

Kars Yöresinde Atık Yapmış İnek Sürülerinden Alınan Süt ve Vajinal Sıvı 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 sıvı 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 sıvı örneğinin 16 (%6.4)'sından olmak üzere toplam 27 (%5.4) örnekte *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. Bu isolatların, *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 isolatların RAPD-PCR ile incelemesinde elde edilen DNA profillerinin, *B. abortus* S19 ile homoloji gösterdiği tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Sığır, *Brucella*, Süt, Vajinal sıvı, 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 sikludan 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

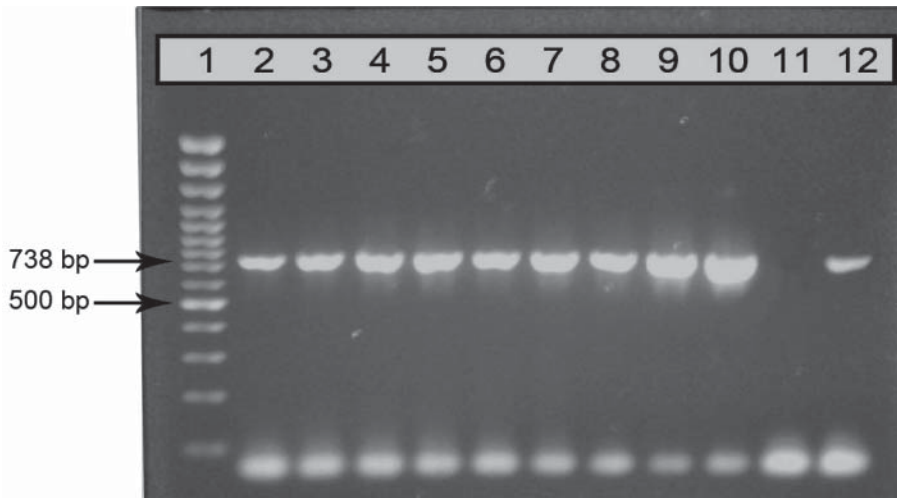
Çalışmada elde edilen izolatların genotiplendirilmesi ve bu izolatların aşı suşuyla karşılaştırılması Ünver¹⁸ ile Tcherneva ve ark.¹⁴ tarafından bildirilen RAPD tekniği kullanılarak yapıldı. RAPD-PCR'da kullanılan primer ve dizilimi; Primer 6:5'-AAC AGC ACT CTG TTC AGG C-3' şeklindedir. Her bir örnek 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 sikludan olu-

şan 94°C'de 45 sn. denatürasyon, 26°C'de 2 dak. birleşme ve 72°C'de 2 dak. ekstensiyon, 30 sikludan 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).

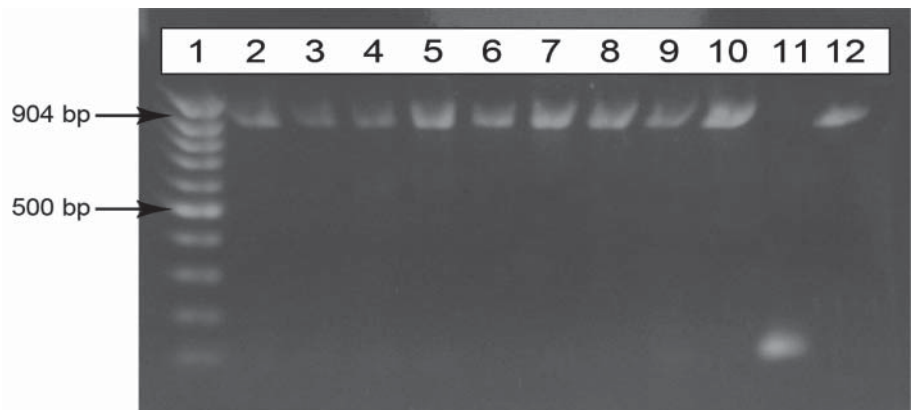


Şekil 1. İzolatlara uygulanan *bp26* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının % 1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker, 2-10 nolu kolonlar; İzolatlar, 11 nolu kolon; negatif kontrol, 12 nolu kolon; pozitif kontrol

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

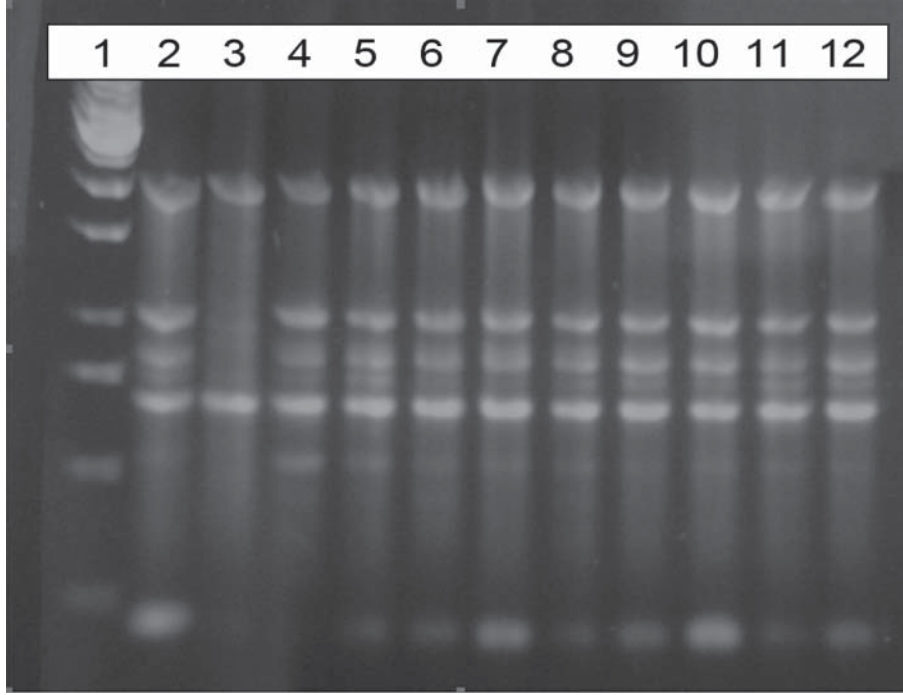
Şekil 2. İzolatlara uygulanan *ery* geni bazlı PCR yöntemi ile saptanan *Brucella* DNA'sının %1.5'luk agaroz jeldeki görüntüsü. 1 nolu kolon; 100 bp DNA step ladder plus marker, 2-10 nolu kolonlar; İzolatlar, 11 nolu kolon; negatif kontrol, 12 nolu kolon; pozitif kontrol

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 isolatların 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 izolata *bp26* geni bazlı PCR tekniği sonucunda 738 baz çiftlik bant oluşturdıkları gözlenerek tamamı *Brucella* spp. olarak teyit edilirken, isolatların 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 isolatların, 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 isolatların 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, Isreal. *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.