

Kars Yöresinde Atık Yapan İneklerin Çeşitli Örneklerinden *Brucella* Etkenlerinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Olguların Epidemiyolojik Analizi ^[1]

Fatih BÜYÜK *  Mitat ŞAHİN *

[1] Doktora tezinden özetlenen bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından 2009-VF-10 nolu proje olarak desteklenmiştir

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-4509

Özet

Bu çalışmada, Kars yöresinde atık yapan ineklerden alınan çeşitli örneklerden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla brusellozise karşı aşılanmamış ve atık yapan 284 inekten alınan 265 süt ve 261 vajinal sıvap örneği ile 97 ineğe ait atık fetal doku örneği incelendi. Bakteriyolojik inceleme sonucunda 265 süt örneğinin 41 (%15.47)'inden ve 261 vajinal sıvap örneğinin 25 (%9.57)'inden ve 97 atık fetus örneğinin 40 (%41.23)'inden olmak üzere toplam 106 (%17.01) örnekten *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. İneklerin 8 (%3.30)'ünün hem süt hem de vajinal sıvap örneğinden *Brucella* spp. izole edildi. İzolatların 105 (%99.05)'i *Brucella abortus* ve 1 (%0.94)'i *Brucella melitensis* olarak tanımlandı. İzolatların tümü saha suşu olarak saptandı. 105 *B. abortus* izolatının 92 (%87.61)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 6, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 9 ve 1 (%0.95)'i *B. abortus* biyotip 1 olarak tiplendirildi. Atık fetus doku örneğinden izole edilen 1 adet *B. melitensis* suşu *B. melitensis* biyotip 3 olarak tiplendirildi. *B. abortus* olarak tanımlanan 8 suş klasik yöntemlerle biyotiplendirilemedi ve atipik *B. abortus* olarak belirlendi. *Brucella* cins spesifik PZR kiti ile tüm izolatlar *Brucella* spp. ve *Brucella* tür spesifik PZR kiti ile 105 izolat *B. abortus* ve 1 izolat *B. melitensis* olarak teyit edildi. Çalışmada, hastalık için risk oluşturabilecek epidemiyolojik faktörler incelendi ve bu faktörlerin brusella pozitifliğine katkı sağladıkları belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Brucella* spp., İnek, İzolasyon ve biyotiplendirme, PZR, Epidemiyoloji

Investigation of *Brucella* Species from Various Samples of Aborted Cattle in Kars Province (Turkey) by Cultural and Molecular Methods and Epidemiological Analysis of Cases

Summary

In this study, investigation of *Brucella* agents from various samples obtained from aborted cattle in Kars province by bacteriological and molecular methods and determination of epidemiological and clinical characteristics of cases were aimed. For this purpose 265 milk and 261 vaginal swab samples were obtained from 284 aborted cattle that were not vaccinated against brucellosis and 97 tissue samples of aborted fetuses were examined. As a result of bacteriological examination, *Brucella* spp. were isolated from total of 106 (17.01%) samples, in 41 (15.47%) out of 265 milk, 25 (9.57%) out of 261 vaginal swab and 40 (41.23%) out of 97 aborted fetus samples. *Brucella* spp. were isolated from both milk and vaginal swab samples of 8 (3.30%) cattle. Among 106 isolates, 105 (99.05%) and 1 (0.94%) were identified as *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*, respectively. All of the isolates were detected as field strains. Among 105 *B. abortus* isolates, 92 (87.61%), 2 (1.90%), 2 (1.90%), 1 (0.95%) were typed as *B. abortus* biotype 3, *B. abortus* biotype 6, *B. abortus* biotype 9 and *B. abortus* biotype 1, respectively. One *B. melitensis* strain isolated from aborted fetus tissue was typed as *B. melitensis* biotype 3. Eight *B. abortus* strains couldn't be biotyped by classical methods and they were determined as atypical *B. abortus*. All of the isolates were confirmed as *Brucella* spp. with *Brucella* genus-specific PCR and 105 isolates were identified as *B. abortus* and one isolate was identified as *B. melitensis* with *Brucella* species-specific PCR. In the study, some epidemiological factors that pose a risk for the disease were also investigated and it was found that these factors contributed to brucella positivity.

Keywords: *Brucella* spp., Cattle, Isolation and biotyping, PCR, Epidemiology



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426836/1171



fatihbyk08@hotmail.com

GİRİŞ

Brusellozis, hayvanlarda abort ve infertilite ile karakterize olan ve *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan, enfeksiyöz, bulaşıcı ve önemli bir zoonotik hastalıktır ^{1,2}. Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Altkomitesi *Brucella* cinsi içerisinde; *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* ve *B. inopinata* sp. nov. adlı 10 farklı tür bildirmiştir ^{3,4}. Sığırlarda enfeksiyondan *B. abortus* sorumlu tutulmuştur ⁵. Fakat *B. melitensis* ve nadiren *B. suis*'in saptandığı sığır enfeksiyonları da mevcuttur ⁶.

Brusellozis, dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir. Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Afrika ve Latin Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir ^{1,7}. Türkiye'de ve Kars yöresinde brusellozis endemik seyreden bir hastalıktır ve epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir ⁸. Kars ili ve çevresinde yapılan çalışmalarda sığır abortlarından %30-40 oranında *Brucella* spp. izole edilirken ⁹⁻¹¹, %30-70 oranında *Brucella* antikoru tespit edilmiştir ^{9,12}.

Bu çalışmada süt, vajinal sıvap ve atık fötuslardan *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu, biyotiplendirilmesi ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Kars yöresinde süt sığırlarında brusellozisin coğrafi dağılımının belirlenmesi, atık olguları ile ilgili epidemiyolojik verilerin ve klinik özelliklerin ortaya konulması ve yorumlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini, Kars ili ve ilçelerine ait işletmelerde Mart 2009 ile Mart 2010 tarihleri arasında atık yapan ve aşısız olduğu bilinen ineklere ait süt ve vajinal sıvap örnekleri ile 2005-2010 yılları (ilk iki ay) arasında teşhis amaçlı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına getirilen atık fötüs örnekleri

oluşturdu. Örneklemeye yapılan 86 farklı işletmedeki toplam inek sayısı 4.276, boğa sayısı 47 ve koyun odağı 14 olarak saptandı. Çalışmada 284 farklı ineğin 242'sinden hem süt hem de vajinal sıvap olmak üzere toplamda 265 süt ve 261 vajinal sıvap örneği ile 97 farklı ineğin fötal doku örneği *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla incelendi (Tablo 1).

Süt ve vajinal sıvap örneklerinden direk ve Farrell Broth'da ön zenginleştirme sonrası *Brucella* selektif supplement (Oxoid, SR0083A) ilave edilmiş Farrell Agar ve *Brucella* Selektif Agar (Oxoid CM0169) ile Kanlı agara (Oxoid CM0271) ekim yapıldı. Atık fötusa ait organ ve doku örnekleri %5-10 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara ekildi. Tüm örnekler için ikili ekim yapılarak bir tanesi aerob diğeri ise %5-10 CO₂'li ortamda, 37°C'de 5-7 gün süre ile inkübe edildi.

Süt, vajinal sıvap ve atık fötüs örneklerinin ekim ve inkübasyonunu takiben, besiyerleri *Brucella* cinsi bakterilerin oluşturdukları koloni morfolojisi yönünden incelenerek şüpheli kolonilerden preparat hazırlandı, Gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Gram negatif kokobasil olarak görülen etkenlerin katalaz, oksidaz ve üreaz aktiviteleri belirlendikten sonra izolatların identifikasyonu ile biyotiplendirilmesi Alton ve ark.¹³ tarafından bildirilen yöntemlere göre yapıldı. Sonuçlar, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde yapılan çalışmalar ile doğrulandı.

Bu çalışmada moleküler yöntemlerle 41 süt, 25 vajinal sıvap ve 40 fötüs *Brucella* izolatu incelenildi. Bu amaçla *Brucella* cins spesifik PZR kiti (FC BIOTEC, 0303) ve *Brucella* tür spesifik (Multiplex) PZR kiti (FC BIOTEC, 0301) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu daha önce bildirilen ¹⁴ kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde hazır olan 45 µl'lik reaksiyon karışımına 5 µl DNA ekstraktı eklendi ve amplifikasyon işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerin değerlendirilmesi amacıyla modifiye bir kesitsel çalışma

Tablo 1. Yerleşim yerlerine göre incelenen örnek cinsi ve sayısı

Table 1. Types and the number of samples examined according to locations

Bölge	İşletme Sayısı	Süt	Vajinal Sıvap	Fötüs
Akyaka	5	7	0	6
Arpaçay	8	0	0	13
Digor	5	4	2	8
Kağızman	4	3	2	8
Merkez	42	187	197	38
Sarıkamış	3	2	0	6
Selim	10	54	55	9
Susuz	9	8	5	9
Toplam	86	265	261	97

şeklinde yürütülen bu araştırmada, örnekleme küme örnekleme yöntemi ile yapıldı. Araştırma verilerinin analizi bilgisayar ortamında Minitab paket programı (Minitab Release 12.1 for Windows, State College, PA) kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde yüzdelik oran ve Ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Bakteriyolojik inceleme sonucu 265 süt örneğinin 41 (%15.47)'inden, 261 vajinal sıvı örneğinin 25 (%9.57)'inden ve 97 fötüs örneğinin 40 (%41.23)'ünden *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. Çalışmada 8 (%3.30) hayvana ait hem süt hem de vajinal sıvı örneğinden *Brucella* spp. izole edildi. Süt ve vajinal sıvı örneklerinden ön zenginleştirme öncesi ve sonrası en çok izolasyon Farrell Agarda bunu takiben Brucella Agar ve Kanlı Agarda yapıldı. Örneklerin 24 (%36.36)'ü Farrell Broth'da zenginleştirmeyi takiben katı besiyerlerinde kültür sonucu üretildi. Çalışmada en fazla izolasyon fötal atığı takiben 3 ile 30. gün arasında alınan örneklerden, en az izolasyon ise 91. günden sonra alınan örneklerden yapıldı (Tablo 2).

Süt ve vajinal sıvı örneklerinin ekimi sonucunda 4-5. günlerde oluşan kolonilerin *Brucella* A ve M antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde 1 adet süt izolatu hariç (A antiserumu ile negatif ve M antiserumu ile pozitif), tüm isolatlar A antiserumu ile pozitif ve M antiserumu ile negatif aglütinasyon reaksiyonu verdiler. Ayrıca nötral akriflavin solüsyonu ile yapılan aglütinasyonda tüm isolatlar smooth koloni yapısı gösterdiler. Süt ve vajinal sıvılardan izole edilen ve *Brucella* spp. olarak tanımlanan 66 izolatu tümü Tbilisi Fajı'nın rutin test dilüsyonu (RTD) ve 10⁴xRTD ile lize oluşturmaları nedeniyle *B. abortus* olarak tanımlanmıştı. Ayrıca isolatların 63'ü ilk izolasyonlarında %5-10 CO₂'li

ortamda üredi ve 64'ü H₂S pozitif saptandı. Atık fötuslardan izole edilen 31 suş A antiserumu ile ve 1 suş M antiserumu ile pozitif reaksiyon oluşturdu. İzolatların 25'inin smooth ve 7'sinin kısmi rough koloni yapısında olduğu saptandı. Atık fötüs doku örneklerinden izole edilen ve *Brucella* spp. olarak tanımlanan bir izolatu, ilk izolasyonda aerob ortamda üremesi, H₂S testinin negatif olması ve Tbilisi Fajı'nın RTD ve 10⁴xRTD ile lize olmaması nedeniyle *B. melitensis* olarak tanımlanmıştı.

Biyotiplendirme çalışmaları sonucu süt isolatlarının 37 (%90.24)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%4.87)'si *B. abortus* biyotip 6, 1 (%2.43)'i *B. abortus* biyotip 1 ve 1 (%2.43)'i *B. abortus* biyotip 9; vajinal sıvı isolatlarının tümü *B. abortus* biyotip 3; atık fötüs isolatlarının 30 (%96.77)'u *B. abortus* biyotip 3 ve 1 (%3.22)'i *B. abortus* biyotip 9 olarak belirlendi. Atık fötüstan izole edilen 1 adet *B. melitensis* suşu ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Çalışmada fötuslardan izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle *B. abortus* olarak tanımlanmış 8 suşun tamamının monospesifik M antiserumu ile pozitif aglütinasyon vermesi ve bunların 7'sinin Tbilisi Fajı'nın değişik konsantrasyonlarıyla (RTD ve RTDx10⁴) ve R/C fajları ile lize özelliklerinde farklılıkların olması nedeniyle bu 8 suş atipik *B. abortus* olarak tanımlandı (Tablo 3). Çalışmada 105 *B. abortus* izolatu tamamı ve 1 adet *B. melitensis* izolatu saha suşu olarak belirlendi.

Süt, vajinal sıvı ve atık fötüs örneklerinden izole ve tanımlanmış 106 izolatu *Brucella* cins spesifik PZR kiti ile yapılan analizi sonucunda yaklaşık 250 bp'lik bantların görülmesi ile tüm isolatlar *Brucella* spp. olarak belirlendi (Şekil 1a). Süt, vajinal sıvı ve atık fötüs örneklerinden izole ve tanımlanmış ve atipik isolatlar da dahil konvansiyonel yöntemlerle ve *Brucella* cins spesifik PZR kiti

Tablo 2. Atık sonrası örnek alma zamanı ve izolasyon oranları

Table 2. The sampling time after the abortion and isolation rates

<i>Brucella</i> spp. İzolasyon Durumu	3-30. Gün	31-60. Gün	61-90. Gün	91-120. Gün	121. Gün Sonrası	Toplam
İzole edilen	32	17	5	2	2	58
İzole edilemeyen	46	73	41	28	38	226
Toplam	78	90	46	30	40	284

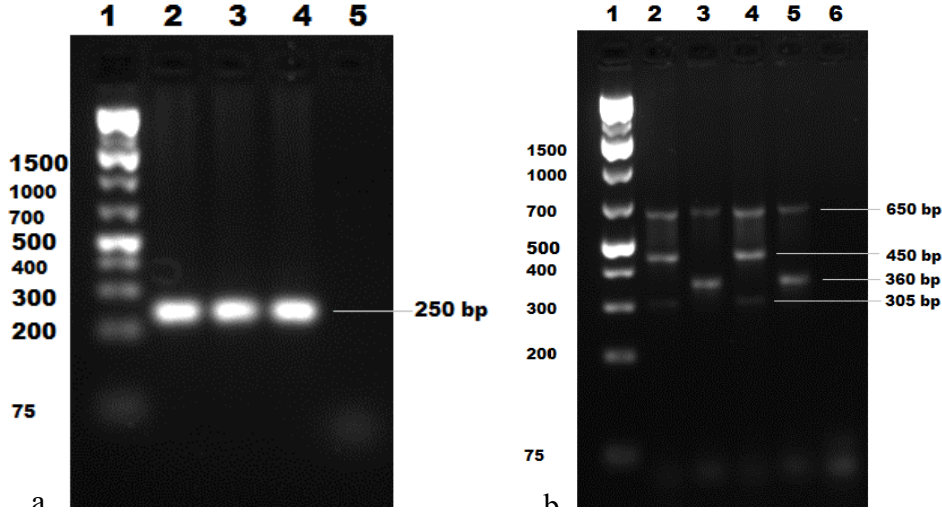
Tablo 3. *Brucella* isolatlarının biyotip dağılımı ve üreme özellikleri

Table 3. Biotype distribution and growth characteristics of *Brucella* isolates

Biyotip	İzolatu Sayısı	Örnek Türü	CO ₂	H ₂ S	Tionin	B. Füksin	A Serum Agl.	M Serum Agl.	Tbilisi Fajı
<i>B. abortus</i> biyotip 1	1	Süt	+	+	-	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 3	92	Süt (37) V. sıvı (25) Fötüs (30)	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 6	2	Süt	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 9	2	Süt (1) Fötüs (1)	-	+	+	+	-	+	+
<i>B. melitensis</i> biyotip 3	1	Fötüs	-	-	+	+	+	+	-
Atipik <i>B. abortus</i>	8	Fötüs	+	+	-/+	+	-/+	+	-/+

ile *Brucella* spp. olduğu doğrulanmış 105 adet *Brucella* spp. suşunun tümü *Brucella* tür spesifik PZR kiti ile 650, 450 ve 305 bp boyutunda bant profilleri göstererek *B. abortus*, klasik yöntemlerle *B. melitensis* olarak tanımlanmış 1 adet suş ise 650 ve 360 bp boyutunda iki bant profili vererek *B. melitensis* olarak belirlendi (Şekil 1b).

yol açan enfeksiyöz bir hastalık olarak güncelliğini korumaktadır^{15,16}. Dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye’de ineklerde abortlara neden olan etkenlerin teşhisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır^{10,17,18}. Peter¹⁹, abort olgularının ancak %50-65’inin etiyolojisinin belirlenebildiğini ve bunların %50-65’inin bakteriyel, %15-25’inin viral ve %20



Şekil 1. *Brucella* cins ve tür spesifik PZR sonuçları

a: *Brucella* cins spesifik PZR sonuçları, 1 nolu kolon; Moleküler ağırlık marker (1 kb DNA ladder, Fermentas, Litvanya), 2 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. abortus* 544), 3 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. melitensis* 16M), 4 nolu kolon; izolat, 5 nolu kolon; negatif kontrol **b:** *Brucella* tür spesifik PZR sonuçları, 1 nolu kolon; Moleküler ağırlık marker (1 kb DNA ladder, Fermentas, Litvanya), 2 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. abortus* 544), 3 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. melitensis* 16M), 4 nolu kolon; *B. abortus* saha izolatu, 5 nolu kolon; *B. melitensis* saha izolatu, 6 nolu kolon; negatif kontrol

Fig 1. The results of *Brucella* genus and species-specific PCR

a: Results of *Brucella* genus-specific PCR, lane 1; molecular weight stand (1 kb DNA plus ladder, Fermentas, Lithuania), lane 2; positive control (*B. abortus* 544), lane 3; positive control (*B. melitensis* 16M), lane 4; isolate, lane 5; negative control **b:** Results of *Brucella* species-specific PCR, lane 1; molecular weight stand (1 kb DNA plus ladder, Fermentas, Lithuania), lane 2; positive control (*B. abortus* 544), lane 3; positive control (*B. melitensis* 16M), lane 4; *B. abortus* field isolate, lane 5; *B. melitensis* field isolate, lane 6; negative control

Atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerine bakıldığında en fazla örnek alınan ve *Brucella* spp. izolasyonu yapılan hayvanlar arasında Montofon melezi, 5 yaş, 1 veya en fazla 3 defa gebelik geçiren, önceki yıllardaki gebelikleri normal sonuçlanan, boğa ile gebe kalan ve 7 ile 9. aylar arasında atık yapan ineklerin çoğunlukta olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde hastalık yönünden sayılan bütün bu risk faktörleri ile brusellozis görülme sıklığı arasındaki ilişki önemli ($P < 0.05$) bulundu. Çalışmada ineklerde abort haricinde klinik belirti olarak metritis (%8.66), retensio sekundinarum (%6.29), infertilite (%1.57) ve mastitis (%1.57) saptandı. Çalışmada sadece 97 ineğe ait fötüs örneğinin patolojik incelemesi yapıldı. Olguların çoğunda fötusta şişkinlik, deri altı ödem ve pnömoni tablosuna rastlandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Brusellozis, gelişmekte olan ülkelerde insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkileyen ve büyük ekonomik kayıplara

-25'inin mantar enfeksiyonlarından kaynaklandığını bildirmiştir. Abort olgularında bakteriyel etken olarak sıklıkla *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Chlamydia abortus*, *Salmonella* spp., *Leptospira* spp. gibi mikro-organizmalar izole edilmiştir^{10,16,19-21} ve olguların çoğunda *Brucella* türlerinin ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir^{19,22}. Ülkemizde yapılan araştırmalarda özellikle Kars ve yöresinde brusellozisin endemik olduğu ortaya konulmuştur^{9,15,16,23}. Bu çalışmada ineklerden %25.72 oranında *Brucella* izolasyonu yapıldı. Bu bulgular yörede yapılan ve brusellozisin endemik olduğunu vurgulayan çalışmalara^{9,15,16,23} sonuçlarına benzer niteliktedir.

Hayvanlarda brusellozisin teşhisine yönelik çalışmalar daha çok kan serumu^{9,15} ve süt örneklerinin²⁴⁻²⁶ serolojik ve atık fötüs materyallerinin^{17,21,23} kültürel incelenmesi şeklindedir. İnsanlar için önemli bir bulaşma kaynağı olan süt ve süt ürünleri ile vajinal akıntıdan etken izolasyonuna yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır^{26,27,29}. Kültürel çalışmalarda seropozitif inek sütlerinden^{24,28} %30-88 oranında *Brucella* spp. izole edilirken, sürü taramasının yapıldığı

çalışmalarda ^{26,29} bu oran süt örnekleri için %4-8 ve vajinal sıvı örnekleri için %6-10 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada süt örneklerinin 41 (%15.47)'inden, vajinal sıvı örneklerinin 25 (%9.57)'inden *Brucella* spp. izole edildi. Bu izolasyon oranları seropozitif inek sütlerinde yapılan çalışmaların ^{24,28} oranlarına göre düşüktür. Seropozitif ineklerden daha fazla *Brucella* spp. izolasyonunun beklenen bir durum olması bu çalışmadaki izolasyon oranlarının daha düşük olmasının sebebi olarak gösterilebilir. Bu çalışmadaki izolasyon oranları sürü taramasının yapıldığı çalışmalara ^{26,29} oranla daha fazladır. Bu durum çalışmada incelenen örneklerin tamamının yavru atan ineklerden alınması ve brusellozisin yörede endemik seyretmesi gerçeği ile açıklanabilir. Bu çalışmada 8 ineğe ait süt ve vajinal sıvı örneğinden eş zamanlı olarak *B. abortus* izole edildi. Bu bulgular ineklerin abort sonrası süt, fetal sıvılar, uterus ve vajinal akıntıları gibi çeşitli salgıları ile *Brucella* etkenlerini eş zamanlı olarak çıkarabileceğini göstermektedir.

Brucella etkenleri atığı takiben fütusa ait doku ve organlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bu tür örneklerin kültürünün yapılması izolasyon şansını artırmaktadır ³⁰. Atık fötüs doku örneklerinden *Brucella* etkenlerinin izolasyonuna yönelik birçok çalışma ^{10,11,17,21,23} yapılmıştır. Sağlam ve ark.¹⁰ Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nden alınan 96 atık inek fötüsünü etiyolojik ve patolojik olarak incelemişler ve örneklerin 40 (%41.6)'ından *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Şahin ve ark.¹¹ Kars yöresinde 87 atık inek fötüsünü bakteriyolojik olarak incelemişler ve 35 (%40.22)'inden *B. abortus* izole ve tanımlamışlardır. Bu çalışmada 97 atık fötüs örneği *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla incelendi ve örneklerin 40 (%41.23)'ünden *Brucella* spp. izole edildi. Bu bulgular brusellozisin endemik seyrettiği Kars yöresinde daha önce yapılan çalışmaların ^{10,11} sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Brucella etkenlerinin izolasyonunda örneklerin uygun bir katı besiyerine direk inokulasyonu en yaygın yöntemlerden birisidir. *Brucella* türlerinin çoğu kanlı agar, çikolata agar, triptik soya agar gibi standart katı besiyerinde ürerler. Fakat kontamine doku veya sekresyonlardan etken izolasyonunda Martin-Lewis, Farrell Besiyeri gibi selektif besiyerleri ve %5 at serumu ile zenginleştirilmiş genel besiyerleri kullanılabilir ^{31,32}. *Brucella* mikroorganizmasının düşük sevide bulunduğu süt, kolostrum ve bazı doku örneklerinde etken izolasyonunda zenginleştirme önerilmektedir. Zenginleştirme, serum dekstrozu broth, triptoz broth, soya broth veya *Brucella* broth gibi besiyerlerine birkaç antibiyotik ilavesi ile elde edilebilir ³². *Brucella* etkenlerinin üretilmesinde çeşitli besiyerlerinin etkinliklerinin değerlendirildiği birçok araştırma ^{24,25,28} mevcuttur. Bu çalışmada *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla Farrell Agar, *Brucella* Agar ve Kanlı Agar kullanılmış ve en yüksek izolasyon Farrell Agarda elde edilmiştir. Bu sonuçlar, *Brucella* etkenlerinin üretilmesinde çeşitli besiyerlerinin etkinliklerinin değerlendirildiği araştırmaların ^{25,28} sonuçları ile benzer niteliktedir. Ayrıca çalışmada elde edilen izolat-

ların 24 (%36.36)'ünün Farrell Brothta zenginleştirmeyi takiben izole edilmiş olması *Brucella* etkenlerinin izolasyonunda ön zenginleştirmenin önemini vurgulayan araştırmalarla ^{24,28} uyum içerisinde.

Bruselloziste atığı takiben genellikle ilk haftalarda süt ve vajinal akıntı gibi sekretlerle *Brucella* türleri yoğun bir şekilde atılmakta ve ilk 6 haftalık sürede en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bazı çalışmalarda etkenin sütle yıllarca (7-9 yıl) atıldığı bildirilmiştir ^{33,34}. Bu çalışmada süt ve vajinal sıvı örneklerinin büyük bir kısmı (%59.15) atık sonrası 3 ile 60. günler arasında alındı. Atığı takiben *Brucella* etkenlerinin çeşitli sekretlerle ilk 6 haftalık dönemde yüksek oranda atıldığı gerçeğine uygun bir şekilde, bu dönemler içerisinde alınan örneklerde daha fazla *Brucella* spp. izole edildi. Atığı takiben örnek alma zamanı ile etken izolasyon oranı arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu. Çalışmada atığı takiben 90 gün sonra ve hatta birkaç olguda 1 yıl sonra bile etkenin izole edilebilmesi, etkenin uzun yıllar süt ile atılabileceğini göstermektedir.

Hayvanlardan izole edilen *Brucella* türleri ve biyovarları ülkeden ülkeye farklılık gösterebileceği gibi bir ülkenin değişik bölgeleri arasında da farklılık gösterebilir. Hastalığa neden olan baskın *Brucella* tür ve biyovarlarının belirlenmesi enfeksiyonun epidemiyolojisi ve kontrol çalışmaları açısından oldukça önemlidir. Türkiye'de sığır ve koyun brusellozis etkenlerinin biyotiplendirilmesine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur ^{16,17,20,21,35}. Çalışmaların sonucunda Türkiye'de ^{17,20} ve Kars yöresinde ^{16,21} sığırlarda atıklara sebep olan baskın suşların *B. abortus* biyotip 1 ve 3 olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada izole edilen 105 *B. abortus* suşunun 92 (%87.61)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 6, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 9 ve 1 (%0.95)'i *B. abortus* biyotip 1 olarak tiplendirildi. Fötüs doku örneğinden izole edilen bir adet *B. melitensis* suşu ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak belirlendi. Bu sonuçlar Türkiye'de yapılan identifikasyon ve biyotiplendirme çalışmalarının ^{17,20,26,35} sonuçlarıyla farklılık göstermektedir. Bunun nedeni olarak çalışılan bölgelerin ve materyallerin farklı olması gösterilebilir. Kars yöresinde sığırlarda görülen brusellozis olgularında diğer çalışmalara ^{16,21,29} benzer şekilde bu çalışmada da *B. abortus* biyotip 3'ün baskın olduğu fakat *B. abortus* biyotip 1'in oranının giderek azaldığı belirlendi. Çalışmada ayrıca Türkiye'de varlığı daha önce bildirilen ^{35,36} *B. abortus* biyotip 6 ve *B. abortus* biyotip 9, Kars yöresinde ilk kez saptandı. Araştırmaların yapıldığı zaman periyotlarının farklı olması ve yörede yoğun hayvan hareketleri nedeniyle değişik zamanlarda hastalığa neden olan tür ve biyotiplerin değişebilme potansiyeli bu farklılıkların nedenleri olarak düşünülmektedir.

Brucella türlerinin geniş konak çeşitliliği vardır. Fakat enfeksiyonların patojenitesinde çok sıkı bir konak spesifikitesi görülür ve türler arasında kros enfeksiyon oldukça nadirdir. Enfekte koyun ve keçilerle temas halinde olan,

aynı ortamlarda barındırılan ve aynı meralarda otlatılan ineklerin *B. melitensis* ile enfekte olabilecekleri bildirilmiştir³⁷. Bu çalışmada sığır kökenli süt, vajinal sıvı ve fötüs doku örneklerinden izole edilen toplam 106 *Brucella* suşunun identifikasyon çalışmaları sonucu 105'i *B. abortus* ve bir izolat *B. melitensis* olarak belirlendi. *B. melitensis*'in izole edildiği fötüsün alındığı işletmedeki ineklerin 4-5 adet keçi ile birlikte barındırıldığı bildirildi. Kars yöresinde yapılan diğer çalışmaların^{16,21,29} sonuçlarına benzer bir şekilde bu çalışmada da sığır brusellozisinden çoğunlukla *B. abortus* saptandı. Ayrıca yörede varlığından daha önce bahsedilmiş²² olmasına rağmen sığır abort olgularından gerçek anlamda ilk *B. melitensis* izolasyonu yapıldı. Daha önce bildirilenlere^{20,37} benzer şekilde bu çalışmada da *B. melitensis*'in sorumlu olduğu sığır abort vakası saptanmıştır. Bu durumun işletmede farklı hayvan türlerinin bir arada beslenmesi ve yakın temasından kaynaklanabileceği ihtimalini akla getirmiştir. Odaktaki ineklerin keçiler ile beraber barındırılması, *B. melitensis*'in keçilerden bulaşabileceği ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Fakat keçilerde brusellozis yönünden herhangi bir mikrobiyolojik yoklama yapılmadığı için bu ihtimal kesinlik kazanmamıştır.

Brucella türleri arasındaki genetik homojenite yüksek olmasına rağmen bazı metabolik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak tür ve biyotip tayini yapılabilmektedir. Fakat konvansiyonel şemaya uymayan yeni ve atipik *Brucella* varyantlarının ortaya çıkması nedeniyle Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Altkomitesi halen *Brucella* için iyi bir klasifikasyon şeması oluşturamamıştır³⁸. Çeşitli araştırmalarda penisilin duyarlı ve bakteriyofaj dirençli smooth *B. abortus* kültürlerinin^{39,40} yanı sıra boya duyarlı, M antijene sahip *B. abortus* izolatları da bildirilmiştir⁴¹. Bu çalışmada yapılan biyotiplendirme sonucunda 105 *B. abortus* suşunun 8 (%7.61)'i standart biyotiplendirme profiline uygun olarak tiplendirilemedi ve atipik *B. abortus* suşları olarak belirlendi. Bu bulgular yapılan diğer çalışmaların^{39,40,42} sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere bir ülke ya da bölgede standart biyotiplendirme şemasına uymayan atipik izolatların görülmesi her zaman olasıdır. Bu tür izolatların tekrarlayan izolasyonlarının yapılması, ileride bu izolatlarla yeni bir biyotip statüsü verilmesinin ilk aşamasıdır ve bunlar epidemiyolojik araştırmalarda değerli veriler oluştururlar.

Brucella etkenlerinin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında karşılaşılan bazı güçlükler nedeniyle son yıllarda insan ve hayvanlardan brusellozisin tanısı ve cins, tür ve biyotip düzeyinde identifikasyonuna yönelik moleküler teknikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır^{43,44}. Bu tekniklerden *in vitro* DNA amplifikasyonunun yapıldığı PZR yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu teknik, örneklerin kültürünü takiben izolatlar üzerine⁴⁵ uygulanabileceği gibi izolasyona gerek duyulmadan kan, süt, vajinal akıntı, atık fötüs doku örneklerinden etkenin aranmasına yönelik direk PZR¹⁸ şeklinde de yapılabilmektedir. Bu çalışmalar ile

brusellozisin teşhisinde PZR'nin daha hızlı, güvenli, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada izole edilen 106 *Brucella* suşunun cins spesifik PZR kiti ile yapılan analizi sonucu tümü *Brucella* spp., multipleks PZR kiti ile yapılan analiz sonrası 105'i *B. abortus* ve 1'i *B. melitensis* olarak belirlendi. Kültürel sonuçlarla *Brucella* cins ve tür spesifik PZR kitleri karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar aynı bulundu. Brusellozisin teşhisinde altın standart olarak kabul edilen bakteri izolasyonu ile moleküler teşhis amaçlı kullanılan bu PZR kitlerinin benzer sonuçlar vermesi, bu kitlerin spesifiklerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Klasik identifikasyon yöntemlerine göre daha kolay ve kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle tercih edilebilir niteliktedir.

Bruselloziste olası enfeksiyon kaynaklarının ve risk faktörlerinin belirlenmesi sonraki epidemilerin önlenmesi açısından oldukça önemlidir ve buna yönelik birçok çalışma yapılmıştır^{7,46,47}. Bu çalışmalarda^{7,46,47} daha çok sürü büyüklüğü, şekli, idaresi, hijyen ve biyogüvenlik açısından risk değerlendirmesi yapılmış ve sayılan tüm bu faktörler *brucella* seropozitifliği için birer risk olarak düşünülmüştür. Yaş, ırk, cinsiyet ve abort varlığı gibi faktörlerin ise bireysel seropozitiflik açısından farklı etkilerinin olabileceği ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada hastalık yönünden risk oluşturabilecek yaş, gebelik sayısı, geçen yıllara ait atık varlığı, tohumlama şekli ve atığın gerçekleştiği gebelik dönemi gibi faktörler değerlendirildi. İneklerin yaş dağılımına bakıldığında en fazla atık yapan ve izolasyon yapılan yaş 5 yaş olarak belirlendi ve yaş ile brusellozis görülme sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) bir ilişki saptandı. Bunun nedeni olarak yaşlı hayvanların verim düşüklüğü ve tekrar atık yapma olasılıkları nedeniyle işletmelerde tutulmaması ve dolayısıyla örnekleme esnasında yaşlı hayvan bulma olasılığının az olması şeklinde açıklanabilir. Çalışmada 1 veya en fazla 3 defa gebelik geçirenlerde brusellozis daha fazla saptandı ve brusellozis ile gebelik sayısı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) bulundu. Bu durum hayvanların yaşları, döl verimi özellikleri ve dolayısıyla hayvanların üretime devam etmek için elde tutulabilirlikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Bruselloziste ilk atığı takiben genellikle sonraki gebelikler normal doğum ile sonuçlanır. Fakat bazen ilk atığı takiben 2 veya 3 yıl üst üste veya aralıklı olarak atıklar şekillenebilir³². Bu çalışmada önceki yıllarda gebelikleri normal sonlanan 290 hayvan olmasına rağmen, atık yapan 23 ve çeşitli infertilite problemleri olan 7 hayvan belirlendi. Geçmiş yıllarda atık yapan ve infertilite problemleri olan hayvanlar hariç büyük bir çoğunluğunun ilk kez atık yaptığı tespit edildi. Çalışmada aynı zamanda 27 ineğin ilk gebeliklerinde atık yaptığı belirlendi. Bu bulgular ile yukarıda açıklanan hipotez doğrulanır niteliktedir.

Çalışmada atık yapan ineklerin tohumlama şekilleri ile atık ve izolasyon oranları karşılaştırıldı ve aralarında

istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bir ilişki saptandı. Doğal aşım ile gebe kalan 357 inek ve sun-i tohumlama yapılan 24 inek saptandı. Çalışmadaki tüm işletmelerde toplam 47 adet boğa ve bu boğaların çoğunun ortak kullanıldığı bildirildi. Bu bulgular brusellozis gibi venereal yolla bulaşabilecek hastalıklarda doğal aşım ile etkenlerin daha fazla bulaşabileceği gerçeğiyle uyum içerisindedir.

Brusellozis genellikle ineklerde gebeliğin son üç aylık döneminde atıklara sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra gebeliğin ilk dönemlerinde erken embriyonik ölümlere ve atıklara sebep olabileceği gibi gebeliğin sonlanmasına yakın ölü doğum veya cansız, yaşama gücü zayıf canlı buzağı doğumları da görülebilmektedir^{6,32}. Bu çalışmada atık ve izolasyon oranları ile ineklerin gebelik dönemleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bulundu. En fazla izolasyon 7 ile 9. aylar arası, bunu takiben sırasıyla 4 ile 6. aylar arası ve 1 ile 3. aylar arasındaki gebelik dönemlerinde yapıldı. Çalışmada ayrıca ölü doğum (21 inek) ve zayıf buzağı doğumu (13 inek) yapan ineklerden de örneklem yapıldı ve *Brucella* izole edildi. Bu bulgular brusellozisin ineklerde özellikle gebeliklerinin son üç aylık döneminde daha fazla görüldüğü ve önemli derecede abortlara yol açtığı gerçeği ile uyum içerisindedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kars yöresindeki ineklerden %25.72 oranında *Brucella* izolasyonu yapılmış ve hastalığın yörede endemik olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur. Sığır brusellozisinin bu yüksek prevalansı ve insan brusellozis vakalarının yıllar içerisinde giderek artması, yörede ve ülke genelinde brusellozise yönelik eradikasyon programları ve uygulamalarının yetersiz kaldığını düşündürmekte ve brusellozisin ülkemizde hem insan sağlığına hem de hayvancılık sektörüne olumsuz etkileri nedeniyle önemli bir sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu sorunun bilincinde olarak, brusellozisin eradikasyonu konusunda çok sayıda disiplinin bir arada programlı bir şekilde çalışması gerekmektedir. Zoonotik hastalıkların insanlara bulaşmasının önlenmesinde temel görev veteriner hekimlerin olmasına rağmen insanlarda ve hayvanlarda brusellozisin kontrolü tıp ve veteriner doktorlarının öncelikli konularından birisi olmalı ve ortaklaşa çalışmalar yürütülmelidir. Bu tür kesit çalışmalarda zaman sıkıntısı olduğundan brusellozis ile ilgili risk faktörlerinin belirlenmesinde büyük öneme sahip kohort çalışmalarının sayılarının artırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Corbel MJ: Brucellosis: An overview. *Emerging Infect Dis*, 3 (2): 213-221, 1997.
2. Ray WC: Brucellosis (due to *Brucella abortus* and *B. suis*). In, Steele JH (Ed): Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases. pp. 99-127. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1979.
3. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM: Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol*, 46, 43-49, 2008.
4. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK: *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 801-808, 2010.
5. Corbel MJ, Banai M: Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., Vol. 2 (Part C). pp. 370-386, Springer, New York, 2005.
6. WHO: Brucellosis in human and animals. 2006. <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>. Accessed: 22.08.2010.
7. Tun TN: Prevalence survey of bovine Brucellosis (*Brucella abortus*) in dairy cattle in Yangon, Myanmar. Master of Veterinary Public Health, Chiang Mai University and Freie Universität, Berlin, 2007.
8. Erdenliç S: Türkiye'de *Brucella* kökenleri. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 30 Mart - 03 Nisan İstanbul, 2003.
9. Genç O, Otlı S, Şahin M, Aydın F, Gökçe Hİ: Seroprevalence of Brucellosis and Leptospirosis in aborted dairy cows. *Türk J Vet Anim Sci*, 29, 359-366, 2005.
10. Sağlam YS, Türkütanıt S, Taştan R, Bozoğlu H, Otlı S: Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden incelenmesi. *Vet Bil Derg*, 14 (2): 133-145, 1998.
11. Şahin M, Atabay Hİ, Otlı 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. 14-16 Eylül Elazığ, 2004.
12. Güllüce M: Kars ve Çevresinde Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. *Doktora Tezi*. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kars, 1993.
13. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM: Techniques for the brucellosis laboratory. pp.17-62. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1988.
14. Ünver A, Atabay Hİ, Güneş V, Çitil M, Erdoğan HM: Kars Yöresinde sığır tüberkülozünün yaygınlığının PCR ile belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 13 (1): 27-31, 2007.
15. Otlı S, Şahin M, Atabay Hİ, Ünver A: Serological investigation of brucellosis in cattle, farmers and veterinarians in the Kars district of Turkey. *Acta Vet Brno*, 77, 117-121, 2008.
16. Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S: Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40 (4): 281-286, 2008.
17. 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.
18. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP: Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol*, 33 (12): 3087-3090, 1995.
19. Peter AT: Abortions in dairy cows: New insights and economic impact. *Adv Dairy Technol*, 12, 233-244, 2000.
20. Buyukcangaz E, Sen A: The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. *J Biol Environ Sci*, 1 (3): 139-142, 2007.
21. Genc O, Kamber U: Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Ind Vet J*, 81, 1164-1165, 2004.
22. Ünver A, Erdoğan HM, Atabay Hİ, Şahin M, Güneş V, Çitil M, Gökçe Hİ: Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12 (2): 121-127, 2006.
23. Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Otlı S: Kars yöresinde sığır ve koyunlarda görülen abortların bakteriyolojik yönden araştırılması. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 27-29 Eylül, Ankara, Türkiye, s. 47. 1994.
24. Brodie J, Sinton GP: Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *J Hyg Comb*, 74 (3): 359-367, 1975.
25. Farrell ID, Robertson L: A comparison of various selective media,

including a new selective medium for the isolation of *Brucellae* from milk. *J Appl Bact*, 35, 625-630, 1972.

26. İlhan Z, Keskin O, Sareyyüpoğlu B, Kökçü L, Akan M: Bir sığırcılık işletmesinde *Brucella abortus* epidemisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 257-262, 1999.

27. Karasoy MH: Brucellosis'li koyunlardan elde edilen sütlerden yapılan peynirlerde *Brucella melitensis*'in dayanma süresi üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 8 (1): 105-112, 1961.

28. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV, Pardo RB, Tonin FB, Mendonça LJP, Machado JAD: 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): 444-448, 2000.

29. Çelebi Ö, Ötlu S: Kars yöresinde atık yapmış inek sürülerinden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (1): 53-58, 2011.

30. Aydın N: *Brucella* enfeksiyonları. In, Aydın N, Paracıkoğlu N (Eds): Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). s. 145-163, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.

31. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler 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, 487-505, 2003.

32. OIE: Bovine Brucellosis. OIE Terrestrial Manual. www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03BOVINE_BRUCCELL.pdf, Accessed: 15.08.2010.

33. Anonim: Brucellosis. www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/brucella.htm. Erişim tarihi: 16.09.2010

34. Anonim: <http://erzurum.vet.gov.tr/ErzurumVetKont/BakteriyelHast.html#Brucellozis>. Erişim tarihi: 22.09.2010.

35. Sarısayın F, Eroğlu M, Nadas UG: Yurdumuzda izole edilen *Brucella* suşlarının tür ve biyotiplerini tayini ile dağılışı durumu üzerine bir çalışma. *Pendik Vet Kont Araşt Derg*, 1, 24-35, 1969.

36. Refai M: Incidence and control of brucellosis in the Near East region.

Vet Microbiol, 90, 81-110, 2002.

37. Koneman E, Winn W, Alen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G: Koneman's Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 8th ed., Lippincott Williams&Wilkins. 482-490, 2006.

38. Corbel MJ. Atypical *Brucella melitensis* strains. International Comitee on Sytematic Bacteriology Subcomitee on the Taxonomy of *Brucella*. 1994. Prague. Czech Republic. *Int J Syst Evol*, 56, 1169-1170, 2006.

39. Corbel MJ, Morris JA: Studies on a smooth phage-resistant variant of *Brucella abortus*. I. Immunological properties. *Br J Exp Pathol*, 55, 78-87, 1974.

40. Harrington RJr, Bond DR, Brown GM: Smooth phage-resistant *Brucella abortus* from bovine tissue. *J Clin Microbiol*, 5, 663-664, 1977.

41. Morgan WJB: The examination of brucella cultures for lysis by phage. *J Gen Microbiol*, 30, 437-443, 1963.

42. Garcia MM, Brooks BW, Ruckerbauer GM, Rigby CE, Forbes LB: Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Can J Vet Res*, 52, 338-342, 1998.

43. Bricker BJ: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 435-446, 2002.

44. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR: Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69 (2): 216-227, 1990.

45. Evangelista TBR, Santos HO De los, Navarro AFL, Basulto GEM, Nielsen K, Francisco M, Gomez M, Roseles JFM, Manriquez LCP: Evaluation of polymerase chain reaction test (PCR) for the diagnosis of bovine brucellosis. *Tec Pecu Mex*, 43, 117-126, 2005.

46. Al-Majali AM, Talafha AO, Ababneh MM, Ababneh MM: Sero-prevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *J Vet Sci*, 10 (1): 61-65, 2009.

47. Kassahun J: Seroepidemiological study of brucellosis in humans and dairy cattle in Addis Ababa. *Master Thesis*, Addis Ababa University, Addis Ababa, 2003.

Sığır Atıklarından İzole Edilen *Brucella* Türlerinin RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi¹

Ahmet UNVER*

Hidayet M. ERDOĞAN**

Halil İ. ATABAY *

Mitat ŞAHİN*

Vehbi GÜNEŞ**

Mehmet ÇİTİL**

Halil İ. GÖKÇE**

¹ KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (VF 2003-5).

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

**Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/21-A

Özet

Brusellozis, Türkiye’de yaygın olan ve ekonomik olarak büyük önem arz eden zoonotik bir enfeksiyondur. Sığır brusellozisine neden olan ajanların genetik karakterizasyonu tam olarak ortaya konulmamıştır. Bu çalışma, *Brucella* türlerinin atık sığırlardan izolasyonu ve genotiplendirmesini amaçlamıştır. Altmışiki atık sığır fetusunun 37’sinden (59.7%) *Brucella* spp. izole ve tanımlanmıştır. Yirmiyedi suş rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği ile analiz edildi ve elde edilen amplifiye DNA polimorfizmi bunların aşı ve tip suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 polimorfizmi ile karşılaştırıldı. Oniki (44.4%) ve 15 (55.6%) suşun RAPD profilleri sırası ile bunların *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 profilleri ile aynı bulundu. Bu sonuçlara dayanarak, sığır brusellozisinin teşhis, kontrol, eradikasyon ve salgın idaresinde her iki *Brucella* türü de (*B. abortus* ve *B. melitensis*) dikkate alınmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Brucella*, sığır, abort, RAPD

Genotyping of *Brucella* spp. Isolated from Aborted Cattle Fetuses by RAPD-PCR

Summary

Brucellosis is an endemic and economically important zoonotic infection in Turkey. Genetic characterization of the agents responsible for brucellosis in cattle has not been documented. The purpose of this study is to isolate and genotype *Brucella* spp. from aborted cattle fetuses. *Brucella* spp. was isolated and identified from 37 out of 62 (59.7%) aborted cattle fetuses. Twenty seven isolates were analyzed by randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and the amplified DNA polymorphisms were compared with those of vaccine and prototype strains of *B. abortus* (S19) and *B. melitensis* (Rev1). The RAPD profiles of 12 (44.4%) and 15 (55.6%) isolates were found to be identical to those of *B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev1, respectively. These results suggest that both *Brucella* spp., *B. abortus* and *B. melitensis*, should be considered for implementing diagnosis, control, eradication and outbreak management of bovine brucellosis in this region.

Keywords: *Brucella*, cattle, abortion, RAPD

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2486800/1173

e-mail: ahmetunver@hotmail.com

GİRİŞ

Brusellozis evcil hayvanlarda görülen zoonotik karakterde bakteriyel bir hastalıktır. *Brucella* mikroorganizmaları hayvanların genital organlarına yerleşerek gebe hayvanlarda abortus, infertilite ve mastitis, erkek hayvanlarda ise orşitis, epididimitis ve steriliteye neden olmaktadır. Nadir olarak nekrotik karakterde yanğılara ve pneumonilere sebebiyet vermektedirler. Hastalık dünyada yaygın olup önemli sağlık ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır¹⁻³.

Hastalık hücre içi mikroorganizmalar olan *Brucella* ailesine ait *Brucella abortus* (sığır), *Brucella melitensis* (koyun-keçi), *Brucella ovis* (koyun), *Brucella canis* (köpek), *Brucella suis* (domuz), *Brucella neotoma* (rat) ve *Brucella maris* (deniz memelileri) etkenlerince oluşturulmaktadır¹⁻³. Ancak *Brucella* mikroorganizmaları anılan konakçı dışında da enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Özellikle *B. melitensis* ve *B. suis* son yıllarda sığırlarda enfeksiyonlara sıklıkla yol açtığı rapor edilmektedir^{2,4}, *B. abortus* ise koyun ve köpeklerden izole edilmektedir^{2,3,5}. Ülkemizde evcil hayvanlarda görülen brusellozis vakalarında *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. canis* etkenleri izole edilmiştir^{6,7}.

Ülkemiz de dahil dünyanın bir çok ülkesinde brusellozis'in evcil hayvanlar arasındaki yaygınlığı kesin rakamlarla bilinmemektedir. Ülkemizde çeşitli bölgelerde abortlar üzerine yapılan izolasyon çalışmalarında ruminantlarda brusellozis'e bağlı abortların %15-40 dolaylarında olduğu bildirilmesine⁸⁻¹² rağmen hasta kayıt ve bildirim sisteminin olmaması, her abort vakasının teşhis laboratuvarlarına gönderilmemesi veya gönderilememesi bu rakamın daha yüksek olmasını muhtemel kılmaktadır. Yine ülkemizde çeşitli serolojik yöntemler kullanılarak yapılan bölgesel çalışmalarda hastalığın seroprevalansı %1-70 arasında değişmektedir^{7,12-14}. Kars ili ve çevresinde yapılan izolasyon çalışmalarında sığır abortlarından *Brucella* izolasyon oranları %30-40 arasında değişmektedir^{9,11,12}. Kars bölgesinde yapılan seroprevalans çalışmalarında kullanılan testin çeşidine göre önemli farklılıklar olmasına rağmen hayvanların %30 ila %70'inde *Brucella* antikörleri tespit edilmiştir^{7,11,13}.

Brusellozis'in hem hayvan ve hem de insanlarda atipik klinik belirtileri olmasından ötürü kesin teşhisi klinik olarak oldukça zor olmasından dolayı teşhiste direk veya indirek laboratuvar metotlarıyla mümkün

olmaktadır. Etkenin direk izolasyonu ve identifikasyonu en etkili metot olmasına karşın bu işlemin günler ve hatta haftalar sürmesi ve biyolojik tehlike arz etmesi birer dezavantajdır^{3,15}. Bunun yanında hastalığın teşhisinde indirek serolojik teknikler de rutin olarak hastalığın epidemiyolojik taramalarında kullanılmasına^{6,7,11,13,16} rağmen bu testlerin bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar; test antijeni olarak kullanmak amacıyla zoonoz bir etkenin laboratuvarında sürekli tutulması ve kültürünün oluşturduğu biyolojik tehlike bütününe yüksekliği, hastalığın aktif durumunun tam olarak ortaya koyulamaması, enfeksiyon veya aşılama sonucu oluşan seropozitiliğin bir çok durumda birbirinden ayıramaması, yapılan saha çalışmalarında farklı seroprevalansların elde edilmesi, hastalığın varlığı hakkında kesin karar vermek için iki ayrı testin kullanılması ve en az iki defa tekrarlanması, testlerde *Brucella* genusu türlerinin bazı mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon vermesi, oluşan immunoglobulinlerin çeşitliliğinin (enfeksiyonun ilk döneminde IgM ve sonraki safhalarda veya ikinci enfeksiyonlarda IgG) testlerin tekrarlanmasını zorunlu kılması, yanlış pozitif sonuçlar ve gizli enfeksiyonun serolojik olarak tanınamaması sayılabilecek en önemlileridir^{1-4,15}. Bu dezavantajlar nedeniyle ciddi ekonomik kayba sebep olan ve ülkemizde ve dünyada en önemli zoonozlardan biri olan brusellozis'in epidemiyolojisi ve hastalığa yol açan etken yada etkenlerin karakterizasyonu günümüzde detaylı olarak ortaya konulamamıştır³. Son yıllarda başta Polymerase Chain Reaction (PCR) olmak üzere moleküler yöntemler ile yapılan teşhis ve genotiplendirme yöntemleri oldukça önem kazanmış ve bu tekniklerin başarı ile uygulanabilirlikleri birçok bakteriyel etken yönünden incelenmiştir¹⁵. Brusellozis'in teşhisinde farklı moleküler yöntemler başarı ile kullanılmıştır^{10,17-19}. Ülkemizde ise yapılan çalışmalarda atık fötusun abomasum içeriğinde *Brucella* türlerinin varlığı PCR ile ortaya konulmuştur^{10,19}. Hastalığın epidemiyolojisinin detaylı anlaşılabilmesi için izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli konvansiyonel ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Konvansiyonel metotlar (serotiplendirme, biyotiplendirme, faj tiplendirme vs) sonucu *B. abortus* (9 biovar) *B. melitensis* (3 biovar), *B. suis* (4 biovar) alt tiplere ayrılmıştır^{2,3}. Fakat konvansiyonel metotlar ile *Brucella* türlerinin alt türlere ayrıştırılması güç olduğu bildirilmiştir^{15,20}. Bu nedenle moleküler tekniklerin kullanıldığı daha gelişmiş tiplendirme metotları *Brucella* türleri arasındaki yüksek DNA homolojisine rağmen yaygınlaşmıştır¹⁵. Bu amaçla restriction fragment length polymorphism (RFLP)²¹, pulse field gel

electrophoresis (PFGE)²², amplified fragment length polymorphism (AFLP)²³, repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (REP-PCR)²⁴, enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction ERIC-PCR²⁵, HOOF Print²⁶, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)²⁰, teknikleri başarıyla kullanılmıştır. Fakat ülkemizde ve Kars bölgesinde brucellozis'e neden olan etkenler genetik olarak karakterize edilmemiş ve geniş kapsamlı bir saha çalışması da yapılmamıştır.

Bu çalışmada, ekonomik olarak oldukça önemli olan hayvan yetiştiriciliği sektöründe büyük ekonomik kayıplara neden olan ve ciddi bir halk sağlığı problemi olan sığır brucellozis'in PCR tekniği kullanılarak kesin ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi ve bu hastalığın moleküler epidemiolojisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yapılacak olan genotiplendirme sonucu virulent *Brucella* türlerinin tespiti ve aşılmalarda kullanılan suş ile uygunluğunun belirlenmesi de hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Atık buzağı örnekleri: Çalışmanın materyalini 2002 ile 2004 yılları arasında Kars merkez ve köylerinden toplanan ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilen toplam 62 adet atık sığır fetusu ile Kars bölgesinde sahadan ve kesimhanelerden toplanan 31 adet atık yapmamış sığırın fetal membranları oluşturdu. Fötlüslara ait iç organlar, fetal membranlar veya abomasum içeriği usulüne uygun olarak alınarak bakteriyolojik ve moleküler biyolojik yoklamalara tabi tutuldu.

***Brucella* izolasyonu:** Atık materyalden *Brucella* cinsine bağlı mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonu için selektif ve zenginleştirilmiş (at veya sığır serumu ile) besi yerlerinden yararlanıldı. Bu amaçla bacitracin/polymixin ilave edilen *Brucella* agara ekimler yapıldı. Ekim yapılan ortamlar aerobik ve mikroaerobik olarak 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremeler *Brucella* mikroorganizmaları yönünden değerlendirildi. Bu amaçla koloniler makroskopik görünimleri, gram boyama ve biyokimyasal testlere tabi tutuldu³.

***Brucella* izolatlarından DNA izolasyonu:** Bu amaçla bakteriyolojik ekim sonucu elde edilen izolatlardan 2-3 koloni 200 µl steril fizyolojik tuzlu su içerisinde bir mikro tüpte süspanse edildi. Bakteri süspan-siyonuna 50 ug Proteinase K (MBI Fermantes) ve 400

µl NETS lizis tampon solusyonu (NETS buffer; 0.01M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M Tris-HCl pH7.6 ve %0.05 Sodyum Dodesil Sülfat) eklendi. Karışım 65°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra eşit miktarda (600 µl) kloroform ve izoamilalkol (24:1 oranında) karışımı ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından sonra tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan süpernatant (akıcı bölüm) başka bir steril mikro tübe aktarılarak üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de 2 saat inkübe edildi. Presipite olan DNA mikro tüpün 13.000 rpm 5 dakika santrifüjünden sonra çöktürüldü. Pelet absolut alkol ve %70'lik etanol ile iki defa yıkandıktan sonra 15-20 dakika kuruması için beklendi. DNA peleti 100 µl steril distile deiyonize su ile sulandırılıp PCR de template (şablon) olarak kullanıldı.

Polymerase Chain Reaction (PCR) ile *Brucella* DNA amplifikasyonu: Her bir örnek için 0.2 ml'lik steril mikrotüp içinde 50µl lik reaksiyon karışım (5 µl 10 x PCR buffer, 250 µmol her bir dNTP, 2 ünite Taq polimeraz, her bir *Brucella* cins spesifik primerinden 50 pg ve 5 ml ekstrakte edilmiş DNA) hazırlandı. Kullanılan primerler ve baz dizilimi; Ba 148-167F: 5' TGCTAATACCGTATGTGCTT 3' ve Ba 928-948R: 5' TAACCGCGACCGGGATGTCAA 3' şeklindeydi¹⁸. Termal şartlar ise; 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 95°C'de 1 dk denatürasyon, 58°C'de 2 dk birleşme (annealing) ve 72°C'de 2 dakika sentez ve çoğalma (extention) ve 72°C'de 7 dk son ekstensiyon şeklinde uygulandı. PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforez ile ayrıldıktan sonra etidyum bromür boyama ile UV illuminatörde gözlemlendi. DNA fragman büyüklükleri eşzamanlı koşuturulan DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantes) ile kıyaslanarak tespit edildi. PCR'de pozitif kontrol olarak *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 aşı suşlarının yukarıda aktarılan DNA izolasyon yöntemi ile saflaştırılmış DNA'ları kullanıldı. Bu teknikte negatif kontrol olarak bütün PCR içeriğine sahip template (şablon) DNA yerine steril damıtık su içeren ve aynı termal ortamda tutulan karışım kullanıldı.

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-PCR Tekniği ile Genotiplendirme: Kültür sonucu elde edilen izolatların genotiplendirmesi ve bu izolatların aşı suşuyla karşılaştırılması Erdoğan²⁰ ve Tcherneva ve ark²⁷ tarafından bildirilen RAPD tekniği kullanılarak yapıldı. PCR tekniği ile temelde aynı olan RAPD-PCR metodunda etkene özgü olmayan rastgele seçilen primerler kullanıldı. RAPD-PCR amplifikasyo-

nunda her bir örnek için 0.2 ml'lik steril mikrotüp içinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı (5 µl 10 x PCR buffer, 250 µmol her bir dNTP, 2 ünite Taq polymeraz, 25 mM primer ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA) kullanıldı. RAPD-PCR'da kullanılan primerler ve dizimleri; PRİMER 6: 5' AACAGCACTCTGTTTCAGGC 3' ve UNİVERSAL: 5' TTATGTAAAACGACGGCCACT 3'shindeydi²⁰. Termal şartlar ise; 94°C'de 3 dk başlangıç denaturasyonu, 4 siklstan oluşan 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 26°C'de 2 dk birleşme ve 72°C'de 2 dakika ekstensiyon, 30 siklstan oluşan 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 36°C'de 2 dk birleşme ve 72°C'de 2 dakika sentez ve çoğalma ve 72°C'de 2 dakika ekstensiyon ve 72°C'de 7 dk son ekstensiyon şeklinde uygulandı. RCR ürünlerinin görüntülenmesi, DNA standardı ve kontroller PCR bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

BULGULAR

Toplam 62 adet atık sığır fetuslarına ait dokulardan *Brucella* spp. izolasyonu amacıyla yapılan ekimler sonunda 37 (%59.7) adet örnekten üreyen mikroorganizmalar kolonilerin makroskopik görünimleri, gram boyama ve biyokimyasal testler ile *Brucella* spp. olarak tanımlanmıştı. Bu 37 örnek içerisinde saklanabilen 32 adet izolat PCR ile test edildi. Toplam atık sığır fetustan izolasyonun yıllara göre oranları; 2002 yılında %66.7 (10/15), 2003 yılında %48.5 (14/19) ve 2004 yılında %72.2 (13/18) olarak belirlendi. Yılların toplam ortalaması ise %59.7 (37/62) olarak tespit edildi (Tablo 1). Muhafaza edilebilen 32 izolatın tamamı *Brucella* spp. olarak teyid edildi (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Atık sığır fetuslarının *Brucella* yönünden kültür ve PCR sonuçları.

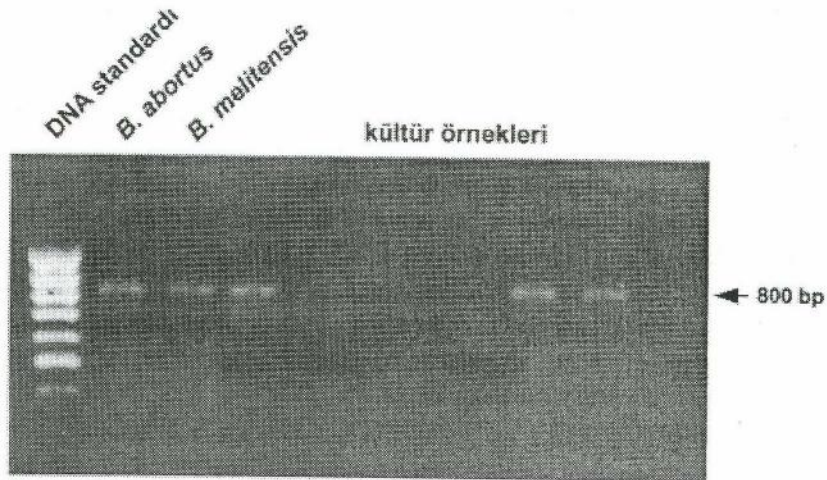
Table 1. *Brucella* culture and PCR results of aborted cattle fetuses.

Örneklerin toplandığı yıllar	İncelenen atık fötüs sayıları	<i>Brucella</i> pozitif olan örneklerin sayıları ve yüzde oranları	
		Kültürel yöntemlerle	PCR ile*
2002	15	10 (%66.7)	10 (%66.7)
2003	29	14 (%48.3)	12 (%41.3)
2004	18	13 (%72.2)	10 (%55.5)
Toplam	62	37 (%59.7)	32 (%51.6)

* PCR ile işlenen izolat sayısı.

Kontrol amacıyla toplanan 31 adet atık yapmamış sığır örneklerinden ise *Brucella* yönünden kültür ve PCR sonuçları negatif bulunmuştur.

İzole edilen ve PCR ile pozitif bulunan 27 adet *Brucella* suşun RAPD-PCR ile analizini takiben elde edilen DNA profilleri *Brucella* standart suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırıldı. İncelenen izolatların %44.4 (12/27) *B. abortus* S19 ve %55.6 (15/27) ise *B. melitensis* Rev1 suşlarının DNA profilini gösterdi (Tablo 2). *B. abortus* S19 suşunun DNA profilini gösteren izolatların yıllara göre dağılım oranları 2002'de %20 (2/10), 2003'te %71.4 (5/7) ve 2004'te ise %50 (5/10) olarak belirlendi (Tablo 2). *B. melitensis* Rev1 suşunun DNA profilini gösteren izolatların yıllara göre dağılım oranları ise 2002'de %80 (8/10), 2003'te %28.6 (2/7) ve 2004'te %50 (5/10) olarak belirlendi (Tablo 2).



Şekil 1. Atık fötüslerde izole edilen etkenler ile yapılan PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroferizini takiben elde edilen temsili bir resim.

Figure 1. Representative agarose gel picture of PCR products from *Brucella* isolates.

RAPD analizleri "Primer 6" (Şekil 2) ve "Universal" (Resim gösterilmedi) olmak üzere iki farklı primer ile gerçekleştirilmiş ve bu iki primere göre yapılan tiplendirme sonuçları birbirlerine paralel bulunmuştur.

Tablo 2. Atık sığır fetusularından izole edilen *Brucella* suşları ile yapılan RAPD sonuçları.

Table 2. RAPD results of *Brucella* strains isolated from aborted cattle fetuses.

Yıllar	İncelenen izolat sayıları	<i>B. abortus</i> S19 benzeri profil üretenlerin sayısı	<i>B. melitensis</i> Rev 1 benzeri profil üretenlerin sayısı
2002	10	2 (20)	8 (80)
2003	7	5 (71.4)	2 (28.6)
2004	10	5 (50)	5 (50)
Toplam	27	12 (44.4)	15 (55.6)

talar sürmesi ve etkenin biyolojik tehlike arzemesi dezavantaj oluşturur. Bu sebeple serolojik testler yaygınlıkla kullanılmakla beraber bu tekniklerin de giriş kısmında açıklanan dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda kullanılan moleküler teknikler (polymerase chain rection-PCR) başarıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da PCR *Brucella* etkenlerini ortaya koymada başarıyla kullanıldı. Nitekim izolatların hepsi PCR ile de *Brucella* oldukları teyid edildi. Bu da kültür ile PCR arasında daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi bir paralellik olduğunu göstermektedir^{17,19}.

Kars ve çevresinde daha önce yapılan çalışmalarda abortların çiftlik prevelansının %46-53 arasında yıllık insidansının ise etkilenen sürülerde %12.5-20 arasında bulunmuştur (Erdoğan ve ark. 2004) ve abortlardan



Şekil 2. *Brucella* izolatları ile "Primer 6" primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroferizini takiben elde edilen temsili bir resim.

Figure 2. Representative agarose gel picture of RAPD-PCR products using "Primer 6" primers from *Brucella* isolates.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde ve Kars bölgesinde büyük ekonomik kayba yol açan ve dünyada en önemli zoonozlardan bir olan Brucellozis'in epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir³. Hem hayvanlarda ve hem de insanlarda atipik klinik belirtiler ile seyretmesinden dolayı hastalığın laboratuvar teşhisi oldukça önemlidir. Etkenin direk izolasyonu ve identifikasyonu en güvenilir metot olmasına karşın bu işlemin günler ve hatta haf-

yapılan izolasyon çalışmalarında %30-40 arasında *Brucella abortus* izole edilmiştir⁹. Bu çalışmada yıllara göre farklılık olmasına rağmen ortalama izolasyon oranı %59.7 (%48.3-%72.2) olarak bulunması sığır atıklarında *Brucella* spp. dominant etiyolojik etken olmaya başladığını göstermektedir. Bunun en önemli nedenleri düşük aşılama oranı (yaklaşık %28)²⁸ veya aşının başarısız olması olabilir (saha ve aşı suşlarının farklı olması). Nitekim çalışmamızda izole edilen suşların çoğunluğu *B. melitensis* Rev 1 DNA profili gös-

termiştir.

Brucella spp. genotiplendirilmesinde çeşitli metotlar başarıyla kullanılmıştır. Bunlardan RAPD çalışmamızda da uygulandı. Teknik olarak kolay, çabuk ve ucuz bir metot olan RAPD herhangi bir DNA sekans bilgisi gerektirmemesi tekniğe pratiklik ve uygulamada kolaylık kazandırmaktadır. Herhangi bir dizileme sahip tek primer kullanıldığında aynı tür veya türler arasında başarıyla genetik ayırım yapabilmektedir²⁰. Çalışmamızda geleneksel olarak kullanılan 10 bazlık primerler yerine daha önce *Listeria monocytogenes* tiplendirilmesinde kullanılan 20 bazlık primerler kullanıldı²⁷. Bu modifikasyon, tekniğin özgünlüğünü ve tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır. Tekniğin tekrarlanabilirliği aynı çalışma prosedürünün sıkı takibiyle daha iyi sağlanabilmektedir²⁰. Bu çalışmada genotiplendirilen *Brucella* suşları iki farklı DNA profili ortaya çıkardı. Bunlar, %44.4 oranıyla *B. abortus* S19 ve %55.6 ile *B. melitensis* Rev1 olarak belirlendi. Bu bulgu daha önce ülke ve bölgemizde rapor edilmemiştir. Saha çalışmaları diğer ülkelerde *B. melitensis*'in sığırlarda abortlara yol açtığını göstermiştir^{2,4}. Elde edilen sonuç *B. melitensis*'in yaygın bir şekilde abortlara yol açtığını göstermektedir. İlginç olan bir diğer bulgu ise elde edilen genotiplerin yıllara göre değişen oranlarda yaygın olmasıdır. Bunun biyolojik açıklaması zor olmakla beraber bölgeden bölgeye veya sürüden sürüye değişen bir durumdan kaynaklanabilir. Ancak bu farklılığı açıklayabilmek için daha detaylı bir saha çalışmasının yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada atık fütüslerin %59.7'inde *Brucella* spp. izole edilmesi enfeksiyonun bölgede oldukça yaygın bir atık nedeni olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu etkenlerin PCR ile de bulunması ve sonuçların kültürel yöntemler ile paralelliği bu tekniğin hastalığın teşhisinde ve epidemiyolojik araştırmalarda başarı ile kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Yine son yıllarda kullanımı yaygınlaşan moleküler yöntemlerle genotiplendirme, infeksiyöz hastalıkların epidemiyolojisinde ve hastalık etkenlerinin sınıflandırılmasında oldukça önem kazanmıştır. Bu yöntemler, etkenin üretilmesine ihtiyaç duyulmaması, tekrar uygulanabilirliğinin yüksek olması, çabuk sonuçlandırılabilmesi gibi bir çok avantajlara sahiptir. Bu çalışmada uygulanan RAPD-PCR yöntemi, elde edilen suşların genetik olarak standart suşlara yakınlığını ortaya koymada başarıyla uygulanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, RAPD-PCR ile analiz edilen suşlardan 15'inin konvansiyonel olarak yaygın sığır brusellozis etkeni olarak bilinen *B. abortus*'dan ziyade *B. melitensis*'e genetik yakınlık

göstermesi, *B. melitensis*'in sığır brusellozis'in etiolojisinde oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. *B. abortus*'a göre daha fazla virulent olan ve dolaşısıyla daha fazla zoonotik potansiyele sahip olan *B. melitensis* beşeri hekimlikte de göz önünde tutulmalıdır. Gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte hastalıkla ilgili teşhis, kontrol ve eradikasyon programlarında ve salgın idaresinde her iki *Brucella* türü de (*B. abortus* ve *B. melitensis*) dikkate alınmalıdır. İleriki çalışmalarda, bölgede brusellozis'e neden olan etkenler antijenik olarak da karakterize edilmeli, günümüzde kullanılan aşı suşları ile saha suşlarının karşılaştırılması gerçekleştirilmeli ve yöreye özgün test ya da aşı antijenleri geliştirilmelisinine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1 Radostits OM, Blood DC, Gay CC: Veterinary Medicine. (8th ed.) pp.787-813. London, 1994.
- 2 Corbel MJ: Brucellosis: An overview. *Emerg Inf Diseases*, 3 (2): 213-221, 1997.
- 3 Arda M, Minbay A, Aydın N, Leloğlu N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker K S: Özel Mikrobiyoloji. Medisan, 1997.
- 4 Banai M: Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol*, 90, 497-519, 2002.
- 5 Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim C, Oluoch A, Kakoma I: *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Can J Vet Res*, 67, 312-313, 2003.
- 6 Yardımcı H: Koyunlarda *Brucella melitensis* enfeksiyonlarının Aglutinasyon, Rose Bengal ve ELISA testleriyle ortaya konması ve bu testlerin teşhisteki değeri üzerinde bir araştırma (Doktora Tezi) Ankara, 1989.
- 7 Güllüce M: Kars ve çevresindeki sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması (Doktora Tezi) Kars, 1993.
- 8 Eroğlu M: Türkiye'de brusellozisin insidensi. Uluslararası Brusellozis Sempozyumu. 18-20 Ekim 1988, İstanbul, Türkiye, sf 33-35, 1988.
- 9 Sağlam YS, Türkütanıt SS, Taştan R, Bozoğlu H, Otlı S: Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönünden incelenmesi. *Vet Bil Derg*, 14, 133-145, 1998.
- 10 Çetinkaya B, Öngör H, Muz A, Ertat HB, Kalender H, Erdoğan HM: Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet Rec*, 144 (9): 239-240, 1999.
- 11 Genç O, Otlı S, Şahin M, Aydın F, Gökçe Hİ: Seroprevalence of Brucellosis and Leptospirosis in Aborted Dairy Cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 359-366, 2005.
- 12 Şahin M, Atabay Hİ, Otlı S, Ünver A, Çelebi Ö: Kars ve çevresinde bulunan insan, sığır ve koyunlarda Brusellozis prevalansının serolojik ve kültürel metotlarla araştırılması. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 14-16 Eylül, Elazığ, 2004.
- 13 Şeyda T, Aydın F, Genç O, Güler MA, Baz E: Sığır serumunda Mikroaglutinasyon Testi (MAT) ile *Brucella* antikorlarının araştırılması. *KAÜ Vet Fak Derg*, 3 (1): 7-11, 1997.

- 14 İyisan AS, Akmaz Ö, Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Güler L, Gündüz K, Işık N, İçyerioğlu K, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu Ş, Tuna İ, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S: Türkiye' de sığır ve koyunlarda brucellosis' in seroepidemiyojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(1): 21-75, 2000.
- 15 Bricker BJ: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90(1-4): 435-446, 2002.
- 16 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):2166-2170, 1995.
- 17 Fekete A, Bantle JA, Halling SH: Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest*, 4 (1): 79-83, 1992.
- 18 Herman L, deRidder H: Identification of *Brucella* spp. by using the Polymersae Chain Reaction. *Appl Environ Microb*, 58 (6): 2099-2101, 1992.
- 19 Leyla G, Kadri G, Umran O: Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol*, 93: 53-61, 2003.
- 20 Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LM: Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol*, 88(1): 69-80, 2000.
- 21 Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O: Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, 141, 2111-2121, 1995.
- 22 Allardet-Servent A, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Michaux S, Ramuz M: Physical map of the *Brucella melitensis* 16 M chromosome. *J Bacteriol*, 173(7): 2219-2224, 1991.
- 23 Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, Macmillan AP: Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol*, 43(2):761-769, 2005.
- 24 Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M: Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J Clin Microbiol*, 34(5): 1299-1302, 1996.
- 25 Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman L: Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol*, 51(1-2): 169-178, 1996.
- 26 Bricker BJ, Ewalt DR: Evaluation of the HOOB-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol*, 5, 37, 2005.
- 27 Erdoğan HM: An Epidemiological Study of Listeriosis in Dairy Cattle in England. PhD Thesis University of Bristol, UK, 1998.
- 28 Erdoğan HM, Çitil M, Güneş V, Unver A: Dairy Cattle Farming in Kars District, Turkey: II. Health Status. *Türk J Vet Anim Sci*, 28, 745-752, 2004.

Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vajinal Sıvap Örneklerinden *Brucella* Etkenlerinin Bakteriyolojik ve Moleküler Tanımlanması ^[1]

Özgür ÇELEBİ *  Salih OTLU *

[1] Aynı adlı doktora tezinden özetlenen bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından 2008-VF-05 nolu proje olarak desteklenmiştir

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars -TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-2382

Özet

Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerde atık yaptığı bilinen sığır sürülerinde bulunan ve hastalığa karşı aşılanmamış 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) örnekten *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. Bu izolatların, *Brucella* cinsine (Omp *bp26*) ve eritritol (*ery*) genine spesifik primerle yapılan PCR incelemesinde hepsinin *Brucella* spp. ve saha suşları olduğu görüldü. İzole edilen tüm suşlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tiplendirildi. Ayrıca bu izolatların RAPD-PCR ile incelemesinde elde edilen DNA profillerinin, *B. abortus* S19 ile homoloji gösterdiği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Sığır, *Brucella*, Süt, Vajinal sıvap, İzolasyon, Biotiplendirme, PCR

Bacteriological and Molecular Description of *Brucella* Species Isolated from Milk and Vaginal Swab Samples of Aborted Cattle in Kars Region

Summary

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. These isolates were found to be *Brucella* spp. Are field isolates based on the PCR analysis using primers specific to *Brucella* genus (Omp *bp26*) and erythritol (*ery*). All of the isolated strains were typed as *B. abortus* biotype 3. RAPD-PCR analysis showed that DNA patterns of these isolates were found to be similar to that of *B. abortus* S19.

Keywords: Cattle, *Brucella*, Milk, Vaginal swab, Isolation, Biotyping, PCR

GİRİŞ

Brusellozis, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve özellikle uterus, meme ve testis gibi genital organlara yerleşerek yavru atma, infertilite ve süt veriminde azalmaya neden olan genellikle kronik seyirli, ekonomik öneme sahip bakteriyel bir zoonozdur ¹⁻⁶.

Brusellozisin teşhisinde temel olarak bakteriyolojik ve serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Teşhis için kültür altın standart olmasına karşın uzun zaman almakta, izolasyon ve identifikasyonda güçlükler yaşanmaktadır ⁷⁻¹⁰. Serolojik testler ise çok duyarlı ve spesifik olmalarına rağmen bir enfeksiyonun dolaylı belirleyicileridirler. Ay-



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426836/1171



ozgurcelebi36@hotmail.com

rica çapraz reaksiyonlar nedeniyle oluşan yanlış teşhis⁸ ve aşılama ile kazanılan bağışıklığın ortaya koyduğu yanlış değerlendirmeler olabilmektedir¹¹. Bu nedenle son yıllarda moleküler DNA teknolojisi kullanılarak genetik tanımlama yoluna gidilmektedir^{8,12}. Bu amaçla yüksek duyarlılığa sahip bir DNA teşhis aracı olarak geliştirilen ve Polymerase Chain Reaction (PCR) adlandırılan metot oldukça önem kazanmış ve uygulanabilirliği birçok bakteriyel etken yönünden incelenmiştir^{10,13}. Epidemiyolojik açıdan brucellozisin detaylı araştırılması için izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi gerekmektedir. Konvansiyonel yöntemler ile *Brucella* türlerinin tiplendirilmesinin güç olması nedeniyle moleküler tekniklerin uygulandığı gelişmiş tiplendirme metotları yaygınlaşmıştır^{10,14}.

Son yıllarda yörede brucellozise ilişkin olarak sığır ve koyunlarda kültürel ya da serolojik araştırmalar yapılmasına rağmen süt ve vajinal sıvı örneklerinden etken izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler yöntemle araştırılması hakkında mevcut bir çalışma bulunmamaktadır¹⁵⁻²¹. Bu çalışmada hayvan popülasyonunun yoğun olduğu Kars yöresi açısından son derece önemli, aynı zamanda zoonotik karakteri ile ciddi bir halk sağlığı problemi oluşturan sığır brucellozisinden etken izolasyonu ve identifikasyonu ile biyotiplendirilmesi, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) - PCR tekniği kullanılarak izole edilen suşların aşı suşları ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Süt ve vajinal sıvı örnekleri

Çalışmanın materyalini Şubat-Mayıs 2008 tarihleri arasında Kars merkez ve Selim ilçesine bağlı köylerden atık yapmış sürülerde bulunan ve brucellozise karşı aşısız oldukları bilinen 250 inekten alınan süt ve vajinal sıvı örneği olmak üzere toplam 500 örnek oluşturdu.

Kültür

Örneklerden *Brucella* cinsi etkenlerin izolasyonu için selektif (Farrell agar, Farrell broth ve *Brucella* selektif agar) ve zenginleştirilmiş (Serum dektroz agar ve Kanlı agar) besiyerlerinden yararlanıldı. Ekim yapılan besiyerleri 37°C'de aerobik ve mikraerobik olarak 3-5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda besiyerleri *Brucella* cinsi bakterilerin oluşturdukları koloni morfolojisi yönünden incelenerek, şüpheli kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Mikroskopik inceleme sonunda Gram negatif kokobasil olarak görülen etkenlerin katalaz ve oksidaz aktiviteleri belirlendi. İzolatların identifikasyonu ve biyotiplendirilmesi karbondioksit ihtiyacı, hidrojen sülfür ve üreaz üretimi, boyalara olan

duyarlılık, A ve M monospesifik antiserumlarla aglütinasyon ve Tbilisi fajı ile lize olma özelliklerine göre değerlendirildi. İzolatların saha suşu ve aşı suşu ayrımları penisilin ve i-eritritol içeren besiyerlerinde üreme özelliklerine göre yapıldı.

DNA Ekstraksiyonu

İzolatlar *Brucella* agara ekilerek 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir izolattan 2-3 koloni 200 µl steril fizyolojik tuzlu su ile süspanse edildi. Bakteri süspanسیونuna 3 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ve 400 µl NETS (0.01M NaCl, 1 mM EDTA, 0.01M Tris-HCl pH 7.6 ve %0.05 Sodyum dodesil sülfat) lizis tampon solüsyonu eklendi. Karışım hafifçe vorteksenerek 65°C'de 20 dak. inkübe edildi. Üzerine 600 µl kloroform/izoamil alkol (24:1) ilave edilerek karıştırıldı. Sonra eppendorflar 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Oluşan süpernatant yeni bir steril eppendorfa aktararak üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm absöüt alkol ilave edilerek vortekslendi ve gece boyunca -20°C'de bekletildi. Ertesi gün 13.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Böylece presipite olan DNA pelet haline geldi. Pelet %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra 20 dak. kuruması için beklenildi. DNA peleti 100 µl steril distile su ile sulandırılıp PCR'de template DNA olarak kullanıldı.

PCR

İzolatların cins düzeyinde belirlenmesi amacıyla dış membran proteinleri *bp26* geni ve aşı ile virulent saha suşu ayrımı için eritritol kullanımı temeline dayalı *ery* geni kullanıldı. Elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve aşı suşlarıyla karşılaştırılması amacıyla RAPD-PCR tekniğinden yararlanıldı. NCBI Accession number (AB126349) *bp26* geninin büyüklüğü 738 bp dir. *Brucella* aşı suşu olan *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. Her iki gen için hazırlanan PCR karışımı ve bileşenleri aynı oranlarda hazırlandı. Bu amaçla her bir örnek için 0.2 ml'lik steril eppendorflar içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı (5 µl 10xPCR buffer, 4 µl 25 mM MgCl₂ 250 mM her bir dNTP, 0.5 µl Taq polimeraz, her bir spesifik primerden 50 pg ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA) hazırlandı. *Bp26* bazlı PCR için uygulanan termal şartlar; 95°C'de 5 dak. başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 66°C'de 30 sn. birleşme (annealing), 72°C'de 1 dak. 30 sn. sentez

(extention) ve 72°C'de 15 dak. son ekstensiyon olarak uygulandı. Ery bazlı PCR için uygulanan termal şartlar; 95°C'de 10 dak. başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 94°C'de 30 sn. denatürasyon, 60°C'de 30 sn. birleşme (annealing), 72°C'de 1 dak. 30 sn. sentez (extention) ve 72°C'de 10 dak. son ekstensiyon olarak uygulandı. PCR ürünlerini görmek için %1.5'luk agaroz jel hazırlanarak 4 µl etidyum bromid ilave edildi. DNA fragman büyüklükleri eşzamanlı koşturulan DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantas) ile pozitif ve negatif kontrollerle birlikte kıyaslanarak UV illuminatörde tespit edildi.

RAPD-PCR Tekniği ile Genotiplendirme

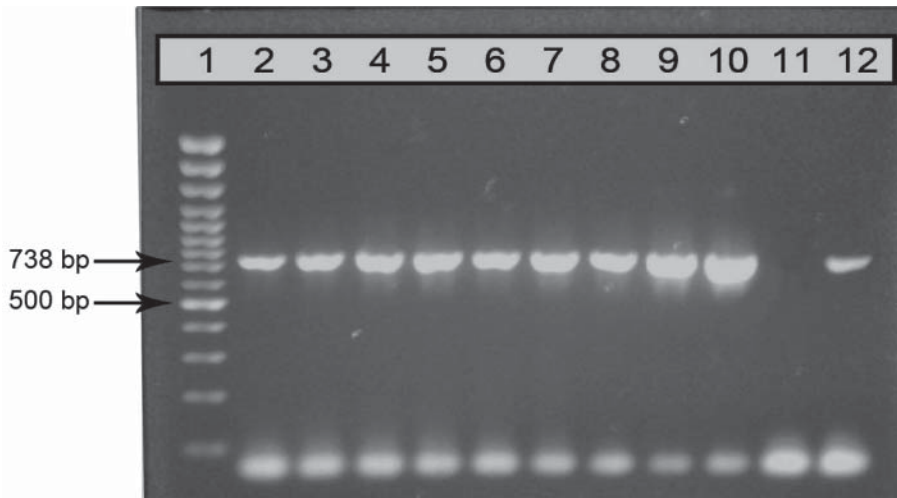
Çalışmada elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve bu izolatların aşı suşuyla karşılaştırılması Ünver¹⁸ ile Tcherneva ve ark.¹⁴ tarafından bildirilen RAPD tekniği kullanılarak yapıldı. RAPD-PCR'da kullanılan primer ve dizilimi; Primer 6:5'-AAC AGC ACT CTG TTC AGG C-3' şeklindedir. Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı (4 µl 10xPCR buffer, 250 mM her bir dNTP, 2 ünite Taq polimeraz, 25 mM primer ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA) hazırlandı. Termal şartlar; 94°C'de 3 dak. başlangıç denatürasyonu, 4 siklustan olu-

şan 94°C'de 45 sn. denatürasyon, 26°C'de 2 dak. birleşme ve 72°C'de 2 dak. ekstensiyon, 30 siklustan oluşan 94°C'de 45 sn. denatürasyon, 36°C'de 2 dak. birleşme ve 72°C'de 2 dak. ekstensiyon ve 72°C'de 7 dak. son ekstensiyon şeklinde uygulandı. PCR ürünlerinin görüntülenmesi, DNA standardı ve kontroller PCR bölümünde anlatıldığı gibi uygulandı.

BULGULAR

Kültürel değerlendirme sonucunda, 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. Yürütülen identifikasyon ve tiplendirme çalışmaları sonucunda tüm izolatların *B. abortus* biyotip 3 ve saha suşu olduğu ortaya konmuştur. Süt ve vajinal sıvı örneklerinden izole ve identifiye edilen 27 izolatın *bp26* geni bazlı PCR tekniği sonucunda 738 baz çiftlik bant oluşturdıkları gözlemlendi (Şekil 1).

İzolatların tümü *ery* geni bazlı PCR'da, 904 baz çiftlik bantlar oluşturmuş ve saha suşu olarak tespit edilmiştir (Şekil 2).

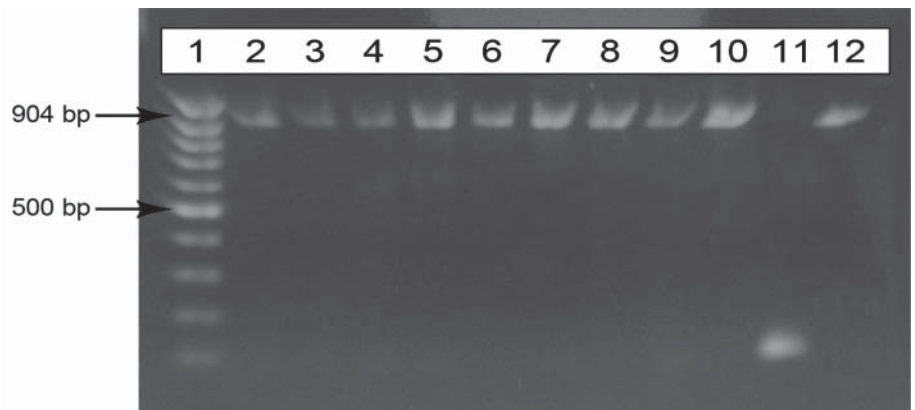


Şekil 1. İzolatlara uygulanan *bp26* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker, 2-10 nolu kolonlar; İzolatlar, 11 nolu kolon; negatif kontrol, 12 nolu kolon; pozitif kontrol

Fig 1. An agarose gel picture of amplified products from *Brucella* by *bp26* based PCR. Lane 1. DNA ladder (100 bp step marker, Fermentas MBI), Lane 2-10. *Brucella* isolates, Lane 11. Negative control, Lane 12. Positive control

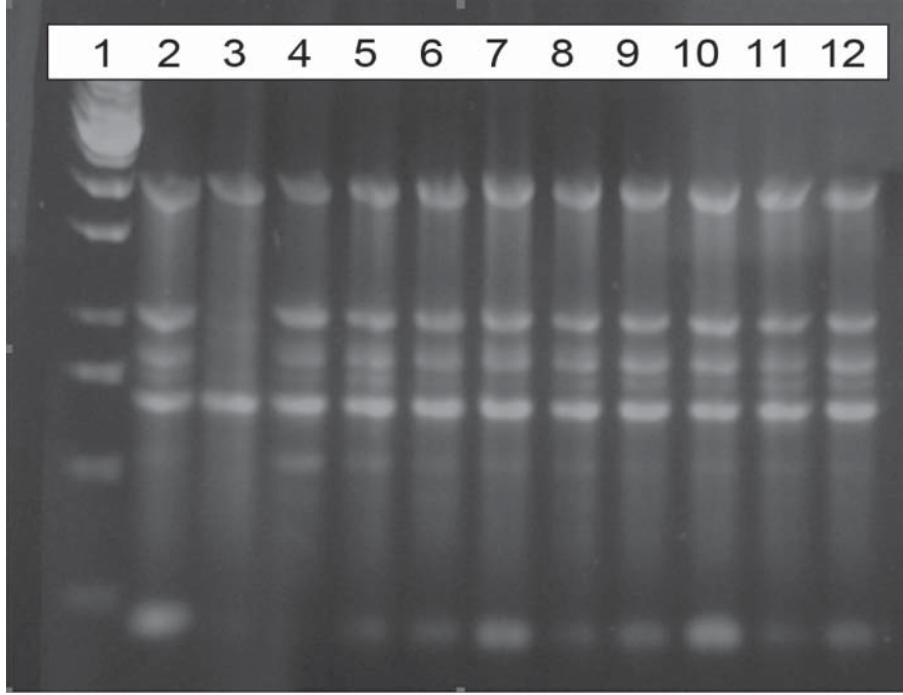
Şekil 2. İzolatlara uygulanan *ery* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker, 2-10 nolu kolonlar; İzolatlar, 11 nolu kolon; negatif kontrol, 12 nolu kolon; pozitif kontrol

Fig 2. An agarose gel picture of amplified products from *Brucella* by *ery* based PCR. Lane 1. DNA ladder (100 bp step marker, Fermentas MBI), Lane 2-10. *Brucella* isolates, Lane 11. Negative control, Lane 12. Positive control



Ayrıca izolatların, aşı suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırılmaları amacıyla RAPD-PCR ile incelenmesinde elde edilen DNA profillerinin, *B. abortus* S19 ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur (Şekil 3).

örneğin 111 (%21)'inden *B. abortus* izole ve tanımlanmış olduğunu, biyotiplendirme çalışmaları sonucunda 111 suşun 68 (%61.2)'inin *B. abortus* biyotip 1, 15 (%13.5)'inin *B. abortus* biyotip 2, 16 (%14.4)'ünün *B. abortus* biyotip 5 ve 6 (%5.4)'ünün ise *B. abortus* biyotip 9 olarak be-



Şekil 3. İzolatlara uygulanan RAPD-PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının % 1.5'lük agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 1 kp DNA step ladder plus marker, 2 nolu kolon; *B. abortus* S19 aşı suşu, 3 nolu kolon; *B. melitensis* Rev1 aşı suşu, 4-12 nolu kolonlar; İzolatlar

Fig 3. An agarose gel picture of RAPD-PCR products from *Brucella* isolates. Lane 1. DNA ladder (1 kp step plus marker, Fermentas MBI), Lane 2. *B. abortus* S19 vaccine strain Lane 3. *B. melitensis* Rev1 vaccine strain Lane 4-12. *Brucella* isolates

TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvanlarda gözlenen brusellozis üzerinde yürütülen araştırmalar hastalığın prevalansı, izole edilen tür ve biyotiplerinin ülkeden ülkeye, hatta bir ülkenin bölgeleri arasında farklılıklar görülebileceğini ortaya koymaktadır. Türkiye genelinde yapılan seroepidemiolojik bir araştırmada ²² brusellozisin prevalansı sığırlarda %1.43, koyunlarda %1.97 olarak tespit edilmiş ise de il bazında Kars'ın, sığırlarda %20.8, koyunlarda %15 prevalans ile yüksek oranlara sahip olduğu görülmektedir. Sığır brusellozisinin etiyolojisi üzerinde yapılan çalışmalar Mısır ²³, Nijerya ²⁴ ve Hindistan'da ^{25,26} daha çok *B. abortus* biyotip 1, İran'da biyotip 2 ile 3 ²³ ve Türkiye'de biyotip 3'ün ^{16,27-29} predominant suş olarak belirlendiğini ortaya koymaktadır. Langoni ve ark.³⁰ Brezilya'da lam, tüp ve merkaptetan 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 1 (%2.04)'ini *B. abortus* biyotip 1, 8 (%16.32)'ini *B. abortus* biyotip 2 ve 6 (%12.25)'ini ise *B. abortus* biyotip 3 olarak biyotiplendirildiğini belirtmişlerdir. Farrell ve Robertson ³¹ serolojik olarak MRT ile brusellozis yönünden pozitif bulunan 560 inek sütü

lirlendiğini 6'sının ise tiplendirilemediğini bildirmişlerdir. İlhan ve ark.³² 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 prepusyum 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 tümünün *B. abortus* biyotip 3 olarak belirlendiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar izole edilen tüm suşların aynı biyotip olmasını işletmede görülen bulaşmanın tek bir kaynaktan olmasına bağlamışlardır. Genç ve Kamber ¹⁵ 1998-2002 yılları arasında Kars'da topladıkları 84 atk sığır fütüsüne 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 belirlendiğini, örneklerin hiçbirinden 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.¹⁶ Kars yöresinde 2001-2006 yılları arasında sağlanan 149 atk sığır fütüsüne 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.¹⁸ 2002-2004 yılları arasında Kars'ta yaptıkları çalışmada 62 atk 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^{15,16,20,21} 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 svap örnekleri olmak üzere toplam 500 örnek *Brucella* etkenleri yönünden bakteriyolojik olarak araştırılmış, süt örneklerinin 11'i (%4.4) ve vajinal svap örneklerinin 16'sından (%6.4) olmak üzere toplam 27 (%5.4) örnekten *B. abortus* izole ve tanımlanmıştır. Bu sonuç yukarıda bildirilen araştırmaları^{30,31} destekler niteliktedir. 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 bir süre bulunacağı dikkate alındığında, elde edilen izolasyon oranlarının diğer bazı araştırmalara göre³⁰⁻³² düşük olduğu görülmektedir. Bu çalışmada süt ve vajinal svap 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^{15,16} 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^{27,29,33} hastalığın oluşmasında tür ve biyotip farklılığının öneminin göz önüne alınmasını işaret etmektedir.

Brucella etkenlerinin konvansiyonel tanımlanmasında karşılaşılan bazı güçlükler nedeniyle, son yıllarda insan ve hayvanlarda brusellozisin tanısına ve *Brucella* etkenlerinin cins, tür, biyotip düzeyinde belirlenmesi ve aşı suşları ile karşılaştırılmasına ilişkin moleküler teknikler yoğun olarak kullanılmaktadır^{8,10-12,34}. Ünver ve ark.¹⁸ 2002-2004 yılları arasında Kars merkez ve köylerinden

toplanan ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirilen toplam 62 adet atk fötüsüne 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 yapmışlar, 12 (%44.4)'sinin *B. abortus* S19 ve 15 (%55.6)'inin ise *B. melitensis* Rev1 aşı 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.

Bu çalışmada süt vajinal svap örneklerinden izole ve tanımlanmış 27 izolatın *bp26* geni bazlı PCR tekniği sonucunda 738 baz çiftlik bant oluşturdıkları gözlenerek tamamı *Brucella* spp. olarak teyit edilirken, izolatların aşı suşu ile ayırımı amacıyla yapılan *ery* geni bazlı PCR'da, tümü 904 baz çiftlik bantlar oluşturdıkları için hepsi saha suşu olarak tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların, aşı suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırılmaları amacıyla RAPD-PCR ile incelenmesinde elde edilen DNA profillerinin, *B. abortus* S19 ile benzerlik gösterdiği ortaya konmuştur. Çalışmada elde edilen izolatların hiç biri *B. melitensis* Rev1 aşı suşu ile aynı profili vermemiştir. Bu bulgu Ünver ve ark.¹⁸ tarafından bildirilen sonuçlarla farklılık göstermektedir. Bunun nedeninin, araştırmalarda kullanılan örneklerin farklı yer ve sürülerden alınmasına, ayrıca 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 durumunu akla getirmektedir.

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. 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 aşılanması 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.

KAYNAKLAR

1. **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.
2. **Aydın N:** Brucella infeksiyonları. In, Aydın N, Paracıklioğlu J (Eds): Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). pp. 145-163, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.
3. **Boschiroli ML, Foulongne V, O'Callaghan D:** Brucellosis: A worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, 4 (1): 58-64, 2001.
4. **Corbel MJ:** Brucellosis: An Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses Jerusalem, Israel. *Emerg Infect Dis*, 3 (2): 213-221, 1997.
5. **Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ:** A Review brucellosis - new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol*, 98 (6): 1270-1281, 2005.
6. **Lang R, Banai M, Lishner M, Rubinstein E:** Brucellosis. *Int J Antimicrob Agents*, 5, 203-208, 1995.
7. **Alton GG, Jones ML, Angus RD, Verger JM:** Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris, 1988.
8. **Bricker BJ:** Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 433-434, 2002.
9. **Roberts A, Kemp C:** Brucellosis (Mediterranean fever, Gibraltar fever, Malta fever, Cyprus fever, undulant fever, typhomalarial fever). *J Am Acad Nurse Pract*, 13 (3): 106-107, 2001.
10. **Bricker BJ:** PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 435-446, 2002.
11. **Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR:** Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69 (2): 216-227, 1990.
12. **Da Costa M, Guillou JP, 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): 267-275, 1996.
13. **Mullis KB, Faloona FA:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*, 155, 335-350, 1987.
14. **Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LMF:** Differentiation of *Brucella* species by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol*, 88 (1): 69-80, 2000.
15. **Genc O, Kamber U:** Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Ind Vet J*, 81, 1164-1165, 2004.
16. **Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S:** Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40, 281-286, 2008.
17. **Unver A, Erdogan HM, Atabay HI, Sahin M, Celebi O:** Isolation, identification, and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars, Turkey. *Revue Méd Vét*, 157 (1): 42-46, 2006.
18. **Unver A, Erdoğan HM, Atabay HI, Şahin M, Güneş V, Çitil M, Gökçe Hİ:** Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12 (2): 121-127, 2006.
19. **Celebi O, Atabay HI:** Seroepidemiological investigation of brucellosis in sheep abortions in Kars, Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 41 (1): 115-119, 2009.
20. **Genç O, Otlı S, Şahin M, Aydın F, Gökçe Hİ:** Seroprevalence of brucellosis and leptospirosis in aborted dairy cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 29 (2): 359-366, 2005.
21. **Otlı S, Sahin M, Atabay HI, Unver A:** Serological investigation of brucellosis in cattle, farmers and veterinarians in the Kars district of Turkey. *Acta Vet Brno*, 77, 117-121, 2008.
22. **İyisan AS, Akmaz Ö, Düzgün SG, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Güler L, Gündüz K, Işık N, İçyerioğlu AK, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu Ş, Tuna İ, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S:** Türkiye'de sığır ve koyunlarda brucellozisin seroepidemiolojisi. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*, 31 (1): 21-75, 2000.
23. **Refai M:** Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol*, 90, 81-110, 2002.
24. **Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JO:** Phenotypic characterization of *Brucella* strains isolated from livestock in Nigeria. *Vet Microbiol*, 103, 47-53, 2004.
25. **Chahota R, Sharma M, Katoch RC, Verma S, Singh MM, Kapoor V, Asrani RK:** 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.
26. **Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M:** Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol*, 90, 183-195, 2002.
27. **Buyukcangaz E, Sen A:** The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. *J Biol Environ Sci*, 1 (3): 139-142, 2007.
28. **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): 659-661, 2008.
29. **Sarısayın F, Eroğlu M, Nadas UG:** Yurdumuzda izole edilen *Brucella* suşlarının tür ve biyotiplerinin tayini ile dağılışı üzerine bir çalışma. *Pendik Vet Kont Araşt Derg*, 1, 24-35, 1969.
30. **Langoni H, Ichihara SM, Silva AV, Pardo RB, Tonin FB, Mendonça LJP, Machado JAD:** 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): 444-448, 2000.
31. **Farrell ID, Robertson L:** A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of *Brucellae* from milk. *J Appl Bact*, 35, 625-630, 1972.
32. **İlhan Z, Keskin O, Sareyyüpoğlu B, Kökcü L, Akan M:** Bir sığircılık işletmesinde *Brucella abortus* epidemisi. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 46, 257-262, 1999.
33. **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.
34. **Terzi G, Buyuktanır O, Genc O, Gucukoglu A, Yurdusev N:** Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-A): 47-52, 2010.