

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE ATIK YAPMIŞ İNEK SÜRÜLERİNDEN
ALINAN SÜT VE VAJİNAL SIVAP ÖRNEKLERİNDEN
BRUCELLA ETKENLERİNİN BAKTERİYOLOJİK VE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

**Arş.Gör. Özgür ÇELEBİ
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof.Dr. Salih OTLU**

2009-KARS

**T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARS YÖRESİNDE ATIK YAPMIŞ İNEK SÜRÜLERİNDEN
ALINAN SÜT VE VAJİNAL SIVAP ÖRNEKLERİNDEN
BRUCELLA ETKENLERİNİN BAKTERİYOLOJİK VE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

**Arş.Gör. Özgür ÇELEBİ
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

DOKTORA TEZİ

**Danışman
Prof.Dr. Salih OTLU**

Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2008-VF-05

2009-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Arş.Gör. Özgür ÇELEBİ tarafından hazırlanmış olan “Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vajinal Sıvı Örneklerinden Brucella Etkenlerinin Bakteriyolojik ve Moleküler Tanımlanması” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek **OY BİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/04/2009

Adı Soyadı

İmza

Başkan: Prof.Dr. Nevzat YURDUSEV

Üye : Prof.Dr. Mitat ŞAHİN

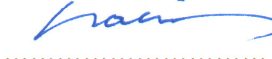
Üye : Prof.Dr. Salih OTLU

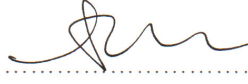
Üye : Doç.Dr. Ahmet ÜNVER

Üye : Doç.Dr. Murat GÜLMEZ











Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **08/05/2009** gün ve **08../75..** sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç.Dr. Hakan KÖÇAMİŞ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No.</u>
Simgeler ve Kısaltmalar	I
Tablo Listesi	II
Resim Listesi	III
Önsöz	IV
1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER	1
2. MATERYAL VE METOT	33
2.1. Materyal	33
2.1.1. Süt ve vajinal sıvap örnekleri	33
2.1.2. Örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besiyerleri	34
2.1.3. İzole edilen Brucella türlerinin biyotiplendirilmesi için kullanılan besiyerleri	37
2.1.4. İzole edilen Brucella etkenlerinin PCR temelli moleküler tanısı için kullanılan araç ve gereçler	38
2.2. Metot	39
2.2.1. Süt ve vajinal sıvap örneklerinden Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu	39
2.2.2. İzole edilen Brucella etkenlerinden DNA izolasyonu	42
2.2.3. PCR işlemi	45
3. BULGULAR	50
3.1. Süt ve vajinal sıvap örneklerinden Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu bulguları	50
3.2. Brucella türlerinin biyotiplendirme çalışmaları bulguları	51
3.3. PCR ve RAPD-PCR bulguları	53

4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	56
5.	ÖZET	67
6.	SUMMARY	68
7.	KAYNAKLAR	69
8.	ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simge-Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
Bp	Baz Çifti
c-ELISA	Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
KFT	Komplement Fiksasyon Test
LPS	Lipopolisakkarit
MRT	Milk Ring Test
NaCl	Sodyum Klorür
OD	Optik Dansite
OIE	Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RAT	Rivanol Aglutinasyon Test
RBPT	Rose Bengal Plate Test
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RTD	Rutin Test Dilusyonu
SAT	Serum Aglutinasyon Test
SDA	Serum-Dextrose Agar
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Buyyon
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Adı	Sayfa
Tablo 1	Brucella cinsi içerisinde yer alan türlere ait biyovaryaların özellikleri (modifiye edilmiştir)	7
Tablo 2	Brucella türlerinin konakçı tercihleri, ilk tanımlanmaları ve virülensi (modifiye edilmiştir)	11
Tablo 3	Brucella etkenlerinin hızlı ve spesifik tanısı için geliştirilen PCR temelli teknikler	28
Tablo 4	Atık yaptığı bilinen sürülerde bulunan ineklerden elde edilen süt ve vajinal sıvay örneklerinin alındıkları yerler ve sayıları	33
Tablo 5	Çalışmada kullanılan besiyerlerindeki izolasyon sayıları	50
Tablo 6	Süt ve vajinal sıvay örneklerinden izole edilen 27 <i>Brucella</i> spp. izolatının tür ve biyotiplendirme ile aşı suşundan ayırımı sonuçları	52

RESİM LİSTESİ

Resim No	Adı	Sayfa
Resim 1	İzolatlara uygulanan <i>bp26</i> geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan <i>Brucella</i> DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	53
Resim 2	İzolatlara uygulanan <i>ery</i> geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan <i>Brucella</i> DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	54
Resim 3	İzolatlara uygulanan RAPD-PCR yöntemi ile saptanan <i>Brucella</i> DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü	55

ÖNSÖZ

Brusellozis hayvancılık alanında önemli bir ekonomik yeri olan ve özellikle büyük baş hayvanlarda yavru atımı, süt ve et verimi kayıplarına sebep olan bir zoonozdur.

Dünyanın bazı bölgelerinde alınan çeşitli tedbirler ile eradike edilmesine rağmen günümüzde ülkemiz ve özellikle yöremiz hayvancılığının önde gelen problemlerindendir. Brusellozisin bu denli yaygın olmasının başlıca nedenleri arasında ülkemizin sahip olduğu coğrafi konum nedeni ile kaçak hayvan giriş ve çıkışlarının kontrol altına alınamaması, özellikle yöremizde geleneksel ve ekstansif bir tarzda uygulanan hayvan yetiştiriciliğine bağlı yoğun hayvan hareketlerinin olması, aşı programlarının tam olarak uygulanmaması, hastalıkta verilen tazminatın yeterli ve düzenli olmayışı, süt ve süt ürünlerinin özellikle modern tesislerde işlenişinin sınırlı olması ve yasaların güncellik taşıması yer almaktadır.

Ekonomik olarak son derece önem taşıyan ve konakçı tercihi farklı olan *Brucella* etkenlerinin yöremizde yetiştirilen sığırlarda araştırılması oldukça önemlidir. Son yıllarda moleküler tekniklerin gelişimi ile hastalığın tanısı ve enfeksiyonun epidemiyolojisine dair bilgiler artmıştır. Bu gibi araştırmaların özellikle hastalığın eradikasyonunda önemli bir yer tutan aşılama programlarına yardımcı olması beklenmektedir.

Bu araştırmada, yöremiz açısından son derece önemli olan hayvancılık sektöründe büyük ekonomik kayıplara sebebiyet veren ve aynı zamanda zoonotik karakteri ile ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturan brusellozisin, kültürel ve moleküler olarak tespit edilmesi, PCR tekniği kullanılarak yörede hastalığa neden olan saha suşlarının aşı suşları ile olan yakınlığının belirlenmesi amaç edinilmiştir. Elde edilen verilerin hastalığa ilişkin olarak yörede yıllardır uygulanan kontrol ve koruma çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve aynı zamanda akademik gelişimimde büyük emeği geçen danışman hocam Prof.Dr. Salih OTLU'ya, araştırmamın her aşamasında zaman ayırıp çalışmamı takip eden ve yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof.Dr. Mitat ŞAHİN, Doç.Dr. Ahmet

ÜNVER, Doç.Dr. Murat GÜLMEZ, Doç.Dr. Hidayet Metin ERDOĞAN, Yrd.Doç.Dr. Atila Taner KALAYCIOĞLU, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem SEZER'e; çalışmanın bir bölümünün yürütülmesinde büyük katkıları nedeniyle OMÜ Veteriner Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof.Dr. Nevzat YURDUSEV ve Yrd.Doç.Dr. Oktay GENÇ'e, örneklerin alınması ve değerlendirilmesinde yaptıkları katkıları için Arş.Gör.Dr. Berna DUMAN, Arş.Gör. Fatih BÜYÜK, Uzm. Doğan AKÇA, Vet.Hek. Erdinç KOÇ, Vet.Hek. Nevzat GÖKSU, Vet.Hek. Baran ÇELİK ve Vet.Hek. Şafak Çağlar GÜLYİYEN'e, maddi desteğinden dolayı KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Fonu Yönetim Kurulu'na ve son olarak beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babama, anneme ve kardeşime, her defasında yeni bir güç ve enerji ile çalışmalarım başlamamı sağlayan eşime ve kızım Rabia Naz ÇELEBİ'ye

Teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

Brusellozis, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve özellikle uterus, meme ve testis gibi genital organlara yerleşerek yavru atımı, infertilite ve süt veriminde azalmaya neden olan genellikle kronik seyirli, ekonomik öneme sahip bakteriyel bir zoonozdur (2, 8, 22, 41). Temelde bir hayvan hastalığı olan brusellozis, infeksiyona yakalanan hayvanların infekte süt ve süt ürünleri, etleri ve vücut sıvıları aracılığı ile insanlara bulaşması nedeniyle halk sağlığı açısından da oldukça önemli bir hastalıktır (6, 12, 49, 87). Hastalığa yakalanan süt sığırlarının % 80'inde etken özellikle meme dokusu ve supramammal lenf yumrularına yerleşir ve burada buldukları sürece süt ile dışarı saçılırlar (47). Brusellozisin sebep olduğu ekonomik kayıplar; yavru atma, infertilite, süt veriminde azalma, veteriner hekim masrafları, hayvan hareketlerinin ve ihracatının engellenmesi ile insanlarda şekillenen iş gücü kaybı ve tedavi masrafları olarak sıralanabilir (182). İnsanlarda görülen brusellozis olgularının hayvansal orjinli olması nedeniyle brusellozisin kontrol altına alınmasında temel amaç hayvanlarda görülen brusellozis ile mücadele etmektir. Bu nedenle hastalığın kontrolü öncelikle veteriner hekimlerin sorumluluğundadır (124).

Ülkemizde brusellozis için halk sağlığı açısından temel bulaşma yolu pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketilmesidir (1, 19, 102, 183). Yöremiz yetiştiricilerinin hastalığa ilişkin bilgi düzeylerinin düşük olması, yeterli ısı işlemine tabi tutulmamış sütlerden peynir üretimi, sokak sütü satışının yaygınlığı, hijyenik kurallara uyulmaması gibi nedenlerle süt ve süt ürünleri ile bulaşma son derece önemli olmaktadır. İnfeksiyonun bir hayvandan diğerine ve insanlara bulaşmasında önemli olan yollardan birisi de vajinal akıntıdır (53, 133, 162). Özellikle yörede hayvan barınaklarının sıkışık olması ve hijyenik kuralların sağlanamaması gibi olumsuz koşullar nedeniyle hayvanlar arasında infeksiyonun bu yolla bulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Hasta hayvanların doğum ya da atık olgularından sonraki 6 haftalık süre boyunca vajinal akıntılarında *Brucella* etkenleri izole edilebilmektedir (3).

Brusellozise neden olan etkenler isimlerini bu mikroorganizmayı ilk izole eden ve İngiliz ordusunda hekim olarak görevli bir mikrobiyolog olan Sir David

Bruce'dan alırlar. Bruce, 1887 yılında Malta adasında, ateşli seyreden infeksiyon sonucu ölen bir İngiliz askerinin dalak pulpasından izole ettiği bakteriyi deneysel olarak maymunlara vermiş ve hastalığı maymunlarda meydana getirmiştir. Küçük bir kok şeklinde görülen bu etkene *Micrococcus melitensis*, infeksiyona ise "Malta Humması" veya "Akdeniz Humması" adını vermiştir (12, 19, 32). Aynı etken 1893 yılında Hughes tarafından *Streptococcus melitensis* olarak adlandırılmıştır. Bang ve Stribolt, 1895 yılında Danimarka'da abort yapmış bir ineğin fetal membranları ve uterus sıvılarından izole ettikleri gram negatif basile *Bacterium Infectiosa Bang* adını vermişlerdir. Bang, 1897 yılında etkenin saf kültürünü yaparak sağlıklı hayvanlarda deneysel olarak infeksiyon oluşturmayı başarmıştır (6, 12, 19). Dr. Zammit, 1905 yılında etkeni keçi sütlerinden izole etmiş ve keçilerin doğuma yakın zamanlarda sık sık abort yaptığını bildirerek etkeni *Micrococcus* olarak adlandırmıştır. Koyunlarda ilk izolasyon 1906 yılında Garcia ve Iscara tarafından yapılmıştır. Koyun brusellozisine *Brucella melitensis*'in neden olduğu 1910 yılında Dubois tarafından bildirilmiş ve etkenin süt ile yayıldığı Spink tarafından açıklanmıştır (32, 33). Domuzlarda brusellozis ilk olarak 1909 yılında Huntyra tarafından Macaristan'da bildirilmiştir (6). Traum, 1914 yılında ABD'nin Indiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden *B. suis*'i izole etmiştir (6, 12). Bakteriyolog olan Alice Evans 1918 yılında; keçi, koyun, sığır ve domuzlarda Bruce, Bang ve Traum tarafından bulunan etkenlerin ayrı infeksiyonlar meydana getirmediklerini ve bu etkenler arasında morfolojik, kültürel ve serolojik benzerliklerin bulunduğunu ve birbirlerine çok yakın mikroorganizmalar olduklarını belirtmiştir (6). Meyer ve Shaw, 1920 yılında *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'i bir grupta toplayarak tümüne, bu konuda ilk önemli çalışmaları yapan Bruce'un ismine ithafen *Brucella* grubu mikroorganizmalar, meydana getirdikleri hastalığa da brusellozis adını vermişlerdir. Koçların epididimitis hastalığının etkeni olan *B. ovis*, 1952 yılında ilk kez Yeni Zelanda'da McFarlan ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir. 1953 yılında Buddle ve Boyes, bu etkenin *B. melitensis*'in bir varyantı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Etkene ismi 1956 yılında verilmiştir. Stoenner ve Lackman 1957 yılında ABD'nin Utah eyaletinde çöl farelerinden *B. neotomae*'i izole etmişlerdir. *B. canis* 1966 yılında av köpeklerinde abortla seyreden bir salgının

araştırılması sırasında izole edilmiş ve 1968 yılında Carmicheal ve Bruner tarafından isimlendirilmiştir (6, 12, 122).

Türkiye’de ilk Brusellozis vakası 1915 yılında Kuleli Askeri Hastanesi’nde, Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından tedavi edilen bir askerde laboratuvar yöntemleri ile teşhis edilmiştir (6, 12). Türkiye’deki sığırlarda *B. abortus* infeksiyonunun ilk kez 1931 yılında kültür ırkı hayvanların ithal edilmesi ile sorun olmaya başladığı bildirilmiştir (55). Sığırlarda ilk izolasyon çalışmaları 1931–1932 yıllarında Berke tarafından yapılmıştır. Golem 1943 yılında brusellozis’i insan ve hayvanlarda serolojik yöntemlerle tanımlamıştır. Aktan ve Köylüoğlu 1944 yılında Bandırma merinos çiftliğindeki koyunlarda brusellozis’in varlığını serolojik olarak tespit etmişlerdir. Türkiye’de koyun ve kıl keçilerinden *B. melitensis* ilk defa 1959 yılında Özcebe tarafından izole edilmiştir. Köpeklerde *B. canis* infeksiyonu serolojik olarak ilk kez 1984’te Diker, İstanbulluoğlu ve arkadaşları tarafından saptanmıştır. Atlarda *B. abortus*’un varlığı İzgür ve ark. tarafından 1988 yılında serolojik olarak saptanmıştır (6, 12, 54).

Brucella cinsi mikroorganizmalar, gram negatif, aerobik ve kokobasil görünümünde, hareketsiz, sporsuz, metabolik aktiviteleri düşük, 0.5–0.7 x 0.6–1.5 µm boyutlarında olan fakültatif intrasellüler patojenlerdir (2, 6, 36, 82). Gerçek kapsülleri yoktur ancak infeksiyonlardan yeni izole edilen ve smooth karakterdeki kolonilerde ince bir kapsül görülebilir (2, 36). Kültürlerde tek tek rastlanmasına karşılık dokulardan hazırlanan preparatlarda kümeler halinde görülürler (6). Etkenin Braunier (Brown) hareketi oldukça belirgindir (6, 19). Normalde asit-fast olmadıkları halde zayıf asitlerle dekolorizasyona dirençli olduklarından modifiye Ziehl-Neelsen, modifiye Köster ve alkali solüsyonu ile kırmızı renkte boyanırlar. Bipolar boyama özelliği göstermezler. Genellikle aerobiktirler, ancak *B. abortus* ve *B. ovis* ilk izolasyonlarından % 5-10 CO₂’e gereksinim gösterirler (6, 19, 45). Etkenler 20-40°C arasında üreyebilirlerse de optimum üreme ısıları 37°C ve besiyeri pH’sı 6.6–7.4’tür (2).

Brucella’lar genel besiyerlerinde güç ürerler ve bazı özel besiyerlerine ihtiyaç gösterirler (2, 12, 19). Üremeleri için tiamin, nikotinamid ve biotine ihtiyaç duyarlar. Besiyerine kan serumu, glukoz, pepton ve karaciğer ekstraktı katılması üremeyi

olumlu yönde etkiler (6, 19). *B. abortus* biyotip 2 gibi bazı suşların üremeleri için besiyerine % 2–5 oranında sığır ya da at serumu ilave edilmesi zorunludur (3, 6, 186). Mikroorganizmaların (özellikle *B. abortus* ve *B. melitensis*) üremelerini stimüle etmek amacıyla eritritol da besiyerine katılabilir (3, 6, 15).

Brucella bakterilerinin üretilmesinde kullanılan besiyerinin temelini Nutrient agar oluşturur. Bunun yanı sıra Serum-Dextrose agar (SDA), Blood agar base, Triptoz agar, Tryptic Soy agar (TSA), Tween Dextrose agar ve sıvı besiyeri olarak da Brucella buyyon, Tryptic Soy buyyon (TSB) ve karaciğerli buyyon kullanılmaktadır (3, 6, 19). SDA, genellikle koloni morfolojisini incelemek amacı ile kullanılmaktadır (186). Selektif besiyeri olarak Brucella agar, Skirrow agar, Farrell besiyeri, Thayer-Martin agar ve ayrıca bifazik (sıvı-katı) besiyerleri kullanılmaktadır (3, 45, 63, 110). Modifiye Thayer-Martin besiyerinin *B. melitensis* izolasyonunda Farrell besiyerine göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak *B. melitensis* üzerine inhibe edici etki gösterebilen basitrasinin Thayer-Martin besiyerinde bulunmayışı gösterilmiştir (110). Kontamine örneklerde besiyerlerine amfoterisin B, basitrasin, sisloheksimid/natamisin (159), d-sisloserin, nalidiksik asit, polimiksin B ve vankomisin gibi antibiyotiklerin katılması gerekir. Bu antibiyotik karışımları, çoğu *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. ovis* suşunun izolasyonu için gereklidir. Fakat *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. canis*'in bazı suşları ile *B. abortus* biyotip 2, 3 ve 4 için inhibitör etki gösterebilirler (2, 110). Brucella etkenlerinin kültürleri için genellikle katı besiyerleri kullanılır. Çünkü katı besiyerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlar. Bununla birlikte kan ve çeşitli sıvı örneklerin kültürü için sıvı besiyerinden de yararlanılabilir (6). Katı besiyerinde Brucella'ların 48–72 saatten önce üreme göstermeleri ender olup ilk izolasyonda koloni şekillenmesi 4. günden sonra görülmeye başlamakta ve üreme süresi pasajlarla kısaltılabilmektedir (45). Koloniler 2–3 gün sonra yuvarlak, kenarları düzgün, saydam ve 0.5–1 mm çapında ve Smooth (S) tipinde görülürler (6, 19). Tipik virulent mikroorganizmalar S tipinde koloniler yaparak ürer ve avirulent olan Rough (R) şekline değişme eğilimleri vardır. R kolonileri kuru, opak, granüler görünümde ve sarımsı bir renge sahiptirler. (3, 45). Avirulent mikroorganizmalar, %1 akriflavin çözeltisinde aglutine olurlar; virulan olanlar aglutine olmazlar. Smooth ve non-smooth suşların ayırımında konkavalin A lektinin de akriflavin ile aynı sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarla

ortaya konmuştur (43). Koloniler yansıyan ışıpta hafif mavimsi-yeşil bir renk verirler (S formu). Koloniler 6–7 günlük bir süre sonunda matlaşır ve dissosiyeye olmaya başlarlar. *B. ovis* ve *B. canis* ilk izolasyondan itibaren R koloni görünümündedirler (12, 19). Bu iki ana koloni formu dışında intermediyer (I) ve mukoid (M) özellik gösteren koloni varyasyonlarına ve bunların da alt formlarına rastlanabilir (6). I kolonilerini S kolonilerinden ayırmak zordur. Hafifçe opaktır ve akriflavinle aglutinasyon reaksiyonlarında çok ince granüller oluştururlar. M kolonilerine öze ile dokunulduğunda ipliksi bir uzama gösterirler, koloniler şeffaf ve grimsi renktedirler (3, 45). Ayrıca Brucella'ların antibiyotik ve kimyasal maddelerden etkilenmeleri sonucu L- formlarının meydana geldiği bildirilmiştir. Sıvı besi yerlerinde yavaş ürerler, homojen bir bulanıklık yanında dipte beyazımsı tortu meydana getirirler, S- koloni formundakiler tüp çalkalandığında homojen halde, R- koloni formundakiler ise granüler tarzda ortama yayılırlar. Kanlı agarda hemoliz yapmadan üreyen etkenler pigment üretmezler (2, 6, 19).

Brucella'lar nitrata redükte ederler, indol oluşturmazlar. Metil Red ve Voges Proskauer testleri negatiftir. Katalaz ve oksidaz pozitif (10–30 sn de reaksiyon verir) olup oksidaz negatif suşlar da bulunmaktadır (2, 6, 12, 19, 155). Sıratlı besiyerinde üremezler. *B. abortus* biyotip 5 hariç diğer *B. abortus* biyotipleri, *B. suis* biyotip 1 ve *B. neotomae* H₂S oluşturmaktadırlar (*B. suis* en az 4 gün etüvde devamlı H₂S oluştururken, *B. abortus* ancak 2 gün süreyle H₂S oluşturmaktadır). İnkübasyon süresinin uzadığı durumlarda H₂S testi yanlış pozitiflik verebilir (155). *B. melitensis* ise fark edilecek düzeyde H₂S meydana getirmez. Suşların çoğu üreaz aktivitesi yönünden pozitifdir. Fakat türler arasında üreaz testinin süresi farklılık gösterir. *B. suis*, *B. neotomae* ve *B. canis* 5–30 dakika içerisinde çok güçlü üreaz aktivitesi gösterirken *B. abortus*'da bu süre 1–2 saat olup bazen daha uzun sürmektedir. *B. melitensis*'in üreaz aktivitesi değişkendir. Bazı suşlar inkübasyondan 7 gün sonra bile negatif reaksiyon verebilir. *B. ovis* üreaz üretmez. Konvansiyel besiyerlerinde *B. neotomae* hariç karbonhidratlardan asit oluşturmazlar (19, 45, 155).

İlk stabil Brucella fajının 1950'de eski Sovyetler Birliği'nde izolasyonundan sonra, birçok Brucella spesifik faj bildirilmiştir. Eski Rusya'nın Tbilisi eyaletinde izole edilip Tbilisi (Tb) adı verilen faj son derece stabil olduğundan referans faj

olarak tür tayininde geniş çapta kullanılmaktadır. Günümüzde Brucella'ların tiplendirilmesinde Weybridge, Tibilisi, Berkeley, Firenze ve İzatnagar fajlarından yararlanılır (23, 44, 45, 46). Non smooth Brucella'ların tiplendirilmesinde ise R, R/O ve R/C fajları kullanılır (23, 43). Brucella cinsi içerisinde yer alan türlere ait biyovaryaların bazı özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Brucella cinsi içerisinde yer alan türlere ait biyovaryların özellikleri (modifiye edilmiştir) (2, 3).

Tür	Biyovar	CO ₂ İhtiyacı (%5–10)	Üreaz aktivitesi	H ₂ S üretimi	Boyalı besiyerinde üreme ^a		Monospesifik serumla aglutinasyon ^c			Tb fajı ile lizis ^g	
					thionin	bazik fuksin	A	M	R	RTD	10 ⁴ xRTD
<i>B. melitensis</i>	1	-	değişken	-	+	+	-	+	-	-	-
	2	-	değişken	-	+	+	+	-	-	-	-
	3	-	değişken	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. abortus</i>	1	(+)	1-2 saat	+	-	+	+	-	-	+	+
	2	+	1-2 saat	+	-	-	+	-	-	+	+
	3	(+)	1-2 saat	+	+	+	+	-	-	+	+
	4	(+)	1-2 saat	+	-	+ ^d	-	+	-	+	+
	5	-	1-2 saat	-	+	+	-	+	-	+	+
	6	-	1-2 saat	-	+	-	+	-	-	+	+
	9	+/-	1-2 saat	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>B. suis</i>	1	-	0-30 dk.	+	+	- ^e	-	-	-	-	+
	2	-	0-30 dk.	-	+	-	+	-	-	-	+
	3	-	0-30 dk.	-	+	+	+	-	-	-	+
	4	-	0-30 dk.	-	+	- ^f	+	+	-	-	+
	5	-	0-30 dk.	-	+	-	-	+	-	-	+
<i>B. neotomae</i>	-	0-30 dk.	+	- ^b	-	+	-	-	-	-	+
<i>B. canis</i>	-	0-30 dk.	-	+	- ^f	-	-	+	-	-	-
<i>B. ovis</i>	+	-	-	-	+	- ^f	-	-	+	-	-

+, Pozitif; -, negatif; (+), genellikle ilk izolasyonda pozitif; (-), genellikle negatif.

a; Boya konsantrasyonu Serum dextrose agarda 20 µg/ml (1:50.000)

b; Thionin konsantrasyonu 10 µg/ml (1:100.000) olan besiyerinde ürer.

c; A, abortus; M, melitensis; R, rough.

d; Kanada, ABD ve İngiltere'de izole edilen bazı suşlar boyalı besiyerinde üremez.

e; Güney Amerika'da izole edilen bazı suşlar bazik fuksine karşı dirençlidir.

f; Suşların çoğu negatiftir.

g; Tb: Tbilisi, RTD: Rutin test dilusyonu.

Brucella türlerinin bazı boyalara (tiyonin, bazik fuksin ve safranin O gibi) karşı duyarlılıkları ve tip tayini için kullanılır. Bu boyaları içeren besiyerlerinde üreyen Brucella türlerinin oluşturdukları inhibisyon zon çapı 4 mm ya da daha fazladır. Bazik fuksin içeren besiyerinde *B. melitensis* ve *B. abortus* (biyotip 4'ün bazı suşları ve biyotip 2 hariç) ürerken *B. suis* (biyotip 3 hariç) üremez. *B. canis*, *B. ovis* ve *B. neotomae* bazik fuksin tarafından inhibe edilir. Thionin içeren besiyerinde *B. abortus* (biyotip 2 hariç), *B. melitensis* ve *B. suis* ürer. Safranin O'da *B. suis* inhibe olurken diğer Brucella türlerinin hemen hemen hepsi ürer (2). Boya sensitivitesi moleküler olarak (örneğin 36kDa'luk dış membran proteini gibi) spesifik porinlerin ekspresyonuna bağlıdır (57).

Smooth Brucella türleri ile *Afipia clevelandensis*, *Escherichia coli* O:116 ve O:157 (125), *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* O:30, *Xanthomonas maltophilia* ve *Yersinia enterocolitica* O:9 (97, 120) başta olmak üzere Pasteurella türleri, *Campylobacter fetus*, *Moraxella*, *S. pullorum* ve *Leptospira* serotipleri arasında serolojik kros reaksiyonlar bildirilmiştir (6, 12, 14, 58). Behan ve Klein (14) mikroaglutinasyon testi ile yaptıkları çalışmada bruselozisli hastalardan alınan 34 serum örneğinin 8'inde *F. tularensis* ile kros reaksiyon, tularemi hastalarından alınan 128 serum örneğinin 42'sinde ise *B. abortus* (suş 1119-3) antijeni ile kros reaksiyon saptamışlardır. Araştırmacılar dithiothreitol ile mikroaglutinasyon testini aynı serumlara uygulamışlar ve kros reaksiyon titrelerinin 10 ya da daha az düzeye indirildiğini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak spesifik *F. tularensis* IgM antikörlerinin miktarını indirgediğinden dolayı mikroaglutinasyon testinde dithiothreitol kullanımını önermemişlerdir. Ancak kros reaksiyon veren antikörlerin ayrımında immunodifüzyon, immünelektroforez, primer bağlanma testleri (RIA, ELISA) ve kros absorsiyon testlerinden başarılı sonuçlar alındığı bildirilmiştir. Brucella etkenlerine karşı vücutta meydana gelen antikörlerin daha çok IgG₁, IgG₂, IgM ve IgA oldukları son çalışmalarda ortaya konmuştur (17).

Etken atık fütusta 75 gün, uterus salgısında 200 günden fazla, çeşme suyunda birkaç ay, idrarda 30 gün, dışkıda 100 gün, deniz suyunda 25 gün, kuru toprakta 43 gün, güneş görmeyen toprakta 70 gün (6), nemli toprakta 60-140 gün, elbise ve kumaşta 5-78 gün, infekte etle yapılmış salam ve soside 21 gün canlı kalmaktadır

(12, 17). Kùltùrlerdeki mikroorganizmalar -20°C 'de 3–6 ay canlı kalabilirler. Etkenler % 0.1 sublimede birkaç dakikada % 2 formalin ve % 1 lizol içinde 15 dakikada ölürler (6). *B. abortus*'un sütte yıkımlanması için gerekli olan pastörizasyon ısı ve süresi 61.7°C 'de 30 dakika ya da 71.7°C 'de 15 saniyedir (98). Sancak ve ark. (148) Van'da yaptıkları çalışmada *B. melitensis* ile infekte çiğ sütlerden yapılan otlu peynirde, etkenin 40 güne kadar canlılığını sürdürdüğünü belirlemişlerdir. Sarısayın ve Erođlu (150) Marmara ve Trakya bölgelerinden krema, tereyağı, dondurmali ve kremali pasta gibi süt ürünlerinden oluşan toplam 260 örneğin kültürel olarak yoklanması sonucu Brucella etkeni izole edilemediğini bildirirken, deneysel olarak kontamine edilen krema örneklerinde Brucella etkenlerinin oda ısısında 3 hafta, 4°C 'de 6 hafta sonunda canlılıklarını kaybettiklerini, buna karşın -22°C 'de 6 hafta sonra bile canlı kaldıklarını saptamışlardır. Kronenwett ve ark. (98) yaptıkları deneysel bir çalışmada sekiz *B. abortus* suşunun 48 saat süreyle elde edilen kültürünü süt içerisine ilave etmiş ve etkenin inaktivasyon ısıları ve sürelerini $61.5\text{--}67.8^{\circ}\text{C}$ 'ler ile 14–270 saniyeler arasında değiştirdiğini belirlemişlerdir. Karasoy (91) Çifteler Harası'ndan alınan 13 adet koyun sütü ve bu sütlerden yapılan peynir örneklerinin tümünden *B. melitensis* izole ve identifiye edildiğini, peynirlerin % 7 tuz ile salamura edilmesi durumunda etkenin 46 gün yaşadığını tespit etmiştir. Araştırmacı bu sonuca dayanarak peynirlerin en az iki ay bekletildikten sonra tüketilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Brucella'ların tek bir monospesifik cinsi ya da çoklu türleri kapsayıp kapsamadığı çoğu tartışmanın kaynağını oluşturur. Verger ve ark. (176) DNA-DNA hibridizasyon metodunu (S1 nukleaz metodu) kullanarak 51 Brucella (saha ve aşı) suşunu incelemişler ve tüm suşların 16M ile 96 ± 5 oranında homolojiye sahip olduklarını saptamışlardır. Araştırmacılar bu sonuca göre tüm türlerin *B. melitensis*'in biyovarları olarak dikkate alınması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Fakat konak tercihinde gözlenen farklılıklar, her türün hastalık şiddetinin farklı olması, biyokimyasal özelliklerindeki farklılıklardan dolayı bu öneri evrensel olarak kabul görmemiştir. Ayrıca restriksiyon haritası ve kros hibridizasyon kullanılarak yapılan çalışmalar bu cinsin klasik sınıflandırma ile uyum içerisinde olduğunu göstermiştir (115, 177). Yapılan biyoteknolojik çalışmalar sonucunda Brucella cinsinin Bartonella/ Rochalimaea, Ochrobacterium ve Agrobacterium'la yakın ilişkili olan

Protobacteria sınıfının α -2 subdivisionunun bir üyesi olduğu ve 16S rRNA gen sekansı ile gösterildikleri saptanmıştır (52, 90, 118, 141). Günümüzde Brucella türleri 2005 yılı basımı (cilt 2) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'e göre Proteobacteria aleminde, Rhodospirilli sınıfında, Rhizobiales takımında, Brucellaceae ailesinde, Brucella cinsi içerisinde yer almaktadır (42). Brucella cinsinde yer alan tür listesine, "International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Brucella" alt komitesi tarafından *B. pinnipedialis*, *B. ceti* ve *B. microti* türlerinin de dahil edileceği bildirilmiştir (187).

Brusellozis hem evcil hem de yabani hayvanlarda görülen zoonotik karakterli bir hastalıktır. Üç klasik tür olan *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*'in tercih ettiği primer konakçıları varsa da diğer hayvan türlerinde de infeksiyon oluşturabilirler. *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae*'nin infekte ettiği hayvan türleri primer konakçıları dışında daha dardır (73, 81). Brucella türlerinin konakçı tercihleri, bugüne kadar belirlenen biyovarları, ilk tanımlanmaları ve insanlar için virülens durumu Tablo 2'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Brucella türleri, belirlenen biyovarları, konakçı tercihleri, ilk tanımlanmaları ve virülensi (modifiye edilmiştir) (109, 132).

Tür	Biyovar	Konakçı tercihi	İlk Tanımlanması	Virülensi (insanlar için)
<i>B. melitensis</i>	1-3	Keçi, koyun ve deve	Bruce, 1887	++++
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Sığır, deve, Tibet öküzü ve bufalo	Bang, 1897	++ ya da +++
<i>B. suis</i>	1-5	Domuz (biyotip 1-3), yabani tavşan (biyotip 2), ren geyiği (biyotip 4) ve yabani kemirgen (biyotip 5)	Traum, 1914	+
<i>B. canis</i>		Köpekgiller	Carmichael ve Bruner, 1968	+
<i>B. ovis</i>		Koyun	Van Drimmelen, 1953	-
<i>B. neotomae</i>		Kemirgenler	Stoenner ve Lackman, 1957	-
<i>B. pinnipediae</i> ve <i>B. cetaceae</i> (geçici)		Balina ve yunus (pinnipediae), fok (cetaceae)	Ewalt ve Ross, 1994	+

İnsanlar üç klasik türle infekte olursa da dünya genelinde vakaların çoğundan en invaziv ve patojenik tür olan *B. melitensis* sorumludur (73, 76). Patojenite yönünden *B. melitensis*'i, *B. suis* sonra da *B. abortus* izler. İnsanlarda *B. neotomae* ve *B. ovis*'e bağlı hiç bir infeksiyon bildirilmemiştir. Ayrıca *B. canis*, *B. abortus* biyotip 5 ve *B. suis* biyotip 2 ile infeksiyon çok nadirdir (73).

Brucella abortus'un sebep olduğu ve Bang hastalığı ya da sığırların bulaşıcı yavru atma hastalığı olarak bilinen sığır brusellozisi dünyanın birçok ülkesinde yaygın bir şekilde görülen zoonotik bir infeksiyondur (3, 6, 12, 19). Sağlam ve ark. (146) Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nde 1994-1996 yılları arasında Erzurum'dan 71 ve Kars'tan 25 olmak üzere toplam 96 atık inek fötusunu kültürel olarak inceledikleri çalışmalarında Erzurum Bölgesi'nden elde edilen örneklerin 30 (%42.25)'undan *Brucella* spp., 1 (%1.4)'inden *Haemophilus somnus*, 1 (%1.4)'inden *Corynebacterium* spp. ve 1 (%1.4)'inden *S. dublin*, Kars Bölgesi'nden elde edilen

örneklerin 10 (%40)'undan *Brucella* spp., 1 (%1.4)'inden *C. fetus* subsp. izole etmişlerdir. Langoni ve ark. (102) yaptıkları çalışmada serolojik olarak brusellozis pozitifliği tespit edilen sığırların sütlerinde *Brucella* etkenlerinin varlığını araştırmışlardır. İnceledikleri 49 örneğin 15 (%30.61)'inde *B. abortus* tespit etmişlerdir. Bu izolatların 1 (%2.04)'ini *B. abortus* biyotip 1, 8 (%16.32)'ini *B. abortus* biyotip 2 ve 6 (%12.25)'sını ise *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlamışlardır. Şahin ve ark. (167) yöremizde 2001-2006 yılları arasında buzağılama döneminde 149 atık sığır fötüsüne ait abomazum içeriği ve akciğer örneklerini incelemişler ve bunların 48'inden *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bu izolatların 45'ini *B. abortus* biyotip 3 ve 3'ünü ise *B. abortus* biyotip 1 olarak tanımlamışlardır. İca ve ark. (85) Türkiye'deki 14 ilden toplanan 75 atık sığır fötüsünden izole edilen ait *B. abortus* suşlarının tümünü konvansiyel metotlar ile *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada Kars yöresinden 1 izolat kullanılmıştır. Araştırmacılar bu sonuçlara göre Türkiye'deki sığırlarda baskın biyotipin *B. abortus* biyotip 3 olduğunu belirtmişlerdir.

Son yıllarda İsrail, Kuveyt, Suudi Arabistan, Brezilya ve Kolombiya gibi ülkelerde sığırlarda, *B. melitensis* ya da *B. suis* biyovar 1 nedeniyle meydana gelen infeksiyonların insidensinde artışın olduğu ve brusellozisin tekrarlayan bir problem olarak dikkati çektiği vurgulanmaktadır (41). Büyükcangaz ve Şen (31) 2004 ve 2005 yıllarında Marmara Bölgesi'nde iki doğum sezonu boyunca farklı sürülerden aldıkları 41 atık sığır fötüsüne ait iç organlar ve abomazum içeriğinin 8 (%19.5)'inde *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bu izolatların 7 (%87.5)'sini *B. abortus* biyotip 3 ve 1 (%12.5)'ini *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlamışlardır. Benzeri sonuçlar yöremizde yetiştirilen sığırlar için de söz konusu olmuştur. Ünver ve ark. (174) 2002-2004 yılları arasında Kars merkez ve köylerinden toplanan ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilen toplam 62 adet atık fötüsa ait iç organları, fetal membranları ve abomazum içeriğini incelemişlerdir. Örneklerin 32 (%51.6)'sinden *Brucella* spp. izole ve tanımlamışlardır. Örneklerin 27 (%44.4)'sinin *B. abortus* S19, 15 (%55.6)'inin ise *B. melitensis* Rev1 aşısı suşunun profilini gösterdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar *B.*

melitensis'in sığır brusellozisinin etiolojisinde oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Malta humması olarak bilinen koyun ve keçi brusellozisi Akdeniz ülkeleri ve Arap yarımadası başta olmak üzere Orta ve Batı Avrupa ülkeleri, Latin Amerika ülkeleri, Batı ve Orta Asya gibi dünyanın güney ve güneydoğu ülkelerinde görülmektedir (6). Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın *B. melitensis* infeksiyonu yönünden ari olduğu kabul edilmektedir (73). Keçiler genellikle *B. melitensis* ile infekte olurlar ve infeksiyonun insana bulaşmasında etkili kaynaklardır. Zira keçiler yaklaşık 6-7 ay kadar vajinal akıntı ile bakteri saçmaktadır. Koyunlarda infeksiyon etkeni çoğu zaman *B. melitensis* bazen de *B. abortus* veya *B. suis*'dir. Erdoğan ve ark. (60) Trakya Bölgesi'nde yaptıkları çalışmada koyun ve keçilerde görülen 145 atık vakasının 29 (%20)'ünde *B. melitensis*, 4 (%2.7)'ünde *C. fetus* izole ve tanımlanmıştır. Muz ve ark. (121) Elazığ ve çevresinde yaptıkları çalışmada 110 koyun ve keçi atık fötüslerinin 22 (%20)'sinden *B. melitensis*, 5 (%4.5)'inden *C. fetus* subsp. *fetus*, 4 (%3.6)'ünden *S. abortus ovis*, 1 (%0.9)'ünden *Listeria monocytogenes* ve 3 (%2.7)'ünden *E. coli* izole ve tanımlanmıştır. Koyunlar, keçilere nazaran etrafa daha kısa süreli bakteri yayarlar (3, 12). *Brucella* cinsi içerisinde virulensi en fazla olan tür *B. melitensis* olup eradikasyonu da oldukça güçtür (122).

Evcil hayvanlarda etkenin bulaşması sindirim, çiftleşme, sağımlar sırasında memenin kontaminasyonu ve damlacık infeksiyonu ile oluşur. İnfeksiyonun indirek yayılmasında vahşi hayvanlar, köpekler, kuşlar ve plasenta ya da atık fötüs ile bulaşık meradan taşıyıcılık yapan kaynağı bilinmeyen vektörler aracılık eder. Ayrıca sığırlara brusellozisin bulaşmasında atık fötüs, uterus akıntısı ve idrar ile kontamine su kaynakları da önemli bir rol oynar (17). İnfeksiyonun bulaştırılmasında sinek, sivrisinek, tahtakurusu, kene ve pire gibi arthropodlar ve yabani tavşan, fare gibi kemiricilerin ayrı rolü vardır. Ayrıca serçe, karga ve kerkenez gibi kuşlar da portör olabilirler (6, 113). İnfeksiyonun sığırlar arasında bulaşmasının en önemli kaynağı etkeni etrafa yayan hayvanlardır. Bulaşmada oral yol oldukça önemlidir. Çünkü sığırlar atık fötüsü ya da atık yapmış hayvanın genital bölgesini ve akıntılarını yalama eğilimindedirler (162). *B. abortus* ile infekte sığırlarda en erken 39. günde

vajinal akıntı ile etken yayılırken (133) genellikle abort oluşumundan önce etkenin saçılmasının yoğun olmadığı kabul edilmektedir (17). Buzağılara infeksiyonun bulaşması ya uterusu olmakta ya da infekte sığırların kolostrum veya sütleri ile beslenmeleri sonucu oluşmaktadır (34). İnfekte buzağular damızlık olarak gönderildikleri brusellozisten ari sürüler için risk oluşturmaktadırlar (179).

Brusellozis boğalarda semen kalitesini etkileyebilmesine rağmen genellikle infertiliteye neden olmamaktadır (100). Akut infeksiyon süresince boğalar semen ile *Brucella* etkenlerini yayarlar. Bazen bu yayılım belirli aralıklarla olabilir (112). Boğalarda *B. abortus*'tan kaynaklanan hastalığın inkübasyon periyodu bilinmemektedir (134). Amin ve ark. (5) *B. melitensis* ile infekte oldukları bilinen karantinaya alınmış çiftliklerden serolojik olarak pozitif olan 65 boğa ve 55 koça ait semen örneğini kültürel ve moleküler olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar boğaya ait örneklerin 4'ünde koçlardan alınan örneklerin ise 3'ünde *B. melitensis* biyotip 3 izole ve tanımlanmışlardır. Örneklerin tümüne uygulanan direkt PCR metodu ile de 7 boğa ve 5 koç örneğinde *B. melitensis* saptanmıştır. Araştırmacılar suni tohumlamada kullanılacak semenlerin *Brucella* etkenlerinden ari olduğu saptanan sertifikalı sürülerden alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

İnsanlarda ise bulaşma genellikle hayvansal ürünlerin (çiğ süt ve süt ürünleri) tüketimi suretiyle olur. Akbulut ve Kavas (1) İzmir'de yaptıkları çalışmada 101 sokak sütü örneğinin 95'inin *Brucella* spp. ile kontamine olduğunu ve özellikle brusellozisin bulaşması açısından yaz aylarının yüksek bir risk taşıdığını bildirmişlerdir. Sancak ve ark. (148) Van'da yaptıkları çalışmada inceledikleri 40 adet otlu peynirinin 7'sinde *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bunların altısını *B. melitensis* ve bir tanesini ise *B. abortus* olarak tanımlanmışlardır. Kuplulu ve Sarımehtetoğlu (99) Ankara yöresinde yaptıkları çalışmada 80 vanilyalı, 75 çikolatalı ve 62 meyveli olmak üzere toplam 217 dondurma örneğini incelemişlerdir. Vanilyalı dondurma örneklerinin 5'inden *B. abortus* izole ve tanımlanmışlardır. Araştırmacılar dondurmanın brusellozisin bulaşmasında potansiyel bir risk taşıdığını bu nedenle halk sağlığı açısından dondurmaların pastörize edilmiş taze sütlerden hazırlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Bunun dışında infekte hayvan ve bunların ürünleri ile direkt temas, solunum veya konjunktiva yolu ile bulaşma olmaktadır (2,

3, 109, 117, 184). Bu açıdan özellikle kasap, laboratuvar çalışanları ile veteriner hekimler için brusellozis bir meslek hastalığı olarak görülmektedir (17, 130). Ayrıca bazı insekt, kemirgen, kuşlar ile evcil ve yabani hayvanların insanlar için vektör veya rezervuar olabileceği de bildirilmiştir (6).

Brucella infeksiyonlarının antikor yanıtında etkin olan antijen lipopolisakkarit (LPS)'tir. Smooth faz (koloni) suşu (S-LPS) bir lipid A (aminoglukozun iki tipini içeren); özel yağ asitleri (β -hidromiristik asit hariç), glukoz, mannoz ve quinovosamine içeren bir iç bölge; yaklaşık olarak 100'lü 4-formamido-4,6-dideoksimannozdan oluşur (41). Lipopolisakkarit epitoplarının şekli bağlanma bölgelerine göre farklılık gösterir. A epitopunun baskın olduğu tipte çubuk şeklinde ve arka arkaya dizilmiş beş adet α -1, 2 bağı parça ile belirlenirken M epitopunun baskın olduğu tipte dirsekli, dört parçalı ve bir α -1, 3 bağı bölge ile belirlenir. Lipopolisakkaritte 4-amino, 4, 6 dideoksimannoz bulunması *E. hermanni*, *E. coli* O:157, *F. tularensis*, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *V. cholerae* O:1 ve *Y. enterocolitica* O:9'un LPS ile çapraz reaksiyon vermesine neden olur. Bu durum özellikle *F. tularensis*'in sebep olduğu infeksiyonlarda önemlidir. Nonsmooth suşların LPS (R-LPS) yapısı temelde S-LPS'ye benzerdir. Fakat O zincirinin birkaç parçası ya yoktur ya da eksiktir (2, 12, 30).

Suşlar hem A hem de M antiserumları ile reaksiyona girerler. *B. melitensis*'in 3 biyotipinden, biyotip 1'de M antijeni, biyotip 2'de A antijeni fazla bulunmakta, biyotip 3'de ise M ve A antijeni yaklaşık aynı oranda bulunmaktadır (19). *B. melitensis*'de A'nın M'ye oranı 1/20 iken *B. abortus* ve *B. suis*'de bu oran 20/1'dir. Serolojik metotlar ile *B. melitensis*'i, *B. abortus* ve *B. suis*'den ayırmak mümkün olmakta, ancak *B. abortus*'u, *B. suis*'den ayırt etmek olası görülmemektedir (6, 12, 30).

Dış ve iç membranda pek çok sitoplazmik ve periplazmik protein antijenleri de karakterize edilmiştir. Bazıları infeksiyon süresince immun sistem tarafından tanınır ve teşhiste kullanılan testlerde antijen olarak yararlanılır (74). Son zamanlarda ribozomal proteinler, immunolojik olarak önemli komponentler olarak tekrar ortaya çıkmışlardır. Yirmi yılı aşkın bir süredir saflaştırılmamış ribozomal preparatlar ile *Brucella*'ya karşı antikor ve hücrel yanıt oluşumu ispat edilmiştir. Bununla birlikte

son yıllara kadar tek başına böyle bir aktivite gösteren komponent tanımlanamamıştır. Özellikle L7/L12 ribozomal proteinler hücresele yanıtı uyarmada önemlidir. Onlar gecikmiş hipersensitivite yanıtına neden olan brusellin komponentlerini ortaya çıkarırlar. Daha çok *B. abortus* suşlarında bulunan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerin immün serumlar ile aglütinasyonuna engel olurlar. Bu durum serumların 100°C'de inaktive edilmesi ile ortadan kalkmaktadır. Ayrıca potansiyel aşı komponenti olmaya adaydırlar (9, 12).

Diğer patojenik bakterilerin aksine *Brucella* etkenlerinde ekzotoksin, sitolizin, kapsül, fimbria, flagella, plazmid, lizojenik faj, direnç formları, antijenik varyasyon veya endotoksik lipopolisakkarit gibi hiçbir klasik virulens faktörü tanımlanamamıştır. Bu gibi virulens faktörlerinin yerine brusellalarda bulunan kimi moleküler determinantlar invazyon, intraselüler direnç ve fagositlerde çoğalmayı sağlar (12, 75).

Brucella cinsinde yer alan bakteriler sahip oldukları lipopolisakkarid yüzeyinden dolayı diğer gram negatif bakterilere kıyaslandığında çok düşük immün yanıtı neden olurlar. *Brucella*'ların özellikle makrofaj ve diğer fagositlerin içinde saklanarak retikuloendotelial sisteme saldırı eğilimi mevcuttur (75, 101). Duyarlı hayvanlarda, etkenin fagositlerin antimikrobiyal etkilerinden kaçma yetenekleri infeksiyonun patogeneğinde kritik bir rol oynar (19). Brusellozise özgü dalgalı ateş fagositik hücrelerden bakteri ve bakteri komponentlerinin salınımı ile ilişkilidir. Özellikle *B. melitensis* serumun bakterisidal aktivitesine ve lökositlerde fagositozun son basamağı olan öldürülmeye dirençlidir. Bu durum etkenin virulansını artırmaktadır (82). Gebe hayvanlarda etkenler plasenta ve fötüse yerleşir, sonuçta abortlar meydana gelir (6). Brusellozis etkenleri vücuda girdikten sonra bölgesel lenf düğümlerine ve buradan da Duktus torasikus yolu ile birkaç gün içinde kan dolaşımına geçerler. Lipopolisakkarit yüzey antijenlerine karşı antikorlar gelişir. Şekillenen anti-LPS antikorları *Brucella* türlerini opsonize ederek makrofajlar tarafından fagosite edilmelerini kolaylaştırırlar. Her ne kadar şekillenen antikorların ölçümü teşhis amacıyla kullanılırsa da, gelişen infeksiyonda hücresele immün yanıt baskındır (181). B lenfositleri, dolaşımda devamlı kalan ve bağışıklık sistemini aynı antijenle tekrar karşılaştığı durumlarda (infeksiyon veya aşılama) savunan bellek

hücrelerine dönüşürler. Brucella etkenleri kan dolaşımında 2-3 hafta kaldıktan ve bakteriyemi sonucu çeşitli organ ve dokulara yayıldıktan sonra kandan çekilirler. Organ ve doku hücrelerinde canlılıklarını koruyabilir ve hatta çoğalarak hücre içi bakteriler için tipik olan granuloamları oluştururlar. Brucella bakterileri, bu odaklardan aralıklarla tekrar kana karışabilirler. İnfeksiyon etkeni zamanla lenf düğümlerine ve dalak, meme, arka bacak lenf düğümleri gibi lenfoid dokulara lokalize olur. Etken özellikle, gebe uterus, lenf düğümleri, testisler, bursalar, tendo kılıfları, memeler ve seyrek olarak da eklemlere yerleşir. Bu organ ve dokulara lokalize olan bakteriler, makrofajların ve özellikle epitelooid hücrelerin buralara infiltrasyonuna neden olurlar. Bu nedenle daha ilk anlarda bu bölgelere makrofaj yığılmaları görülür (6, 12, 19).

Hayvanların fötüs zarlarında bulunan polihidrik bir alkol olan eritritol brusellozis etkenlerinin (özellikle *B. abortus*) üremelerini olumlu yönde etkilediğinden burada üreme çok fazla olur ve buna bağılı olarak kotiledonlarda yangısal ve nekrotik değışiklikler meydana gelir. Bu değışmeler sonucu fötüsün beslenme ve gelişmesi durur sonuçta fötüs ölür. Etken fötüsa ait korionik villi epitellerinde üredikten sonra korion ve uterus mukozası arasına yayılır. Villilerde oluşun yağ dejenerasyonu ve otoliz sonucu meydana gelen fibrinopurulent eksudat fötal ve maternal zarlar arasındaki bağılantının gevşemesine böylece fötal membranın ayrılması sonucu yavrunun atılmasına neden olur. Gebe hayvanların Brucella etkenlerine karşı duyarlı olmaları bu şekilde açıklanmaktadır (19, 33).

Brucella infeksiyonlarında abortların büyük çoğunluğu gebeliğın ikinci yarısında meydana gelir (96). Koyun ve keçilerde gebeliğın son dönemlerinde infeksiyona bağılı olarak yavru atmalar görülür. Ayrıca, mastitis, genel düşkünlük, zayıflama, eklemlerde şişkinlik ve topallıklar şekillenir. Genellikle, *B. melitensis*'ten ileri gelen koyun brusellozisinde ilk yıllarda yavru atmalar çok yüksek oranlarda seyreder. Takip eden yıllarda ise yavru atma oranı düşer. Bu durum hiçbir zaman hastalığın söndüğü anlamını taşımaz. Bazı vakalarda etken plasenta içinde kalabilir. Bu durumda infertilite ve septisemi meydana gelebilir. Özellikle abort öncesi etkenler süt, gaita ve vajinal akıntı; abort sonrası ise embriyonal zar ve sıvılarla çevreye bol miktarda aralıklı olarak yayılırlar. Mastitiste memelerin görünüşü normal

olsa da sütte yapısal değişiklikler olur ve meme içinde de nekrotik odaklar gözlenir. Bu odakların çevresi fibröz bir kapsülle çevrilir. Kotiledonların ortaları boz sarı renkte, nekroze olmuş ve çevreleri koyu kırmızıdır. Uterus mukozası şişkindir. Atık yavruda karaciğer üzerinde milier nekrozlar ve hepatitis gözlenebilir (6, 19). İnfekte hayvanların çoğu sütleri ile etrafa mikroorganizma saçarlar. *B. abortus* için üreme yönünden iyi bir ortam olan memeler, normal bir görünümde olmasına rağmen etken interstisyel mastitis oluşturarak supramamam lenf yumrularında büyümeye neden olabilir (8). Beytut ve ark. (18) Kars yöresinde 2002 yılı kış ayları süresince ilk gebeliklerinde atık yapmış ve Brucella-seropozitif (1/160-1/1280) oldukları saptanan 11 ineğe ait meme bezi ve supramammal lenf düğümlerini patolojik, immunohistokimyasal ve bakteriyolojik olarak incelemiştir. Araştırmacılar patolojik olarak meme bezlerinde lenfo-plazmositik ve histiyositik intersitisyel mastitis, lenf düğümlerinde folliküler hiperplazi ve medullar plazmasitozis gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Xavier ve ark. (180) gebeliklerinin 6-7. aylarında konjunktival yol ile deneysel olarak *B. abortus* ile infekte ettikleri 42 ineği patolojik, immunohistokimyasal ve bakteriyolojik olarak incelemişler, doğumu takiben ya da aborttan sonra 48 saat içerisinde deneklere otopsi yapmışlardır. İneklerde gözlenen en belirgin lezyonların nekrotik ve suppuratif plasentitis ile lenfohistositik mastitis, atık fötuslarda ise fibrinöz pleuritis, fibrinöz perikarditis ve bronkopnömoni olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar bu ineklerden alınan süt ve meme dokusu örneklerinden *B. abortus* izolasyonu yapıldığını kaydetmişlerdir. Brusellozise neden olan etkenler eklemlere ve tendo zarlarına yerleşerek buralarda kronik iltihaplanmalara neden olurlar. Daha çok diz eklemine ve daima tek eklemde artritisi görülür. Gebe hayvanlar abort yapmasa bile artritisi görülebilir (8). Johnson ve ark. (89) deneysel olarak *B. abortus* S19'u intra-artikuler olarak injekte ettikleri genç sığırlarda bakteriyi synovial biopsiden izole etmişler ve etkenin oluşturduğu lezyonları immunohistokimyasal ve elektron mikroskobu ile görüntülemişlerdir.

Brusellozide ortaya çıkan ve atipik bir özellik gösteren klinik belirtiler çoğu zaman infeksiyonu tanımak için yetersiz kalırlar. Brusellozis'in inkübasyon süresi etkenin giriş yolu ve sayısına bağlı olarak 10-250 gün arasındadır. Sığırlarda görülen başlıca klinik bulgular yavru atma, kısırılık, orşitis ve mastitistir. Gebelik süresince hayvanlarda klinik belirti görülmez. Yavru atımı gebeliğin her döneminde

oluşabilirse de genellikle gebeliğin ikinci yarısında (daha çok 6-8. aylarda) meydana gelir (19, 96). Bunun nedeni, infeksiyonun inkübasyon periyodunun uzunluğudur (170). Genellikle ilk kez infekte olan ineklerin % 80'inde atık olguları gözlenirken, hastalığın kronikleşmesi halinde bu oran % 25-50 dolayındadır. İnfekte inekler abort veya doğum yaptıktan sonra vajina mukozasında kırmızı renkte nodüller bulunur. Vajinal akıntı mukopurulent, gri-beyaz ve kötü kokuludur. Bu akıntı 1-2 hafta sonra kesilir. Gebeliğin 6. ayından sonra meydana gelen abortlarda fötüs canlı olarak atılabilir ve 1-4 gün içinde gelişen gastroenteritis veya septisemi sonucu ölürlür. Abortlardan sonra plasentanın içeride kalmasına (Retentio secundarium) ve metritise çok sık rastlanır. Özellikle geç yavru atan hayvanlarda normal olarak plasenta düşmez ve yardımı gerektirir. İnfeksiyonda görülen diğer semptomlardan biri olan kısırlığın nedeni uterusdaki yangısal reaksiyonlar veya yumurtalıkta oluşan atonidir. Hastalığın kronikleştiği durumlarda daha çok görülür (8). Brusellozis etkenleri hayvanlarda atıklara neden olurken insanlarda görülen abort etiolojisindeki yeri tam olarak bilinmemektedir. Hayvan ve insanlarda görülen abortların farklılığı insan plasentasında eritritol bulunmaması ve amniyotik sıvısında Brucella etkenlerini inhibe eden aktivitenin bulunması gibi faktörlere bağlıdır (95, 154). Ancak Sayılır ve ark. (151) Wright aglütinasyon testi ile infeksiyona yakalandıklarını saptadıkları iki hamile kadının kan kültürlerinde Brucella etkenlerini üretmişler ve bu iki hastada da düşük olgusu görülmüştür.

İnfeksiyonun erkek hayvanlarda oluşturduğu en önemli klinik semptom orşitistir. Penis kızarır ve üzerinde darı tanesi büyüklüğünde kırmızı kabarcıklar gözlenebilir. Testis ve testisi saran katmanlarda iltihaplanma ve ödem görülür. Başlangıçta oluşan ağrı 3-4 hafta sonra kaybolur ve testislerdeki ödem azalarak sertleşmeye başlar. Orşitis akut olarak seyrederse boğalarda kısırlık oluşur. Bu devrede boğalar spermaları ile bol miktarda mikroorganizma çıkarırlar (8).

Sığırlarda brusellozis hastalığında genel olarak yavru atımından başka klinik belirtiler gözlenmez. Bu durum, *Trichomonas fetus*, mikotik abortuslar, enzootik abortuslar, Campylobacteriosis, Listerial abortuslar ve gıda zehirlenmeleri ile karışır. Bu nedenle direk (etkenin izolasyonu ve identifikasyonu) ve indirek (serolojik, allerjik) teşhis metotlarına başvurulur. İnfeksiyon etkeninin izolasyonu ve

identifikasyonu kesin teşhis için çok önemlidir. Ancak bazen bu mümkün olmaz, bu durumda serolojik ve alerjik indirek teşhis metotlarına başvurulur. İnfeksiyonun teşhisi amacıyla laboratuvara kan, atık yavru, uterus-vajen akıntısı, plasenta, süt, sperma vs. gibi çeşitli patolojik materyaller gönderilir. Laboratuvar muayenelerinden bakteriyoskopi, kesin teşhis için yeterli değildir. Atık mide sıvısı, karaciğer ve akciğeri ile anaya ait vajinal akıntı, kotiledonlar, dalak, fötal membranlar vs. gibi şüpheli materyallerden frotiler hazırlanır ve bu frotiler Stamp (modifiye Ziehl-Neelsen), modifiye Köster ve Gram boyama metotları ile boyanarak incelenirler. Kültürel yoklamalar için özel besi yerleri kullanılır. Brucella'lar genellikle bu ortamlarda yavaş ve güç ürerler. Hayvan deneyinde kobay kullanılır. Elde edilen kültürler ve kontaminasyon ihtimali olan marazi maddeler (süt, idrar vs.); intraperitoneal, subkutan ve kas içi yolla deney hayvanlarına verilir. Her örnek için iki deney hayvanı kullanılmalıdır. Deney hayvanlarının 3. ve 6. haftalarda kanları alınarak serolojik inceleme yapılır ve sonra öldürülürler. Otopside görülen patolojik lezyonlar değerlendirmeye alınır ve özellikle dalak, karaciğer vs. gibi lezyonlu organlardan uygun besiyerine ekimler yapılarak izolasyona çalışılır (6).

Brusellozisin kesin teşhisi etkenin izolasyonuna ve identifikasyonuna bağlı olmasına rağmen çok sayıda hayvan sözkonusu olduğunda kültürel muayenelerle infekte hayvanları saptamak saha ve laboratuvar personeli için pratik değildir (108). Ayrıca birçok nedenden dolayı infekte hayvandan etken izolasyonu her zaman mümkün olmayabilir (61, 79). Bundan dolayı brusellozisin kontrol ve eradikasyonu, serolojik testlerle reaktörlerin saptanmasına dayandırılmıştır. Bir sürüde brusellozisin belirlenmesi şüpheli sığırların serum, süt, vajinal mukus ve semen plazmalarında bulunan ve Brucella etkenlerine karşı oluşan antikorların saptanması ile olur (17, 87). Serolojik teşhis için kan örneklerinin genellikle yavru atımından 15-20 gün sonra alınması gerekmektedir (61).

Brusellozisin serolojik teşhisinde Milk Ring Testi (MRT) (171), Serum Aglutinasyon Testi (SAT) (11, 107), Komplement Fiksasyon Testi (KFT) (21, 136), Rose Bengal Plate Test (RBPT) (20), Enzyme Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) (68, 152), Rivanol Aglutinasyon Testi (RAT) (84, 123), 2-mercaptoethanol testleri (17) yaygın olarak kullanılmaktadır. Otlı ve ark. (131) Kars yöresinde atık

yaptığı bilinen 27 sürüden alınan 407 sığır kan serumunu RBPT ve SAT ile incelemişler ve sırasıyla 134 (%32.92) ve 141 (%34.64) örnekte pozitiflik saptamışlardır. Araştırma kapsamında aynı bölgeden alınan 246 yetiştirici ve 28 veteriner hekime ait kan serumlarını da RBPT, SAT ve ELISA ile incelemişlerdir. Veteriner hekimlerden alınan örneklerin 13 (%46.42)'ünde her üç testle brusellozis yönünden pozitiflik belirlerken, yetiştiricilere ait örneklerin sırasıyla 32 (%13), 35 (%14.22) ve 44'ünde (%17.88) pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar yörede brusellozis prevalansının hem sığırlarda hem de insanlarda yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Serum Aglutinasyon Testi, brusellozisin kontrol ve eradikasyonunda uluslararası uyuma yardım eden önemli bir serolojik testtir. Çünkü bu test IgM, IgG₁, IgG₂ ve IgA tipi antikorların aglutinasyon özelliklerinin bir ölçüsüdür. Akut infeksiyonları saptamada kullanılır (13, 17). Bununla birlikte SAT hayvanlara bireysel olarak uygulandığında yanlış negatiflik ya da yanlış pozitiflik sonuçlarından her ikisini de verebilir. Bu nedenle SAT brusellozisi güvenilir olarak sadece ana sürüde belirler (17). KFT'nin aktivitesi temelde belirli bir komplemente karşı oluşan spesifik IgM ve IgG₁ tipi antikorları saptamasına dayanır. Testte genellikle IgG₁ tipi antikorlar saptanır ve IgG₂ tipi antikorların aktivitesi engellenebilir (56, 106). KFT doğal infekte hayvanlarda yüksek spesifikite ve sensitiviteye sahiptir (3). KFT'deki uluslararası komplement fizyasyon birimi (IU) ≥ 20 ve SAT'de ≥ 30 olduğu zaman sığırlar brusellozis ile infekte kabul edilir. SAT ve KFT'nin birlikte uygulandığı ve kesin sonuç alınamadığı durumlarda Coombs testi yararlı olabilir. Coombs testi SAT sonuçlarını doğrulayan ve IgG₂ tipi antikorları tespit eden bir testtir. Tüm dünyada brusellozis için referans test olarak KFT kabul edilmiş, SAT ve RBPT ise tarama testi olarak kullanılmaktadır (17). Çelebi ve Atabay (35) Kars yöresinde atık vakalarının olduğu ve Brucella aşısı uygulanmamış 16 farklı sürüden alınan 400 koyun kan serumunu SAT, RAT, RBPT ve KFT ile incelemişler ve sırasıyla 147 (%36.7), 142 (%35.5), 139 (34.75) ve 135 (%33.75) örnekte pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar brusellozisin koyunlarda önemli bir atık etkeni olduğunu ve bu bölgedeki diğer hayvan ve insanlar için potansiyel risk taşıdığını bildirmişlerdir. Ayrıca brusellozisin serolojik teşhisinde en az iki testin yapılması gerektiğini ve KFT'nin doğrulama testi olarak kullanılmasını önermişlerdir.

Rose Bengal Plate Testi'inde, *B. abortus* suşu (1119-3 veya *B. abortus* biyovar S99) ile hazırlanan antijen kullanılır (3). Rose Bengal boyası ile boyanmış olan bu antijen Dr. Pietz tarafından geliştirilmiş olup, pH'sı 3.6 (3.6 ± 0.05)'dir (20). pH'nın düşük olması testi spesifitesini artırarak IgM'lerin aktivitesini etkisiz kılar ve IgG'lerin (özellikle IgG₁) reaksiyonda rol oynamamasını sağlar (11, 17, 106). Bununla birlikte bazı infekte sığırlarda KFT ile pozitiflik saptanırken RBPT ile negatif sonuç alınmıştır (144).

İnfekte hayvanların tümünü belirlemede konvansiyonel serolojik testlerin yetersiz kalması sonucunda, sığırlarda *B. abortus* infeksiyonlarını ortaya koymak üzere, antijen, konjugat ve substrat içeren geniş kapsamlı bir ELISA tekniği geliştirilmiştir (126). ELISA'da brusellozisin tespiti için süt ve serum örneklerinin ikisi de kullanılabilir. Test, sütte *Brucella* antikorlarının bulunmasında MRT'den daha spesifik ve sensitivdir (16). Bununla birlikte doğumdan bir hafta sonra süt az miktarda kolostrum içerdiği zaman bile yanlış pozitiflik verebilir (94, 163). ELISA, SAT kadar sensitiv olup sonuçları genellikle KFT ile uyumludur (145). Fakat bazı durumlarda KFT pozitif iken ELISA negatif sonuç verebilir. Bu nedenle test KFT'den daha az sensitivdir (3, 164).

Brusellozisin tanısında alerjik reaksiyonlardan da yararlanılmaktadır. Çeşitli ülkelerde, birçok araştırmacı tarafından günümüze kadar farklı metot ve teknikler ile çeşitli isimler altında allerjenler hazırlanmış ise de bugün kullanılan iki allerjen vardır. Bunlar Çin'de ve birçok Avrupa ülkesinde hazırlanan *Brucella* hücre hidrolizati (F-fraksiyonu) ve Fransa'da elde edilen lipopolisakkaritsiz protein (Brucellin-INRA) den ibarettir (93). Kültür ve serolojik testler kadar güvenilir sonuç vermeyen alerjik testlerin bazen iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir (59). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından koyun, keçi, domuz ve insanlarda brucellohydrolysate, MBP antijen ve mellitin isimli allerjenlerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Ancak bu konuda henüz bir standardizasyon sağlanamamıştır (3). Allerjenler; yağlı kuyruklu koyunlara, oftalmo veya intra-palpebral olarak, bazen de subkutan olarak, çoğunlukla da koyunların kuyruk altı derisine uygulanır. İntra-palpebral uygulama, pratik ve zararsız olmasından dolayı tercih edilmektedir (3, 59).

Brusellozisin teşhisinde temel olarak bakteriyolojik ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Teşhis için altın standart, kültüre edilmiş etkenin mikrobiyolojik olarak tanımlanmasıdır (3, 27, 140). Bu yaklaşım kesin olmasına rağmen birkaç sakıncası da mevcuttur. Klinik örneklerden *Brucella* etkenlerinin kültüre edilmesi zaman almakta (28) ayrıca etkeni tanımlamada kullanılan spesifik testler karmaşık olup çok deneyimli personel tarafından yapılması gerekmektedir. Brusellozis zoonotik bir hastalıktır ve bakterinin canlı olarak muhafaza edilmesi laboratuvar personeli için büyük bir tehlikedir (27, 28). Serolojik testler ise çok duyarlı ve spesifik olmalarına rağmen bir infeksiyonun dolaylı belirleyicileridirler. Çapraz reaksiyonlar sonucu oluşan yanlış teşhis ender olmasına rağmen önemlidir (27). Aşılama ile bağışıklık kazanan hayvanlar test edildiğinde yanlış sonuçlar alınmaktadır (65). Epidemiyolojik araştırmalar, daha hızlı, basit ve hassas prosedürlere ihtiyaç olduğunu göstermiştir. Bu nedenle son yıllarda moleküler DNA teknolojisi kullanılarak genetik tanımlanma yoluna gidilmektedir (27, 51). Mullis ve Faloona tarafından 1987 yılında yüksek duyarlılığa sahip bir DNA teşhis aracı olarak geliştirilen ve PCR olarak adlandırılan metot hızlı, kolay ve düşük maliyetlidir (28, 119). PCR tekniği brusellozisin tanısında kan kültüründen daha fazla sensitivite ve serolojik testlere göre ise daha fazla spesifite sağlar (135). Test sisteminin spesifitesi filogenetik olarak *Brucella* ile ilişkili suşların DNA'sı ve serolojik olarak kros reaksiyon gösteren bakteriler ile değerlendirilir (2). PCR, inokulasyondan sonra *Brucella* türlerini en erken (ortalama 10 gün içinde) belirleyen yöntemdir. Bu süre Rose Bengal testte ortalama 18 gündür (105). PCR, *Brucella* türlerinin süt, peynir gibi ürünler ile insan ve sığır kanı, doğal olarak infekte olmuş ineklere ait organlar ve diğer çeşitli klinik materyallerde belirlenmesi için güvenilir bir yöntemdir (2). PCR metodu, güvenilir sonuçlar gösteren 16S rRNA gen sekansına dayanır (83). *B. abortus*'un 16S rRNA geninden primer olarak seçilen oligonukleotidler, gen homolojisi hemen hemen %100 olduğu için diğer tüm *Brucella* türlerinin identifikasyonunu sağlayabilir (52). Baily ve arkadaşları, bütün *Brucella* türlerinde korunan BCSP31 gen bölgesini hedef alan PCR yöntemi geliştirmişlerdir (10). Bu gen 31 kDa molekül ağırlıklı *B. abortus*'un eksternal membranının immunojenik proteinini kodlar. Amplifikasyon ürünü 223 baz çiftinden ibarettir. *B. abortus* ve *B. melitensis* için spesifik olan bu yöntemde diğer *Brucella* türleri denenmemiştir (111).

Da Costa ve arkadaşları (51), 31 kDa Brucella proteini, ısı şoku proteinleri (*DnaJ*, *DnaK*, *HtrA* ve *GroEL*) ve 16S rRNA genlerini kodlayan spesifik primerler kullanmışlardır. Araştırmacılar tüm Brucella türleri, referans ve aşı suşları ile diğer bazı bakterilerden elde ettikleri DNA'yı tekli (single) ve "nested" PCR ile amplifiye etmişlerdir. Her iki yöntem karşılaştırıldığı zaman "nested" yöntemi tekli PCR'a göre en az on kat daha fazla duyarlı bulunmuştur. Restriksiyon enzim analiz yapıldıktan sonra bile Brucella türleri ve biyovarları arasında amplifiye olan fragmentler yönünden herhangi bir fark tespit etmemişlerdir. Çalışmada Brucella, *Ochrobactrum anthropi* ve *Phyllobacterium* spp. dışındaki tüm türler negatif sonuç vermiştir.

İnsan brusellozisi ya da besinlerin Brucella ile kontaminasyonu gibi çalışmalarda Brucella cinsinin tür bazında ayrımı önemli olmayabilir. Bu tür çalışmalarda cins spesifik PCR yeterlidir. Fakat eradikasyon amacıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda özellikle geniş coğrafi alanlarda infeksiyondan sorumlu tür ve biyovarı belirlemek açısından Brucella cinsinin tür spesifik ayrımı önemlidir. Bu tür PCR yönteminde strateji multipleks suş spesifik hedef dizileri ya da çok değişken DNA dizilerini tanıyan özgüllüğü yüksek olan çift primerler kullanılmasıdır. Ayrıca bu tür yöntemlerde 20–25 bp gibi uzun primerler kullanılarak yanlış pozitiflik riski azaltılmaktadır (28). İlk kez Bricker ve Halling (25) tarafından Brucella türlerinin hepsinde korunan insersiyon sekans bölgelerinden biri olan IS711 (IS6501 olarak da bilinmektedir) gen bölgesini saptayan bir yöntem geliştirilmiştir. Her türde bulunan IS elementini taşıyan kromozal bölge türe özgüdür. Araştırmacılar geliştirdikleri bu yönteme identifiye edilen ve ayrımları yapılan Brucella türlerinin (*B. abortus* biyovar 1, 2 ve 4; *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* biyovar 1) baş harflerinden (Abortus, Melitensis, Ovis ve Suis) oluşan AMOS-PCR adını vermişlerdir. Bu PCR yönteminde araştırmacılar IS elementine bağlanan genel bir primer ve IS sekansında türe özgü bir primer kullanmışlardır (25, 28). *B. abortus* biyovar 1, 2 ve 4 498 bp, *B. melitensis*'in bütün biyovarları 731 bp, *B. ovis* 976 bp ve *B. suis* biyovar 1 285 bp ürün amplifiye eder. AMOS-PCR'ın asıl dezavantajı saha suşu ile aşı suşunu ayırt edememesidir. Aynı araştırmacılar bu yöntemi modifiye ederek (bir primer ekleyerek) ve suş spesifik primer kullanarak *B. abortus* saha suşları ile yaygın olarak kullanılan S19 ve RB51 aşı suşlarının (364 bp amplikon) ayrımını yapmışlardır. Ayrıca çift primer (eri1 GCGCCGCGAAGAACTTATCAA

ve eri2 CGCCATGTTAGCGGCGGTGA; eri eritritol katabolizması için gereklidir) kullanarak S19 aşısı suşları ile saha suşlarının ayırımı yapmışlardır. Bu primerler S19 aşısı suşu hariç diğer tüm *Brucella* suşlarında 178 bp fragmentleri amplifiye ederler (26). Bu yöntem ABD’de Tarım Bakanlığı’na bağlı Ulusal Veteriner Araştırma Laboratuvarı’nda kullanılmıştır. Konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle test edilen 231 örnekte %100 oranında başarılı bulunmuştur. Bu örneklerde *B. abortus* saha suşu ile *B. abortus* RB51 ya da *B. abortus* S19 aşısı suşlarının ayırımı doğru bir şekilde yapılmıştır (62). Fekete ve ark. (65) sığırların aşısı suşu olan S19’dan elde edilen 43 kDa’luk dış membran proteininin 635 bp’lik fragmanının amplifikasyonunu sağlayan açıklanmamış bir sekansın primerlerini üretmiştir. Ocampo-Sosa ve ark. (127) IS711 insersiyon sekansına dayalı *B. abortus* biyovar 5, 6, 9 ve biyovar 3’ün yeni bir alt grubu olarak tanımlanan 3b’yi tanımlayan bir PCR tekniği geliştirmişlerdir. İlk kez Ficht ve ark. (69) tarafından tanımlanan *omp2* lokusuna özgü ayırıcı PCR teknikleri de geliştirilmiştir. Bu lokusta her ikisinde 36 kDa’luk dış membran proteinlerini kodlayan *omp2A* ve *omp2B* adı verilen iki gen bölgesi bulunmaktadır. Bu gen bölgesi *Brucella* türlerinde iyi bir şekilde korunmasına rağmen bazen delesyonlar (*B. abortus* biyovar 1, 2 ve 4’ün *omp2A* geninde oluşan 115 bp’lik delesyon gibi) meydana gelmektedir. Leal-Klevezas ve ark. (103) bu polimorfizmi kullanarak *B. abortus*’u diğer *Brucella* türlerinden ayırmışlardır. Cloeckert ve ark. (39) *omp2a* ve *omp2b* gen sekanslarına dayanan PCR tekniği geliştirmişlerdir. Bu teknikte amplifikasyondan sonra amplikonların restriksiyon endonükleazlar ile kesimi yapılmaktadır. RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism-PCR) adı verilen bu yöntemle çoğu *Brucella* türünü ve bazı biyovarları tanımlamayı ve ayırmayı başarmışlardır. Araştırmacılar *omp25* ve *dnaK* genleri ile yaptıkları çalışmada dokuz farklı restriksiyon enzimi kullanmışlar fakat sadece *B. melitensis* ve *B. ovis*’i diğer *Brucella* türlerinden ayırmışlardır (38, 39). Cloeckert tarafından tanımlanan ve Sifuentes-Rincon ve ark. (156) tarafından modifiye edilerek yapılan *omp2* lokusunun RFLP-PCR analizi birçok araştırmacı tarafından *Brucella* türlerinin ayrımsal identifikasyonu ya da yeni tür ve suşların karakterizasyonu için tercih nedeni olmuştur (40, 116).

AFLP-PCR (Amplified fragment length polymorphism-PCR) son zamanlarda çoğu bakteri türünün ayrılmasında yararlı bir teknik olarak bildirilmiştir. Teknik tüm

genom üzerindeki değişiklikleri sıralayan değerli bir metottur. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonu esasına dayanan bir genotiplendirme metodudur. Yöntemde ya iki farklı restriksiyon enzimi ve amplifikasyon için iki primer kullanılmakta ya da tek restriksiyon enzimi ve tek primer kullanılmaktadır. Amplifikasyon ürünleri poliakrilamid jelde elektroforeze tabi tutulur (49). Bu metot *Brucella* izolatlarını açık bir şekilde tanımlama ve bazı istisnalar hariç son zamanlarda bulunan türleri de belirleyebilen yeterli düzeyde ayırım gücüne sahiptir. AFLP-PCR verilerinin epidemiyolojik önemi sınırlı olmasına rağmen *Brucella*'nın taksonomisi ile diğer tür ve biyovaryantları arasındaki ilişki hakkında yararlı bilgiler sağlar (49, 178).

RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA-PCR) yönteminde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine rastgele seçilen bir veya daha fazla primer ile DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması sağlanır. Konakçı önceliğine göre yakın ilişkili *Brucella* suşlarının ayırımı sağlayan bu teknik özellikle birden fazla *Brucella* türünün endemik olduğu bölgelerde yararlı olabilir (157, 169, 175). Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, amplifiye edilen DNA parçalarının sayısı ve büyüklüğü de agaroz jel elektroforezinde farklılık gösterecektir. Amplifikasyon sonucunda jelde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatların genetik olarak ilişkili olabilecekleri şeklinde yorum yapılabilir (114, 172, 175). Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı standardizasyonunun sağlanmasındaki zorluklardır. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik oranı düşüktür. Bu sorunları gidermek için kullanılan DNA konsantrasyonunun primer konsantrasyonuna oranı, DNA ekstraksiyon protokolü, $MgCl_2$ ve dNTP konsantrasyonlarının iyi ayarlanması gerekmektedir (129, 169).

PCR tekniğinin gelişiminin başlangıcında test örnekleri genelde kültürde üreyen mikroorganizmaların DNA'sının saflaştırılması ve amplifikasyonuna dayanmakta iken, sonraları etkenin biyolojik savaş ajanı olarak kullanılabilmesi,

kültürde üretilmesinin zor olması ve acil durumlarda hızlı sonuç alınmasının gerekli olması gibi nedenlerden dolayı kontamine materyallerden (kan, doku, süt ve süt ürünleri gibi) direkt Brucella DNA'sı saptayabilen yöntemler geliştirilmiştir (28). Brucella etkenlerinin hızlı ve spesifik tanısı için geliştirilen PCR temelli teknikler Tablo 3'te gösterilmiştir. Brucella cinsinde genetik homoloji nedeniyle alt tiplendirme yapmak oldukça zordur. Son yıllarda Bricker ve ark. (24) tarafından VNTRs (variable number tandem repeats) multi lokus analizi ile suşların tiplendirilmesi yapılmaktadır. Araştırmacılar bu yöntemi HOOOF-Prints (Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger Prints) olarak isimlendirmişlerdir.

Hayvan hastalıklarının tanısında bir teşhis aracı olarak PCR; atık fötusa ait dokular ve maternal dokularda Çetinkaya ve ark. (50), Cortez ve ark. (48), Gallien ve ark. (70), Fekete ve ark. (67), Güler ve ark. (78), kanda; Guarino ve ark. (77), sütte; Tantillo ve ark. (168), Leal-Klevezas ve ark. (104), Romero ve Lopez-Goni (142), Romero ve ark. (143), Rijpens ve ark. (139), nazal sekresyonlarda; Sreevatsan ve ark. (158), semende; Amin ve ark. (5) gibi araştırmalarda doğrudan Brucella DNA'sını saptamak amacıyla geniş ölçüde kullanılmıştır.

Tablo 3. Brucella etkenlerinin hızlı ve spesifik tanısı için geliştirilen PCR temelli teknikler (2).

PCR/amplifikasyon ürünleri	Gen lokusu	Primerler (5'→3')	Kaynak
16S-23S-rRNA-PCR (P5/P8 726 bp, P6/P7 678 bp)	16S-23S-rRNA ara bölgesi	BRU-P5 (10-29) (TCGAGAATTGGAAAGAGGTC) BRU-P6 (22-40) (AAGAGGTCGGATTATCCG) BRU-P7 (682-699) (CGAGCATTTCAGTCGAA) BRU-P8 (717-735) (GCATAATGCGGCTTTAAGA)	Rijpens 1996
16S-23S-rRNA-PCR (316, 399, 701, 916 ve 1530 bp)	16S-23S-rRNA ara bölgesi	KF5 (GAAGTCGTAACAAGG) KF6 (CAAGCATCCATCGT)	Fox 1998
16S-rRNA-PCR (800 bp)	16S-rRNA	Ba148-167F (TGCTAATACCGTATGTGCTT) Ba928-948R (TAACCGCGACCGGGATGTCAA)	Herman 1992
16S-rRNA-PCR (905 bp)	16S-rRNA	F4 (63-79) (TCGAGCGCCCGCAAGGGG) R2(947-966) (AACCATAGTGTCTCCACTAA)	Romero 1995
<i>omp2b</i> PCR	<i>omp2b</i>	bruspe1 (GCCTTCTGCGTAGCCTGAT) bruspe2 (CGATGACGTTTACTCCGGTA)	Ficht 1990
<i>BCSP31</i> -PCR (223 bp)	31 kDa <i>Brucella abortus-omp</i>	B4 (TGGCTCGGTTGCCAATATCAA) B5 (CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG)	Baily 1992, Matar 1996, Queipo-Ortuno 1997, Casanas 2001
<i>omp2</i> PCR (804-830 bp, 689 bp fragmenti amlifiye eden <i>B. abortus</i> biovar 1 hariç)	36 kDa <i>Brucella abortus-omp</i>	DSF (GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA) DSR (CACCCAGACAGCCCAA)	Leal-Klevezas 1995
<i>omp2</i> PCR (193 bp)	36 kDa <i>Brucella abortus-omp</i>	JPF (GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA) JPR (ACCAGCCATTGCGGTCGGTA)	Leal-Klevezas 1995
<i>omp2</i> PCR	36 kDa <i>Brucella abortus-omp</i>	2ab5' (ACTGACGGATCCGCGCTCAGGCGGCCGACGCAA) 2a900 (ACTGACTTCGAATTGCCTTTTCGGGGGCAATGA) 2ab200 (ACTGACTTCGAAACCAGCCATTGCGGTCGGTAC) 2b600 (ACTGAAGCTTAGCCGTCGATGTGGTAGT)	Sifuentes-Rincon 1997
AMOS-PCR (<i>B. abortus</i> bv 1, 2 ve 4 498 bp; <i>B. melitensis</i> 731 bp; <i>B. ovis</i> 976 bp; <i>B. suis</i> bv 1 285 bp)	tekrarlanan DNA sekansı <i>IS711</i> (<i>IS6501</i>)	<i>B. abortus-specific</i> (GACGAACGGAATTTTCCAATCCC) <i>B. melitensis-specific</i> (AAATCGCGTCTTGCTGGTCTGA) <i>B. ovis-specific</i> (CGGGTCTGGCACCATCGTCC) <i>B. suis-specific</i> (GCGCGGTTTTCTGAAGGTTCAAG) <i>IS711-specific</i> (TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT)	Halling 1993 Bricker 1994
IS-bağlı PCR	tekrarlanan DNA sekansı <i>IS711</i> (<i>IS6501</i>)	ISP1 (GGTTGTTAAAGGAGAACAGC) ISP2 (GACGATAGCGTTTCAACTTG) ISP3 (CACGGCTGTTCTCCTTTAAC) ISP4 (AGAAAACATTGACCGCATTC)	Ouahrani-Bettache 1996
<i>bp26</i> PCR (saha izolatu 1029 bp; Deniz memelisi izolatu 1900 bp)	<i>bp26</i> (<i>omp28</i>)	26A (GCCCCTGACATAACCCGCTT) 26B (GAGCGTGACATTTGCCGATA)	Cloekaert 2000

Tablo 3. Brucella etkenlerinin hızlı ve spesifik tanısı için geliştirilen PCR temelli teknikler (2). (Devamı)

<i>dnaK</i> PCR-RFLP (EcoRV restriksiyon bölgesi <i>B. melitensis</i> spp. nin ayrılmasında kullanılır)	<i>dna K</i> (hsp70 family)	70A (TCGAGGTCTTGGCAGTTTGC) 70B (TCCGTTTCATGCAGCGTGAC)	Cloekaert 1996
<i>rpsL</i> PCR-RFLP (510 bp ve bir NciI restriksiyon bölgesi ile kesimden sonra 348 bp <i>B. melitensis</i> aşısı suşu REV 1 in ayırımında kullanılır)	<i>rpsL</i>	RpsIA (GAGGGCTGACTCCGAATTG) RpsIB (ACGCTTCTCTGCCTTATGGC)	Cloekaert 2002
<i>B. suis</i> specific PCR (<i>B. suis</i> 420 bp; <i>B. abortus</i> 420 ve 650 bp)	<i>B. suis</i> spesifik hibridizasyon probu	Sense (GCTTATCGACGTTCTGGGCAGTCAC) Anti-sense (GGCACACAGGTCAATATCAGCGGTG)	Fayazi 2002
AP-PCR	Arbitrarily primer	P1 (GGACTGCATAAAAATTGGCAC) P2 (CAGCAGCAGCAAGACCTTCA) P3 (CGGCCACTGT) P4 (CGGCCCTGT) P5 (CGGCCCGGT)	Fekete 1992
REP-PCR ve ERIC-PCR	Tekrarlayan ekstragenik palindromik sekanslar; enterobakteriyal tekrarlayan intergenik ortak sekanslar	REP1R-1 (IIICGICGICATCIGGC) REP2-I (ICGICTTATCIGGCCTAC) ERIC1R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) ERIC2 (AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG) REP konsensusu içerisindeki inosine ait belirsiz pozisyonları içeren primerler	Mercier 1996, Tcherneva 1996
RAPD-PCR	Rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA	P5 (CGGCCCGGT) OPLO4 (GACTGCACAC)	Tcherneva 2000
real-time PCR (<i>B. abortus</i> 113 bp; <i>B. melitensis</i> 252 bp; <i>B. suis</i> 1 170 bp)	IS711	Forward primer CATGCGCTATGTCTGGTTAC <i>B. abortus</i> reverse primer GGCTTTTCTATCACGGTATTC <i>B. melitensis</i> reverse primer AGTGTTTCGGCTCAGAATAATC <i>B. suis</i> reverse primer ACCGAACATGCAAATGAC <i>B. abortus</i> FRET probe 1 GCCCTAGAACGCCTTTCGCAAGG (FLSN) <i>B. abortus</i> FRET probe 2 (Cy5) CAGATTAAGCCGAAACGGCCCC (p) <i>B. melitensis</i> FRET probe 1 GGTAAGCTATTCCAATCTCGCTATTG (FLSN) <i>B. melitensis</i> FRET probe 2 (Cy5) TAATGGCGTCTATTGGATATTACTGCT (p) <i>B. suis</i> FRET probe 1 CCCAAGCGATAATGCATTACC (FLSN) <i>B. suis</i> FRET probe 2 (Cy5) CCGCATAAGTAGGGTCTAAGCCG (p)	Redkar 2001

Brusellozis kontrol ve eradikasyonunda bugün için genel tedbirlerin (brusellozisten ari sürülere enfeksiyonu sokmamak, portörleri tespit edip sürüden ayırmak, hijyenik önlemleri zamanında almak ve devam ettirmek, bağışıklık artırıcı önlemler almak, sürüye dışarıdan getirilecek tüm hayvanların kontrol edildikten sonra sürüye sokmak, yurt içi hayvan hareketleri kontrol altında tutmak, yurt dışından ithal edilecek hayvanlara gerekli kontrol işlemlerinin sınır kapılarında uygulamak ve daha sonra ülke içine girişlerine izin verilmesi gibi) yanı sıra aşılama, test-kesim ve bu iki yöntemin birlikte uygulanması gibi üç temel yöntem kullanılmaktadır (87, 182). Ülkemizde hastalıkla mücadele aşılama ile yapılmaktadır. Yalnızca genç hayvanların aşılama ile tüm populasyonda immunité oluşması uzun yıllar alacağından mücadelenin başlangıcında daha kısa sürede ve etkili bir bağışıklık için genç ve erginlerin birlikte aşılama önerilmektedir. Şimdiye kadar çeşitli ülkelerde çok sayıda araştırmacı çeşitli aşilar üzerinde çalışmışlardır. Brusellozise karşı hayvanlarda immunité sağlamak amacıyla güden bu çalışmalar başarılı sonuçlar vermiştir. Bunların çoğu geniş ölçüde uygulanmış ve güvenilirlikleri üzerinde çalışılmıştır. Aşılama, hastalığı eradike edemez. Ancak insidensini çok düşük bir seviyeye getirerek ve hastalığın yayılmasını sınırlandırarak eradikasyona zemin hazırlar. Sığırlarda canlı *Brucella abortus* S19 aşısı, ölü adjuvanlı R 45/20 ve RB51 aşıları kullanılmaktadır. *B. abortus* suş RB51, bir LPS O-antijensiz suş 2308'in mutanlığı olup bu aşının uygulanması ile olumlu sonuçlar alındığı belirtilmektedir (153, 161). Kullanılan aşilar genellikle aglutinojenik aşilar olup iyi bir bağışıklık oluşturma gücüne sahiptirler. Ancak aglutinojenik aşilar uzun bir süre aglutine edici antikorların oluşumuna sebep olarak hastalığın tanısına yönelik yapılan testlerde yanlış pozitif sonuçların alınmasına neden olabilirler. Buna karşılık non-aglutinojenik bir aşı olan R 45/20 aşısının verdiği bağışıklık daha düşük bir düzeydedir (87). Sığırlar için S19, koyunlar için Rev.1 en yaygın ve kabul gören canlı aşilardır (6, 87). *B. melitensis* Rev.1 suşu ilk defa Elberg ve Meyer tarafından tanımlanmıştır. Ülkemizde ise bu aşı 1966 yılında kullanılmaya başlanmıştır. *B. melitensis* Rev.1 aşısı, 3-8 aylık kuzu ve oğlaklara veya dişi koyun ve keçilere koç katımından 1 ay önce uygulanmalıdır. Rev.1 aşısı ile aşılama koyunlarda ikinci veya üçüncü gebeliğin sonuna kadar koruma sağlanmaktadır (87, 88). Rev.1 aşısı ülkemizde 1968 yılından beri kuzu ve oğlaklara uygulanmaktadır. *B. abortus* S19 aşısı ise 4-8 aylık dişi

danalara ve 8 aylıktan büyük sağlıklı dişi sığırlara uygulanmalıdır. *B. abortus* S19 aşısı hayvanları dördüncü veya beşinci gebeliğe kadar enfeksiyona karşı korumaktadır. Bu aşı ülkemizde 1960 yılından beri uygulanmaktadır (87). Yoğun olarak enfekte olan ve özellikle ekstansif yetiştiriciliğin yaygın olduğu bölgelerde küçük ruminantlarda tek başına test-kesim yöntemiyle hastalığın eradikasyonu mümkün değildir. Bu nedenle aşılama enfeksiyonun kontrolünde başlıca kontrol stratejisini oluşturmaktadır. Aşılama enfeksiyona karşı hayvanların direncini artırmakta ve atık sayısını azaltmaktadır. Ancak uzun süren (5-10 yıl) etkili bir genel aşılama programı (populasyonun en az %80'inin aşılmasıyla) ile enfeksiyon oranı yeterince azaldıktan sonra (enfekte sürü oranı yaklaşık %1 olduğunda) test-kesim yöntemiyle eradikasyona başlanabileceği kabul edilmektedir (87, 88, 182).

Brusellozisin kontrolünde aşılama başlıca kontrol stratejisi olduğuna göre aşılama ile ilgili problemlerin doğru bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Aşıların hem insanlarda hem de hayvanlarda enfeksiyon oluşturma riski mücadele programının kritik elemanları olan, uygulayıcılar (Veteriner Hekimler) ve hayvan yetiştiricilerinde bir isteksizlik yaratmaktadır. Brusellozide aşılamanın etkisi kümülatiftir. Yetiştirici aşının yararını hemen görememektedir. Hastalığın kontrolünde onların işbirliği ve çabası olmaksızın başarı sağlamak güç olduğuna göre yetiştiricilerin eğitimi ve teşvik edilmesi önemlidir (87). Ayrıca "Brusellozis Mücadele Talimatnamesi'nin 13. maddesinde; brusellozis dolayısı ile kesimlerine hükmedilen süt veya et sığırlarının kesiminden sonra hayvan sahibine, kanuni hükümler dahilinde tazminat verilir" denmektedir. Ancak yetiştiricilere tazminatın ödenmesinde de sıkıntılar olduğu bir gerçektir.

Türkiye İstatistik Kurumu 2007 yılı verilerine göre ülkemizde bulunan 11 milyon baş sığırın yaklaşık 400 bini Kars yöresinde bulunmaktadır (185). Hayvan populasyonunun bu derece yoğun olduğu Kars yöresi, ülkemizde hayvan yetiştiriciliği ve hayvansal ürünlerin (süt, süt ürünleri, et ve et ürünleri) üretimi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Yörede yetiştirilen hayvanlar ve hayvansal ürünler hem bölgeye hem de ülkemize sunulmaktadır. Bu özelliği ile hayvancılık sektörü önemli bir istihdam kaynağı ve Kars ili ekonomisinde de önemli bir yere sahiptir. Yöremiz açısından da son derece önemli olan hayvancılık

sektöründe büyük ekonomik kayıplara neden olan ve aynı zamanda zoonotik karakteri ile ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturan sığır brusellozisin kültürel ve moleküler olarak tespit edilmesi, PCR tekniği kullanılarak yörede hastalığa neden olan saha suşlarının aşı suşları ile olan ilişkisinin belirlenmesinin yörede yıllardır uygulanan kontrol ve koruma çalışmalarına katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Son yıllarda yörede brusellozise ilişkin olarak sığır ve koyunlarda kültürel (71, 167, 173, 174) ya da serolojik (35, 72, 131) çeşitli çalışmalar yapılmasına rağmen süt ve vajinal sıvı örneklerinden etkenin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler yöntemle araştırılması hakkında mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmada Kars yöresinde atık yapmış sürülerde bulunan ineklerden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Süt ve vajinal sıvı örnekleri

Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2008 tarihleri arasında Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve aşısız oldukları bilinen 250 inekten elde edilen süt ve vajinal sıvı örnekleri olmak üzere toplam 500 örnek Brucella etkenlerinin izolasyonu amacıyla değerlendirildi. Süt örnekleri sağımından önce, meme başları sabunlu bez ve alkol ile temizlenip, ilk sağım dışarı atılmak üzere steril vida kapaklı 50 ml'lik falkon tüplerine çeşitli meme loblarından yaklaşık 40 ml miktarında alındı. Yine süt örneği alınan ineklerden steril sıvı ile 3 adet vajinal akıntı örneği alınarak içerisinde 5 ml Tryptose broth bulunan 10 ml'lik vida kapaklı tüplere konuldu. Alınan süt ve vajinal sıvı örnekleri soğuk zincirde aynı gün içerisinde incelenmek üzere Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na getirildi. İneklerden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerin alındığı yerler ve sayıları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Atık yaptığı bilinen sürülerde bulunan ineklerden elde edilen süt ve vajinal sıvı örneklerin alındıkları yerler ve sayıları.

İLÇE/KÖY	SÜT ÖRNEğİ	VAJİNAL SIVAP ÖRNEğİ
Kars Merkez/Boğazköy	30	30
Kars Merkez/Çakmak	20	20
Kars Merkez/Hacıveli	30	30
Kars Merkez/Karakaş	20	20
Kars Merkez/Külveren	20	20
Kars Merkez/Ölçülü	20	20
Kars Merkez/Subatan	20	20
Selim/Bayburt	15	15
Selim/Baykara	15	15
Selim/Beyköy	15	15
Selim/Darboğaz	15	15
Selim/Merkez	15	15
Selim/Sarıgün	15	15
Toplam	250	250

2.1.2. Örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan besiyerleri

Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu için kullanılan ve aşağıda sıralanan besiyerleri ile solüsyonlar üretici firmanın prosedürü dikkate alınarak kimi belirtilen modifikasyonlarla hazırlandı.

Tryptose Broth (Merck 1.10676.0500): Bir litre distile su içerisinde 26 g besiyeri eritilerek otoklavda 121°C'de 15 dk. süre ile steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutulup, pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı ve vida kapaklı tüplere 5'er ml dağıtılarak +4°C'de buzdolabında saklandı. Vajinal sıvap örneklerinin taşınmasında kullanıldı.

Brucella Medium Base (Oxoid CM0169): Bir litre distile su içerisinde 45 g besiyeri eritilerek otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Takiben 50 °C'ye kadar soğutulup içerisinde 2 şişe Brucella selektif supplement (Oxoid SR0083) katıldı ve pH 7.2 ± 0.2 ayarlanarak petri kutularına dökülüp +4°C'de buzdolabında saklandı. Ayrıca Farrell agar besiyerinin hazırlanmasında da kullanıldı. Besiyeri örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Brucella Selective Supplement (Oxoid SR0083): Brucella agar, Farrell broth ve agarın bileşimine katıldı. Bir şişe supplement içerisine 5 ml steril distile su ve 5 ml methanol ilave edilerek hazırlandıktan sonra 35°C'de 10-15 dk. bekletildi. Her şişe 500 ml besiyeri için kullanıldı. İlave edildikleri besiyerlerinde Brucella etkenlerinin izolasyon seçiciliğini artırmak amacıyla kullanıldı.

Blood Agar Base No.2 (Oxoid CM0271): Bir litre distile su içerisine 40 g besiyeri ilave edilerek sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 7 steril koyun kanı ilave edildi. Petrilere dağıtıldıktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı.

Farrell Broth Besiyeri: Bir litre distile su içerisine 28 g Brucella broth (BD BBL 211088) ilave edildi ve çözündürüldü. Daha sonra 10 g dekstroz (Oxoid LP0071) eklendi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5 oranında 56°C'de 30 dakika inaktive edilmiş

steril at serumu (Oxoid SR0035) ve 2 şişe Brucella selective supplement (Oxoid SR0083) eklendi. İyice çalkalandıktan sonra pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı. Steril tüplere 5'er ml dağıtıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, Brucella etkenlerini zenginleştirme amacı ile kullanıldı (64).

Farrell Agar Besiyeri: Brucella agardan (Oxoid CM0169) 45 g tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözdürüldü ve içerisine 10 g dekstroz (Oxoid LP0071) eklendi. Otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 50°C 'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5 oranında 56°C 'de 30 dakika inaktive edilmiş steril at serumu (Oxoid SR0035) ve 2 şişe Brucella selective supplement (Oxoid SR0083) eklendi. İyice çalkalandıktan sonra pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı. Petri kutularına dağıtıldı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı. Besiyeri örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı (64).

Christensen's Üre Agar (Oxoid CM053): Brucella bakterilerinin üreaz aktivitelerini saptamak amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 21 g tartılarak üzerine 1000 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50°C 'ye kadar soğutuldu ve içerisine steril % 40'luk üre solüsyonundan (Oxoid SR020) 5 ml ilave edilip, tüplere 5'er ml miktarında dağıtılarak katılaşması sağlandı. Kullanılncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı (3).

Serum Dekstroz Agar: Tryptic Soy agardan (Oxoid CM0131) 40 g tartılarak 950 ml distile su içerisinde eritildi. Otoklavda 121°C 'de 15 dk. steril edildi ve 50°C 'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde serum-dekstroz solüsyonu ilave edildi. İyice karıştırıldı, pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı. Sonra petrilere ve vida kapaklı tüplere dağıtıldı. Kullanılncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında saklandı. Besiyeri örneklerden Brucella etkenlerinin izolasyonu amacıyla kullanıldı (4).

Serum-dekstroz Solüsyonu: At serumu (100 ml, Oxoid SR0035) Brucella aglutininlerini inaktive etmek için 56°C 'de 30 dakika bekletildi. Sonra 1 g dekstroz (Oxoid LP0071) + 5 ml inaktive at serumu hesabıyla hazırlanarak filtreden geçirilip steril edilip vida kapaklı tüplere 5'er ml konularak kullanılncaya kadar buzdolabında saklandı (4).

Penisilin Besiyeri: Besiyeri, SDA bileşimine son konsantrasyonu 5 IU/ml olacak şekilde penisilin ilave edilerek hazırlandı (3). Saha suşu ile aşı suşunun ayırımında kullanıldı.

İ-eritritol Besiyeri: Besiyeri, SDA bileşimine son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde i-eritritol (Sigma E7500) ilave edilerek hazırlandı (3). Saha suşu ile aşı suşunun ayırımında kullanıldı.

Pepton Salin Solüsyonu: Bir litre distile su içerisine 10 g pepton, 5 g sodyum klorür ilave edilerek otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi ve pH 7.2 ± 0.2 ayarlandı. Vida kapaklı tüplerde saklandı. Bakteri ve fajların dilüe edilmesinde bu solüsyon kullanıldı (3).

Akriflavin Solüsyonu: Nötral akriflavinin (Sigma A8126) 1/1000'lik solüsyonu distile suda günlük olarak hazırlandı (3).

İzolatlardan H₂S, oksidaz ve katalaz aktivitelerini belirlemek için hazır olarak alınan; Kurşun Asetat Kağıdı (Merck 1.09511), Oksidaz Ayıracı (GBL idantirosa 0534) ve Katalaz Ayıracı (GBL idantirosa 0532) kullanıldı.

Tbilisi Fajı: Faj, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

Referans Suşlar: *B. abortus* Tulya, *B. abortus* 544 ve *B. melitensis* 16M referans suşları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Brucella Antiserumları: A ve M Brucella Poliserumları ve Brucella Monospesifik A ve M Antiserumları, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

2.1.3. İzole edilen Brucella türlerinin biyotiplendirilmesi için kullanılan besiyerleri

Bazik Fuksin Besiyeri: Tryptic Soy Agar'dan (Oxoid CM0131) 40 g tartılarak 1 litre distile su içerisinde eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde serum-dekstroz solüsyonu ve % 0.1'lik steril bazik fuksin (Merck 1.15937) stok solüsyonundan 20 ml ilave edilerek 1/50.000 (20 µg/ml) oranında bazik fuksin içeren besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri petrilere döküldükten sonra +4 °C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, örneklerden elde edilen Brucella izolatlarının tiplendirilmesi amacıyla kullanıldı (3).

Thionin Besiyeri: Tryptic Soy Agar'dan (Oxoid CM0131) 40 g tartılarak 1 litre distile su içerisinde eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde serum-dekstroz solüsyonu ve % 0.1'lik steril thionin (Sigma T3387) stok solüsyonundan 20 ml ilave edilerek 1/50.000 (20 µg/ml) oranında thionin içeren besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri petrilere döküldükten sonra +4°C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri örneklerden elde edilen Brucella izolatlarının tiplendirilmesi amacıyla kullanıldı (3).

Safranin Besiyeri: Tryptic Soy Agar'dan (Oxoid CM0131) 40 g tartılarak 1 litre distile su içerisinde eritildikten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra içerisine son konsantrasyonu % 5 olacak şekilde serum-dekstroz solüsyonu ve % 0.5'lik steril safranin (Merck 1.15948) stok solüsyonundan 20 ml ilave edilerek 1/10.000 (100 µg/ml) oranında safranin içeren besiyeri hazırlandı. Hazırlanan besiyeri petrilere döküldükten sonra +4°C'de buzdolabında saklandı. Besiyeri, örneklerden elde edilen Brucella izolatlarının tiplendirilmesi amacıyla kullanıldı (3).

2.1.4. İzole edilen Brucella etkenlerinin PCR temelli moleküler tanısı için kullanılan araç ve gereçler

- Taq DNA Polimeraz (Sigma D-6677)
- 10X PCR Buffer (Sigma P-2192)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 10 mM dNTP Mix (Fermentas)
- Proteinaz K (Sigma P2308)
- Agaroz (Prona)
- Gene Ruler 100 bp DNA Step Ladder Plus Marker (Fermentas SM 0241)
- Gene Ruler 1 kb DNA Step Ladder Plus Marker (Fermentas SM 0311)
- Ethidium Bromide (Sigma E7637)
- Loading dye (6x) (Fermentas R0611)
- Etanol Absolut (Merck 1.00983)
- Otomatik Pipet Seti (Rainin)

2.2. Metot

2.2.1. Süt ve vajinal sıvab örneklerinden Brucella etkenlerinin izolasyon ve identifikasyonu

Süt örnekleri

Süt örneklerinin 15 ml'si 6500 rpm de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan kaymak tabaka alttaki krema tabakasına zarar verilmeden alınarak dezenfektanın içerisine atıldı. Daha sonra krema tabakası ile dipteki tortu vorteksle karıştırılıp bir öze dolusu alınarak Farrell Agar, Brucella Selektif Agar, Serum Dekstroz agar ve Kanlı Agara ekim yapıldı. Ayrıca 5'er ml Farrell Broth içeren iki adet besiyerine pastör pipeti ile örnekten 2'şer ml inoküle edildi. Her örnek için ikili ekim yapılarak bir tanesi aerob diğeri ise % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 5-7 gün süre ile inkübe edildi. Bu süre sonunda Farrell Broth'da zenginleştirme yapıldıktan sonra tekrar katı besiyerlerine geçilerek aynı koşul ve süre ile inkübasyon yapıldı.

Vajinal sıvab örnekleri

Tryptose broth içerisinde taşınarak laboratuvara getirilen vajinal sıvab örneklerinin bir tanesi ile Farrell Agar, Brucella Selektif Agar, Serum Dekstroz agar ve Kanlı Agara ekim yapıldı. Diğeri sıvab 5 ml Farrell Broth içeren tüp içerisine bırakıldı. Üçüncü sıvab ise Tryptose broth içerisinde buzdolabında saklandı. Her örnek için ikili ekim yapılarak bir tanesi aerob diğeri ise % 5-10 CO₂'li ortamda, 37°C'de 5-7 gün süre ile inkübe edildi. Farrell Broth'da zenginleştirme yapıldıktan sonra tekrar katı besiyerlerine geçildi. Aynı koşul ve sürelerde inkübasyon yapıldı.

Süt ve vajinal sıvab örneklerinin ekim ve inkübasyonunu takiben, besiyerleri Brucella cinsi bakterilerin oluşturdukları koloni morfolojisi yönünden incelenerek şüpheli kolonilerden preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Mikroskobik inceleme sonunda gram negatif kokobasil olarak görülen etkenlerin katalaz, oksidaz ve üreaz aktiviteleri rutin yöntemlerle belirlendikten sonra izolatların identifikasyonu ile biyotiplendirilmesi Alton ve ark. (3) tarafından aşağıda bildirilen yöntemlere göre yapıldı.

Karbondiyoksit (CO₂) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H₂S) üretimi

Selektif Brucella besiyerinde üreyen her bir örneğe ait izolatlardan tek bir koloni iğne uçlu öze ile alınarak yatık olarak hazırlanan SDA tüplerine (her örnek için ikişer adet) pasajları yapıldı. Ekim yapılan her tüpün içerisine besiyerine temas etmeyecek şekilde kurşun asetat içeren kağıt şeritler konarak tüp kenarı ile vida kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Her izolat için yapılan ikili ekimlerden bir tanesi aerob diğeri ise % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Kontrol suşları olarak, % 5-10 CO₂'li ortama gereksinim duyan ve H₂S pozitif olan *B. abortus* 544 ile her iki özellik yönünden negatif olan *B. melitensis* 16M kullanıldı.

Bazik fuksin ve tiyonin varlığında üreme

Selektif Brucella besiyerinde üreyen her bir örneğe ait izolatlardan tek bir koloni iğne uçlu öze ile alınarak tüpte yatık olarak hazırlanan SDA besiyerine pasajları yapıldı. Brucella cinsine ait tüm suşlar CO₂'li ortamda üreyebileceklerinden izolatların hepsi ve referans suşları % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-5 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler (her izolat için ayrı ayrı olarak) peptonlu tuzlu su ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve Mac Farland no: 4'e göre ml'de 1x10⁹ bakteri olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. Bazik fuksinin ve tiyoninin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA'lara, hazırlanan her bir izolata ait bakteri süspansiyonundan steril eküvyon ile ekim yapıldı. Her petriye 5 farklı izolat birbirine paralel şeritler halinde ekildi ve % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi.

Safranin O içeren besiyerinde üreme

SDA'a 1/10.000 konsantrasyonunda safranin O ilave edilerek hazırlanan besiyerinde *B. abortus* 86/8/59 ve *B. suis* üremez iken diğeri Brucella suşları üremektedir (3). Diğeri boyalı besiyerlerine yapılan ekimler ile aynı yöntem kullanılarak tüm izolatlar safranin O'lu besiyerlerine ekildi ve % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi.

Penisilinli besiyerinde üreme

B. abortus suşları 5 iu/ml penisilin içeren SDA besiyerinde ürerken aşı suşu olan *B. abortus* S19 suşu üremez (3). Çalışmada incelenen izolatların aşı suşundan ayrımını yapmak için tüm izolatlar penisilinli besiyerine ekilerek % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Testte kontrol suşu olarak penisilinli besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 aşı suşu kullanıldı.

İ-eritritol Besiyerinde Üreme

B. abortus suşları 1 mg/ml i-eritritol içeren SDA besiyerinde ürerken aşı suşu olan *B. abortus* S19 suşu üremez (3). Çalışmada incelenen izolatların aşı suşundan ayrımını yapmak için tüm izolatlar i-eritritol besiyerine ekilerek % 5-10 CO₂'li ortamda 37°C'de 3-4 gün inkübe edildi. Testte kontrol suşu olarak i-eritritol besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 aşı suşu kullanıldı.

A ve M monospesifik antiserumlar ile aglütinasyon

Her bir izolatın fizyolojik tuzlu su içerisinde Mac Farland no: 4'e göre ml'de 1x10⁹ bakteri olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı. Temiz bir lam üzerine A ve M monospesifik antiserumlarından birer damla konup ve üzerlerine birer damla incelemek için izolatın süspansiyonundan ilave edilerek karıştırıldı. Sonuçlar bir dakika içerisinde oluşan aglütinasyon durumuna göre değerlendirildi.

Fajın Rutin Test Dilüsyonunun (RTD) Saptanması

Tbilisi fajı için *B. abortus* Tulya (biyovar 3) konakçı suşu olarak kullanıldı. Yatık olarak tüpte hazırlanan SDA besiyerlerine ekilen konakçı suşu, 37 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanıp ve Mac Farland No: 4'e göre ml'sinde yaklaşık 1x10⁹ bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Ayrıca fajların pepton-salin de 10⁻¹'den 10⁻⁸'e kadar on katlı dilüsyonları yapıldı. Steril bir sıvı hazırlanan bakteri süspansiyonuna daldırıldı ve SDA içeren petrilerin bütün yüzeyine homojen bir şekilde yayıldı. Petrilerin yüzeyleri kuruduktan sonra alt kısımlarına cam kalemi ile fajların dilüsyonları yazıldı. Fajların her bir dilüsyonundan SDA petrilere steril pipet uçları kullanılarak 20'şer µl damlatıldı. Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra mikroaerobik

ortamda 37 °C'de 24 saat inkübe edildiler. Damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek dilüsyon, fajın RTD'u olarak kabul edildi.

Tbilisi Fajı ile Lizis

Yatık SDA tüplerine referans suşlar ve test edilecek izolatlar ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanıp Mac Farland No: 4'e göre ml'sinde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Her bir bakteri süspansiyonuna daldırılan steril sıvap ile agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde ekim yapıldı. Şeritlerin orta kısımlarına Tbilisi Fajı'nın RTD'undan 20'şer µl damlatıldı. Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra mikroaerobik ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildiler. Sonuçlar lizis durumuna göre değerlendirildi.

2.2.2 İzole edilen Brucella etkenlerinden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için iki yöntem kullanıldı. Klasik kloroform ekstraksiyonu (147) modifiye edilerek ve ticari firma tarafından üretilen DNA izolasyon kiti (Fermentas K0512) prosedüre göre yapıldı.

A- Kloroform ekstraksiyon yöntemi

1. Brucella agarda üretilen her izolattan bir öze dolusu alınarak 200 µl FTS içeren ependorflara konuldu ve süspanse edildi.
2. Üzerine 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ilave edilip hafifçe karıştırıldı.
3. Daha sonra 400 µl NETS lizis tampon solüsyonu eklendi.
4. Karışım hafifçe vortekslenerek 65°C'de 15 dk. blok ısıtıcıda inkübe edildi.
5. İnkübasyondan sonra hafifçe vortekslenip, üzerine 600 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 oranında) ilave edildi.
6. Her bir gode 15 sn. kuvvetlice vortekslendi.
7. Sonra godeler 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
8. Oluşan süpernatant (üstteki berrak kısım) yeni bir steril ependorfa alındı.

9. Üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm soğuk absolüt alkol ilave edilerek vortekslendi ve gece boyunca -20°C 'de bekletildi.
10. Ertesi gün 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Böylece presipite olan DNA pelet haline geldi.
11. Üstteki sıvı pelete zarar verilmeden boşaltıldı.
12. Sonra ependorflara 1 ml % 70'lik soğuk etanol eklendi.
13. Karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
14. Pelete zarar vermeden alkol boşaltıldı ve ependorfların kuruması için oda ısısında 20 dk beklendi.
15. Tamamen kuruduktan sonra üzerine 100 µl distile su eklenerek vortekslendi ve kullanılmaya kadar -20°C 'de saklandı.

B- DNA izolasyon kiti

1. Brucella agarda üretilen her izolattan bir öze dolusu alınarak 200 µl TE (Tris-EDTA) içeren ependorflara konuldu ve süspansiyon edildi.
2. Üzerine 400 µl lysis solüsyonu eklendi ve 65°C de 5 dk. blok ısıtıcıda inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası hemen 600 µl kloroform ilave edilerek 3-5 kez ters çevrildi ve hafifçe emülsiyon edilerek 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
4. Sonra 720 µl steril distile su ile 80 µl stok 10x konsantrasyon solüsyonu karıştırılarak presipitasyon solüsyonu hazırlandı.
5. Santrifüj sonrası oluşan üstteki faz DNA içerir, bu kısım yeni bir tüpe alındı ve üzerine 800 µl presipitasyon sol ilave edilip hafifçe birkaç kez ters yüz edilerek karıştırıldı. Sonra oda ısısında 1-2 dk. bekletilip 10.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi.
6. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldı ve DNA peleti ne 100 µl 1.2 M NaCl solüsyonu ilave edilerek hafifçe pelet olarak çözününceye kadar vortekslendi.
7. Vortekslenen tüplere 300 µl soğuk etanol ilave edildi ve 10 dk. -20°C de DNA'nın presipitat haline gelmesi sağlandıktan sonra 10.000 rpm'de 3-4 dk. santrifüj edildi.

8. Süpernatant atıldıktan sonra pelet bir kez % 70'lik soğuk etanol ile yıkandı. Etanol boşaltıldı ve ependorfların kuruması için 20 dk. oda ısısında beklendi.

9. Pelet tamamen kuruduktan sonra üzerine 100 µl TE eklenerek vortekslendi ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Genomik DNA Konsantrasyonunun (miktarının) Tespiti ve Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

DNA izolasyonu işlemi sonrasında DNA bütünlüğünün kontrolü için örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek tespit edildi. Genomik DNA miktarının hesaplanmasında amaç DNA içeren distile suyun emdiği ultraviyole radyasyon miktarının spektrofotometre ile ölçülmesidir. DNA miktarı 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Spectramax Plus 384) absorbans ölçümü yapılarak belirlenirken, elde edilen genetik ürünün protein kirliliği taşıyıp taşımadığı ise 280 nm'de ölçüm yapılarak tespit edildi. Kuvartz küvet içersine referans olarak DNA'yı sulandırmada kullanılan distile su konuldu. 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans ölçülerek elde edilen değer kör olarak kaydedildi. Ardından küvete genomik DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbans ölçüldü ve okunan bu değerden köre ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulundu. Absorbans ölçümü 280 nm için de aynı işlemlerle yapıldı. Örnekte, bir optik dansite (OD) yaklaşık olarak 50 µg/ml çift sarmallı DNA'nın bulunduğu kabul edilerek 260 nm ve 280 nm'de okunan değerlerin oranı (OD_{260}/OD_{280}) nükleik asidin saflığının ölçüsünü verdi. Çalışmada $OD_{260}/OD_{280}= 1.8-2.0$ olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanıldı (147).

DNA konsantrasyonu ($\mu\text{l/ml}$)= $OD_{260} \times 250$ (seyrelme faktörü) $\times 50$ (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonun DNA konsantrasyonu belirlendi. İstenen konsantrasyon \times İstenen hacim / Stok DNA konsantrasyonu ($\mu\text{l/ml}$) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlandı. Bulunan değer stok DNA çözeltilisinden alınması gereken miktarı verdi. Elde edilen değer 100 µl'de çıkartılarak hazırlanacak çalışma solüsyonu için alınması gereken distile su miktarı bulundu. Hazırlanan DNA çalışma solüsyonları kullanılıncaya kadar -20°C'de bekletildi.

2.2.3 PCR İşlemi

İzolatların cins düzeyinde belirlenmesi amacıyla dış membran proteinlerden *bp26* geni ve aşı ile virulent saha suşu ayrımı için eritritol kullanımı temeline dayalı *ery* geni kullanıldı. Çalışmada *ery* ve *bp26* genlerine bağlı PCR optimizasyonları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı olanaklarından faydalanılarak yapıldı. Elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve aşı suşlarıyla karşılaştırılması amacıyla RAPD-PCR tekniğinden yararlanıldı.

Çalışmada kullanılan reaksiyon karışımlarının dış ortam kaynaklı DNA ile kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanılan sarf malzemelerinin, çözeltilerin steril olmasına dikkat edildi ve steril bir kabinde yapıldı. PCR reaksiyonunda ısı iletiminden kaynaklanabilecek sorunların en aza indirilmesi için ince duvarlı, DNase ve RNase enzimlerinden arındırılmış steril 0.2 ml'lik PCR tüpleri (Axygen Thin-Walled PCR Tubes) kullanıldı. Genomik DNA dışındaki tüm reaktifler, kullanılacak örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde 1.5 ml'lik bir PCR tüpünde (Master Mix) karıştırıldı ve 0.2 ml'lik diğer tüplere eşit miktarda dağıtıldı. Daha sonra her örneğe ait genomik DNA'lar tüplere eklendi ve pipetaj yapılarak tüpteki içerik iyice karıştırıldı.

Primerler

bp26 Geni

Çalışmada kullanılan *Brucella* spp. DNA'sına özgü 26 baz çiftlik primerler kullanıldı. NCBI Accession number (AB126349) *bp26* geninin büyüklüğü 738 bp dir. Bu primerlerin baz dizilimi şu şekildedir;

5'-GCT AGC AAT TTT GTC GAC GCC TCA TTT TC-3' (Forward *bp26*)

5'-CTT GAT TCT AGA AAC GAC ATT GAC CGA TAC-3' (Revers *bp26*)

ery Geni

Brucella aşı suşu *B. abortus* S-19'da eritritol genine özgü bir mutasyon vardır. NCBI Accession number (U57100)'de belirtildiği üzere Brucella eritritol operon gen bölgesi 7717 bp olup, primerlerin çoğalttığı gen bölgesi *eryC* ve *eryD* bölgesine ait 904 bp (3875-4778 bp lik gen bölgesi) içermektedir. Aşı suşu olan *B. abortus* S-19 da, delesyon gen bölgesi *eryC* ve *eryD*'ye ait 3975-4675 bp'lik (701bp) kısımda mevcuttur. Bu nedenle *B. abortus* S-19 suşunun yukarıdaki primerler ile çoğalttığı gen bölgesi (904-701: 203 bp) 203 bp olmaktadır. Bu amaçla kullanılan primerlerin baz dizilimi şu şekildedir;

5'-GAT CGC CAT CGA CTG CTG GG-3' (*eryC* Forward Primer)

5'-GGT CAT CGG CAT CGG CCA TGG C-3' (*eryD* Revers Primer)

Amplifikasyon İşlemi

***bp26* Geni İçin**

Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının bileşenleri ve konsantrasyonları;

Reaksiyon bileşenleri	Tek bir örnek için kullanılacak miktar (µl)
Distile su	32
10xPCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	4
250 mM her bir dNTP'den	1.5
Primer F (100 pmol/µl)	1
Primer R (100 pmol/µl)	1
Taq polimeraz	0.5
DNA ekstraktı	5
Toplam	50

***ery* Geni İçin**

Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının bileşenleri ve konsantrasyonları;

Reaksiyon bileşenleri	Tek bir örnek için kullanılacak miktar (µl)
Distile su	32
10xPCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	4
250 mM her bir dNTP'den	1.5
Primer F (100 pmol/µl)	1
Primer R (100 pmol/µl)	1
Taq polimeraz	0.5
DNA ekstraktı	5
Toplam	50

Reaksiyon Isıları ve Döngü Sayıları

Bp26 bazlı PCR için uygulanan termal şartlar; 95°C'de 5 dk. başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 66°C'de 30 sn. birleşme (annealing), 72°C'de 1 dk. 30 sn. sentez (extention) ve 72 °C'de 15 dk. son ekstensiyon optimizasyon şartları olarak belirlendi.

Ery bazlı PCR için uygulanan termal şartlar; 95°C'de 10 dk. başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 60°C'de 30 sn. birleşme (annealing), 72°C'de 1 dk. 30 sn. sentez (extention) ve 72 °C'de 10 dk. son ekstensiyon optimizasyon şartları olarak belirlendi.

PCR ürünleri (amplikonlar) elektroforez işleminde kullanılana kadar 4°C'de saklandı.

RAPD-PCR Tekniği

Çalışmada kullanılan izolatlardan elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve bu izolatların aşı suşuyla karşılaştırılması Ünver (174) ile Tcherneva ve ark. (169) tarafından bildirilen RAPD tekniği kullanılarak yapıldı.

RAPD-PCR'da kullanılan primer ve dizilimi; Primer 6: 5'-AAC AGC ACT CTG TTC AGG C-3' şeklinindedir. Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR karışımının bileşenleri ve konsantrasyonları;

Reaksiyon bileşenleri	Tek bir örnek için kullanılacak miktar (µl)
Distile su	39
10xPCR buffer	4
250 mM her bir dNTP'den	1
Primer 6 (50 pmol/µl)	0.4
Taq polimeraz	0.6
DNA ekstraktı	5
Toplam	50

Termal şartlar ise; 94°C'de 3 dk. başlangıç denatürasyonu, 4 siklustan oluşan 94°C'de 45 sn. denatürasyon, 26°C'de 2 dk. birleşme ve 72°C'de 2 dk. ekstensiyon, 30 siklustan oluşan 94°C'de 45 sn. denatürasyon, 36°C'de 2 dk. birleşme ve 72°C'de 2 dk. ekstensiyon ve 72°C'de 7 dk. son ekstensiyon şeklinde uygulandı.

PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak amacıyla agaroz jel tekniği kullanıldı. Jelin hazırlanmasında ve tank tamponu olarak 1xTBE (Tris-Borik Asit-EDTA) kullanıldı. Agaroz jel (% 1,5 'luk) için, 40 ml 1xTBE içeren bir balon joje içerisine 0.6 g agaroz (Prona Basica Le, PL 100g) tartılarak ilave edildi. Mikrodalga fırında homojen hale gelinceye dek ısıtıldı ve buhar çıkması durduktan sonra etidyum bromidten 4 µl eklendi. Hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırıldıktan sonra içerisine tarak yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 20-25 dk beklenerek jelin donması sağlandı. Bu sırada etidyum bromidin aktivitesini yitirmemesi için hazırlanan jel gün ışığından korundu. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılarak içerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi.

Jeldeki ilk çukura DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermentas) 3 µl yüklendi. Diğer çukurlara ise her bir örnek için 1.5 µl 6x yükleme tamponu (Fermentas R0611), 5 µl PCR ürünü karıştırılarak yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 80 volta ayarlanarak 2 saat yürütüldü. DNA fragman büyüklükleri UV illuminatörde (UVP/LMS-20E) görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. Süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin izolasyonu ve identifikasyonu bulguları

Bu çalışmada Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve aşısız oldukları bilinen 250 inekten elde edilen süt ve vajinal sıvı örnekleri olmak üzere toplam 500 örnekte *Brucella* cinsi bakterilerin varlığı araştırıldı. Bakteriyolojik inceleme sonucunda, koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, oksidaz ve üreaz aktivitesi, A ve M poliserumlarıyla aglütinasyon sonuçları dikkate alınarak, 250 süt örneğinin 11 (%4.4)'inden ve 250 vajinal sıvı örneğinin 16 (%6.4)'sından olmak üzere toplam 27 (%5.4) örnekte *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. Çalışmada elde edilen izolatların 6 (%1.2)'si Farrell Broth'ta zenginleştirmeyi takiben katı besiyerlerinde inkübasyon sonucu üretilmiştir. Kullanılan besiyerleri içerisinde en fazla izolasyon Farrell Agara yapılan ekimlerde elde edilmiştir. Araştırmada *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla kullanılan besiyerlerine göre izolasyon sayısı ve oranları Tablo 5'de verilmiştir. Buna göre izolasyon başarı sıralaması Farrell Agar, *Brucella* Agar, SDA Agar ve Kanlı Agar olarak belirlenmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan besiyerleri ile bunlardaki izolasyon sayısı ve oranları.

Besiyeri	Süt örneği (ilk ekim)	Vajinal sıvı (ilk ekim)	Süt örneği (zenginleştirme)	Vajinal sıvı (zenginleştirme)
Farrell Agar	9 (%3.6)	12 (%4.8)	11 (%4.4)	16 (%6.4)
<i>Brucella</i> Agar	7 (%2.8)	9 (%3.6)	10 (%4)	14 (%5.2)
SDA Agar	8 (%3.2)	11 (%4.4)	10 (4.4)	13 (%6)
Kanlı Agar	4 (%1.6)	2 (%0.8)	7 (%2.8)	6 (%2.4)

Süt ve vajinal sıvap örneklerinin ekimi sonucunda 4-5. günlerde oluşan kolonilerin yapılan incelemelerinde, *Brucella* spp. kolonisine benzer şekilde 2-3 mm çapında yuvarlak, şeffaf, sarı bal renginde ve şebnem tanesi görünümünde, kolonilerden yapılan preparatların Gram boyama yöntemi sonucu mikroskopik incelenmesinde izolatin gram negatif kokobasiller morfolojisinde olduğu görüldü. Koloniler için lam üzerinde Brucella A+M antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde tüm izolatlar kısa sürede aglütinasyon reaksiyonu verdiler. Tüm izolatlar katalaz, oksidaz ve üreaz aktiviteleri yönünden pozitif bulundu. Ayrıca kolonilerin morfolojilerini (S, R veya M) belirlemek amacı ile lam üzerinde yapılan nötral akriflavin solüsyonu ile aglütinasyonda, tüm izolatlar homojen bir süspansiyon göstererek smooth koloni yapısı gösterdiler.

Brucella spp. olarak tanımlanan 27 izolatin ilk izolasyonlarında % 5-10 CO₂'li ortamda üremeleri, yatık SDA tüplerine ekimi sonucu 1-3 saat içerisinde kurşun asetatlı kağıtlarda siyahlaşmaya neden olmaları ve tümünün Tbilisi Fajı'nın 10⁻¹, 10⁻² ve 10⁻⁴ RTD'lerde lize olmaları nedeniyle *B. abortus* olarak tanımlanmışlardır.

Süt ve vajinal sıvap örneklerinden izole ve tanımlanmış 27 *B. abortus* suşunun 5 iu/ml penisilin içeren SDA besiyerinde ve 1 mg/ml İ-eritritol içeren SDA besiyerinde ürettiği gözlemlendiğinden tüm izolatlar saha suşu olarak belirlenmiştir.

3.2. *Brucella* türlerinin biyotiplendirme çalışmaları bulguları

Süt ve vajinal sıvap örneklerinden izole ve tanımlanmış 27 *B. abortus* suşunun tümü, Safranin O'nun 1/10.000 konsantrasyonunu, Bazik fuksinin ve tiyoninin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA'lara ekimi sonucu üremesi ve A antiserumu ile aglütinasyon verirken M antiserumu ile aglütinasyon göstermemesi nedeniyle *B. abortus* biyotip 3 olarak belirlenmiştir. Süt ve vajinal sıvap örneklerinden izole edilen 27 *Brucella* spp.'lerin tür ve biyotiplendirme ile aşı suşundan ayırımı sonuçları Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Süt ve vajinal sıvı örneklerinden izole edilen 27 *Brucella* spp. izolatlarının tür ve biyotiplendirme ile aşı suşundan ayırımı sonuçları.

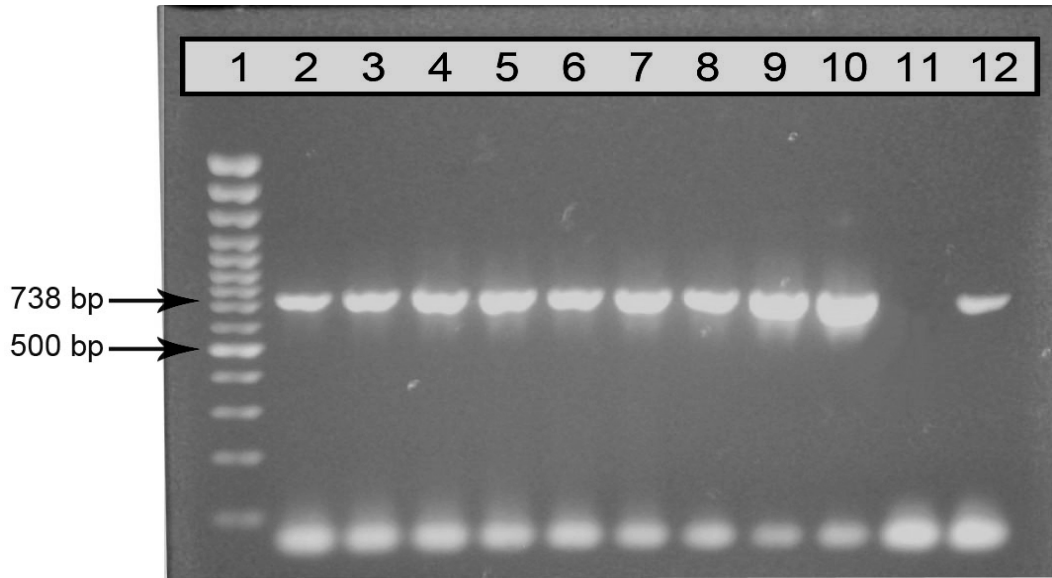
No	İzolat kodu	CO ₂ İht.	H ₂ S üret.	Boyalı besiyerinde üreme ^a		Monospesifik serumla aglütinasyon		Tb fajı ile lizis		Safranin O'da üreme ^b	Penisilinde üreme	i-eritrolde üreme
				BF	T	A	M	RTD	RTDx10 ⁴			
1	3v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
2	4s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3	5v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4	6s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
5	11v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
6	13s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
7	13v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
8	18v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
9	41v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	45v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
11	50v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
12	51v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
13	54v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	81s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
15	81v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
16	95v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
17	96v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
18	99v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
19	102s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
20	103v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
21	105s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
22	117s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
23	168s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
24	177s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
25	191s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
26	195s	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+
27	239v	+	1. gün	+	+	+	-	+	+	+	+	+

a; Boya konsantrasyonu Serum dekstroz agarda 20 µg/ml (1:50.000)

b; Boya konsantrasyonu Serum dekstroz agarda 100 µg/ml (1:10.000)

3.3. PCR ve RAPD-PCR bulguları

Süt vajinal sıvı örneklerinden izole ve tanımlanmış 27 izolatın *bp26* geni bazlı PCR tekniği sonucunda 738 baz çiftlik bant oluşturdukları gözlemlendi. Dolayısıyla 27 izolatın tümü *Brucella* spp. olarak teyit edildi (Resim 1). İzolatların aşı suşu ile ayırımı amacıyla yapılan *ery* geni bazlı PCR'da, tümü 904 baz çiftlik bantlar oluşturdukları için hepsi saha suşu olarak tespit edilmiştir (Resim 2). İzolasyonu ve tanımlanması yapılan, *bp26* geni bazlı PCR ile pozitif bulunan 27 adet *Brucella* suşunun RAPD-PCR ile elde edilen DNA profillerinin aşı suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırılmaları sonucunda tümü *B. abortus* S19 suşunun profiline benzerlik göstermiştir (Resim 3).



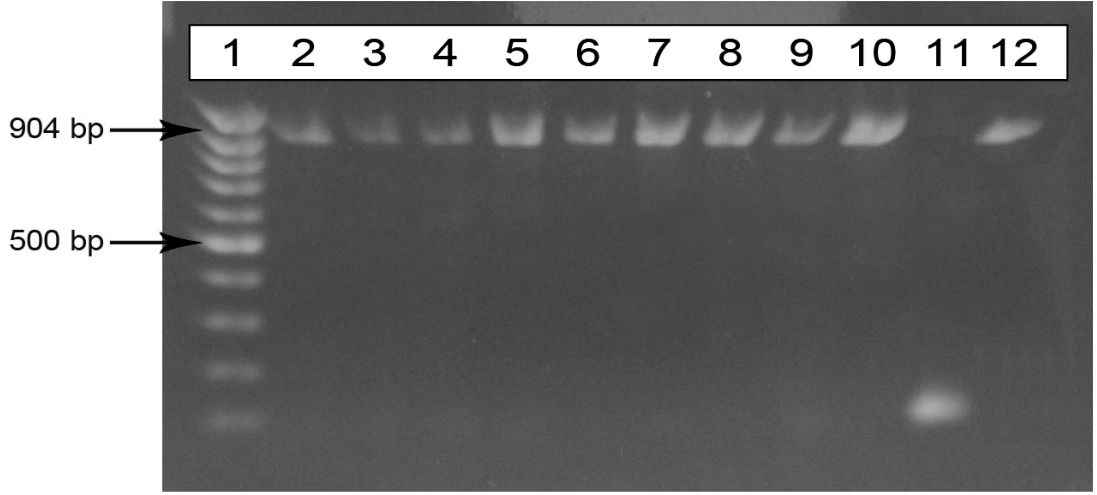
Resim 1. İzolatlara uygulanan *bp26* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının % 1.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker (moleküler ağırlık standı)

2-10 nolu kolonlar; İzolatlar

11 nolu kolon; negatif kontrol

12 nolu kolon; pozitif kontrol



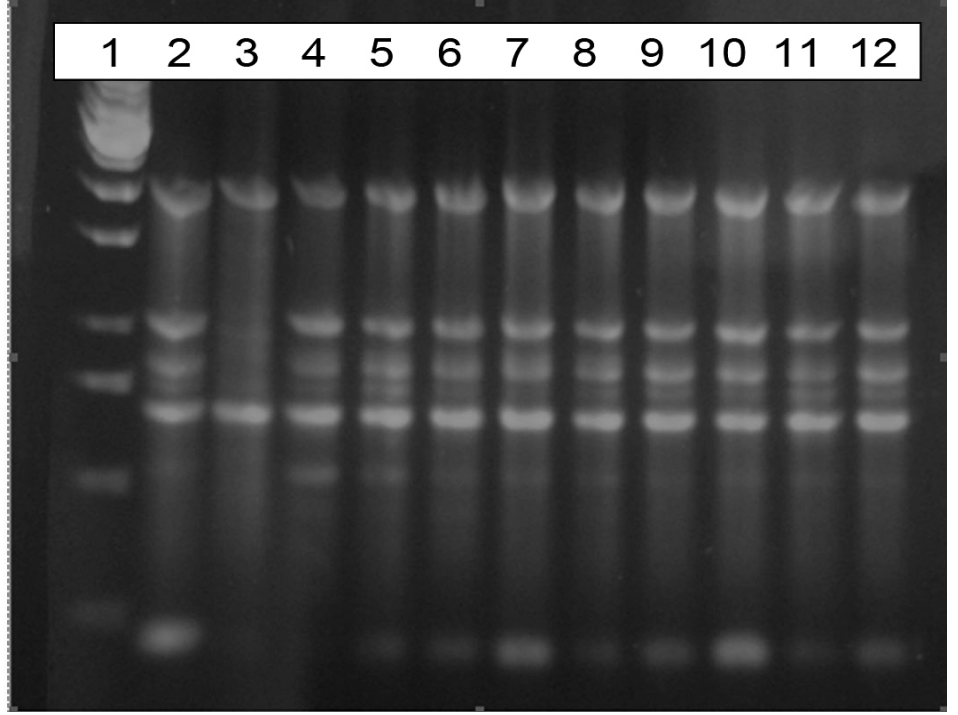
Resim 2. İzolatlara uygulanan *ery* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker (moleküler ağırlık standı)

2-10 nolu kolonlar; İzolatlar

11 nolu kolon; negatif kontrol

12 nolu kolon; pozitif kontrol



Resim 3. İzolatlara uygulanan RAPD-PCR yöntemi ile saptanan Brucella DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü.

1 nolu kolon; 1 kp DNA step ladder plus marker (moleküler ağırlık standı)

2 nolu kolon; *B. abortus* S19 aşı suşu DNA'sı

3 nolu kolon; *B. melitensis* Rev1 aşı suşu DNA'sı

4-12 nolu kolonlar; İzolatlar

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Brusellozis, dünyanın birçok ülkesinde sığır, koyun, keçi ve domuz gibi evcil hayvanlarda sıklıkla görülen akut veya kronik seyirli, bulaşıcı ve nekrotik yangısal infeksiyonlarla ortaya çıkan, eradikasyonu güç zoonotik bir hastalıktır (6, 22, 49, 87, 101). İnfeksiyon abort, süt verimi ve damızlık değeri kaybı, infertilite, veteriner hekim ve aşılama masrafları sonucu önemli ekonomik kayıplara neden olmasının yanı sıra infekte hayvanlar ile direk temas veya kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketimiyle insanlara bulaşarak önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (1, 19, 102, 183). Ayrıca infeksiyon uluslararası hayvan ve bunlardan elde edilen ürünlerin ticaretini de engelleyerek, özellikle çoğunluğu kırsal kesimde bulunan ve kısıtlı imkanlara sahip olan hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişimini etkilemesi sonucu ülke ekonomisine zarar vermektedir (87, 182).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonotik hastalık olarak kabul edilmiştir. (2, 3, 160). Türkiye’de sığır ve koyunlarda görülen abortların çoğunun infeksiyöz kaynaklı olduğu ve sıklıkla *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., Chylamydia, Salmonella ve Leptospira gibi etkenler izole edildiği bildirilmektedir. (31, 60, 71, 78, 92, 121, 146, 166, 167, 173). Birçok araştırmada infeksiyöz abortlar içerisinde de brusellozis ilk sırada yer aldığı ifade edilmektedir. Türkiye genelinde yapılan seroepidemiolojik bir araştırmada (87) brusellozisin prevalansı sığırlarda % 1.43, koyunlarda %1.97 olarak tespit edilmiş ise de çalışmada Kars ili, sığırlarda % 20.8, koyunlarda % 15 prevalans ile en yüksek oranlara sahip il olmuştur.

Hayvanlarda hastalığa neden olan baskın *Brucella* türleri ve biyovarlarının belirlenmesi, infeksiyonun kontrol altına alınması için yürütülecek çalışmalar ile epidemiyolojik araştırmalar açısından oldukça önemlidir. Brusellozise yakalanmış hayvanlardan izole edilen *Brucella* tür ve biyotipleri ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebileceği gibi bir ülkede bulunan bölgeler arasında da farklılıklar görülebilir. Sığır brusellozisinin etiyolojisi üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda Mısır (137), Nijerya (128) ve Hindistan’da (37, 138) daha çok *B. abortus* biyotip 1, İran’da biyotip 2 ile 3 (137) ve Türkiye’de biyotip 3’ün (31, 85, 149, 167) predominant

suşlar olarak belirlendiğini ortaya koymaktadır. Türkiye’de sığır brusellozisinden daha az oranda *B. abortus* biyotip 1,2,4 ve 6’ında sorumlu olduğu tespit edilmiştir (137).

Gerek yabancı ülkelerde gerekse ülkemizde sığır, koyun-keçi, domuz ve insan brusellozisi üzerinde çok sayıda yapılan serolojik (35, 72, 80, 87, 131), kültürel (31, 60, 85, 146) ve epidemiyolojik (86, 87) çalışmalarla hastalığın etiyoloji, bulaşma, patogenezi ve prevalansına dair bilgiler elde edilmiştir.

Langoni ve ark. (102) Brezilya’da lam, tüp ve merkaptotanol testleri ile serolojik olarak brusellozis pozitifliği tespit edilen sığırların sütlerinde *Brucella* etkenlerinin varlığını araştırdıkları bir çalışmada elde edilen 49 süt örneğinin 15 (%30.61)’inde *B. abortus* tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu izolatların thionin ve füksin varlığında üremeleri esasına göre, 1 (%2.04)’ini *B. abortus* biyotip 1, 8 (%16.32)’ini *B. abortus* biyotip 2 ve 6 (%12.25)’sini ise *B. abortus* biyotip 3 olarak biyotiplendirildiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada süt örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu amacıyla Farrell agar ve *Brucella* agar besiyerlerinin kullanıldığını, elde edilen sediment ve süpernatantın ayrı ayrı ve ikili ekiminin aerobik ve mikroaerobik koşullarda inkübe edildiğini, en başarılı izolasyon oranının sediment ve süpernatantın Brodie Sinton sıvı besiyerinde zenginleştirmeyi takiben Farrell Agarda sırasıyla % 40 ve % 46.6 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Farrell ve Robertson (64) serolojik olarak MRT ile brusellozis yönünden pozitif bulunan inek sütlerinden *Brucella* spp. izolasyonu amacıyla 4 farklı besiyerini (Mair, Ryan, SDA ve Farrell agar) karşılaştırmışlar, brusellozis pozitif olarak belirlenen 560 süt örneğinin 111 (%21)’den *Brucella* spp. izole edildiğini, izolasyonun en yüksek oranda Farrell agarda yapıldığını, izolatların *B. abortus* olarak tanımlendiğini, biyotiplendirme çalışmaları sonucunda 111 suşun 68 (%61.2)’inin *B. abortus* biyotip 1, 15 (%13.5)’inin *B. abortus* biyotip 2, 16 (%14.4)’sının *B. abortus* biyotip 5 ve 6 (%5.4)’sının ise *B. abortus* biyotip 9 olarak belirlendiğini 6’sının ise tanımlenemediğini bildirmişlerdir. Brodie ve Sinton (29) MRT ile brusellozis yönünden pozitif olarak tespit ettikleri inek sütlerinden *B. abortus*’un izolasyonu amacıyla Tryptone soya broth besiyerine % 5 steril at serumu, basitrasin, polimiksin B sülfat, nalidiksik asit, vankomisin, niystatin, sikloheksimid, amfoterisin B ve

sikloserin ilave ederek hazırladıkları zenginleştirme ortamına süt örneklerini inoküle etmişler, inkübasyonu takiben bu ortamdan, hazırladıkları üç besiyerine (cycloserine ilave edilmemiş Brucella agar, A), (cycloserine ilave edilmiş Brucella agar, B) (yarı miktarda cycloserine ilave edilmiş Brucella agar, C) iki farklı metot ile (birinci metotta süt örneklerini santrifüj ettikten sonra kaymak tabakasını uzaklaştırıp krema ve tortuyu karıştırıp A ve B besiyerlerine ekmiş, ayrıca A besiyerine sadece kremayı ekmişler, ikinci metotta ise krema ve tortu karışımından A, B ve C besiyerine) ekim yaparak izolasyon sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Her iki metotla da besiyerlerine hem direk ekim hem de zenginleştirme sonrası ekim yapmışlardır. Araştırmacılar zenginleştirme sonrası yapılan birinci metot ile elde edilen sonuçların *B. abortus*'un izolasyon oranını % 10-16 oranında artırdıklarını bildirmişlerdir.

Stringfellow ve ark. (162) yaptıkları deneysel bir çalışmada farklı ırktan 5 gebe ineği (biri aşısız, dördü 8-14 aylık iken *B. abortus* S19 ile subkutan olarak aşılanmış) gebeliklerinin orta dönemi sürecinde subkonjunktival yolla *B. abortus* biyotip 1 suş 2308 ile inoküle etmişler, ineklerin 4'ünün 7-8. aylarda abort, birinin ise zayıf buzağı doğumu yaptığını gözlemlemişlerdir. Atık ya da doğum sonrası haftada bir olmak üzere periyodik olarak ineklerden kan, meme salgısı, servikal mukus örnekleri ile kimi zamanlarda alınan uterus sürüntüsünü incelemişlerdir. Araştırmada aşısız ineğin gebeliğinin 7. ayında abort yaptığını ve atık fötustan *B. abortus* suş 2308 izole edildiğini, yine aborttan sonra bu ineğin servikal mukusundan 7, 13 ve 20. günlerde alınan sıvı örneklerinden de etken izolasyonu yapıldığını, aşılı ineklerin ikisinin 7. ayında, birinin ise 8. ayında abort yaptığını, aşılı son ineğin ise zayıf bir buzağı doğurduğunu bildirmişlerdir. Aşılı ve abort yapan ineklere ait fötusların tümünden *B. abortus* suş 2308 izole etmişler, gebeliğin 7. ayında abort yapan ineklerden birinin abort sonrası servikal mukusundan 16., uterus sürüntüsünden ise 36. güne kadar, diğer ineğin uterus sürüntüsünden ise 17. güne kadar etken izole edildiğini bildirmişlerdir. Gebeliğin 8. ayında abort yapan ineğin meme salgısından etken izolasyonu yapıldığını, doğum yapan ineğin meme salgısının 5 hafta boyunca kültür pozitif olmasına rağmen, buzağısında etken izolasyonu yapılamadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmadan elde ettikleri sonuçlara dayanarak normal östrusa döndükten sonra bile hayvanların uterus sürüntülerinden *Brucella*'nın tespit edilmiş olmasıyla, bu tür hayvanların kronik taşıyıcı olarak

tehlike oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Delgado ve ark. (53) Holstein ırkı 1340 sığır ve 533 düveyi kapsayan, atık yapmış sığırlarda *B. abortus* DNA'sının tespitini ve aşı suşları ile saha suşlarının ayrımını amaçladıkları bir araştırmada, buzağı iken RB51 aşısıyla normal dozda ve çalışmaya başlamadan 8 ay önce yine aynı aşı ile ancak düşük dozda tekrar aşılanmışlar, bu hayvanlardan gebeliğin 166-260. günleri arasında atık yapan 30 sığırdan atıktan 22-30 gün sonra alınan süt, kan serumu ve vajinal akıntı örneklerini değerlendirmişlerdir. Kard, rivanol ve radial immunodiffüzyon testleri ile brusellozis pozitif bulunan 4 ineğin vajinal akıntısından *B. abortus* biyotip 1 izole ve tanımlanmıştır. Ancak süttten izolasyon yapılamadığını, ayrıca vajinal sıvı örneklerinden RB51, S19 ve saha suşlarına ait spesifik primerler kullanarak yaptıkları PCR'da örneklerin 13'ünde RB51 aşı suşu DNA'sının saptandığını, ancak bu örneklerin bakteriyolojik ve serolojik açıdan negatif bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak atık yapmış ineklerin vajinal akıntılarında RB51 aşı suşunun elimine olduğunu belirtmişlerdir.

Otlu ve ark. (131) 2004-2006 yılları arasında Kars'ta yaptıkları bir çalışmada yavru atmaların görüldüğü 27 sığır sürüsünden aldıkları 407 kan serum örneğinde RBPT ile 134 (%32.92) ve SAT ile 141 (%34.64)'inde pozitiflik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu sürü sahibi olan 246 yetiştiriciye ait kan serumlarını RBPT, SAT ve ELISA testleri ile incelemişler, sırasıyla 32 (%13), 35 (%14.22) ve 44 (%17.88) örnekte pozitiflik belirlerken, bölgede çalışan 28 veteriner hekime ait kan serumlarının 13 (%46.42)'ünde her üç testle brusellozis yönünden pozitiflik saptayarak enfeksiyonun yörede zoonotik karakteri ve yayılımına dikkat çekmişlerdir. Genç ve ark. (72) Brucella aşısı yapılmamış abort yaptığı bilinen 163 sığırdan elde edilen kan serumu örneğini c-ELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), CFT, RBPT ve SAT testleri ile değerlendirmişler *B. abortus*'a karşı sırasıyla % 68.1, % 65.6, % 58.9 ve % 55.2 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Güllüce ve Leloğlu (79) Kars merkez ve ilçelerine bağlı aşısız ve infekte sürülerin bulunduğu 22 yerleşim biriminden aldıkları 712 adet süt örneğini serolojik olarak incelemişler, MRT ile 401 (%56.32) ve ELISA ile 467 (%65.59) örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir. Gürtürk ve ark. (80) Van ve yöresindeki yerleşim birimlerinde bulunan sığırlardan rastgele örnekleme yöntemi ile aldıkları sütleri süt halka testi (SHT) ile serolojik olarak brusellozis yönünden incelemişler, alınan 518 süt örneğinin 11

(%2.1)'ini brusellozis yönünden pozitif bulmuşlardır. Sığır brusellozisi insidensinin düşük olmasını yöredeki sığırlarda yavru atma vakalarının sporadik olarak görülmesine bağlamışlardır. Türütöğlü ve ark. (171) Eylül 2000-Eylül 2001 tarihleri arasında Burdur merkez ve köylerinden tesadüfi örnekleme ile seçilen 14 çalışma merkezindeki 23 inek işletmesinden aldıkları 101 ineğe ait 404 süt örneğini serolojik ve bakteriyolojik olarak incelemişlerdir. Çalışmada kullandıkları 404 inek sütü örneğinden brusellozis etkenlerini izole edememişler, ancak MRT ile incelenen süt örneklerin 12 (%3)'ünü ve süt serumu ile yapılan aglütinasyon testinde (Whey-AT) ise 9 (%2.2)'unu brusellozis yönünden pozitif bulmuşlardır. MRT sonuçlarına ve Whey-AT'de saptanan antikor titrelerine göre Burdur yöresinde brusellozis oranını % 1 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar süt örneklerinden izolasyon yapılamamasının nedeni olarak aynı hayvanlardan belirli aralıklarla süt alınmamış olmasına, örneklerde etken bulunmaması ve brusellozis yönünden serolojik olarak pozitif bulunan sütlerin düşük antikor titrelerine sahip olmalarından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Beytut ve ark. (18) Kars yöresinde 2002 kış ayları süresince ilk gebeliklerinde atık yapmış ve *Brucella*-seropozitif (1/160-1/1280 arası antikor titresini) oldukları saptanan 11 ineğe ait meme bezi ve supramammal lenf düğümlerini patolojik, immunohistokimyasal ve bakteriyolojik olarak incelemişlerdir. İmmunohistokimyasal incelemede 3 ineğe ait meme bezinde intralobular intersitisyum ve periduktal stromada özellikle makrofaj ve nötrofil lökositlerin sitoplazmasında *Brucella* antijeni tespit etmişlerdir. Dört inekten alınan örneklerden *B. abortus* biyotip 3 izole ve tanımlanmışlardır. Araştırmacılar brusellozisin kesin tanısında en güvenilir yöntemin etken izolasyonu olmasına rağmen bakteriyel kültürün negatif olduğu ya da dokunun formalin ile tespit edildiği durumlarda, *Brucella* antijenlerinin belirlenmesi için immunohistokimyasal yöntemlerin teşhis aracı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Şahin ve ark. (165) yavru atma olgularının salgın olarak görüldüğü Kars yöresinde yetiştirilen sürülerden aldıkları 219 sığır kan serumu ile elde ettikleri 87 atık sığır fötüsünü incelemişlerdir. Serum örneklerinin RBPT ile 72 (%32.8), SAT ile ise 121 (%28.7)'inde pozitiflik tespit edildiğini, 87 atık fötüs örneğinin ise 35 (%40.22)'inden *B. abortus* izole ve tanımlanmış olduğunu bildirmişlerdir. Büyükcangaz ve Şen (31) 2004 ve 2005 yıllarında Marmara Bölgesi'nde iki doğum sezonu boyunca farklı sürülerden elde

edilen 41 atık sığır fötüsüne ait iç organlar ve abomazum içeriğinin 8 (%19.5)'inde *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bu izolatların 7 (%87.5)'sini *B. abortus* biyotip 3 ve 1 (%12.5)'ini *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlamışlardır. Sağlam ve ark. (146) 1994-1996 yılları arasındaki iki doğum sezonu boyunca Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nden sağlanan 96 atık sığır fötüsünün etiyojik ve patolojik bulgularını araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, örneklerin 40 (%41.6)'ından *Brucella* spp. izole edildiğini bildirmişlerdir. Aydın ve ark. (7) Aralık 1993-Mart 1994 tarihleri arasında Kars yöresinde yaptıkları çalışmada 30 atık sığır fötüsüne ait iç organlar ve abomazum içeriğini incelemişler, bu örneklerin 14 (%46.6)'ünden *B. abortus* izole ve tanımlamışlardır. İzolasyon yapılan fötüslerin analarından alınan kan serumu örneklerinde tüp aglütinasyon testi ile 1/160-1/1280 arasında değişen titrelere pozitiflik saptamışlardır. Erdoğan ve ark. (60) Trakya bölgesinde 1989-1992 yılları arasında yaptıkları çalışmada 97 sığır ve 145 koyun-keçiye ait atık fötüslerden alınan abomazum içeriği ve iç organları ile abort görülen sürülerden toplanan 361 sığır ve 1029 koyun-keçi kan serumu örneğini serolojik olarak incelemişler, klasik yöntemler kullanılarak 97 atık fötüs örneğinin 13 (%13.4)'ünden *B. abortus*, histopatolojik inceleme ile 2 (%2.06)'sinde leptospirozis belirlemişlerdir. Koyun-keçi atık fötüslerinin 29 (%20)'ünden *B. melitensis*, 4 (%2.7)'ünden *C. fetus* izole ve tanımlamışlar, 7 (%4.8) fötüste ise histopatolojik olarak listeriozis saptamışlardır. Araştırmacılar atık sığır fötüslerinden izole ve tanımlamışları 13 *B. abortus* suşunun biyotiplendirmesini yaparak, bunların 9 (%69)'unu *B. abortus* biyotip 3 ve 4 (%31)'ünü *B. abortus* biyotip 1 olarak tiplendirmişlerdir. Koyun atık fötüslerinde izole ve tanımlamış edilen 29 *B. melitensis* suşunun 25 (%86)'ini *B. melitensis* biyotip 1, 3 (%10)'ünün biyotip 2 ve 1 (%3.4)'ini ise biyotip 3 olarak tiplendirmişlerdir. Atık görülen sürülerden aldıkları 361 sığır kan serum örneklerinin 40 (%11)'ini, 1029 koyun-keçi kan serumu örneğinin ise 166 (%16.13)'sini brusellozis yönünden pozitif bulmuşlardır. İca ve ark. (85) Türkiye'deki 14 ilden toplanan atık sığır fötüsünden izole edilen 75 *B. abortus* suşlarının tümünü konvansiyel metotlar ile *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlamışlardır. Bu çalışmada Kars yöresinden izole edilen 1 izolat kullanılmıştır. Araştırmacılar bu sonuçlara göre Türkiye'deki sığırlarda baskın suşun *B. abortus* biyotip 3 olduğunu belirtmişlerdir. Sarısayın ve ark. (149) ülke genelinde sığırlardan izole edilen 114

sığır ve 2 manda orjinli toplam 116 *Brucella* spp.'nin 9'unu *B. abortus* biyotip 1, 1'ini *B. abortus* biyotip 2, 102'sini *B. abortus* biyotip 3, 2'sini *B. abortus* biyotip 6 ve 2'sini *B. melitensis* biyotip 2 olarak tanımlamışlardır. İlhan ve ark. (86) Holstein ırkı sığırlardan oluşan 720 başlık bir süt işletmesinde yaptıkları çalışmada, 4 boğa, 12 buzağı ve 414 inekten alınan toplam 430 kan serumunu RBPT ve SAT, 50 süt örneğini halka testi ile 50 süt ve 50 vajinal sıvap ve 4 boğanın prepsium örneğini bakteriyolojik olarak incelemişler, 50 adet süt örneğinin 4 (%8)'ünden ve 50 adet vajinal sıvap örneğinin 5 (%10)'ünden olmak üzere toplam 9 (%9) örnekten *B. abortus* izole edildiğini, izole edilen suşların tümünü *B. abortus* biyotip 3 olarak belirlediğini ifade etmişlerdir. Boğalardan alınan sıvap örneklerinden *Brucella* spp. izole edilemezken, süt halka testi ile inceledikleri 50 süt örneğinin 29 (%58)'unda, kan serumlarının RBPT ve SAT ile serolojik olarak incelenmesinde sırasıyla 132 ((30.7) ve 135 (%31) örnekte brusellozis yönünden pozitiflik saptamışlardır. Araştırmacılar izole edilen tüm suşların aynı biyotip olmasını işletmede görülen bulaşmanın tek bir kaynaktan olmasına bağlamışlardır. Genç ve Kamber (71) 1998-2002 yılları arasında Kars'da topladıkları 84 atık sığır fötüsüne ait örneklerin 28 (%33.3)'inde *Brucella* spp. izole edildiğini, yöreden izole edilen bu izolatların ilk kez biyotiplendirilmesinin yapılması sonucu 13 (%46.43)'ünün *B. abortus* biyotip 1 ve 15 (%53.57)'inin *B. abortus* biyotip 3 olarak belirlediğini, örneklerin hiçbirisinden aşı suşunun izole edilmediğini bu nedenle Kars bölgesinde bulunan sığırlarda görülen atıklarda baskın suşların *B. abortus* biyotip 1 ve *B. abortus* biyotip 3 olarak ele alınmasını rapor etmişlerdir. Şahin ve ark. (167) Kars yöresinde 2001-2006 yılları arasında sağlanan 149 atık sığır fötüsüne ait abomazum içeriği ve akciğer örneklerini incelemişler ve bunların 48 (%32.2)'inden *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bu izolatların 45'ini *B. abortus* biyotip 3 ve 3'ünü ise *B. abortus* biyotip 1 olarak tanımlamışlardır. Ünver ve ark. (174) 2002-2004 yılları arasında Kars'ta yaptıkları çalışmada 62 atık sığır fötüsüne ait örneklerin 37 (%59.7)'sinden *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Çalışmalarında yıllara göre farklılık olmasına rağmen ortalama izolasyon oranını % 59.7 olarak belirtmişlerdir. Bu sonuçlara göre yörede sığır atıkları etiolojisinde *Brucella* türlerinin oldukça önemli olduğunu bildirmişler ve bunun sebeplerinin düşük aşılama oranı veya aşının başarısız olma ihtimali olarak açıklamışlardır.

Görüldüğü üzere Brusellozis dünyanın birçok coğrafyasında evcil hayvanlar ile insan sağlığını tehdit etmektedir. Ülkemiz açısından değerlendirildiğinde ise özellikle Kars ve yöresinde hastalığın endemik olarak görüldüğü (7, 71, 72, 131, 167) ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, Şubat-Mayıs 2008 tarihleri arasında, Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve brusellozise karşı aşısız 250 inekten elde edilen süt ve vajinal sıvı örnekleri olmak üzere toplam 500 örnek *Brucella* etkenleri yönünden bakteriyolojik olarak araştırılmış, 250 süt örneğinin 11'i (%4.4) ve 250 vajinal sıvı örneğinin 16'sından (%6.4) olmak üzere toplam 27 (%5.4) örnekte *Brucella* spp. izolasyonu yapılmıştır. Araştırmada *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla Farrell Agar, *Brucella* Agar, SDA Agar ve Kanlı Agar kullanılmış en yüksek izolasyon başarı oranı Farrell Agar besiyerinde elde edilmiştir. Bu sonuç yukarıda bildirilen araştırmaları (64, 102) destekler niteliktedir. Ayrıca çalışmada elde edilen izolatların 6'sının (%22.2) Farrell Brothta zenginleştirmeyi takiben izole edilmiş olması *Brucella* etkenlerinin izolasyonunda ön zenginleştirmenin önemini vurgulayan araştırmalarla (29, 102) uyum içerisinde dir.

Hayvanlarda Brusellozis hastalığının tanısına ilişkin araştırmalar dikkate alındığında, daha çok serolojik olarak kan serumu (53, 72, 102, 131, 165) ile süt örneklerinin (29, 64, 80, 86, 171) incelendiği ve atık fütusa ait materyallerin kültürel olarak (7, 18, 60, 71, 162) değerlendirildiği görülmektedir. Süt ve vajinal akıntı yoluyla etkenlerin saçılımı ile süresi ve bu örneklerde etken izolasyonuna dair araştırmalar daha kısıtlıdır (86, 91, 162). Yürütülen bu araştırmada, atık yaptığı bilinen sürülerde bulunan ve hastalığa karşı aşısız ineklerden elde edilen 250 süt örneğinin 11'i (%4.4) ve 250 vajinal sıvı örneğinin 16'sından (%6.4) olmak üzere toplam 27 (% 5.4) örnekte *B. abortus* izole ve identifiye edilmiştir. Araştırmada süt ve vajinal akıntı ile *Brucella* etkenlerinin ne kadar süreyle çıkarıldığı amaç edinilmediği ve atık olguları üzerinden geçen zaman dikkate alınmadığından örnek alımı bir kez olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca süt ve vajinal akıntıda etkenin belirli dönemlerde bulunacağı dikkate alındığında elde edilen izolasyon oranlarının diğer bazı araştırmalara göre (64, 86, 102) düşük olduğu görülmektedir.

Sığırlarda Brusellozise neden olan *Brucella* türleri ve biyotipleri coğrafyalar arasında farklılıklar göstermektedir. Bu araştırmada süt ve vajinal sıvay örneklerinden izole edilen tüm *Brucella* etkenleri *B. abortus* olarak tanımlanmış, yapılan biyotiplendirme sonucunda tümü biyotip 3 olarak belirlenmiştir. Bu sonuç yöremizde yapılan izolasyon ve tanımlama ile biyotiplendirme sonuçları (18, 71, 167) ile paralellik göstermekte ve yöre sığırlarında görülen Brusellozis olgularında bu tür ve biyotipin baskın olduğunu ortaya koymaktadır. Sığırlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda değişik tür ve biyotiplerin belirlenmesi (31, 60, 149) hastalığın oluşmasında tür ve biyotip farklılığının öneminin göz önüne alınmasını işaret etmektedir.

Brucella etkenlerinin konvansiyonel tanımlanmasında karşılaşılan bazı güçlükler (kültürün uzun sürmesi, bazı örneklerde kültür ile sonuç alınmaması, etkenin üremesi için özel ortamlara gereksinimi olması ve patojen olması gibi) nedeniyle son yıllarda insan ve hayvanlarda brusellozisin tanısına ve *Brucella* etkenlerinin cins, tür ve biyotip olarak ortaya konmasına ilişkin moleküler teknikler yoğun olarak kullanılmaktadır (27, 28, 51, 65).

Ünver ve ark. (174) 2002-2004 yılları arasında Kars merkez ve köylerinden toplanan ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilen toplam 62 adet atık fötusa ait iç organ, fetal membran ve abomazum içeriğini bakteriyolojik yönden incelemişler, örneklerin 37 (%59.7)'sinden *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Bu örneklerin 32 (%51.6)'sini PCR ile pozitif bulmuşlar ve 27 *Brucella* suşunun RAPD-PCR ile analizini yapmışlardır. İzolatların 12 (%44.4)'si *B. abortus* S19 ve 15 (%55.6)'i ise *B. melitensis* Rev1 aşısı suşlarının profillerini gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu bulgunun daha önce ülkemiz veya bölgemizde rapor edilmediğini, *B. melitensis*'in yaygın bir şekilde sığırlarda abortlara yol açtığını gösterdiğini, ayrıca bu durumun bölgeden bölgeye veya sürüden sürüye değişebilir bir durumdan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Tcherneva ve ark. (169) yaptıkları çalışmada 46 *Brucella* suşu ve *Proteobacteria*'nın alfa 1 ve alfa 2 alt gruplarını temsil eden 14 örnek kullanmışlardır. Araştırmacılar uygun koşullar sağlandığı takdirde RAPD-PCR'in akraba bakteri türlerinin ayırımında yararlı bir metot olduğunu ve *Brucella* infeksiyonunun görüldüğü

bölgelerde aniden ortaya çıkan hastalığın epidemiyolojik araştırılmasında basit, hızlı ve hassas bir teknik olduğunu bildirmişlerdir. Fekete ve ark. (66) yaptıkları çalışmada *Brucella* suşları arasındaki polimorfizmi belirlemek için basit ve hızlı bir teknik geliştirmişlerdir. AP-PCR (Arbitrarily primed PCR) adı verilen bu yöntem standart PCR'dan farklıdır. Genomik DNA'nın rastgele seçilen basit sekanslara sahip primerler ile amplifikasyonuna dayanır. Nükleotid polimorfizminin identifikasyonu RFLP belirleyicilerine oranla rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA belirleyicileri ile daha kolaydır. Bu özellik rastgele amplifiye edilmiş polimorfik belirleyicileri, *Brucella* cinsinde olduğu gibi oldukça yakın ilişkili türlerde avantajlı kılar. Araştırmacılar çalışmalarında 25 farklı *Brucella* suşu arasındaki genomik farklılıkları göstermek ve polimorfizmi saptamak için ayrı ayrı veya çiftler halinde 5 adet primer kullanmışlardır. Primer 5'in suş identifikasyonu için daha yararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada süt vajinal sıvı örneklerinden izole ve identifiye edilen 27 izolatın *bp26* geni bazlı PCR tekniği sonucunda 738 baz çiftlik bant oluşturdukları gözlenerek tamamı *Brucella* spp. olarak teyit edildi. İzolatların aşı suşu ile ayırımı amacıyla yapılan *ery* geni bazlı PCR'da, tümü 904 baz çiftlik bantlar oluşturdukları için hepsi saha suşu olarak tespit edilmiştir. İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan, *bp26* geni bazlı PCR ile pozitif bulunan 27 adet *Brucella* suşunun RAPD-PCR ile elde edilen DNA profillerinin aşı suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırılmaları sonucunda tümü *B. abortus* S19 suşunun profilini göstermiştir. Çalışmada elde edilen izolatların hiç biri *B. melitensis* Rev1 aşı suşu ile aynı profili vermemiştir. Bu bulgu Ünver ve ark. (174) tarafından bildirilen sonuçlarla farklılık göstermektedir. Bunun nedeninin Ünver ve ark. araştırmalarında değerlendirdikleri örneklerin bu çalışmaya göre farklı yer ve sürülerden alınmasına bağlı olarak saha izolatlarının farklı olması ve/veya örneklerin alındığı sürülerde sığır ve koyun yetiştiriciliğinin iç içe olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca araştırmaların yapıldığı zaman periyotlarının farklı olması ve yörede yoğun hayvan hareketleri nedeniyle değişik zamanlarda hastalığa neden olan tür ve biyotiplerin değişebilme potansiyeli bu iki çalışma arasındaki farklılığın nedeni olması muhtemeldir.

Yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde hayvan sayısı ve hareketlerinin oldukça fazla olduğu Türkiye'nin Kuzeydoğu'sunda bulunan Kars yöresinde sığırlarda görülen abortların en büyük nedeninin brusellozis olduğu görülmektedir. Bu nedenle ülkemiz hayvancılığı açısından oldukça önemli bir yere sahip olan yöremizde endemik olduğu bilinen ve insanlar ile hayvanlarda önemli sağlık sorunları ve ekonomik kayıplara neden olan brusellozisin kontrol ve eradikasyonu oldukça önemlidir. Yörede uygulanan koruma ve kontrol önlemlerinden istenilen başarıyı elde etmek için sığır, koyun ve keçi gibi evcil hayvanların brusellozis yönünden test edilmesi serolojik olarak pozitif bulunanların kesimi ve diğer hayvanların aşılınması gibi uygulamaların yanı sıra ülkemizle sınır olan İran, Irak, Gürcistan ve Suriye gibi ülkelerden hayvan giriş ve çıkışlarının kontrol altına alınması, hastalıkla mücadelenin bu ülkeler ile birlikte koordineli olarak yürütülmesi ve bu amaçla ortak projeler hazırlanarak bunların hayata geçirilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca yörede sığırlarda brusellozisin epidemiyolojisinin tam olarak belirlenebilmesi ve elde edilen izolatlardan hazırlanacak aşının uygulamada daha başarılı sonuç vereceği düşünüldüğünde konuya ilişkin geniş ölçekli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

5. ÖZET

Brusellozis, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve özellikle uterus, meme ve testis gibi genital organlara yerleşerek yavru atımı, infertilite ve süt veriminde azalmaya neden olan genellikle kronik seyirli, ekonomik öneme sahip bakteriyel bir zoonozdur.

Bu araştırmada Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve hastalığa karşı aşılınmamış 250 inekten elde edilen süt ve vajinal sıvap örnekleri olmak üzere toplam 500 örnek *Brucella* cinsi bakteriler yönünden kültürel olarak değerlendirildi. Bakteriyolojik inceleme sonucunda 250 süt örneğinin 11 (%4.4)'inden ve 250 vajinal sıvap örneğinin 16 (%6.4)'sından olmak üzere toplam 27 (%5.4) örnekte *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. İzole edilen tüm suşlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tiplendirildi. İzolatların PCR ile tespiti amacıyla, cins düzeyinde belirlenmesi için *Brucella* etkeni dış membran proteinlerden *bp26* ile aşı ve virulent saha suşu ayrımı için ise eritritol kullanımından sorumlu *ery* geni kullanıldı. Elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve aşı suşlarıyla karşılaştırılması amacıyla RAPD-PCR tekniği uygulandı. *Bp26* geni hedefli PCR sonucunda tüm izolatlarda 738 baz çiftlik bant gözleendiğinden tamamı *Brucella* spp. olarak teyit edildi. *Ery* geni hedefli PCR'da tüm izolatların 904 baz çiftlik bantlar oluşturdukları ve dolayısı ile hepsinin saha suşu olduğu saptandı. İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan, *bp26* geni bazlı PCR ile pozitif bulunan 27 adet *Brucella* suşunun RAPD-PCR ile elde edilen DNA profillerinin, aşı suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* REV1 ile karşılaştırılması sonucunda tümü *B. abortus* S19 suşunun profiline benzerlik gösterdi.

Araştırmada elde edilen sonuçlar, yörede bulunan sığırlarda süt ve vajinal akıntı ile *Brucella* etkenlerinin önemli oranda saçılımını göstermekte, bu durumun hayvan ve insan sağlığı açısından risk potansiyelini ortaya koymaktadır. Ayrıca yöremiz sığırlarında hastalığa neden olan baskın biyotipin *B. abortus* biyotip 3 olarak tespit edilmesi bundan böyle yapılacak epidemiyolojik araştırmalara ışık tutacak, hastalığın kontrol ve eradikasyonuna katkıda bulunacaktır.

6. SUMMARY

Brucellosis, a bacterial diseases caused by members of the genus *Brucella*, is a chronic and important zoonosis with a special location to genital organs such as testis, uterus and udder causing of milk and reproductive loses and aborts in domestic and wild animals.

In this study, the milk and vaginal swab samples, collected from each of 250 cows raised in Kars and Selim areas, were analysed for culturing *Brucella* species. These animals had a history of abortion and they were unvaccinated against Brucellosis. Based on the bacteriological examination, *Brucella* spp. was isolated from total of 27 (%5.4) samples, 11 (%4.4) and 16 (%6.4) originated from milk and vaginal swab samples, respectively. All of the isolated strains were typed as *B. abortus* biotype 3. For the genus-level identification of the isolates, *bp26* outer membrane protein genes were amplified by PCR and *ery* gene encoding the erythritol use was used to discriminate the strains as vaccine or field isolates. RAPD-PCR technique was utilized for genotyping the strains and comparing them with the vaccine strains. All isolated strains were identified as *Brucella* spp. based on the observation of 738 bp gene fragment by *bp26* targeted PCR. In *ery*-based PCR, all isolated strains produced 904 bp gene fragments showing them as field strains. RAPD-PCR profiles of all *Brucella* isolates were compared with the vaccine strains (*B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev1) and the amplified gene fragment profiles of the isolates from current study was similar to that of *B. abortus* S19.

The results of the present study showed that cattle in this region scatter the bacteria with milk and vaginal discharge which pose a significant potential to animal and human health. The determination of the dominant biotype as *B. abortus* biotype 3 is expected to better understand the epidemiology of Brucellosis and to help the control and eradication studies of the disease in this region.

7. KAYNAKLAR

- 1- Akbulut, N., Kavas, G.: İzmir ilinde satılan sokak sütlerinin mikrobiyolojik özellikleri üzerinde bir araştırma. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 30(1-2): 89-96, 1993.
- 2- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., Frangoulidis, D.: Laboratory-based diagnosis of brucellosis – A Review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. Clin. Lab. 49(9+10): 487-505, 2003.
- 3- Alton, G.G., Jones, M.L., Angus, R.D., Verger, J.M.: Techniques for the brucellosis laboratory. INRA ed., 147, rue de l'Université, 75007 Paris, 1988.
- 4- Alton, G.G., Jones, M.L., Pietz, D.E.: Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization Monograph Series No. 55 Second edition Geneva 1975.
- 5- Amin, A.S., Hamdy, M.E., Ibrahim, A.K.: Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet. Microbiol. 83(1): 37-44, 2001.
- 6- Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Karaman, M., Akay, Ö., Ilgar, A., İzgür, M., Diker, K.S.: Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı Medisan Ankara, 1997.
- 7- Aydın, F., Leloğlu, N., Şahin, M., Otlı, S.: Kars yöresinde sığır ve koyunlarda görülen abortların bakteriyolojik yönden araştırılması. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. syf. 47 27-29 Ankara/Türkiye, Eylül 1994.
- 8- Aydın, N., İzgür, M., Diker, K.S., Yardımcı, H., Esenal, Ö., Paracıklıoğlu, J., Akan, M.: Brucella infeksiyonları 145-163 içinde: Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel hastalıklar). Aydın, N., Paracıklıoğlu, J., (edt.). İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.
- 9- Bachrach, G., Banai, M., Bardenstein, S., Hoida, G., Genizi, A., Bercovier, H.: *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of Brucellin INRA for delayed hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea-pigs. Infect. Immun. 62(12): 5361-6, 1994.

- 10- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G.: Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95(4): 271-5, 1992.
- 11- Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A., Banai, M.: Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. J. Clin. Microbiol. 33 (8): 2166-70, 1995.
- 12- Baysal B.: *Brucella* Ed: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 571-577 Eylül 1999.
- 13- Beh, K.J.: Quantitative distribution of *Brucella* antibody among immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. Res. Vet. Sci. 17(1): 1-4, 1974.
- 14- Behan, K.A., Klein, G.C.: Reduction of *Brucella* species and *Francisella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. J. Clin. Microbiol. 16(4): 756-7, 1982.
- 15- Bellaire, B.H., Elzer, P.H., Baldwin, C.L., Roop II, R.M.: Production of the siderophore 2,3-Dihydroxybenzoic acid is required for wild-type growth of *Brucella abortus* in the presence of erythritol under low-iron conditions in vitro. Infect. Immun. 71(5): 2927-32, 2003.
- 16- Bercovich, Z., Taaijke, R.: Enzyme immunoassay using Mouse monoclonal anti-bovine antibodies for detection of *Brucella abortus* antibodies in cow milk. J. Vet. Med. B 37(10): 753-9, 1990.
- 17- Bercovich, Z.: The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: A Review. Vet. Quart. 22(3): 123-30, 2000.
- 18- Beytut, E., Şahin, M., Erginsoy, S., Sözmen, M.: Pathological, immunohistochemical, and bacteriological findings in the mammary glands and supramammary lymph nodes of cows with a history of abortion due to *Brucella abortus*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 33(1): 37-43, 2009.
- 19- Bilgehan H.: *Brucella*. Klinik Mikrobiyoloji. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 10. Baskı, İzmir, 199-214, 2000.
- 20- Blasco, J.M., Garin-Bastuji, B., Marin, C.M., Gerbier, G., Fanlo, J., Jimenez de Bagues, M.P., Cau, C.: Efficacy of different rose bengal and complement

- fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet. Rec. 134 (16): 415-20, 1994.
- 21- Blasco, J.M., Marin, C., Jimenez de B, M.P., Barberan, M., Hernandez, A., Molina, L., Velasco J., Diaz R., Moriyon I.: Evaluation of allergic and serological tests for diagnosing *Brucella melitensis* infection in sheep. J. Clin. Microbiol. 32 (8): 1835-40, 1994.
 - 22- Boschioli, M. L., Foulongne, V., O'Callaghan, D.: Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr. Opin. Microbiol. 4(1): 58-64, 2001.
 - 23- Bowden, R.A., Verger, J.M., Grayon, M., Limet, J.N., Dubray, G.: Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. J. Med. Microbiol. 39(5): 363-70, 1993.
 - 24- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., Halling, S.M.: *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiol. 3: 15, 2003.
 - 25- Bricker, B.J., Halling, S.M.: Differentiation of *B. abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 32(11): 2660-6, 1994.
 - 26- Bricker, B.J., Halling, S.M.: Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. J. Clin. Microbiol. 33(6): 1640-2, 1995.
 - 27- Bricker, B.J.: Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. Vet. Microbiol. 90(1-4): 433-34, 2002.
 - 28- Bricker, B.J.: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol. 90(1-4): 435-46, 2002.
 - 29- Brodie, J., Sinton, G.P.: Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. J. Hyg. Camb. 74(3): 359-67, 1975.
 - 30- Bundle, D.R., Cherwonogrodzky, J.W., Gidney, M.A.J., Meikle, P.J., Perry, M.B., Peters, T.: Definition of *Brucella* A and M epitops by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Infect. Immun. 57(9): 2829-36, 1989.

- 31- Buyukcangaz, E., Sen, A.: The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. *J. Biol. Environ. Sci.* 1(3): 139-42, 2007.
- 32- Carter, G.R., Chengappa, M.M., Roberts, A.W.: *Essential of Veterinary Microbiology*. Fifth edition. Williams and Wilkins. USA, 1995.
- 33- Carter, G.R., Chengappa, M.M.: *Essential of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 4th ed., Lea-Febiger, Philadelphia, 1991.
- 34- Catlin, J.E., Sheehan, E.J.: Transmission of bovine brucellosis from to calve. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188: 867-9, 1986.
- 35- Celebi, O., Atabay, H.I.: Seroepidemiological investigation of brucellosis in sheep abortions in Kars, Turkey. *Trop. Anim. Health. Prod.* 41(1): 115-9, 2009.
- 36- Cengiz, A.T., Dolapçı, G.İ.: Brusella'ların özellikleri ve brusellozda tanı yöntemleri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 50(1): 41-6, 1997.
- 37- Chahota, R., Sharma, M., Katoch, R.C., Verma, S., Singh, M.M., Kapoor, V., Asrani, R.K.: Brucellosis outbreak in an organized dairy farm involving cows and in contact human beings, in Himachal Pradesh, India. *Vet. Arhiv.* 73(2): 95-102, 2003.
- 38- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Grépinet, O.: Polymorphism at the dnaK locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J. Med. Microbiol.* 45(3): 200-5, 1996.
- 39- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Grépinet, O.: Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* 141(Pt 9): 2111-21, 1995.
- 40- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J.: Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microb. Infect.* 3(9): 729-38, 2001.
- 41- Corbel, M. J.: Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Isreal. *Emerg. Infect. Dis.* 3(2): 213-21, 1997.
- 42- Corbel, M.J., Banai, M.: Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173 AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp.370-386. Edt. G.M. Garrity. Springer, 2005.

- 43- Corbel, M.J., Cockrem, S., Brewer, R.A.: Differentiation of smooth and rough *Brucella* strains by lectins. *Vet. Rec.* 113(12): 261-2, 1983.
- 44- Corbel, M.J.: *Brucella* phages: advances in the development of a reliable phage typing system for smooth and non-smooth *Brucella* isolates. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138(1): 70-5, 1987.
- 45- Corbel, M.J.; MacMillan, A.P.: Brucellosis. In: Colloer, L.H., Balows, A., (eds) Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. London: Arnold, syf. 2039-2068, 1998.
- 46- Corbel, M.J.: Properties of *Brucella*-phages lytic for non-smooth *Brucella* strains. *Dev. Biol. Stand.* 56: 55-62, 1984.
- 47- Cordes, D. O., Carter, M.E.: Persistency of *Brucella abortus* infection in six herds of cattle under brucellosis eradication. *New Zeal. Vet. J.* 27(12): 255-9, 1979.
- 48- Cortez, A., Scarcelli, E., Soares, R.M., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Genovez, M.E., Ferreira, F., Richtzenhain, L.J.: Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine foetuses by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 79(7): 500-1, 2001.
- 49- Cutler, S.J., Whatmore, A.M., Commander, N.J.: A Review brucellosis – new aspects of an old disease. *J. Appl. Microbiol.* 98(6): 1270-1281, 2005.
- 50- Çetinkaya, B., Öngör, H., Muz, A., Ertaş, H.B., Kalender, H., Erdoğan, H.M.: Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet. Rec.* 144(9): 239-40, 1999.
- 51- Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiébaud, M., Dubray, G.. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 81(3): 267-75, 1996.
- 52- De Ley, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, M., Denijn, M., Vanhoucke, M., Gillis, M.: Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(1): 35-42, 1987.
- 53- Delgado, M.D.F., Mendoza, I.V.V., Arellano-Reynoso, B., Castro, R.H., Alvarez, J.F.M., Cruz-Vazquez, C., Suarez-Guemes, F., Diaz-Aparicio, E.:

- Presence of *Brucella abortus* vaccinal strain RB51 in vaginal exudates of aborted cows. Res. J. Dairy Sci. 1(1-4): 13-7, 2007.
- 54-** Diker, S., İstanbulluoğlu, E., Ayhan, H., Soysal, G.: Bursa bölgesindeki insanlarda *Brucella canis* infeksiyonları üzerinde serolojik inceleme. Mikrobiyol. Bült. 18(4): 203-7, 1984.
- 55-** Doğuer, M., Yılmaz, S.: Türkiye’de brusellozis. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg. 2: 1-20, 1963.
- 56-** Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J., Forbes, L.B.: A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. Can. J. Vet. Res. 50(4): 485-93, 1986.
- 57-** Douglas, J.T., Rosenberg, E.Y., Nikaido, H., Verstrete, D.R., Winter, A.J.: Porins of *Brucella* species. Infect. Immun. 44(1): 16-21, 1984.
- 58-** Drancourt, M., Brouqui, P., Raoult, D.: *Afipia clevelandensis*, antibodies and cross-reactivity with *Brucella* spp. and *Yersinia enterocolitica* O:9. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4(6): 748-52, 1997.
- 59-** Ebadi, A., Zowghi, E.: The use of allergic test in the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Br. Vet. J. 139(5): 456-61, 1983.
- 60-** Erdoğan, I., Gurel, A., Tekin, C., Uyanık, F., Bitgel, A.: Detection and distribution of bacterial abortion in sheep, goats and cattle in the Thrace region. J. Pendik Vet. Microbiol. 24: 23-35, 1993.
- 61-** Erganiş, O., Kaya, O., Güler, L., Kenar, B.: Koyun brusellozisinin sahada koagülünasyon testi ile teşhisi. Veterinarium 3 (1) : 11-3, 1992.
- 62-** Ewalt, D.R., Bricker, B.J.: Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. J. Clin. Microbiol. 38(8): 3085-6, 2000.
- 63-** Farrell, I.D.: The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. Res. Vet. Sci. 16(3): 280-6, 1974.
- 64-** Farrell, ID., Robertson, L.: A comparison of various selective media, including a new slective medium fort he isolation of Brucellae from milk. J. Appl. Bact. 35: 625-30, 1972.

- 65- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Sanborn, M.R.: Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* 69(2): 216-27, 1990.
- 66- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Stich R.W.: Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174(23): 7778-83, 1992.
- 67- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M.: Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4(1): 79-83, 1992.
- 68- Ficapal, A., Alonso-Urmenata, B., Velasco, J., Moriyón, I., Blasco, J.M.: Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Vet. Rec.* 137(6): 145-7, 1995.
- 69- Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A., Adams, L.G.: DNA sequence and expression of the 36 kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57(11): 3281-91, 1989.
- 70- Gallien, P., Dorn, C., Alban, G., Staak, C., Protz, D.: Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet. Rec.* 142(19): 512-4, 1998.
- 71- Genç, O., Kamber, U.: Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Ind. Vet. J.* 81:1164-65, 2004.
- 72- Genç, O., Otlu, S., Şahin, M., Aydın, F., Gökce, H.İ.: Seroprevalence of brucellosis and leptospirosis in aborted dairy cows. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 29(2): 359-66, 2005.
- 73- Godfroid, J.: Brucellosis in wildlife. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 21 (2): 277-86, 2002.
- 74- Goldbaum, F.A., Leoni, J., Walach, J.C., Fossati, C.A.: Characterisation of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(8): 2141-5, 1993.
- 75- Gorvel, J.P., Moreno, E.: *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90(1-4): 281-97, 2002.

- 76- Gorvel, J.P.: *Brucella*: a Mr “Hide” converted into Dr Jekyll. *Microbes Infect.* 10(9): 1010-3, 2008.
- 77- Guarino, A., Serpe, L., Fusco, G., Scaramuzzo, A., Gallo, P: Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet. Rec.* 147(22): 634-6, 2000.
- 78- Guler, L., Gunduz, K., Umran, O.: Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet. Microbiol.* 93(1): 53-61, 2003.
- 79- Güllüce, M., Leloğlu, N.: Kars ve çevresinde, süt sığırlarında, *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve MRT ile saptanması, sonuçlarının karşılaştırılması. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 20(4): 251-5, 1996.
- 80- Gürtürk, K., Alan, M., Boynukara, B., Solmaz, H.: Van ve yöresinde koyun ve sığır brusellozisinin insidensi üzerinde seroepidemiolojik araştırmalar. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 5(1-2): 121-5, 1994.
- 81- Hagan, W.: The animal reservoirs of brucellosis. *Cornell Vet.* 26(1): 14-20, 1973.
- 82- Helvacı, S.: *Brucella*. 135-139. İçinde: Kılıçturgay, K. (Edt.) *Klinik Mikrobiyoloji*. 2. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. Bursa, 1994.
- 83- Herman, L., De Ridder, H.: Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6): 2099-101, 1992.
- 84- Huber, J.D., Nicoletti, P.: Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring tests with isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 47(7): 1529-31, 1986.
- 85- Ica, T., Aydın, F., Erdenlig, S., Guler, L., Buyukcangaz, E.: Characterisation of *Brucella abortus* biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b. *Vet. Rec.* 163(22): 659-61, 2008.
- 86- İlhan, Z., Keskin, O., Sareyyüpoğlu, B., Kökçü, L., Akan, M.: Bir sığırcılık işletmesinde *Brucella abortus* epidemisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 46: 257-62, 1999.
- 87- İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Düzgün, S.G., Ersoy, Y., Eskiizmirliler, S., Güler, L., Gündüz, K., Işık, N., İçyerioğlu, A.K., Kalender, H., Karaman, Z., Küçükayan, U., Özcan, C., Seyitoğlu, Ş., Tuna, İ., Tunca, T., Üstünakın, K.,

- Yurtalan, S.: Türkiye’de sığır ve koyunlarda brusellozisin seroepidemiolojisi. *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.* 31(1): 21-75, 2000.
- 88-** İyisan, A.S.: Ergin Koyunlarda, Düşük Doz *Brucella melitensis* REV-1 aşısı ile aşılama sonucu oluşan antikorların çeşitli reaksiyonlarla saptanması, *Pendik Vet. Mikrobiol. Derg.* 23 (2) :175-185, 1992.
- 89-** Johnson, B., Mosier, D.A., Morton, R.J., Confer, A.W.: Experimental *Brucella abortus* strain 19 arthritis in young cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6: 56-61, 1994.
- 90-** Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M., Allardet-Servent, A.: Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.* 180(10): 2749-55, 1998.
- 91-** Karasoy, M.H.: Brusellosis’li koyunlardan elde edilen sütlerden yapılan peynirlerde *Brucella melitensis*’in dayanma süresi üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 8(1): 105-12, 1961.
- 92-** Kaya, O., Erganiş, O., Güler, L., Hadımlı, H.H.: Koyunlarda atıklara sebep olan *Brucella*, *Campylobacter* ve *Salmonella*’ların teşhisi için bakteriyolojik muayene ve koaglutinasyon tekniğinin karşılaştırılması. *Veterinarium* 6(1-2): 40-3, 1995.
- 93-** Kaya, O.: Koyun ve keçi brusellozisinin alerjik deri testleri ile teşhisi üzerine çalışmalar. *Veterinarium* 3(1) : 13-5, 1992.
- 94-** Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P., Limet, J.N.: Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.* 24(1): 73-80, 1990.
- 95-** Khan, M.Y., Mah, M.W., Memish, Z.A.: Brusellosis in pregnant women. *CID.* 32(8): 1172-7, 2001.
- 96-** Kırkbride, C.A.: Managing an outbreak of livestock abortion-2: Diagnosis and control of bovine abortion. *Vet. Med.* 80(5): 70-9, 1985.
- 97-** Kittelberger, R., Bundesen, P.G., Cloeckert, A., Greiser-Wilke, I., Letesson, J.J.: Serological cross-reactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9: IV. Evaluation of the M- and C- epitope antibody response for the specific detection of *B. abortus* infections. *Vet. Microbiol.* 60: 45-57, 1998.

- 98- Kronenwett, F.R., Lear, S.A., Metzger, H.J.: Thermal death time studies of *Brucella abortus* in milk. J. Dairy Sci. 37(11): 1291-302, 1954.
- 99- Kuplulu, O., Sarimehmetoglu, B.: Isolation and identification of *Brucella* spp. in ice cream. Food Control, 15: 511-4, 2004.
- 100- Lambert, G., Manther, C.A., Deyoe, B.L.: Studies on *Brucella abortus* infection in bulls. Am. J. Vet. Res. 24: 1152-6, 1963.
- 101- Lang, R., Banai, M., Lishner, M., Rubinstein, E.: Brucellosis. Int. J. Antimicrob. Agents 5: 203-8, 1995.
- 102- Langoni, H., Ichihara, S.M., Silva, A.V., Pardo, R.B., Tonin, F.B., Mendonça, L.J.P., Machado, J.A.D.: Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 37(6): 444-8, 2000.
- 103- Leal-Klevezas, D.S., Lopez-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P.: Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I using PCR. Arch. Med. Res. 26(3): 263-7, 1995.
- 104- Leal-Klevezas, D.S., Martinez-Vazquez, I.O., Garcia-Cantu, J., Lopez-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P.: Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. Vet. Microbiol. 75(1): 91-7, 2000.
- 105- Leal-Klevezas, D.S., Martinez-Vazquez, I.O., Lopez-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P.: Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. 33(12): 3087-90, 1995.
- 106- Levieux, D.: Bovine immunoglobulins and brucellosis. II. Activity of serum IgG₁, IgG₂ and IgM in agglutination, coombs, cf and rose bengal tests. Ann. Res. Vet. 5: 343-53, 1974.
- 107- MacMillan, A.P., Cockrem, D.S.: Reduction of non-specific reactions to the *Brucella abortus* serum agglutination test by the addition of EDTA. Res. Vet. Sci. 38(3): 288-91, 1985.
- 108- Mahajan, N.K., Kulshreshtha, R.C.: Comparison of serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. Trop. Anim. Hlth. Prod. 23(1): 11-6, 1991.

- 109- Mantur, B.G., Amarnath, S.K., Shinde, R.S.: Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian J. Med. Microbiol.* 25(3): 188-202, 2007.
- 110- Marin, C.M., Jimenez de Bagues, M.P., Barberan, M., Blasco, J.M.: Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Vet. Rec.* 138(17): 409-11, 1996.
- 111- Mayfield, J.E., Bricker, B.J., Godfrey, H., Crosby, R.M., Knight, D.J., Halling, S.M., Balinsky, D., Tabatabai, L.B.: The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene* 63(1): 1-9, 1988.
- 112- McCaughey, W.J., Purcell, D.A.: Brucellosis in bulls. *Vet. Rec.* 93(12): 336-7, 1973.
- 113- Mense, M.G., Van deVerg, L.L., Bhattacharjee, A.K., Garrett, J.L., Hart, J.A., Lindler, L.E., Hadfield, T.L., Hoover, D.L.: Bacteriologic and histologic features in mice after intranasal inoculation of *Brucella melitensis*. *AJVR* 62(3): 398-405, 2001.
- 114- Meunier, J.R., Grimont, P.A.D.: Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144(5): 373-9, 1993.
- 115- Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D., Ramuz, M.: Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179(10): 3244-9, 1997.
- 116- Miller, W.G., Adams, L.G., Ficht, T.A., Cheville, N.F., Payeur, J.P., Harley, D.R., House, C., Ridgway, S.H.: *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 30(1): 100-10, 1999.
- 117- Mishal, J., Ben-Israel, N., Levin, Y., Sherf, S., Jafari, J., Embon, E., Sherer, Y.: Brucellosis outbreak: analysis of risk factors and serologic screening. *Int. J. Mol. Med.* 4 (6): 655-8, 1999.
- 118- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H.: *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship

- with members of the alpha-2 subdivision of the class Protobacteria. *J. Bacteriol.* 172(7): 3569-76, 1990.
- 119-** Mullis, K.B., Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-50, 1987.
- 120-** Muñoz, P.M., Marín, C.M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Mainar-Jaime, R.C., Moriyón, I., Blasco, J.M.: Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12(1): 141-51, 2005.
- 121-** Muz, A., Ertaş, H.B., Öngör, H., Gülcü, H.B., Özer, H., Eröksüz, H., Dabak, M., Başbuğ, O., Kalender, H.: Elazığ ve çevresinde koyun ve keçilerde abortus olgularının bakteriyolojik, serolojik ve patolojik olarak incelenmesi. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 23(Ek sayı 1): 177-88, 1999.
- 122-** Nicoletti, P.: A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90(1-4): 5-9, 2002.
- 123-** Nicoletti, P.: Further evaluation of serologic test procedures used to diagnose Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 30: 1811-21, 1969.
- 124-** Nicoletti, P.: The control of brucellosis-a veterinary responsibility. *Saudi Med. J.* 13: 10-13, 1992.
- 125-** Nielsen, K., Smith, P., Widdison, J., Gall, D., Kelly, L., Kelly, W., Nicoletti, P.: Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Vet. Microbiol.* 100(1-2): 25-30, 2004.
- 126-** Nielsen, K.H., Wright, P.F., Cherwonogrodzky, J.H.: A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle. *Vet. Immun. Immunopathol.* 18(4): 331-47, 1988.
- 127-** Ocampo-Sosa, A.A., Agüero-Balbín, J., García-Lobo, J.M.: Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet. Microbiol.* 110: 41-51, 2005.
- 128-** Ocholi, R.A., Kwaga, J.K.P., Ajogi, I., Bale, J.O.: Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. *Vet. Microbiol.* 103: 47-53, 2004.

- 129- Olive, M., Bean, P.: Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1661-9, 1999.
- 130- Olle-Goig, J.E., Canela-Soler, J.: An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. *AJPH* 77 (3): 335-8, 1987.
- 131- Otlu, S., Sahin, M., Atabay, H.I., Unver, A.: Serological investigation of brucellosis in cattle, farmers and veterinarians in the Kars district of Turkey. *Acta Vet. Brno.* 77: 117-21, 2008.
- 132- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E.: Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352(22): 2325-36, 2005.
- 133- Philippon, A., Renoux, G., Plommet, M.: Experimental bovine brucellosis. III. The vaginal excretion of *Brucella abortus* before and after parturition. *Ann. Rech. Vet.* 1(2): 215-24, 1970.
- 134- Plant, J.W., Claxton, P.D., Jakovljevic, D., Saram, W.: *Brucella abortus* infection in the bull. *Aust. Vet. J.* 52(1): 17-20, 1976.
- 135- Queipo-Ortuno, M.I., Morata, P., Ocon, P., Manchado, P., Colmenero, J.D.: Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35(11): 2927-30, 1997.
- 136- Rahaley, R.S., Dennis, S.M., Smeltzer, M.S.: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. *Vet. Rec.* 113(20): 467-70, 1983.
- 137- Refai, M.: Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet. Microbiol.* 90: 81-110, 2002.
- 138- Renukaradhya, G.J., Isloor, S., Rajasekhar, M.: Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet. Microbiol.* 90: 183-95, 2002.
- 139- Rijpens, N.P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R., Herman, L.M.: Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1683-8, 1996.

- 140-** Roberts, A., Kemp, C.: Brucellosis (Mediterranean fever, Gibraltar fever, Malta fever, Cyprus fever, undulant fever, typhomalarial fever). *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 13(3): 106-7, 2001.
- 141-** Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., López-Goñi, I.: Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33(3): 615-7, 1995.
- 142-** Romero, C., López-Goni, I.: Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3735-7, 1999.
- 143-** Romero, C., Pardo, M., Grillo, M.J., Diaz, R., Blasco, J.M., López-Goni, I.: Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairly cattle. *J. Clin. Microbiol.* 33(12): 3198-200, 1995.
- 144-** Rose, J.E., Roepke, M.H.: An acidified antigen for detection of nonspecific reactions in the plate agglutination test for bovine brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 18(68): 550-5, 1957.
- 145-** Ruppner, R., Meyer, M.E., Willeberg, P., Behymer, D.E.: Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with others tests for brucellosis, using sera from experimentally infected heifers. *Am. J. Vet. Res.* 41(8): 1329-32, 1980.
- 146-** Sağlam, Y.S., Türküanıt, S.S., Taştan, R., Bozođlu, H., Otlı, S.: Kuzeydođu Anadolu Bölgesi'nde görölen bakteriyel sığı ve koyun abortlarının etiyołojik ve patolojik yönden incelenmesi. *Vet. Bil. Derg.* 14(2): 133-45, 1998.
- 147-** Sambrook, J., Russell, D.: *Molecular cloning: A laboratory manual* (Third edition), volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory, America, 2001.
- 148-** Sancak, Y.C., Boynukara, B., Yardımcı, H.: The existence and lifetime of *Brucella* species in Van herby cheese. *Veterinarium*, 4(1): 1-3, 1993.
- 149-** Sarısayın, F., Eroğlu, M., Nadas, U.G.: Yurdumuzda izole edilen *Brucella* suşlarının tür ve biyotiplerinin tayini ile dağılış durumu üzerine bir çalışma. *Pendik Vet. Kont. Araşt. Derg.* 1: 24-35, 1969.
- 150-** Sarısayın, F., Eroğlu, M.: Marmara ve Trakya bölgelerinde üretilen tereyağı, krema (kaymak) ile bunlardan yapılan pasta ve dondurmanın insanlardaki

- Brucella* enfeksiyonu yönünden rolü. Pendik Veteriner Bakteriyoloji ve Seroloji Enstitüsü Dergisi. 10(1): 22-9, 1978.
- 151-** Sayılır, K., Kutlu, S.S., Baykam, N., Eren, Ş., Çelikbaş, A.K., Dokuzoğuz, B.: Abortusla sonuçlanan iki insan bruselloz olgusu. İnfeksiyon Dergisi. 17(3): 345-8, 2003.
- 152-** Saz, J.V., Beltran, M., Diaz, A., Agulla, A., Merino, F.J., Villasante, P.A., Velasco, A.C.: Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis. Eur. J. Clin. Microbiol. 6(1):71-4, 1987.
- 153-** Schuring, G.G., Roop, R.M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., Sriranganathan, N.: Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 28(2): 171- 88, 1991.
- 154-** Seoud, M., Saade, G., Awar, G., Uwaydah, M.: Brucellosis in pregnancy. J. Reprod. Med. 36(6):441-5, 1991.
- 155-** Shapiro, D.S., Wong, J.D.: *Brucella*. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (eds) Manual of clinical microbiology. Washington: ASM Press, syf. 625-632, 1999.
- 156-** Sifuentes-Rincón, A.M., Revol, A., Barrera-Saldaña, H.A.: Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. Mol. Med. 3(11): 734-9, 1997.
- 157-** Sineo, L., Martini, G., Borghi, M., Failli, M. : Analysis of genetic markers by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). Boll. Chim. Farmacol. 132(6): 201-2, 1993.
- 158-** Sreevatsan, S., Bookout, J.B., Ringpis, F., Perumaalla, V.S., Ficht, T.A., Adams, L.G., Hagius, S.D., Elzer, P.H., Bricker, B.J., Kumar, G.K., Rajasekhar, M., Isloor, S., Barathur, R.R.: A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Clin. Microbiol. 38(7): 2602-10, 2000.
- 159-** Stack, J.A., Harrison, M., Perrett, L.L.: Evaluation of a selective medium for *Brucella* isolation using natamycin. J. Appl. Microbiol. 92: 724-8, 2002.
- 160-** Staszkiwicz, J., Lewis, C.M., Colville, J., Zervos, M., Band, J.: Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers in a community hospital. J. Clin. Microbiol. 29(2): 287-90, 1991.

- 161-** Stevens, M.G., Olsen, S.C., Cheville, N.F.: Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308 proteins in RB51-vaccinated or 2308-infected cattle. *Infect. Immun.* 64(3): 1007-10, 1996.
- 162-** Stringfellow, D.A., Scanlan, C.M., Hannon, S.S., Panangala, V.S., Gray, B.W., Galik, P.A.: Culture of uterine flushings, cervical mucosa, and udder secretions collected post-abortion from heifers artificially exposed to *Brucella abortus*. *Theriogenology*, 20(1): 77-83, 1983.
- 163-** Sutherland, S.S., Evans, R.J., Bathgate, J.: Application of an enzyme linked immunosorbent assay in the final stages of a bovine brucellosis eradication program. *Aust. Vet. J.* 63(12): 412-5, 1986.
- 164-** Sutherland, S.S.: An enzyme linked immunosorbent assay for detection of *Brucella abortus* in cattle using monoclonal antibodies. *Aust. Vet. J.* 62(8): 264-8, 1985.
- 165-** Şahin, M., Atabay, H.İ., Otlu, S., Ünver, A., Çelebi, Ö.: Kars ve çevresinde bulunan insan, sığır ve koyunlarda brusellozisin prevalansının serolojik ve kültürel metotlarla araştırılması. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. syf. 132-133 Elazığ/Türkiye, 14-16 Eylül 2004.
- 166-** Şahin, M., Beytut, E.: Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30(5): 503-6, 2006.
- 167-** Şahin, M., Genç, O., Ünver, A., Otlu, S.: Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop. Anim. Health. Prod.* 40: 281-86, 2008.
- 168-** Tantillo, G., Di Pinto, A., Vergara, A., Buonavoglia, C.: Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *J. Food Prot.* 64(2): 164-7, 2001.
- 169-** Tcherneva, E., Rijpens, N., Jersek, B., Herman, L.M.F.: Differentiation of *Brucella* species by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J. Appl. Microbiol.* 88(1): 69-80, 2000.
- 170-** Thomsen, A.: Experimental studies on the incubation period of infectious abortion in cattle. *Brit. Vet. J.* 106: 41-5, 1950.
- 171-** Türütoğlu, H., Mutluer, B., Uysal, Y.: Burdur yöresinde toplanan sütlerin *Brucella* infeksiyonu yönünden araştırılması. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.* 27(4): 1003-9, 2003.

- 172- Tyler, K.D., Wang, G., Tyler, S.D., Johnson, W.M.: Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 35(2): 339-46, 1997.
- 173- Ünver, A., Erdogan, H.M., Atabay, H.I., Sahin, M., Celebi, O.: Isolation, identification, and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars, Turkey. *Revue Méd. Véd.* 157(1): 42-6, 2006.
- 174- Ünver, A., Erdoğan, H.M., Atabay, H.İ., Şahin, M., Güneş, V., Çitil, M., Gökçe, H.İ.: Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* 12(2): 121-7, 2006.
- 175- van Belkum, A.: DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR: a literature review. *Clin. Microbiol. Rev.* 7(2): 174-84, 1994.
- 176- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M.: *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 292-5, 1985.
- 177- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M.: Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 138(2): 235-8, 1987.
- 178- Whatmore, A.M., Murphy, T.J., Shankster, S., Young, E., Cutler, S.J., MacMillan, A.P.: Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J. Clin. Microbiol.* 43(2): 761-9, 2005.
- 179- Wilesmith, J.W.: The persistence of *B. abortus* infection in calves: A retrospective study of heavily infected herd. *Vet. Rec.* 103(): 149-53, 1978.
- 180- Xavier, M.N., Paixão, T.A., Poester, F.P., Lage, A.P., Santos, R.L.: Pathological, immunohistochemical and bacteriological study of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J. Comp. Path.* 140(2-3): 149-57, 2009.
- 181- Yingst, S., Hoover, D.L.: T cell immunity to brucellosis. *Crit. Rev. Microbiol.* 29(4): 313-31, 2003.
- 182- Yurtalan, S.: Türkiye'deki *Brucella abortus* hastalığı kontrolünün ekonomik önemi. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 30(2): 35-41, 1999.
- 183- Yüce, A., Çavuş, S.A.: Türkiye'de bruselloz: Genel bakış. *Klinik Derg.* 19(3): 87-97, 2006.

- 184-** Zervos, M.J., Bostic, G.: Exposure to *Brucella* in the laboratory. *Lancet* 349(9052): 651-7, 1997.
- 185-** http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&ust_id=13: Türkiye istatistik kurumu: Büyükbaş hayvan sayıları. Erişim tarihi: 09.03.2009.
- 186-** http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_00052.htm: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Part 2 Section 3 Chapter 1.: Bovine Brucellosis. Erişim tarihi: 09.03.2009.
- 187-** <http://www.the-icsp.org/subcoms/Brucella.htm>: International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Erişim tarihi: 09.03.2009.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kars 1977 doğumluyum. İlköğrenimimi Diyarbakır'da, lise öğrenimimi ise Kars'ta tamamladım. 1995 yılında girdiğim Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2000 yılında "Veteriner Hekim" ünvanı alarak mezun oldum. 2001 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Mikrobiyoloji Anabilim Dalına açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak Yüksek Lisansa başladım. 2003 yılında Enstitünün aynı birimde açtığı Araştırma Görevlisi sınavını kazandım. 2004 yılında Yüksek Lisansı bitirterek Doktora öğrenimime başladım. 2007 yılında Araştırma Görevlisi kadrom Veteriner Fakültesine aktarıldı. Halen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.