlamda ciddi zararlar veren bir zoonozdur. Hastalığın teşhisinde kültüre göre daha çabuk ve pratik olan serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Serolojik testlerde kullanılan antijen, virulensi yüksek *Brucella* suşlarından hazırlanmaktadır. Bu durumda *Brucella* ile immünolojik çapraz reaksiyon veren ve virulensi insanlar için çok düşük olan suşların antijen üretiminde kullanılması cazip bir yaklaşım olacaktır. Dolayısıyla bu çalışmada, *Brucella* suşları ile filogenetik olarak yakınlığı bulunan ve virulensi *Brucella* bakterilerinden çok daha az olan, normalde saprofit olarak değerlendirilen *Ochrobactrum anthropi* gibi fırsatçı patojen olan alfa-*Proteobacteria* sınıfına ait 3 ayrı bakteri türünün (*O. anthropi*, *O. intermedium*, *Rhizobium tropici*) *Brucella* antijeni yerine kullanılıp kullanılmayacağı araştırıldı. Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozu açısından test edilen antijenlerin hiçbirisi kabul edilebilir seviyede bir sensitivite ve spesifite göstermediler. Bu türlerde negatif serumları yüksek reaksiyon göstermelerine bağlı olarak eşik değeri çoğu zaman pozitif kontrol ortalamasının üstüne çıktığından % 100 bir spesifite ve 0 ve 0'a yakın bir sensitivite gösterdiler. Çalışmada sadece rough bir tür olan ve dolayısıyla S-LPS yerine R-LPS taşıyan, O-polisakkariti ya indirgenmiş ya da tamamen olmayan *O.intermedium* antijeni ile ve sadece koyun ve köpekte kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanısal performans alınmıştır. Çalışmada alınan tüm sonuçlar dikkate alındığında Proteobakterilerin α -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozun serolojik tanısında birtakım çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği akılda tutulmalıdır.Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B.canis* ve *B.ovis* enfeksiyonlarında kullanılma potansiyelini artırabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelime: *Brucella*, serolojik çapraz reaksiyonlar, alfa-*Proteobacteria*

ABSTRACT

EVALUATION OF USAGE SEROLOGICAL CROSS-REACTIVITIES BETWEEN *BRUCELLA* AND SOME BACTERIAL GENERA OF ALPHA-PROTEOBACTERIA IN SEROLOGIC DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS

Ahmet Selman MIZRAKLIDAĞ

Microbiology, Master Thesis

Brusellosis is an important zoonosis that cause serious infections in man and animals. This infection constitutes a risk for public health and big economical losses in animal industry. Serological tests have been intensively used for serologic diagnosis of the disease because of being quicker and more practical than culturing of the causative organism. Antigens used in serological tests are prepared from virulent *Brucella* strains. In this regard, to use antigens prepared from bacterial strains that are not virulent for human and show immunological cross reaction with *Brucella* will be a desired approach. These organisms have much lower virulence than *Brucella* and generally they are considered as saphrophytic and some of them are oppurtunistic pathogen like *O.anthropi*. For this reason, in this study, we planned to search the possibility of usage of antigens prepared from three bacterial species of alpha-Proteobacteria (*Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Rhizobium tropici*) which are filogenetically close to *Brucella*. As conclusion, none of the antigens yielded acceptable sensitivity and specificity for cattle and human brucellosis. In these species, the mean of negative controls were even higher than those of positive controls. Therefore, the value of cutoff were higher and this resulted in very low sensitivity that approached 0 or near zero and 100% specificity. In the study, only sheep and dogs sera against *O.intermedium*, which are a rough species and carry R-LPS instead of S-LPS showed diagnostic performance in acceptable ranges. When considering all the results of the study, it was thought that some members of alpha Proteobacteria might cause cross reaction in the serologic diagnosis of brucellosis and cause false positive reactions and this should be remembered when evaluating the results. On the other hand, pure antigens from *O.intermedium* might have the potential to be used in *B.ovis* and *B.canis* infections and it was thought that the future works in this field might be needed.

Keywords: *Brucella*, serological cross-reactivities, alpha-Proteobacteria

1. GİRİŞ

Önemli bir zoonoz olan brusellozun tanısı geniş anlamda serolojik teşhise dayanmaktadır. Zira kültür zaman alıcı ve laboratuvar personeli için infeksiyon riski taşımaktadır. Ancak serolojik testler için hazırlanan antijenler virulent *Brucella* suşlarından hazırlanmakta ve bu suşlar ile çalışan laboratuvar personeli için risk oluşturmaktadır. Bu yüzden laminar airflow kabin altında çok dikkatli olarak ve konusunda uzman kişiler tarafından çalışılmalıdır. *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar, alfa-*Proteobacteria* sınıfında bulunan çoğunlukla saprofit olan toprak bakterileri ile yakın akrabalık ilişkisi içindedirler. Bu gruba ait mikroorganizmalar *Brucella* spp. ile yakın antijenik benzerlik göstermektedirler(1,2). Çalışmamızda bu gruba bağlı *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium* ve *Rhizobium tropici* olmak üzere 3 ayrı bakteri türünden hazırlanan LPS tabakasının bruselloz serolojik tanısında kullanılabilirliği araştırıldı. Bu karşılaştırma rough ve smooth suşlardan hazırlanan antijenler ile yapıldığından sadece smooth *Brucella* suşları ile değil rough suşlar olan *B. ovis* ve *B. canis* infeksiyonlarının teşhisinde kullanılmakapasiteleri de araştırıldı. Ayrıca testlerin validasyonunda sadece sığır ve koyun değil ayrıca köpek ve insanlardan alınan serumlar da kullanıldığından hastalığın serolojik tanısında alfa-*Proteobacteria* grubundaki 3 ayrı bakterinin kullanılması geniş kapsamlı olarak değerlendirildi. Bu grup bakteri antijenlerinden alınan sonuçlar *Brucella* antijenleri ile istenilen düzeyde benzer sonuçlar verseydi biyogüvenlik açısından neredeyse risk oluşturmayan bu bakteriler ile antijen üretimi yapılabilecekti.

Bu amaçla bu 3 bakteri suşundan hazırlanan ham LPS antijenleri in house ELISA ile karşılaştırıldı. Bu antijenlerin optimum antijen konsantrasyonları saptandıktan sonra antijen kaplama için üretilmiş özel ELISA pleytleri kaplandı. Çalışmamızda smooth suşlar olarak *O. anthropi*, *R. tropicive* *Brucella abortus* S99 ve rough suş olarak *O. intermedium* kullanıldı. Bu şekilde bu antijenlerin hem smooth ve hem de rough *Brucella* suşlarının infeksiyonlarında kullanılabilirliği araştırıldı. Geliştirilen ELISA modellerinin validasyonlarında bruselloz yönünden gerçek infekte ve gerçek non-infekte koyun, sığır, köpek ve insan serumları kullanıldığından bu modellerin her türde hastalığın serolojik tanısında kullanılma potansiyeli de belirlendi.

2. GENEL BİLGİLER

Alpha-Proteobacteria sınıfı ökaryotik hücrelerle değişik şekillerde yakın ilişki kurma kabiliyeti olan mikroorganizmaları içermektedir. *Agrobacterium* bitki hücrelerinde tümör oluşturan bir cins iken *Brucella*, *Bartonella*, *Phyllobacterium* ve *Sinorhizobium* patojen veya endosimbiyont olarak davranan fakültatif ekstrasöllüler ve intrasellüler davranan bakterilerdir(1).

2.1. *Brucella* Cinsi Bakteriler

Bruselloz, *Brucella* cinsine ait türlerin sebep olduğu insanların ve hayvanların önemli bir infeksiyonu olup Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı(FAO), Dünya Sağlık Örgütü(WHO) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi(OIE) tarafından dünyanın en yaygın zoonozlarından biri olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde özellikle de kırsal alanlarda Bruselloz vakalarına sık olarak rastlanmaktadır. Bruselloz insan ve hayvanlarda atipik klinik semptomlar oluşturduğundan hastalığın nörolojik, dermatolojik, hematolojik, romatizmal ve kardiyak hastalıklarla karıştırılması mümkün olabilmekte ve klinik teşhisi güçleşebilmektedir. Kesin teşhis için laboratuvar sonuçlarına gereksinim duyulmaktadır(2). Bruselloz hayvanlarda özellikle genital organlara(uterus, testis, meme) yerleşerek dişilerde infertilite, mastitis, artrit ve gebelerde abortlara, erkek hayvanlarda ise orşitis, artrit, epididimitis ve steriliteye neden olan, nadir olarak nekrotik karakterde yangılara sebep olan, akut, subakut veya kronik seyirli olabilen infektif bir hastalıktır(3).

Bruselloz ilk olarak Hippocrates tarafından 'humma' olarak tanımlanmış, 'Akdeniz ateşi', 'Malta humması', 'Ondülan ateşi', 'Bang's hastalığı' gibi farklı isimlerle anılmıştır. Gram negatif, fakültatif ve intrasellüler olan *Brucella* etkeni ilk olarak 1886'da Sir David Bruce tarafından, Malta adasında Akdeniz hummasından ölen askerlerin dalaklarından izole edilmiştir(4). Sığırlarda ilk kez Danimarka'lı hekim Dr. Bernhard Bang tarafından 1897 yılında uterus duvarından *Brucella abortus* izole edilmiştir. Koyunlarda ise ilk kez Garcia ve Iscara tarafından izole edilmiştir. Ülkemizde ilk Bruselloz vakası Abdülkadir NOYAN tarafından I.Dünya Savaşı sırasında askerlerde tanımlanmıştır. Ülkemizde koyunlarda Bruselloz varlığı ilk 1944'te Aktan ve Köylüoğlu tarafından Bandırma Merinos Çiftliği'nde

serolojik olarak saptanmış, sığırlarda ise ilk olarak 1931'de Zühtü BERKE tarafından saptanmıştır(5).

Bruselloz Akdeniz Ülkeleri ve Arap Yarımadası başta olmak üzere Latin Amerika Ülkeleri, Orta ve Batı Avrupa, Batı ve Orta Asya, Dünya'nın Güney ve Güneydoğusunda görülmektedir. Koyun brusellozu dünyanın birçok yerinde endemik olup gelişmekte olan ülkelerde prevalansı artmaktadır. Ancak sığır brusellozu birçok ülkede eradike edilmiştir(6). Dünyanın birçok yerinde de ülkemizde de Brusellozun hayvanlardaki yaygınlığı kesin olarak ifade edilememektedir. Ülkemizde ruminantlardaki abortların %15-40'ndan Bruselloz sorumlu tutulmakla birlikte tüm abortların teşhis laboratuvarlarına gönderilmemesi, bildirim ve hasta kayıt sistemlerinin olmamasından ötürü daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir. Serolojik testlerle ülkemizde yapılan taramalarda hastalığın seroprevalansının %1-70 arasında değiştiği ve yaşın artmasına bağlı olarak arttığı bildirilmektedir. Ülkemizde 2011 yılında yapılan son ulusal serolojik brusella sero-surveyi sonuçlarına göre sığırlarda sürü prevalansı %6,9 (fert prevalansı %2,6) ve koyunlarda her köy bir sürü olarak kabul edildiğinde prevalans %30 (fert prevalansı %4,7) olarak tespit edilmiştir(7).

Brucella etkenleri sperm, süt, idrar, gebe hayvanların plasenta, fötüs, fötal membran ve uterus içeriğinde bulunup bu yolla vücuttan atılır. Bir hayvandan diğerine bulaşma sağında memelerin kontaminasyonu, konjunktiva, çiftleşme(koç sperması ile), sindirim sistemi(bulaşık mera, yem, su, idrar) ve deri yoluyla olabilmektedir. Gebe hayvanlar hastalığa daha duyarlıdır ve enfeksiyon genelde abortla sonuçlanır. Hasta hayvanlar kısa zamanda enfeksiyondan kurtulabilir ve ikinci abort nadir olarak görülür. Sığırlarda etkenin vajinal yolla atılımı koyun ve keçilere oranla daha az ve kısa sürelidir. Süt verimindeki azalma da koyun ve keçilere oranla daha azdır. İnfertilite oranı sığırlarda koyun ve keçilere oranla daha yüksektir(5).

Bruselloz hayvanlarda ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte enfekte hayvanların süt ve süt ürünleriyle tüketicileri de etkilemesi sebebiyle halk sağlığı açısından önemli bir hastalıktır(8).

B. abortus (biyovar 1,2,3,4,5,6,9), *B. melitensis* (biyovar 1,2,3), *B. suis* (biyovar 1,2,3,4,5) biyovarlara sahiptirler(9).

Brucella türleri konakçı tercihi, biyokimyasal özellikler, patojenite, üreme özellikleri, fenotipik karakterler, faj tipleri, boyalara karşı olan duyarlılık gibi özellikler açısından farklı

tür ve biyovarlara ayrılırlar. *Brucella* cinsi günümüzde özellikle konakçı spesifitesine göre 11 türü içermektedir. *B. abortus* (sığır), *B. melitensis* (koyun-keçi), *B. ovis* (koyun), *B. canis* (köpek), *B. suis* (domuz, ren geyiği ve rodentler), *B. neotoma* (rat) klasik 6 türü kapsamaktadır. Yeni bildirilen türler *B. ceti* (yunuslar, musurgiller), *B. pinnipedialis* (deniz aslanları), *B. microti* (tarla faresi, tilki), *B. inopinata* (insan göğüs implantı) ve *B. papionis* (babunlar) olmak üzere 5 türü içermektedirler(OIE,2016). Ülkemizde sığırlarda en fazla *B. abortus* biyotip 3, koyunlarda ise en fazla *B. melitensis* biyotip 3 ve daha az sıklıkla *B. melitensis* biyotip 1 izole edilmektedir(10,11). Ancak konakçı spesifikliği çok keskin değildir ve heterolog enfeksiyonlar oldukça yaygındır. *B. suis* ve *B. melitensis*'in sığırlarda, *B. abortus*'un ise köpek ve koyunlarda enfeksiyona sebep olabildiği son yıllarda rapor edilmiştir. Ülkemizde *B. suis* ilk kez bir insan vakasından izole edilmiştir. *B. canis* ve *B. ovis*'in varlığına ilişkin serolojik kanıtlar vardır(12,13).

Dünyada patojenitesi en yüksek olan *Brucella* türleri; sığırlarda bruselloza sebep olan en önemli tür olan *B. abortus*, insanlarda çok şiddetli enfeksiyona sebep olan, koyun ve keçileri enfekte eden *B. melitensis* ve domuzlarda bruselloza sebep olan *B. suis*'tir. Ülkemizde ise patojenitesi en yüksek olan türler *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus* ve *B. canis*'tir. Bu türler abortlara sebebiyet vererek ekonomik anlamda önemli kayıplara neden olurlar. Patojenitesi yüksek olan bu türler teşhis, kontrol, eradikasyon ve salgın idaresinde dikkate alınmalıdırlar(14).

Brusellozun laboratuvar tanısında serolojik ve bakteriyolojik testler uygulanmaktadır. Kesin tanı etkenin izolasyonu ve identifikasyonu ile konur. Bakteriyolojik tanı kısa zamanda sonuç vermediğinden pratik değildir ve izolasyon her zaman mümkün olamamaktadır. Dolayısıyla brusellozun tanısında bakteriyolojik testler alerjik veya serolojik testlerle kombine edilmektedir. Brusellozun tanısında serolojik testlerden ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) oldukça güvenilir, pratik ve hızlı sonuç veren bir testtir. Az zamanda çok sayıda testin değerlendirilebilmesini mümkün kılmaktadır. Brusellozun tanısında ELISA'nın sensitivite ve spesifitesinin yüksek olduğu ve *Brucella*'ya karşı oluşmuş düşük titredeki antikorları saptayabildiği birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır(15).

Brucella türlerinin enfeksiyon yapma kapasitesi fagositlerin içinde yaşamlarını idame etme ve üreme yeteneklerine bağlı olarak değişmektedir. *B. abortus* Vero hücreleri ve trofoblastlardaki yuvarlak endoplazmik retikulum (ER) siternaları içinde çoğalır. Vücuttaki

fagositik hücrelerin iç kısımları nonoksidatif (proteazlar, lizozom, laktoferritin, katyonik proteinler, PH:5,4) ve oksidatif (H_2O_2 , halid, miyeloperoksidaz) mekanizmalarıyla mikroorganizmalar için öldürücü niteliktedir. *Brucella* türü mikroorganizmaların bu mekanizmalardan nasıl korundukları tam olarak tesbit edilememiş olmakla birlikte *B. abortus*'un lizozom ile fagozomların biraraya gelmesini engellediği ve oksidatif mekanizmaya rezistans gösterdiği bildirilmektedir. *Brucella* türlerinde ilk doğrulanan virulans faktörü olan lipopolisakkarit (LPS) mikroorganizmayı komplemen aracılı parçalanmadan korur, hücre içi yaşam süresini artırır. HtrA, Cu-Zn süperoksit dismutaz, DnaK ve Rec A gibi gen ürünlerinin virulans ile ilgili olduğu tahmin edilerek bu proteinleri sentezlemeyen delesyon mutantlarında *Brucella* türlerinin konağı kolonize ettiği erken dönemde normal suşlardan daha kısa yaşadıkları saptanmıştır. Günümüzde BvrR/BvrS diye isimlendirilen iki regülatörlü proteik sistemin, *B. abortus*'un HeLA hücreleri ve makrofajlar içindeki çoğalmasında önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir. *Brucella*'da iki regülatör sisteminden NtrC/NtrB azot metabolizmasında görev alırken, FeuQ/FeuP ise demir alımını düzenler. Regülatör sistemler bugüne değin tanımlanmamış multipl genler ile kontrol edilmektedir(16).

2.2. *Brucella*'nın Antijenik Özellikleri

Brucella türü bakterilerin hücre duvarı kapsül, pilus, fimbria gibi antijenik yapıları ihtiva etmez. Dış membran outer membrane proteins (OMPs) ve lipopolisakkarit (LPS) ihtiva eder. Outer membrane proteins(OMPs) farklı *Brucella* türlerinde değişik yapıdadır. Lipopolisakkarit (LPS) antijenleri ise Smooth (S) ve Rough (R) suşlar arasında önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. Bunlar dışındaki antijenik yapılar tüm *Brucella* türlerinde ortaktır(17,22).

Filogenetik açıdan *Brucella* türleri *Rhizobiaceae* grubunun *Ochrobactrum* ve *Rhizobium* genuslarının da içinde yer aldığı *Proteobacteria* sınıfının α -2 alt grubunda yer alırlar. *Brucella* türleri arasındaki DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla türler arasında %90'dan fazla DNA homolojisinin olduğu saptanmıştır(18). Bu benzerlik, bazı araştırmacıları biyogüvenlik sağlama açısından, *Brucella* infeksiyonlarının teşhisinde kullanılan antijenlerin yerine bu benzer *Proteobacteria* cinslerindeki bakterilerden elde edilen antijenlerin kullanılma olasılığı ile ilgili çalışmalara yöneltmiştir. Delpino ve ark. (19), *O. anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* kökenli sitosolik ve membran antijenleri ile *Brucella* infekte insan, sığır, köpek ve koyun serumlarının ELISA reaktivitesini

değerlendirmişler ve *B.canis* ile infekte köpeklerde *Agrobacterium*, *Sinorhizobium*, *Ochrobactrum* için sırası ile %58, %88 ve %84 sensitivite elde ettiklerini açıklamışlardır. Araştırmacılar sağlıklı insan, sığır ve koyun serumlarının bu antijenlere yüksek reaksiyon göstermesi nedeni ile, *O. anthropi*, *A. tumefaciens*, *S. meliloti* orijinli sitosolik ve membran proteini antijenlerinin *Brucella* infeksiyonunu saptamada insan, sığır ve koyunlarda tanısal bir fayda sağlamadığını bildirmişlerdir. Aras ve Uçan (4), *R. tropici* ile pleyt test antijeni hazırlamışlar ve *Brucella* ile infeksiyon olma şüphesi olan sürülerden 100 koyun ve sığır serumunu hazırladıkları antijen ve *B.abortus* S99 suşundan hazırlanmış Rose-Bengal pleyt test (RBPT) antijeni ile aglütinasyon yönünden test etmişlerdir. *Brucella* Serum tüp aglütinasyon (SAT) antijeni ile yapılan aglütinasyon testini gold standart olarak kabul ettiklerinde *R. tropici* antijeninin koyunlarda sensitivite ve spesifitesini sırası ile % 80.1 ve % 59.5; sığırlarda %81.1 ve % 22.6 olarak bulmuşlardır. Bu bulguların ışığında *R.tropici* tüm hücre antijeni ile yapılan aglütinasyon testinin sığır ve koyunlarda brusellozun serolojik tanısında kullanılmayacağını, ancak bu hayvanların *R.tropici*'ye karşı antikor geliştirdiklerinden yanlış pozitiflik yönünden göz önünde bulundurulmaları gerektiğini bildirmişlerdir.

LPS antijenleri humoral bağışıklıkta, OMP antijenleri ise hücresel bağışıklıkta rol oynar.

Smooth lipopolisakkarit (S-LPS) lipid A, kor bölgesi ve O-polisakkaritten müteşekkil olup *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerin LPS tabakası ile benzerlik göstermektedir. S-LPS, M ve A diye isimlendirilen epitoplara ihtiva eder. M ve A epitoplarına karşı monoklonal antikor kullanımı, LPS'ye uygulanan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve sentez yoluyla elde edilen *Brucella* oligosakkaritleri kullanılarak yapılan inhibisyon çalışmalarıyla A ve M antijenlerinin linear O zinciri üzerinde bulunan 1,2 ve 1,3 bağlantılarının oranlarına göre birbirlerinden ayrıldığı saptanmıştır.

Smooth (S) ve Rough (R) suşlarda duvar yapısı benzerlik göstermektedir. Ancak R-LPS'de S-LPS'den farklı olarak O-polisakkarit ya indirgenmiş ya da tamamen yoktur. Dolayısıyla R-LPS'de daha geniş bir kor polisakkariti mevcuttur. R-LPS protein ve nükleik asit ihtiva etmez. Ayrıca R-LPS'de kinoyozamin dışındaki yağ asitleri S-LPS ile aynı yapıdadır.

A epitopunu içeren serotiplerde O-polisakkarit, α -1,2 bağlı 4,6-dideoksi-4-formamido-D-mannopiranosil (N-formil perosamin)'in linear bir homopolimeri olup *Yersinia*

enterocolitica O:9'un LPS'si ile birebir uyumaktadır. M epitopunu içeren serotiplerde ise O-polisakkarit, dördü α -1,3 bağlı, biri ise α -1,2 olmak üzere beş adet N-formil perosamin'in tekrarlayan kısımlarından oluşur(20,22).

A ve M epitoplarına karşı kullanılan monoklonal antikolar ile yapılan immunobloting ile A ya da M determinantına karşı reaksiyon oluşmakta ve aynı anda her iki antijene karşı reaksiyon oluşmamaktadır. Bu durum her iki antijeni taşıyan türlerdeki (*B. suis* biyotip 4 ve *B. melitensis* biyotip 3) A ve M tipindeki LPS'lerinin ayrı ayrı sentezlendikleri şeklinde açıklanmaktadır.

A ve M epitopları *Brucella* türlerinde farklı oranlarda bulunmaktadır. M epitopu *B. melitensis*'te somatik antijenlerden dominant olanıdır(A/M=1/20). A epitopu ise *B. suis* ve *B. abortus*'ta dominant somatik antijendir(A/M=20/1). Dolayısıyla jel difüzyon ve aglütinin absorpsiyon testleriyle *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. abortus*'tan ayırt edilebilirken *B. ovis*'i *B. abortus*'tan ayırmak olanaksızdır(21,22).

LPS virulans faktör olarak tanımlanır. S-LPS ihtiva eden suşların virulansı yüksektir. Ayrıca bu suşlar polimorf nüveli lökositlerce hücre içi öldürülmeye karşı rezistans gösterirler. R-LPS ihtiva eden suşlar düşük virulansa sahiptir. R-LPS içeren *B. canis* ve *B. ovis* diğer Rough suşlardan daha yüksek virulansa sahiptirler(22,23).

B. canis ve *B. ovis* R-LPS ihtiva eden rough suşlar iken *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* ise S-LPS veya R-LPS ihtiva eden rough veya smooth suşlardır. *B. neotomae* da smooth suşlardan oluşmaktadır(22,24).

Brucella türleri ile bazı bakteriler (*Salmonella* O:30, *Vibrio cholerae* O:1, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia*) arasında LPS tabakalarındaki N-formil perosamin'ler arasındaki benzerlikten dolayı çapraz reaksiyonlar görülür(22,25).

Siklik D-glukanlarından mütevelliit düşük molekül ağırlıklı bir şeker olan polisakkarit B (Poly B) ile O polisakkarit zincirinin kor bölgesi şekerlerini ihtiva etmeyen formu olan natif haptin (NH) *Brucella* bakterilerinin iki önemli polisakkarit yapısındaki antijenik yapılarıdır.

Outer membrane proteins (OMP) *Brucella* bakterilerinin önemli virulans faktörleridir. OMP'ler grup 1, grup 2 ve grup 3 outer membrane proteins olmak üzere üçe ayrılırlar. Grup

1 OMP'ler 88-94 kDa molekül ağırlığına, grup 2 OMP'ler (porin proteinler) 35-40 kDa molekül ağırlığına, grup 3 OMP'ler ise 25-30 kDa molekül ağırlığına sahiptirler. Enterobacteriaceae ailesinde dış membranda fosfoditiletalonamin açısından zengin iken *Brucella* türlerinde dış membran fosfoditilkolin bakımından zengindir. Dolayısıyla *Brucella* türlerinde polimiksin gibi antibiyotiklere direnç gelişmesi LPS'nin anılan antibiyotiklere bağlanamamasından kaynaklandığı rapor edilmiştir.

OMP2 porin protein profillerinin *Brucella* türlerini sınıflandırmada kullanılabileceği bildirilmektedir(22,26).

Brucella türü bakterilerin tür ve biyotip düzeyinde tanımlanmalarını mümkün kılan tiyonin duyarlılığı testinde kullanılan tiyonin minimum 0,7 nm çapında hidrofilik bir boya olup porin kanallarının penetrasyonunda rol aldığı bildirilmektedir. OMP2a geninin 108 bp'lik bir segmenti delesyona uğratmak suretiyle üreme yeteneğini yok ettiği bildirilmiştir.

Other membrane proteins (OMP)'in yanı sıra *Brucella* protein antijenlerinin büyük bölümü hücre içerisinde yer almaktadır. Hücre içerisinde yer alan bu antijenik yapılar (A1, A2, A5,.....X antijenleri) deri testlerinde yer alırlar.

Günümüze değin yapılan çalışmalarda saf ribozomal preparasyonların hücre aracılıklı immün yanıtı ve antikorları devreye koydukları, *Brucella*'ya karşı koruma sağladıkları saptanmış günümüzde de ribozomal proteinlerin immünolojik açıdan önemli bileşenler oldukları saptanmıştır(20,22).

2.3. *Ochrobactrum* spp.

O. anthropi(önceden *Achromobacter* spp.), doğada yaygın olarak bulunan, aerob, laktozu fermente edemeyen, göreceli olarak düşük virulansa sahip, non-fermenter, Gram negatif çomaklardır. *Brucella*'ya benzer olarak Proteobakterilerin alfa-2 alt bölümüne dahildir ve iki kromozomu vardır. Tip suşu ATCC 49188'dir(=LMG 3331=NCTC 12168). Eskulin ve fenilalanin testleri pozitif, oksidaz pozitif, indol negatiftir. Hızlı üreaz reaksiyonu verirler. Peritriköz flagellalarıyla hareketlidirler. Mac Conkey agarda hızlı ürerler. *Ochrobactrum*genusu diğer alfa proteobakterilere benzer bir şekilde *Brucella*genusu ile yüksek fenotipik benzerliklerden dolayı bazı rutin biyokimyasal testleri benzerlik göstermektedir(27).

Son derece virulent bir bakteri olan *Brucella*'ya yakın filogenetik ilişkisi nedeniyle *Ochrobactrum* dikkat çekmiştir. Fenotipik analizler *O. anthropi*'nin *Brucella* virulansında kritik olduğu bilinen hücre duvar moleküllerini sergilediğini ortaya koymuştur. Bunlar fosfoditilkolin ve çok uzun zincirli yağ asitleri olan lipit A'yı içeren lipopolisakkarittir. Aynı zamanda Brucellaceae ailesindeki diğer üyeler gibi, *O. anthropi* tipik bir Gram negatif bakteride bulunandan daha yüksek karbon sayılı serbest lipitleri taşımaktadır(28).

DNA-rRNA hibridizasyon verilerine göre *O. anthropi*'nin en yakın akrabaları *Brucella*, *Phyllobacterium*, *Agrobacterium*, *Mycoplana* ve *Rhizobium*'dur. Bütün bu organizmalar rRNA süperfamilya IV. Grubuna aittirler(29).

Son yapılan çalışmalar *O. anthropi* ile *Brucella* türleri arasında immünolojik çarpaz reaksiyonları ortaya koymuştur. Bu antijenlerin Rough lipopolisakkarit ve eriyen bir takım membran proteinleri olduğu bildirilmiştir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında *Ochrobactrum* genusunun *O. anthropi* ve *O. intermedium* olarak iki türe ayrıldığı bildirilmiştir. *O. intermedium*'un *Brucella*'ya *O. anthropi*'den daha fazla genetik ve antijenik benzerlik gösterdiği belirtilmiştir(30,31).

DNA-rRNA hibridizasyonu yanında, *Brucella* ve *Ochrobactrum* arasındaki yakın ilişki diğer testlerle de ortaya konmuştur. Örneğin, Romero ve ark. (32)'nin *B. abortus*'un 16S rRNA sekansına yönelik tasarlamış oldukları bir çift primer, *O. anthropi* biyotip D suşundan 905 bp'lik bir fragmenti çoğaltmıştır. Yine benzer olarak bir başka çalışmada, *Brucella* 16S rRNA ve DnaK, DnaJ ve GroEL gibi ısı şok proteinlerini kodlayan spesifik genler için tasarlanmış 4 çift primerin kullanıldığı PCR, *Brucella*'yı *O. anthropi*'den ayıramamıştır. Da Costa (33) ve Cloeckart ve ark. (34), yaptıkları çalışmada *Brucella* dış membran lipoproteinleri Omp 10, Omp 16 ve Omp19'a yönelik spesifik monoklonal antikörlerin çoğunun ELISA'da *O. anthropi* (LMG 3331), *O. intermedium* (LMG 3301) ve *Phyllobacterium rubiacearum* ile kuvvetli çarpaz reaksiyon verdiklerini, bu yanıtın *Rhizobium* ve *Agrobacterium* için daha zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Ancak monoklonal antikörlerin hiçbiri S-LPS ile çarpaz reaksiyon veren *Y. enterocolitica*, *E. coli* O:157 veya *Salmonella urbana* gibi bakterilerle çarpaz reaksiyon vermemiştir. İmmunoblotting de ELISA ile aynı reaksiyonları vermiş ancak Omp10 için spesifik olan monoklonal antikörler sadece *Brucella* ile reaksiyon vermiştir. Araştırmacılar Omp 10 ve Omp19'un sadece *Rhizobiaceae*'da rastlanılan yeni bir OMP ailesi olabileceğini öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar bu bulgular

ışığında *Brucella* ile infekte konakçılarda çeşitli testler ile açığa çıkan immun reaksiyonun sadece *Brucella* için spesifik olamayabileceği ve sağlıklı hayvanların OMP'lerine karşı çıkan yanıtın *O.anthropi* ve yakın ilişkili diğer bakteri kaynaklı olabileceğinin hatırlanması gerektiğini bildirmişlerdir. *Brucella* infekte koyun ve keçi serumları *Brucella* grup 3 OMP'ye *O.anthropi* proteinlerine benzer moleküler ağırlıklarda yanıt vermişlerdir. Ancak *O.anthropi* LPS'nin O spesifik polisakkaritine *Brucella* infekte konakçı serumlarının hiçbirinden pozitif bir yanıt alınmamıştır. Bununla birlikte *B.melitensis* ile infekte koyun keçi ve tavşan serumu *O.anthropi* rough LPS'sine ve lipid A'ya immunoblotting testinde pozitif yanıt vermişlerdir.

O. anthropi toprakta, suda ve hastane cihazlarında serbest olarak bulunup insanlar için fırsatçı patojen olabilmektedir. Bazı araştırmacılar *O. anthropi*'nin sülüklerin normal florasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla hirudoterapi uygulamalarında bu konunun üzerinde durulması gerekir(27).

O. anthropi suşlarının başlıca izole edildikleri klinik örnekler kan, yara yeri, dışkı, ürogenital ve solunum sistemi örnekleri, kulak, göz ve beyin-omirilik sıvısı (BOS) olgusu bildirilmiştir.

Son yıllarda *O. anthropi*'nin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarda artış olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyonlar her ne kadar immunsupresif hastalarda (organ transplantı, AIDS, kanser hastaları gibi risk grupları) daha sık görülse de immün sistemi baskılanmamış kişilerde de bu mikroorganizmanın etken olduğu farklı klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir.

O. anthropi enfeksiyonlarının rapor edildiği olguların büyük çoğunluğu santral venöz kateter ve hemodiyalizle ilişkili sepsis olmasına rağmen nekrotizan fasciit, endoftalmit, enfektif endokardit, menenjit, pelvik abse, pankreatik abse, peritonit, osteomyelit, osteokondrit ve üriner sistem enfeksiyonlarından da sorumlu tutulmaktadır(35).

O.anthropi aminoglikozitler, gentamisin, sulfonamidler, trimetoprim/sülfametoksazol, rifampisin, tetrasiklin, kotrimoksazol, siprofloksasin, karbapenem ve kinolonlara duyarlı ancak beta-laktam (karbapenemler hariç), kloramfenikol, makrolid ve trimetoprim antibiyotiklere dirençlidirler.

O. anthropi' nin yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirmesi hastane ortamında kolaylıkla yaygınlaşmasını mümkün kılmaktadır. Dolayısıyla ampirik tedavide özellikle immunsupresif hastalarda bu durum dikkate alınmalıdır(27,29).

2.4. *Rhizobium* spp.

Rhizobium türleri (önceden *Agrobacterium*); doğada yaygın olarak bulunan, aerob, düşük virulans gösteren, Gram negatif çomaklardır. Katalaz pozitif, oksidaz pozitif, hareketli olup spor oluşturmazlar. Yeast Mannitol Agar(YMA)'da beyaz saydam veya hafif mat, mukozlu, yuvarlak kabarık koloniler oluştururlar.

Başlangıçta hastalığa neden olan bir patojen olarak değil, kolonizasyon ya da kontaminasyonda rol aldıkları düşünölmüştür. Ancak daha sonra *R. radiobacter*'in insanda fırsatçı patojen olduğu ve *Rhizobium* türleri içerisinde en sık enfeksiyona sebep olan tür olduğu bildirilmiştir. Genel olarak bakteremi ve yabancı cisim varlığında enfeksiyona sebep olduğu belirtilmektedir.

Toprakta, suda, bitkilerin kök kısmındaki nodozitelerde ve hastane cihazlarında yaygın olarak bulunur. *R. radiobacter* kateter kökenli enfeksiyonlara, endoftalmit, bakteremi, peritonit, protez kapak endokarditi, ürogenital sistem enfeksiyonları ve selülitten sorumlu tutulmaktadır(36).

R. radiobacter enfeksiyonları genellikle immunsupresif hastalarda(AIDS, Kanser hastaları, organ transplantı gibi risk grupları) veya yabancı cisim varlığında(sıklıkla santral intravenöz kateter kullanımı-protez) gelişebilmektedir. Ancak immunsupresif olmayan sağlıklı kişilerde de enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir(37).

R. radiobacter'e bağlı olarak gelişen enfeksiyonlarda hastanın antibiyotiğe verdiği yanıt güçlüdür. Ancak yabancı cisim varlığı söz konusu ise hasta antibiyotiğe yanıt vermeyebilir. Bu durumda kateterin çıkarılması gerekmektedir(36).

R. radiobacter kolistin ve imipenem'e duyarlı iken seftriakson, amikasin, piperasilin-tazobaktam, sefepim ve siprofloksasin'e dirençlidir(37).

Patojen *Rhizobium* türlerinin yanında baklagillerin köklerinde nodül oluşturup baklagillerle simbiyotik ilişkisi olan, biyolojik azot fiksasyonunu gerçekleştiren türler de

mevcuttur. Bu türler bütün hayat formlarının temelini oluşturan nükleik asit ve proteinlerin yapıtaşı olan azot(N)'u havadan moleküler formda(N₂) alıp sentezledikleri nitrojenaz enzimiyle amonyağa indirgeyip toprağa fikse ederek bitkinin alabileceği forma dönüştürürler. Bitki tarafından alınan yarayışlı azot bitkinin ve azot döngüsü vasıtasıyla da tüm canlıların üreme ve gelişmelerinde gerekli bileşiklerin oluşumunda biyolojik sistemler tarafından kullanılır. Bu yolla toprağa bağlanan azotun 75-300 kgN/ha veya 75x10⁶ ton.yıl⁻¹ olduğu kabul edilmektedir(38).

Bitkilerle simbiyotik ilişkisi olan bu *Rhizobium* türleri aynı zamanda bitkiler için azottan sonra en önemli besin elementi olan fosforu yarayışsız halden bitki tarafından alınabilir bir forma dönüştürürler. Bu işlem fosfataz enzimi ve 2-ketoglukonik asit sentezi ve H⁺(proton) pompası mekanizması ile toprağın PH'ını değiştirmek suretiyle gerçekleştirirler. Bu türler ayrıca fitohormon (Indol-3-asetik asit(IAA), sitokinin, gibberrellin) üreterek bitkilerdeki fizyolojik olaylara müdahalede bulunurlar. Ayrıca Etilen hormonunun blokleri olan ACC (1 amino cyclopropan-1-carboxylic acid) deaminase sentezleyerek kök uzamasını teşvik ederler(39).

IAA floem ve ksilemin farklılaşması, yaprak yaşlanmasının gecikmesi, meyve tutumu ve gelişmesi, çiçek gelişiminin artırılması, kambiyum hücrelerinin bölünmesi, hücre uzamasının teşviki, bitkinin apikal gelişmesi ve meyve olgunlaşmasının geciktirilmesi gibi fizyolojik olayları kontrol ederken, Sitokinin hücre çoğalması, hücre genişlemesi, doku genişlemesi, gibi fizyolojik olayları kontrol eder. Gibberrellin ise hücre büyümesi ve bölünmesini uyararak gövde ve yaprakların uzamasını, çiçeklenmeyi teşvik eder. Tohumda dormansinin kalkmasını sağlayarak çimlenmeyi teşvik eder(40).

Simbiyotik *Rhizobium* türleri toprakta sınırlı miktarda bulunan demir elementini almak için siderofor denen bileşikler üretirler. Bu türler hem kendi sentezledikleri sideroforları hem de patojen mikroorganizmalar tarafından sentezlenen sideroforları kullanabilirken patojen mikroorganizmalar sadece kendi sentezledikleri sideroforları kullanabilirler. Böylece besin maddeleri açısından rekabet sağlanarak patojenler baskılanmış olur. Patojenler demir elementini alamayınca bitkilerde kök uzamasını engelleyen HCN sentezini de gerçekleştiremezler.

Simbiyotik *Rhizobium*'lar bitkinin direncini artırarak ve bitkiyi koruyarak patojenlere karşı biyokontrol ajanı olarak görev yaparlar. Bitki savunma mekanizmalarını teşvik ederek dolaylı, rekabet ve antibiyosis ile patojenin gelişimini yavaşlatarak direkt olarak hastalık üzerinde etkili olmaktadır(41).

Ayrıca antimikrobiyal aktivite gösteren ekstrasellüler bileşikler(bakteriyosinin) üretip rizosfere salarak ve toksik maddeler(fitoaleksin) sentezleyerek patojenleri baskırlarlar.

Rhizobium'lar baklagiller dışındaki birçok bitkinin kökünde kolonize olabilirler. Baklagil olmayan bitkilerin endofitleri olduğu bildirilmiştir.(42)

Bu çalışmanın temel amacı *Brucella* genusunun en yakın akrabası olan alfa-*Proteobacteria* grubundaki *Rhizobium* ve *Ochrobactrum* genuslarında bulunan bakteriler gibi non patojenik bakterilerden elde edilen antijenlerin *Brucella* gibi virulensi bir hayli yüksek olan bir patojenin neden olduğu insan, sığır, koyun ve köpek brusellozunun serolojik tanısında kullanılıp kullanılmayacağını belirlemesidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Antijen Hazırlanmasında Kullanılan Besiyeri ve Solüsyonlar

Serum Dekstroz Agar (SDA):

Triptik soy agar	40 g
Distile su	900 ml
Steril fötal calf serumu	50 ml
Steril dekstroz solusyonu	50 ml
pH	7,2±0,2

40 g triptik soy agar 900 ml distile su içerisine katılarak su banyosunda 100°C'de eritilip pH 7,2±0,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 20 dakikadasterilize edildi. Ardından 56°C'ye soğutuldu. Daha sonra besiyerine son konsantrasyonu %5 olacak şekilde fötal calf serumu ve %1 olacak şekilde 0,2 µm'lik filtreden süzölmüş %20'lik stok dekstroz çözeltisinden 50 ml katılarak petrilere taksim edildi. Petrilere sterilizasyon kontrolünden sonra buzdolabında +2°C/+8°C'de saklandı.

Dengeli Tuzlu Su (PBS):

Di-sodiumhydrogenorthophosphate (Na ₂ HPO ₄)	1,4 g
Sodiumchloride (NaCl)	7,0 g
Potassiumchloride (KCl)	0,2 g
Potassium di-hydrogenphosphate (KH ₂ PO ₄)	2 g
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır.

Hazırlanan solüsyonun pH değeri 7,2'ye ayarlandı ve 121°C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

ELISA Pleyt Kaplama Solüsyonu:

Sodiumhydrogencarbonate	2,93 g
Sodiumcarbonate	1,59 g
Distile su 1000 ml'ye tamamlandı	(pH 9,6)

Yıkama Solüsyonu:

PBS	1 L
Tween- 20	1 ml

3.1.2. Bakteriyel Suşlar

Çalışmada kullanılan *O.anthropi* (LMG 3331) ve *O.intermedium* (LMG 3301) standart suşları ve *B.abortus* S99 suşundan elde edilmiş smooth lipopolisakkarit (S-LPS) antijeni Animal Plant Health Agency (APHA) (Hayvan Bitki Sağlığı Ajansı), Weybridge, İngiltere'den temin edilmiştir. *R.tropicı* standart suşu ise Selçuk Üniversitesi Prof. Dr. Uçkun Sait UÇAN tarafından temin edilmiştir. *B. abortus* S99 standart antijen suşu laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunmaktadır.

3.1.3. Serum Örnekleri

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı serum bankasında bulunan, daha önce yapılan çalışmalarda kullanılmış ve bruselloz yönünden doğruluğu kültür ile doğrulanmış 30 sığır, 24 koyun, 22 köpek ve 20 insan serumu çalışmada *Brucella* antijeni ile birlikte diğer test antijenlerinin ELISA ile değerlendirilmesinde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Aynı şekilde bruselloz yönünden negatif anamnezi olan ve klasik serolojik yöntemlerle negatif bulunan 17 sığır, 23 koyun, 25 köpek ve 27 insan serumu çalışmada her bir test antijeni için eşik değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Antijen Üretimi

Antijen olarak tüm test suşlarından ham LPS izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, Yi ve Hackett (43)'in bildirmiş olduğu Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Bu

amaçla, *O. anthropi* (LMG 3331), *O. intermedium* (LMG 3301), *R. tropicive* *B.abortus* S99 suşları serum dekstroz agar (SDA)'da üretildikten sonra, üreyen koloniler sterilite ve saflık yönünden kontrol edildiler. Uygun bulunun petriyelerdeki üreyen kültürler PBS ile toplandılar. Toplanan kültürler su banyosunda 80°C'de 90 dakika bekletilerek öldürüldü. Isı ile öldürülen kültürlerden örnek alınarak SDA petriyelerine ekildi ve ekimi yapılan petriyeler 37°C'de 1 hafta süre ile inkübe edilip canlı bakteri olup olmadığı tespit edildi. Ölü bakteri süspansiyonu, +4°C'de 3500 rpm'de santrifüj edilerek üstteki besiyeri uzaklaştırıldı ve alttaki ölü bakteri pelleti toplandı. Toplanan her bir gram bakteri pelleti için 2 ml Tri-reagent kullanıldı. Karışım oda ısısında 10-15 dakika tam bir homojenizasyon için bekletildi. Bu sürenin sonunda, faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri pelleti için karışıma 200 µl kloroform eklendi. Süspansiyon vortekste hızlıca karıştırılarak 10 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra 12000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Böylece su ve organik fazlar ayrıldı. Su fazı yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne transfer edildi. Organik fazın üstüne 100 µl distile su eklendi ve karışım tekrar 12000 g'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazı bir önceki su fazı ile kombine edildi ve elde edilen bu Tri-reagent ile ekstrakte edilen LPS çözeltisi, -20°C'de muhafaza edilen %95'lik etanol içinde hazırlanan 0,375 M magnezyum klorid ile karıştırıldı. Bu karışım 12000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet 200 µl distile su içinde süspanse edildi. Daha sonra küçük miktarlarda steril PCR tüplerine taksim edilerek -20 °C'de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı. Antijen çözeltisindeki protein miktarı sığır serum albümin pozitif kontrol olarak kullanılarak bicinchoninic asit (Pierce) yöntemi ile saptandı.

3.2.2. İndirekt ELISA

Çalışmada kullanılacak olan her bir test ELISA solid faz antijeni 0,1 µg/kuyucuk olacak şekilde 0,05M sodyum karbonat (pH 9,6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı maxisorp polistiren pleytlerin (NUNC 692620) blank (kör) olarak kullanılan H11 ve H12 nolu kuyucukları hariç diğer tüm kuyucuklarına 100 µl olarak taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler +4 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ardından pleytler %3'lük skim milk içeren PBS solüsyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytler %0,05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandılar. Primer antikör bağlanması aşamasında, her hayvan türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 skim milk içeren PBS/T

solüsyonu içinde 1:50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl olarak konuldu. Pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile shaker üzerinde inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini belirlenen dilüsyonda %1'lik skim milk içeren PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve % 0.03 H₂O₂) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H₂SO₄ ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Her bir ELISA modeli için eşik değeri negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması artı 2 standard sapma olarak belirlendi.

3.2.3. Sensitivite ve Spesifisite Saptanması

Her bir antijenin her bir konakçı türü için sensitivite ve spesifisitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Sensitivite = $\frac{\text{Brusella Pozitif Serumlar}}{\text{Brusella Pozitif Serumlar} + \text{Yanlış Negatifler}}$

Spesifisite = $\frac{\text{Brusella Negatif Serumlar}}{\text{Brusella Negatif Serumlar} + \text{Yanlış Pozitifler}}$

4. BULGULAR

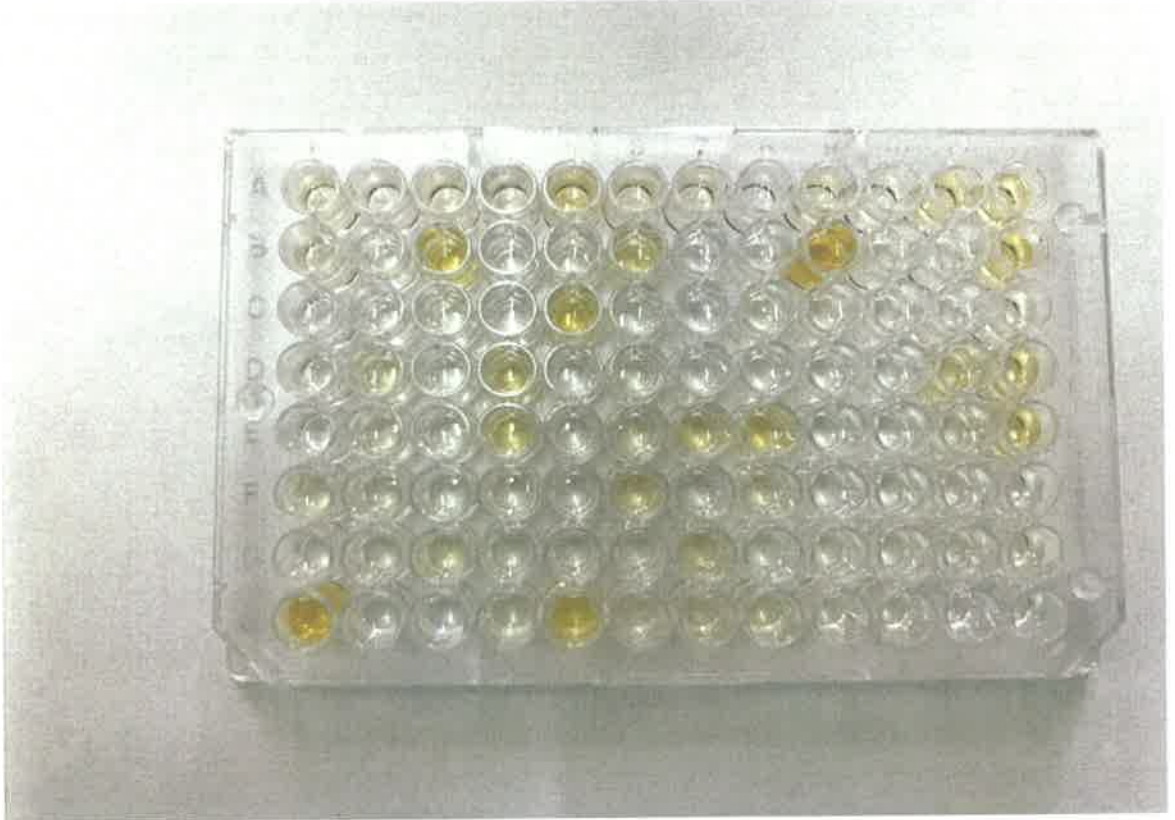
Farklı *Brucella* türleri ile infekte insan ve hayvanlardan alınan, kültürel ve/veya serolojik testler ile pozitifliği teyit edilmiş pozitif kontrol serumları ve sağlıklı birey ve hayvanlardan alınan negatif kontrol serumları, *O.anthropi*, *O.intermedium*, *R.tropici* ve *B.abortus* S99 bakterilerinden elde edilen ham LPS antijenlerine karşı in house indirekt ELISA ile test edildiler. Tablo 1. *O. anthropi*, *O. intermedium*, *R. tropici* ve *B. abortus* S99 türlerinden izole edilen ham lipopolisakkarit (LPS)'e karşı koyun, inek, insan ve köpeklerin *Brucella* (+) ve *Brucella* (-) serumlarıyla oluşmuş reaksiyonların OD değerlerinin ortalamasını göstermektedir. Alınan sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, antijenlere karşı ortaya çıkan serolojik reaksiyon, *Brucella* antijeni ile karşılaştırıldığında diğer bakteriler için düşüktü. Ancak *Brucella* dışındaki diğer bakteriler kendi aralarında karşılaştırıldığında, en kuvvetli serolojik reaksiyonu insanlardaki sonuçlar hariç, *O.intermedium* gösterdi. Brusellozun serolojik teşhisinde testin tanısal performansı pozitif ve negatif serumlar arasındaki OD farkına bağlı olduğundan, yine *O.intermedium* koyunlarda ve köpeklerde bu farkın diğerlerine göre en fazla olduğu bakteri oldu.

Tablo 1. Her bir antijen türünün her bir konakçıda oluşturmuş olduğu serolojik yanıtın OD ortalaması alınarak gösterilmesi

	KOYUN (+)	KOYUN (-)	İNEK (+)	İNEK (-)	İNSAN (+)	İNSAN (-)	KÖPEK (+)	KÖPEK (-)	BLANK	BLANK
A	0,5383	0,1969	0,4267	0,7821	0,5700	0,5743	0,5291	0,4380	0,0418	0,0436
İ	1,0019	0,3864	0,7517	0,5288	0,2997	0,2245	0,6728	0,2636	0,0422	0,0525
T	0,5809	0,1977	0,2512	0,6785	0,3455	0,2553	0,3432	0,4229	0,0420	0,0403
B	2,4027	0,5221	2,1950	0,4637	2,1607	0,3313	1,0663	0,3981	0,0410	0,0422

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Her bir ELISA için eşik değeri sağlıklı insan/hayvanlardan elde edilen optik dansite (OD) değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir tür için değerlendirildiğinde, koyun brusellozunun tanısında *O. anthropiham* LPS antijeninin kullanıldığı ELISA modelinin sensitivitesi % 42, spesifisitesi % 92 iken, *O. intermedium* için sensitivite % 71, spesifisite ise % 84 olarak bulundu. *R. tropici* ELISA modelinde ise sensitivite % 40, spesifisite % 100; *B. abortus* S99 için hem sensitivite hem de spesifisite % 92 olarak bulundu(Tablo 2.). Pozitif ve negatif kontroller arasındaki OD farkı ($1,0019-0,386=0,6159$) en yüksek olarak *O.intermedium* antijeninin kullanıldığı testte saptandığından *Brucella* antijeninin kullanıldığı test hariç, en yüksek duyarlılık (% 71) bu ELISA modelinde saptandı. Ancak duyarlılık *Brucella* antijeninin kullanıldığı modelde (% 92) belirgin derecede daha yüksekti. *O.intermedium* ham LPS'si ile kaplı ELISA modelinde *Brucella* pozitif ve negatif serumlarının vermiş olduğu reaktivite Şekil 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. *O.intermedium* bakterisinden hazırlanan antijen ile kaplı ELISA pleytinde brusella- infekte ve sağlıklı koyun serumlarının verdiği reaksiyon.

Tablo 2. Koyun brusellozunun tanısında bazı Alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Koyun (+)	Koyun (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5383	0,1969	0.386	42	92
İ	1,0019	0,386	0.546	71	84
T	0,5809	0,1977	0.369	40	100
B	2,4027	0.5221	0,682	92	92

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

İnsan brusellozunun serolojik tanısında ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin sensitivite ve spesifisitesi *O. anthropive* *O. intermedium* için sırası ile % 0, % 100 olarak bulundu. *R. tropici* için yine sırası ile % 0 ve % 100 iken *B. abortus* S99 suşu için % 100, % 93 olduğu saptandı. İnsan negatif kontrol serumlarının *O. anthropi*, *O. intermedium* ve *R. tropici* için yüksek reaktivitesi, pozitif ve negatif kontrol serumları OD farkının olmaması, yüksek eşik değerleri ve dolayısıyla çok düşük sensitivite ve yüksek spesifisite ile sonuçlandı(Tablo 3.).

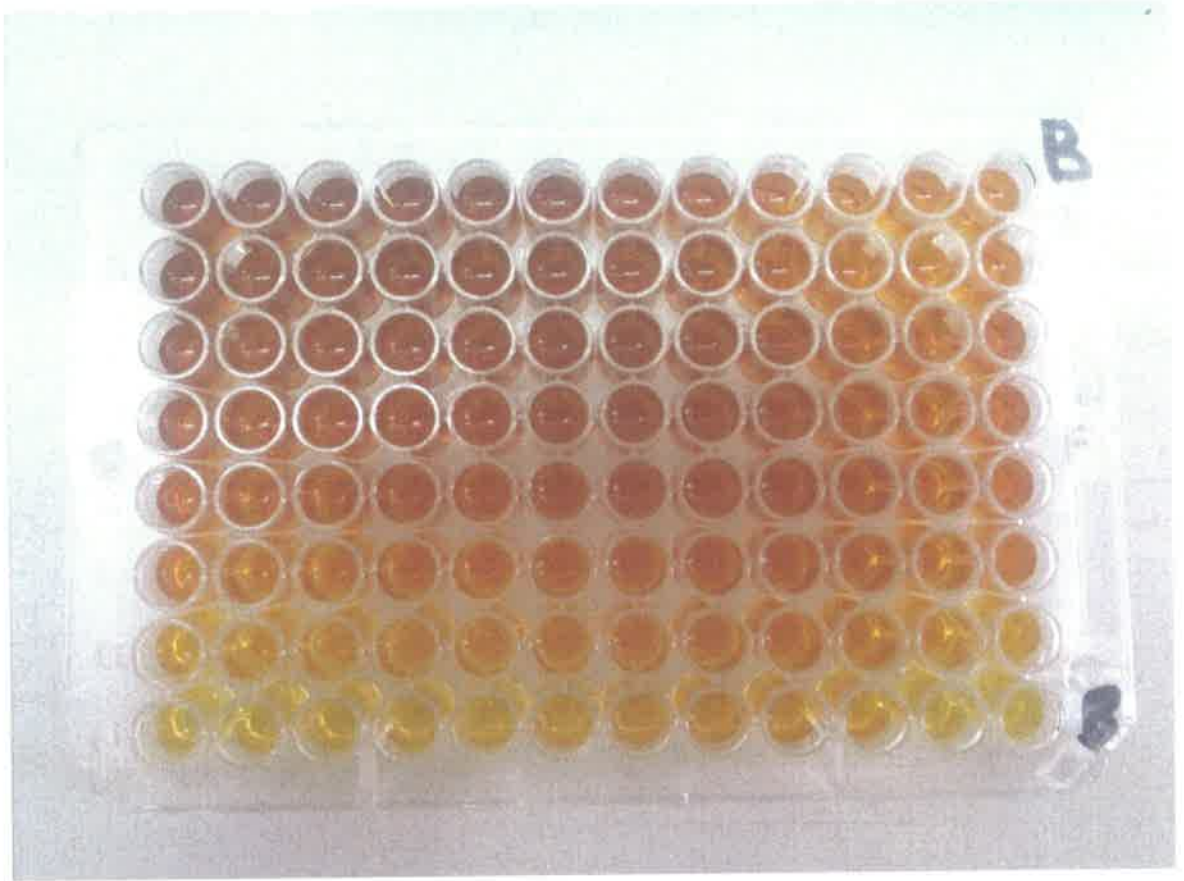
Tablo 3. İnsan brusellozunun tanısında bazı Alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnsan (+)	İnsan (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5700	0,5743	0.687	0	100
İ	0,2997	0,2245	0.365	0	100
T	0,3455	0,2553	0.398	0	100
B	2,1607	0,3313	0.513	100	93

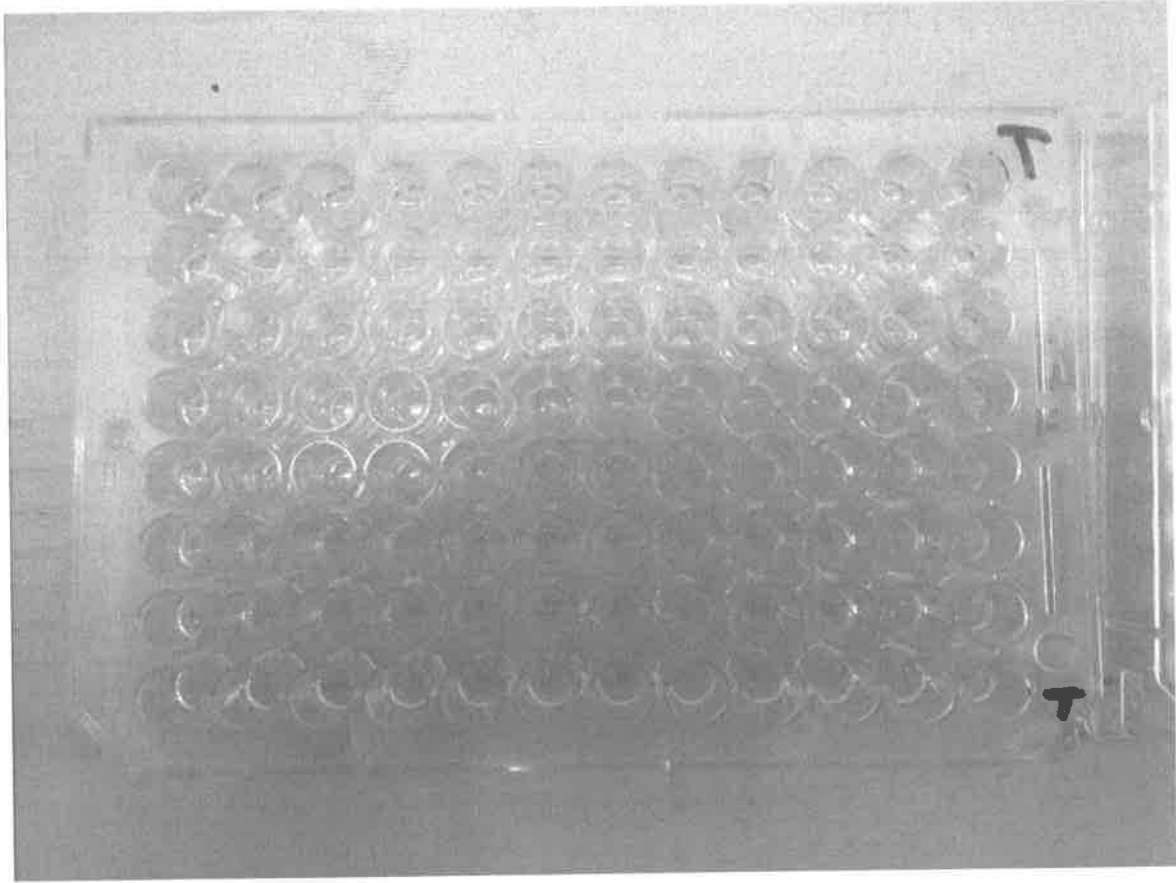
(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Sığır brusellozunun tanısında kullanılan ELISA modellerinde *O. anthropive* *O. intermedium* ham LPS antijenleri için sensitivite % 0, spesifisite % 100 olarak saptandı. *R. tropici* için sensitivite % 0, spesifisite % 100 iken *B. abortus* S99 için sensitivite % 100,

spesifisite ise % 100 olarak saptandı. Sığırlarda negatif kontrol serumlarının yüksek reaktivite göstermesi, negatif kontrollerin OD değerlerinin *O. anthropi* ve *R. tropici* için pozitif kontrollerden çok daha yüksek olması, yüksek eşik değerleri ve testlerin hiçbir tanısal sensitivite göstermemesi ile sonuçlandı(Tablo 4). Dört ayrı bakteri suşundan hazırlanan ham LPS antijenlerinin sığırlarda pozitif *Brucella* serumu ile karşılıklı titrasyonu (checkerboard) yapıldığında kontrol için en yüksek reaktiviteyi *B.abortus* S99 LPS'si gösterirken(Şekil 2), en düşük reaktiviteyi *R.tropici* gösterdi(Şekil 3).



Şekil 2. *Brucella abortus* S99 ham LPS antijeninin optimum dilüsyonunun saptanmasında *Brucella* pozitif serumla karşılıklı titrasyonu (Checkerboard)



Şekil 3. *Rhizobium tropici* ham LPS antijeninin optimum dilüsyonunun saptanmasında *Brucella* pozitif serumla karşılıklı titrasyonu (Checkerboard)

Tablo 4. Sığır brusellozunun tanısında bazı Alpha-Proteobacteria ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnek (+)	İnek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,4267	0,7821	0.945	0	100
İ	0,7517	0,5288	0.648	0	100
T	0,2512	0,6785	0.823	0	100
B	2,1950	0,4637	0.578	100	100

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Köpek brusellozunda *O. anthropi* LPS antijeninin kullanıldığı ELISA modelinde sensitivite % 7.3, spesifisite % 100, *O. intermedium* için ise sensitivite % 69, spesifisite % 78 olarak bulundu. *R. tropici* için sensitivite % 0, spesifisite % 100 iken *B. abortus* S99 için

sensitivite % 76 ve spesifisite % 85 olarak saptandı(Tablo 5.). Köpeklerde negatif kontrol serumları *O.intermedium* için diğer türlerdeki gibi yüksek bir reaktivite göstermedi ve pozitif ve negatif serum OD değerleri arasında belirgin bir fark vardı. *B.abortus* S99 antijenin kullanıldığı ELISA modeli diğer türlere göre en düşük reaktivite gösterdi (Tablo 5).

Tablo 5. Köpek brusellozunun tanısında bazı Alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Köpek (+)	Köpek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5291	0,4380	0.521	7.3	100
İ	0,6728	0,2636	0.332	69	78
T	0,3432	0,4229	0.512	0	100
B	1,0663	0,3981	0.497	76	85

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O.anthropi* İ: *O.intermedium* T: *R. tropici* B: *B.abortus*

5. TARTIŞMA

Brucella cinsinin üyeleri insanlarda ve çiftlik hayvanlarında önemli bir infeksiyon olan bruselloza neden olurlar. Bu cinsin üyeleri, içinde *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Phyllobacterium* gibi daha bir çok bakteri cinslerinin bulunduğu *Proteobacteria* alfa 2 alt grubuna dahildir(1). *Brucella* ile bazı alfa-*proteobacteria* üyeleri arasında yakın genetik ve antijenik yakınlık olduğu, bu yakınlığın çeşitli serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar olarak da ortaya konduğu bir çok kaynakta bildirilmektedir(4,19,29,30,31). Çoğu *Brucella* türünün yüksek patolojik potansiyeline karşılık, çoğu alfa-*proteobacteria* sağlıklı bireyler için ya patojenik değildir ya da çok sınırlı bir patojenite göstermektedir. Özellikle *O.anthropi* ile immun yetmezliği olan bazı hastalarda infeksiyonlar bildirilse de sağlıklı bireyler için bir risk bulunmadığı kabul edilmektedir(28).

Yaygın patojenler arasında ortaya çıkan çapraz reaksiyonlar bu patojenler tarafından ortaya çıkan infeksiyonların ayırıcı tanısında bazı zorluklar ortaya çıkardığı için istenmeyen bir durumdur. Ancak çapraz reaksiyon veren türlerden biri patojenik değilse, bu çapraz reaksiyonun patojen olanın oluşturduğu infeksiyonun saptanması noktasında tanısız bir yararı olabilir. Bu çalışma bu ihtimalin araştırılması üzerine planlanmış bir çalışmaydı. Bu amaçla *Brucella* etkenleri ile infekte olmuş insan ve hayvanlardan alınan, pozitifliği teyit edilmiş pozitif serumlar ve sağlıklı birey ve hayvanlardan alınan negatif kontrol serumları, *O.anthropi*, *O.intermedium*, *R.tropicus* ve *B.abortus* S99 bakterilerinden elde edilen ham LPS antijenlerine karşı in house indirekt ELISA ile test edildiler.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde *Brucella*-infekte serumlar ile test edilen alfa 2 *Proteobacteria* üyeleri düşük reaktivite gösterdiler. Oysa Velasco ve ark. (30), *B.melitensis* ve *O.anthropi* kökenli sitosolik proteinlerin ve membran antijenlerinin çok geniş çaplı çapraz reaksiyon verdiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanında, az oranda çapraz reaksiyonun dış membran proteinleri (OMPs) ve LPS (sadece kor ve lipid A bölgesi) seviyesinde de ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bunun nedeni çalışmamızda kullandığımız antijenin ham olmasına rağmen, yani bir miktar OMPs taşımaya rağmen büyük oranda LPS tabakası olmasıdır. Çalışmada protein yerine LPS antijeninin seçilmesinin nedeni, smooth *Brucella* türlerine maruz kaldıktan sonra gelişen serolojik yanıtın büyük bir oranda S-LPS

tabakasına karşı olmasıdır. Ayrıca S-LPS'ye karşı oluşan antikorlar bugün için kullanılan standard serolojik testlerin temelini oluştururlar(4). Çalışmada ham LPS antijenlerine karşı ortaya çıkan en yüksek serolojik reaksiyon, tahmin edilebileceği gibi *B.abortus* S99 ham LPS antijenine karşı oldu. Bunu çok daha düşük yoğunlukta olmak üzere *O.intermedium*, *O.anthropi* ve *R.tropicı* antijenleri izledi. En yüksek reaksiyonun *O.intermedium* olması bu türün rough LPS taşıyor olmasına bağlandı. Çünkü R-LPS'de S-LPS'den farklı olarak O-polisakkarit ya indirgenmiş ya da tamamen yoktur. Dolayısıyla R-LPS'de daha geniş bir kor polisakkariti mevcuttur(20). Ayrıca DNA hibridizasyon çalışmaları *O.intermedium*'un *Brucella* genusuna *O.anthropi*'den daha yakın olduğunu göstermiştir(29). Velasco ve ark. (31) tüm hücre ekstraktlarını kullanarak yaptıkları Western blot analizinde *O.anthropi* LMG3301'in (*O.intermedium*'un eski adı) *Brucella* antijenlerine *O.anthropi* LMG 3331'den daha yakın olduğunu ve ayrıca yaptıkları konvensiyonel fenotipik karakterizasyon çalışmalarında da bu yakınlığı gösterdiklerini bildirmişlerdir. *O.intermedium*'un çalışmamızda daha yüksek reaktivite göstermesi araştırmacıların bu bulguları ile uyum göstermektedir. Ayrıca, *O.intermedium*'un tür olarak koyun ve köpeklerde daha yüksek reaktivite vermesi ve pozitif ve negatif kontrol serumları arasında bir fark oluşturmasının nedeni koyun ve köpeklerin rough türler olan *B.ovis* ve *B.canis*'in doğal konakçıları olmasına büyük oranda bağlı olabilir. Çalışmamızda koyun brusellozunun tanısında *O. intermedium* ham LPS antijeninin kullanıldığı ELISA modelinin sensitivitesi % 71, spesifisite ise % 84 olarak bulundu. *R. tropici*ELISA modelinde ise sensitivite % 40, spesifisite % 100 olarak tespit edilmiştir. Köpek brusellozunda da sadece *O. intermedium* için ise sensitivite % 69, spesifisite % 78 olarak belirlendi. Uçan ve Aras (4) koyunlarda *R. tropici* ile hazırlanan lam aglütinasyon testinde sensitiviteyi % 80.1 ve spesifisiteyi % 59.5 olarak bulmuştur. Sonuçların farklı çıkmasının nedeni kullanılan testin ve kontrol serumlarının farklı olmasına bağlanmıştır. Zira çalışmada antijen olarak tüm bakteri değil onun bazı dış membran proteinlerini de ihtiva eden ham LPS tabakası ELISA ile test edildi. Ayrıca kullanılan serumlar pozitif ve negatifliği önceden teyit edilmiş serumlardı. Bütün bunlar alınan farklı sonuçların nedeni olabilir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozu açısından test edilen antijenlerin hiçbiri kabul edilebilir seviyede bir sensitivite ve spesifisite göstermediler. Bu türlerde kontrol serumları yüksek reaksiyon gösterdiklerinden eşik değeri çoğu zaman pozitif kontrol ortalamasının üstüne çıktığından % 100 bir spesifisite ve 0 ve 0'a yakın bir sensitivite gösterdiler. Özellikle sığırlarda negatif kontrollerin *R. tropici* ve *O.anthropi* için yüksek OD değeri göstermesi sığırların çoğu bitki patojeni ve toprak bakterisi olan bu türlere fazlaca maruz kalmış olduklarını göstermektedir. İnsanlarda *B.abortus* dışındaki tüm bakteri türleri negatif kontrollere genel olarak düşük bir reaktivite gösterdi. Muhtemelen insanların bu bitki ve çevre patojenleri ile çok maruz kalmadığı düşünülebilir.

Çalışmada sadece rough bir tür olan ve dolayısı ile S-LPS yerine R-LPS taşıyan, O-polisakariti ya indirgenmiş ya da tamamen olmayan *O.intermedium* antijeni ile ve sadece koyun ve köpekte kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanısal performans alınmıştır. Çalışmada alınan tüm sonuçlar dikkate alındığında Proteobakterilerin α -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozun serolojik tanısında birtakım çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği akılda tutulmalıdır. Ancak Brusellozun serolojik tanısında kullanılan antijenler tüm bakteri içerdiklerinden hedefleri anti-LPS antikoru olacaktır. Bu durumda rough olmayan α -2 Proteobakterilerin yanlış pozitiflik için fazla bir sorun yaratacağı düşünülmemektedir. Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B.canis* ve *B.ovis* infeksiyonlarında kullanılma potansiyelini artırabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1-Batut J, Andersson SG, O'Callaghan D. The evolution of chronic infection strategies in the alpha-proteobacteria. Nat Rev Microbiol, 2004;2:933-945.
- 2-Arıca V, Tutanç M, Arıca S, Köksaldı Motor V. Atipik Olarak Makülopapüler Döküntüyle Seyreden İki Kardeş Bruselloz Olgusu. ANKEM Derg , 2010;24(Ek):79.
- 3-Corbel MJ. Brucellosis: An overview. Emerg Inf Diseases, 1997;3(2): 213-221.
- 4-Aras Z, Uçan US. *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* Enfeksiyonlarında Oluşan Antikorların *Rhizobium tropici* Antijeni ile Tesbit Edilmesi. Vet. Bil. Derg. 2008;24(1):47-52.
- 5-İyisan AS, Akmaz Ö, Gökçen Düzgün S ve ark. Türkiye'de Sığır ve Koyunlarda Brucellosis'in Seroepidemiolojisi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 2000;31:21-75.
- 6-Abuharfeil N, Abo-Shehada MN. A Comparison Between Three Serological Tests for *Brucella melitensis* Infection in Sheep. Turk J Vet Anim Sci, 1998;22:119-122.
- 7-tvhb.org.tr/duragan/d/dosya/genelgeler/HayHast_Muc_Kontrol_Genelge_2016-2.pdf
- 8-Türütoğlu H, Mutluer B, Uysal Y. Burdur Yöresinde Toplanan Sütlerin *Brucella* İnfeksiyonu Yönünden Araştırılması. Turk J Vet Anim Sci, 2003;27:1003-1009.
- 9-CloECKaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol, 2002;90:229.
- 10-Erdenliğ Gürbilek S, Baklane A, Saytekin AM, Sağlam G, Karagül S. The Identification of *Brucella* strains during mass vaccination campaign with *B. melitensis* Rev1 and *B. abortus* S19 vaccines in Turkey. Brucellosis 2014 International Research Conference, Federal Institute for Risk Assessment, 2014.
- 11-Office International des Epizooties. Brucellosis Chapter 2.1.4. In:Manuel of the Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris, France, 2016:2-12.
- 12-Erdenliğ Gürbilek S, Keskin O, Büyükçangaz E, Tel O. Evaluation of Usage Indirect ELISA Using Antigens From Two Different *Brucella* Strains in Serological Diagnosis of *B. canis* Infection. Van Vet J. 2016;J27:135-139.
- 13-Tel OY, Erdenliğ Gürbilek S, Keskin O. The Evaluation of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Antigens Prepared from *Brucella abortus* RB51 and *Brucellacanis* M- Variant Strains for Serologic Diagnosis of *Brucella ovis* Infection. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 2016;22(1):63-67.
- 14-Ünver A, Atabay Hİ, Şahin M, Güneş V, Çitil M, Gökçe Hİ, Erdoğan HM. Sığır Atıklarından İzole Edilen *Brucella* Türlerinin RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg. 2006;12(2):121-127.

- 15-Erdenliğ Gürbilek S, Tel OY, Keskin O. Comparative evaluation of three serological tests for the detection of *Brucella* antibodies from infected cattle herds. Journal of Applied Animal Research, 2017;45(1):557-559.
- 16-Altöparlak Ü. Brusellozun Etiyolojisi. Ankem Derg, 2003;17(No.3):330-332.
- 17-Paquet JY, Diaz MA, Genevrois S, Grayon M, Verger JM, De Bolle X, Lakey JH, Letesson JJ, Cloeckaert A. Molecular, antigenic and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. Jour of Bac, 2001;183(16):4839-4847.
- 18-Vizcaino N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernandez -Lago L. DNA polymorphism in the genus *Brucella*. Microb Infect , 2000;2:1089.
- 19-Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC. Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha Proteobacteria. Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology, 2004;11(5):868-873.
- 20-Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerg Infect Dis, 1997;3(2):213-221.
- 21-Young EJ. *Brucella* Species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases 5 th ed. New York: Churchill Livingstone Inc., 2000;2386-2392.
- 22-Aktaş A. 2002-2004 Yıllarında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde İzole Edilen *Brucella* Kökenlerinde Doksisisiklin, Rifampisin, Streptomisin, Siprofloksasin Duyarlılığı'nın Agar Dilüsyon ve E Test Yöntemleri İle Saptanması. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne, 2001;11-14.
- 23-Young EJ. An overview of human Brucellosis. Clin Inf Dis, 1995;21:283-290.
- 24-Cloeckaert A, Verger JM, Weynants V, Godfroid J, Grayon M, Zygmunt MS. Opolysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme linked immunosorbent assay and flow cytometry. Clin Diag Lab Immun, 1998;5(6):862-870.
- 25-Corbel MJ. Microbiology of the genus *Brucella*. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. In: Young EJ, Corbel MJ, Eds. CRC Pres, Inc., Boca Raton, 1989: 54-67.
- 26-Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolisaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infec and Immun, 1995;3945-3952.
- 27-Bayramov R, Mesimova E. Ağırlaşmış Sinüzitlerden İzole Edilen Etken *Ochrobactrum anthropi* Suşlarının Antibiyotik Direnci. ANKEM Derg, 2010;24(Ek 1):8.
- 28-Xu J, Moore JE, Millar BC et al. Identification of a novel alphaproteobacterium causing bacteremia in immunocompetent patient. J Infect, 2003;47:167-169.
- 29-Holmes B, Popoff M, Kiredjian M et al. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. from human clinical specimens and previously known as Group Vd. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998;38:406-416.
- 30-Velasco J, Dı'az R, Grillo MJ, Barbera'n M, Marı'n C, Blasco JM and Moriyó'n I. Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic

- and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997;4:279–284.
- 31-Velasco J, Romero C, Lopez-Goni I, Leiva J, Diaz R and Moriyon I. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 1998;48:759–768.
- 32-Romero C, Gamazo C, Pardo M and Lopez-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol. 1995;33:615-7.
- 33-Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M and Dubray G. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacteriol. 1996;81:267-275.
- 34-Cloeckaert A, Tibor A, Zygmunt SM. *Brucella* outer membrane lipoproteins Share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 1999;6:627-629.
- 35-Vila A, Pagella H, Bello GV, Vicente A. *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system. J Infect Dev Ctries, 2016;10(4):432-436.
- 36-Lai CC, Teng LJ, Hsueh P, Yuan A, Chau Tsai K, Tang JL, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Rhizobium radiobacter* infections. Clin Infect Dis, 2004;38:149-53.
- 37-Altunçekiç Yıldırım A, Çetinkol Y, Yağan Ö, Taş N. *Rhizobium radiobacter*'e Bağlı Gelişen Pnömoni Olgusu. Mediterr J Infect Microb Antimicrob, 2014;3:13.
- 38- Çakmakçı R. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Rizobakterilerin Tarımda Kullanımı. Atatürk Üniv. Zir.Fak.Derg. 2005;36(1):97-107.
- 39-Küçük Ç, Güler İ. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Biyokontrol Mikroorganizmalar. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 2009;07(1):30-42.
- 40-Karapire M, Özgönen H. Doğada Yararlı Mikroorganizmalar Arasındaki Etkileşimler ve Tarımsal Üretimde Önemi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 2013;6(2):149-157.
- 41-Tsavkelova EA, Yu S, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Appl. Microbiol Biotechnol. 2006;71:137-144.
- 42-Hafeez FY, Naeem FF, Naeem R, Zaidi AH, Malik KA. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalaba Environ. Exper. Bot. 2005;54:142-147.
- 43-Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram negative bacteria. Analyst. 2000;125(4):651-6.

DOLLVET A.Ş.

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)

Karar No : 2016/17

Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

20.05.2016 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz " Brucella ve alfa-Proteobacteria Grubuna Ait Bazı Bakteri Cinsleri Arasındaki Serolojik Çapraz Reaksiyonların Brusellozun Serolojik Tanısında Potansiyel Uygulanabilirliği Yönünden Araştırılması." isimli HÜBAK projenizde yapacağınız çalışmalarda deney hayvanı kullanılmadığı için "Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izni alınmasına gerek olmadığına" dair karar alınmıştır.

Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Hülya KAPLAN
Veteriner Hekim
Deney Hayvanları Üretim ve
Araştırma Laboratuvarı
Sorumlusu

Dr. Nilay ÜNAL
Veteriner Hekim
Kalite Güvence Birimi
Sorumlusu

Cahit BAYBURS
Veteriner Hekim
Üretim Sorumlusu

Müzeyyen KENDİRCİ
Veteriner Hekim
Kalite Kontrol Birimi
Sorumlusu

Rojda KIZILTAŞ
Veteriner Hekim
Hayvan Refahı Birimi
Sorumlusu

İbrahim YAŞAR
Biyolog
Bakteriyel Aşılar Üretim
Laboratuvarı

Ramazan ABİKOĞLU
Biyolog
Paraziter Aşılar Üretim
Laboratuvarı Sorumlusu

Ahmet Özgür YAHLIZADE
Veteriner Hekim
Damızlık Sığır Yetiştiricileri
Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

Aziz YALÇIN
Veteriner Hekim
Süt Üreticileri Birliği Üyesi
Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)

BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERIA GRUBUNA AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA POTANSİYEL UYGULANABİRLİĞİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%7

BENZERLİK ENDEKSİ

%7

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

dspace.trakya.edu.tr
İnternet Kaynağı

%2

2

veteriner.fusabil.org
İnternet Kaynağı

%1

3

library.cu.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%1

4

readgur.com
İnternet Kaynağı

<%1

5

www.forumpaylas.net
İnternet Kaynağı

<%1

6

www.biomedcentral.com
İnternet Kaynağı

<%1

7

www.nenedir.net
İnternet Kaynağı

<%1

8	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
10	www.mikrobiyoloji.org İnternet Kaynağı	<%1
11	ŞAHİN, Tekin and YILDIZ, Abdullbaki. "Hatay yöresindeki koyun ve keçilerde brusellozisin seroprevalansının araştırılması", Fırat Üniversitesi, 2006. Yayın	<%1
12	Edgardo Moreno. "The Genus Brucella", The Prokaryotes, 2006 Yayın	<%1
13	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
14	www.vsini.rs İnternet Kaynağı	<%1
15	tanjuyildon.tr.gg İnternet Kaynağı	<%1
16	veterina.com.hr İnternet Kaynağı	<%1
17	tndt.org İnternet Kaynağı	<%1

- 18 www.ankemdernegi.org.tr İnternet Kaynağı <% 1
-
- 19 acikerisim.aku.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı <% 1
-
- 20 ÇEREKÇİ, Ayşe, KILIÇ, Selçuk, BAYRAKTAR, Mehmet, UYANIK, M. Hamidullah, YAŞAR, Ekrem and ESEN, Berrin. "İnsan kaynaklı brucella izolatlarının tanımlama ve tiplendirmesinde konvansiyonel yöntemler ile gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonunun karşılaştırılması", Mikrobiyoloji Derneği, 2011.
Yayın <% 1
-
- 21 www.scribd.com İnternet Kaynağı <% 1
-
- 22 openaccess.inonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı <% 1
-
- 23 web.harran.edu.tr İnternet Kaynağı <% 1
-
- 24 www.science.gov İnternet Kaynağı <% 1
-