T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *BRUCELLA* İZOLATLARININ EPİDEMİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN MULTİ-LOCUS VARİABLE NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSİS VE PULSED FİELD GEL ELECTROPHORESİS YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ

Süleyman ASLAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Toğrul NAĞIYEV

ADANA - 2015

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *BRUCELLA* İZOLATLARININ EPİDEMİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN MULTİ-LOCUS VARİABLE NUMBER TANDEM REPEAT ANALYSİS VE PULSED FİELD GEL ELECTROPHORESİS YÖNTEMLERİ İLE TESPİTİ

Süleyman ASLAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Toğrul NAĞIYEV

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF2013D2 nolu proje ile desteklenmiştir.

ADANA - 2015

TEŞEKKÜR

Eğitim sürem boyunca bilimsel desteklerini esirgemeyen, her zaman hoşgörülü davranan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Fatih KÖKSAL ve akademik tecrübelerinden faydalandığım, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım danışman hocam Sayın Yrd.Doç.Dr. Toğrul NAĞIYEV başta olmak üzere Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Yrd.Doç.Dr. Tülin GÜVEN GÖKMEN'e;

Bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN'e, çalışmam boyunca destek veren Tülay KANDEMİR'e, Cansu ÖNLEN'e ve birlikte çalıştığım arkadaşlarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Klinik örneklerimizin toplanması ve değerlendirilmesinde her türlü desteği veren Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Mikrobiyoloji laboratuar Şefi Nevin TURUT ve Moleküler Laboratuvar Şefi Murat ÖZMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda, bana destek olan sevgili eşim Gülsen ASLAN'a en içten duygularımla sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Süleyman ASLAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Brusellozis Tanım	4
2.2. Tarihçe	4
2.3. Epidemiyoloji	5
2.4. Bakteriyolojik Özellikler	8
2.4.1. Brucella Türleri	8
2.4.1.1. *Brucella abortus*	8
2.4.1.2. *Brusella melitensis*	8
2.4.1.3. *Brucella suis*	8
2.4.1.4. *Brucella ovis*	8
2.4.1.5. *Brucella neotomae*	8
2.4.1.6. *Brucella canis*	9
2.4.2. Mikrobiyolojik Özellikleri	9
2.4.3. Antijenik Yapıları	12
2.4.4. Üremeleri için Gerekli Besiyerleri ve Özellikleri	13
2.4.5. Besiyerlerindeki İnkübasyon Süreleri ve Görünümleri	13
2.4.6. Koloni Morfoloji Özellikleri	14
2.4.7. Tür identifikasyonu	15
2.4.8. Biyotip Düzeyinde İdentifikasyonlar	15
2.4.8.1. CO_2 Gereksinimi ve H_2S Üretimi	16

2.4.8.2. Bazik Fuksin ve Tiyonin Boyalar ile İnhibisyona Duyarlılıklar 16
2.4.8.3. Antiserumlarla Aglutinasyonlar 16
2.5. Patogenez 17
2.6. Klinik Belirti ve Bulgular 18
2.6.1. Kas İskelet Sistemi Bulguları 18
2.6.2. Cilt Bulguları 19
2.6.3. Kan Bulguları 20
2.6.4. Hepatobiliyer Sistem Bulguları 20
2.6.5. Sindirim Sistemi Bulguları 20
2.6.6. Sinir Sistemi Bulguları 21
2.6.7. Kalp Damar Sistem Bulguları 21
2.7.7. Solunum Sistem Bulguları 21
2.7.8. Üreme ve Boşaltım Sistem Bulguları 22
2.6.9. Göz Lezyonları 22
2.6.10. Hayvanlarda Görülen Bulgular 22
2.7. Tanı ve Ayırıcı Tanı 23
2.8. Laboratuar Muayeneleri 24
2.8.1. Bakteriyoskopi 24
2.8.2. Kültür 24
2.8.3. Hayvan Deneyi 24
2.8.4. Serolojik Testler 25
2.8.4.1. Aglütinasyon Testleri 25
2.8.4.2. Sütle Yapılan Ring Testi (Halka Testi) 26
2.8.4.3. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT) 26
2.8.4.4. Coombs (Antiglobulin) Testi 26
2.8.4.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 27
2.8.4.6. Flöresan Antikor Tekniği (FAT) 27
2.8.5. Bakteriyofaj Testi 27
2.8.6. Alerjik Testler 28
2.8.7. Moleküler Teknikler 28
2.8.7.1. Restriction Fragment Lengrh Polimorphism(RFLP) 29

2.8.7.2. Multipleks PZR ve Real-Time PZR 29
2.8.7.3. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) 29
2.8.7.3.1. PFGE Kullanım Alanları 31
2.8.7.4. Variable Number Tandem Repeats (VNTR) 31
2.9. Tedavi 32
2.10. Korunma 33
2.10.1. Sürüye İnfeksiyonu Sokmamak 33
2.10.2. Reaktörleri Elimine Etmek 33
2.10.3. Hijyenik Tedbirler 33
2.10.4. Hayvanları Bağışık Kılmak 34
2.10.4.1. Aglutinojen Aşılar 34
2.10.4.2. Aglutinojen Olmayan Aşılar 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 36
3.1. Örneklerin Toplanması 36
3.1.1. İzolatlar 37
3.1.2. Kültür Ortamında Çoğaltma 37
3.1.2.1. Brusella Selektif Agar Besiyeri 37
3.1.2.1.1. Brucella Medium Base 37
3.1.2.1.2. Brucella Selective Supplement 38
3.1.2.1.3. At serumu 38
3.2. Genotipik İnceleme 38
3.2.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu 38
3.2.2. AMOS-ERY-PCR Yöntemiyle Brucella İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu 38
3.2.2.1. AMOS-ERY-PCR Yönteminin Uygulanması 39
3.2.3. Klonal İlişkinin Belirlenmesi 40
3.2.3.1. Klonal İlişkinin Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemi ile Belirlenmesi 40
3.2.3.1.1. PFGE'de Kullanılan Solüsyonlar 40
3.2.3.1.2. Örneklerin Hazırlanması 41
3.2.3.1.3. PFGE Yönteminin Uygulanması 42
3.2.3.1.4. PFGE Sonuçlarının Değerlendirilmesi 44

3.2.3.2. Klonal İlişkinin Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) Yöntemi ile Belirlenmesi 44
3.2.3.2.1. MLVA Yönteminin Uygulanması 45
3.2.3.2.2. MLVA Sonuçlarının Değerlendirilmesi 46
4. BULGULAR 48
5. TARTIŞMA 58
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 61
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PFGE yönteminin pratik adımları 30

Şekil 3.1. PFGE tankı ve soğutucu 44

Şekil 3.2. Gel logic 1500 imaging system 44

Şekil 4.1. PFGE bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı 50-51

Şekil 4.2. MLVA-16 bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı 52-53

Şekil 4.3. *B. melitensis Rev-1* izolatlarının; (A) diğer *B. melitensis* ve (B) *B. abortus* izolatları ile klonal ilişkilerinin MLVA dendrogramında gösterilmesi 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Brusella genusu türlerinin ve biyotiplerinin ayırıcı karakterleri 10
Çizelge 2.2. Brusella türlerinin farklı ortamlarda yaşam süreleri 11
Çizelge 3.1. AMOS-ERY-PCR primer dizileri 39
Çizelge 3.2. MLVA-16 yönteminde kullanılan primer dizileri 45
Çizelge 3.3. MLVA-16 yöntemi ile allel belirlenmesi için tekrarlanan ünite sayıları ve amplikon büyüklükleri 47
Çizelge 4.1. PFGE yöntemi ile *Brucella* izolatlarının allel durumları ve HGDI değerleri 48
Çizelge 4.2. MLVA-16 sonucunda 101 ***B. melitensis*** izolatının allel durumlarıve HGDI değerleri 55
Çizelge 4.3. MLVA-16 sonucunda 17 ***B. abortus*** izolatının allel durumları ve HGDI değerleri 55
Çizelge 4.4. MLVA-16 sonucunda toplam 118 ***Brucella*** izolatının allel durumları ve HGDI değerleri 56
Çizelge 4.5. MLVA ve PFGE yöntemlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda belirlenen 51 genotipin 118 ***Brucella*** izolatına dağılımı 57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

B. abortus : *Brucella abortus*

B. maris : *Brucella maris*

B.melitensis : *Brucella melitensis*

B.neotomae : *Brucella neotomae*

B. ovis : *Brucella ovis*

B. suis : *Brucella suis*

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

ELISA : Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay

FAO : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı

FAT : Flöresan Antikor Tekniği

H_2S : Hidrojen sulfür

I : İntermediyen

KFT : Kompleman fiksasyon testi

M : Mukoid

OIE : Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi

ONPG : o-Nitrophenyl-Beta-D-galactopyranoside

PCR-RFLP : PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism

PFGE : Pulsed- Field Jel Elektroforezi

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

RAPD-PCR : Random Amplified Polymorphic DNA-PCR

S : Smooth

SDA : Serum Dekstroz Agarın

SNP : Single Nucleotide Polymorphisms

SSR : Simple Sequence Repeat

ST : Spot test

STA : Serum tüp aglitinasyon

STR : Short Tandem Repeat

R : Rough

RBT : Rose Bengal Testi

RES : Retikülo-Endotelyal sistem

RFLP : Restriction Fragment Lengrh Polimorphism

RTD : Rutin Test Dilüsyonu

Tb : Tibilisi fajı

TMP-SMZ : Trimetoprim-Sulfametoksazol

TSA : Tripticase Soy Agar (

VNTR : Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Brucella* İzolatlarının Epidemiyolojik Özelliklerinin Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis ve Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemleri ile Tespiti

Bruselloz, insanlara bulaşabilen, ancak öncelikle çiftlik hayvanlarını hedef alan *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan infeksiyöz, genellikle subakut veya kronik seyirli zoonoz bir hastalıktır. Hayvanlarda sebep olduğu kayıplar dikkate alınırsa bruselloz evcil hayvanların en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilir. *Brucella* enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda akut vakalarda erken tanı ve doğru tedavi, risk gruplarının zamanında aşılanması, salgın suşlarının genotiplendirilerek salgının kaynağının tespiti ve bakterinin insan ve hayvan popülasyonlarındaki hareketinin izlenmesi, böylece bulaş yolunun belirlenmesi, bölgesel hakim genotiplerin ortaya çıkarılması, bu genotiplerin eradikasyonu için aşı ve tedavi seçeneklerinin araştırılması, kısaca genotipik sürveyans hayati önem taşır. Son yıllarda Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) yönteminin *Brucella* türleri arasındaki genotipik ilişkinin araştırılmasında da kullanılabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızın amacı Bölgemizde *Brucella* klinik izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin MLVA ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile tespit edilmesi ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğinin incelenmesidir.

Fenotipik olarak biyotiplendirilmiş olan 118 hayvan kaynaklı *Brucella* izolatı AMOS-ERY-PCR yöntemiyle tür düzeyinde identifiye edildikten sonra genotipik ilişkileri PFGE ve MLVA-16 yöntemleri ile araştırıldı.

AMOS-ERY-PCR ile izolatların 101'i *B. melitensis*, 17'si ise *B. abortus* olarak tespit edildi ve biyotipleme sonuçları ile uyumlu olduğu görüldü. PFGE yöntemi ile 21, MLVA yöntemi ile 28, ikisinin birlikte değerlendirilmesiyle de 51 genotip tespit edildi ve ayırt edici güçlerinin oldukça yüksek olduğu belirlendi (HGDI değerleri sırası ile: 0,899; 0,9071 ve 0,9631). MLVA yönteminde panel 2B'deki lokusların daha ayırt edici oldukları görüldü. *B. melitensis Rev-1* aşı suşu olarak izole edilen 26 suşun tamamının MLVA profilinin aynı olduğu, iki yöntemin birlikte değerlendirilmesiyle de, 13 *B. melitensis Rev*-1 izolatının toplandığı genotip 3'ün en baskın genotip olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, MLVA-16 ve PFGE yöntemlerinin bölgesel hakim olan genotiplerin belirlenmesinde çok ayırt edici olduğu gözlendi.

Anahtar Sözcükler: *Brucella*, genotipleme, MLVA, PFGE, aşı izolatı

ABSTRACT

Determining of Epidemiological Characteristics of Brucella Strains Isolated from Clinical Samples by Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis and Pulsed Field Gel Electrophoresis Methods

Brucellosis is an infectious, usually subacute or chronic zoonotic disease caused by bacteria of the *Brucella* genus that can infect humans but primarily infects livestock. Considering the losses in animals that it causes, brucellosis is considered to be one of the most important diseases of domestic animals. In control and eradication of Brucella infections, early diagnosis and correct treatment of acute cases, timely vaccination of risk groups, detection of the source of the outbreak by genotyping the pandemic strains and monitoring of the bacterial movement in human and animal populations, thus, determination of the transmission path, discovery of the regional predominant genotypes, also investigation of vaccination and treatment options for the eradication of these genotypes, briefly, genotypic surveillance is very important. In recent years, is shown that the Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) method can be successfully used for the the detection of the relationship between the genotypes of the Brucella species.

In our study, we aimed to determine the epidemiological features of the clinical *Brucella* isolates using the MLVA and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) methods and to investigate the applicability of these methods in our Region.

Following the identification to species level using the AMOS-ERY-PCR method of the phenotypically biotyped 118 *Brucella* isolates of animal origin, genotypic relationships were investigated using the PFGE and the MLVA methods.

By AMOS-ERY-PCR, 101 and 17 of the isolates were detected as *B. melitensis* and *B. abortus*, respectively, and these results were accordant with biotyping results. The 21, 28 and 51 genotypes were detected by PFGE, MLVA and by overall evaluation of both, respectively, and their discriminative power values were very high (HGDI were 0,899; 0,9071 and 0,9631, respectively). In MLVA method, loci of panel 2B were more discriminative. MLVA profiles of all of the 26 strains isolated as *B. melitensis Rev-1* vaccine strain were identical, and by overall evaluation of the results of MLVA and PFGE, genotip 3 consisting of 13 *B. melitensis Rev-1* isolates was the most predominant genotype.

In conclusion, it was observed that the MLVA-16 and the PFGE methods are very discriminative for determination of the regional predominant genotypes.

Keywords: *Brucella*, genotyping, MLVA, PFGE, vaccine strain

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Brusellozis, insan ve hayvanlarda *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan infeksiyöz, genellikle subakut ve kronik seyirli zoonoz bir hastalıktır (1,2,3). Brusellozis, sığır, koyun, keçi, domuz ve geyik gibi hayvanlarda genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye sebeb olmaktadır. Halk arasında yavru atma hastalığı olarak bilinen hastalığın bölgesel olarak da "akdeniz humması", "malta humması" ve "bang hastalığı" gibi birçok ismi bulunmaktadır (4). Altı türü bulunan *Brucella* grubu mikroorganizmalardan *Brucella melitensis, Brucella abortus* ve *Brucella suis* halk sağlığı yönünden büyük önem taşır.

Bruselloz, dünyada en fazla yayılım alanına sahip zoonoz olarak tarif edilmiştir. Yalnızca insanlarda ciddi zararlar vermesiyle değil, evcil hayvanları enfekte etmesi, süt veriminde düşmelere ve yavru atmalara sebep olmasından dolayı çok ciddi ekonomik kayıplara sebep olabilmektedir (5,6). Hayvanlarda neden olduğu yavru kaybı, süt veriminde azalma, damızlık değeri kaybı, kısırlık gibi zararlar dikkate alındığında bruselloz evcil hayvanların en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilir. Hastalığın çabuk yayılması, kontrol ve mücadelesinin uzun süre alması ve masraflı olması dikkati çekmektedir. Hayvansal protein kaynaklarına olan olumsuz etkisi, hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine engel teşkil etmesi ve çoğunluğu kırsal kesimde bulunan kısıtlı imkanlara sahip hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişmesini engellemesi gibi zararlarının olması bir başka faktördür.

Bazı gelişmiş ülkelerde bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmakla birlikte, ülkemizde hayvanlar arasında oldukça yaygın bir hastalıktır. Özellikle Ankara ovasında, Konya yöresinde, güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve Urfa yörelerinde hayvanlarda yaygındır (6,7). Ayrıca insan sağlığı açısından taşıdığı risk hastalığın önemini daha da artırmaktadır. İnsanlarda uzun süren bir hastalığa neden olan Bruselloz fizik yetersizliği ve iş gücü kaybına neden olurken, tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik kayba neden olmaktadır.

Brucelozis ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda ihbarı mecburi bir hastalıktır. Hayvanlarda brusellozisin prevalansını belirlemek amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 1998-1999 yılları arasında yapılan projede hastalığın prevalansı sığırlarda % 1,43, koyunlarda ise %1,97 olarak bildirilmiştir (8). Ülkemizde

çeşitli tarihlerde yapılan araştırmalarda bruselloza ait seropozitiflik %2-6 olarak belirtilmiştir (6,7). Ülkemizde her yaş ve cinsiyette görülmektedir. Hastalık görülme oranı 15-35 yaş grubunda daha fazladır. Yaz aylarında insanların kırsal kesime seyahat olanaklarının artması, süt ve süt ürünlerinden taze peynir ve krema tarzında yağları taze olarak elde etme imkanları, infeksiyonun yaz mevsiminde 4 kat fazla görülmesine neden olmaktadır (6).

Gıda tarım ve hayvancılık bakanlığının hayvanlardaki brusellozisle mücadele proğramına rağmen hastalık artmakta hem hayvan endüstrisini hem de insan sağlığını etkilemesiyle ülke ekonomisine ciddi zararlar vermektedir. Brusellozis hastalığıyla mücadele kapsamında hayvanların aşılanması çalışması son derece önemlidir. Genellikle enfeksiyon hastalıkları hayvanların düzenli aşılanmasıyla kontrol altına alınabilmektedir (9).

Genellikle infekte hayvanların genel durumları tanı için ipucu verse de, hastalığın tanısı ancak laboratuvar testleri ile konur. Tanıda atık yavru, yavru zarları, vaginal svablar, süt örnekleri, antikorların tespiti amacıyla kan serumu örnekleri değerlendirilir. Rose Bengal Plate Test, Süt Halka Testi, Tüp Aglutinasyon Testi, Komplement Fikzasyon Testi ve Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay (ELISA) en fazla kullanılan tanı yöntemleridir (1,3).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ise klinik örneklerde Brusella DNA'sını doğrudan tespit edebilecek duyarlı ve özgül bir yöntemdir. Klasik yöntemlerle kıyaslandığında çok kısa sürede yanıt alınması, ayrıca etkenin üretilmesinden kaynaklanabilecek laboratuvar içi bulaş gibi komplikasyonların olmaması nedenleriyle son zamanlarda başta ABD olmak üzere bazı merkezlerde ilk basamak yöntem olma özelliğini kazanmıştır. PZR ile yaklaşık 700 cfu/mL bakteri belirlenebilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü %98,3-100'dür.

Brusella enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda akut vakalarda erken tanı ve doğru tedavi, risk gruplarının zamanında aşılanması ve salgın suşlarının genotiplendirilerek salgının kaynağı, bakterinin insan ve hayvan popülasyonlarındaki hareketinin izlenmesi ve bulaş yolunun belirlenmesi, bölgelerde hakim genotiplerin ortaya çıkarılması, bu genotiplerin eradikasyonu için aşı ve tedavi seçeneklerinin araştırılması, kısaca genotipik sürveyans hayati önem taşır. Bu güne kadar fenotipik yöntemlerle yapılan tanı ve tiplendirmenin epidemiyolojik sürveyans için beklentileri

karşılamıyor olması sebebi ile geniş çaplı ve kullanılabilir sonuçlar üreten çalışmalar yapılamamıştır. ***Brucella*** suşlarını genom düzeyinde tiplendirmek adına birçok moleküler yöntem denenmiştir. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), multiplex PCR ve Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) bu yöntemler arasındadır. Son yıllarda *M. tüberculosis* gibi zor mikroorganizmaların klonal düzeyde tiplendirilmesinde başarı ile kullanılan, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) analizi yöntemi ile hastane enfeksiyonlarında salgın analizinde altın standart olarak kabul edilen Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) yönteminde ***Brucella*** türleri arasındaki genotipik ilişkinin araştırılmasında kullanılabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) ve PFGE yöntemleri ile Bölgemizde ***Brucella*** klinik izolatlarının klonal ilişkilerinin ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ***Brucella*** suşları kullanılmıştır. Bu çalışma Türkiye'de hayvan kökenli Brucella izolatlarının klonal ilişkilerinin MLVA ve PFGE yöntemleri ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Brusellozis Tanım

Brusella, insan ve hayvanlarda, Brucella genusu mikroorganizmaları tarafından oluşturulan enfeksiyöz, genellikle subakut ve kronik seyirli bulaşıcı ve nekrotik zoonoz bir hastalıktır (1,2,3). Brusella cinsi bakterilerle oluşan brusellozis temelde bir hayvan hastalığı olup koyun, keçi, sığır, manda ve domuz gibi hayvanların etleri, sütleri, idrar gibi vücut sıvıları, iyi pişirilmemiş, kontamine sütten hazırlanan süt ürünleri, infekte hayvanların düşük materyali aracılığı ile insanlara bulaşabilen, titreme ile yükselen ateş, terleme, kas ve büyük eklemlerde ağrılarla seyreden bir zoonozdur (6).

Brusella cinsi bakteriler, evcil hayvanlarda yavru ve süt miktarı bakımından önemli ekonomik kayıplara neden oldukları gibi, enfekte hayvanların süt ve süt ürünleri, etleri ve vücut sıvıları aracılığıyla insanlara bulaştıklarından dolayı halk sağlığı bakımından da önemli görülmektedir (2,3,10).

2.2. Tarihçe

Hastalık ilk olarak Hippocrates tarafından 'humma' olarak tanımlanmıştır (6). Bruselloz ilk defa 1861 yılında Kırım Savaşı sırasında İngiliz Ordusunda bir cerrah olan Marston tarafından Malta adasındaki İngiliz askerlerinde diğer ateş nedenlerinden "farklı bir ateş nedeni" olarak bildirilmiştir. Hastalık İngiliz ordusunda Dr Sör David Bruce tarafından "Malta humması" nedeni ile ölen hastaların dalak pulpasından izole edilmiş ve *Micrococcus melitensis* olarak adlandırlmıştır (5,6). Veteriner hekim olan Bang 1895 yılında düşük yapılmış sığır yavru atıkları olgularından izole ettiği bir tür organizmayı *Bacillus abortus* olarak adlandırmıştır (2,6,7). Zammit 1905 yılında Malta'da bruselloz rezervuarının keçiler olduğunu ortaya koymuş ve o dönemde askeri personelin, pastörize edilmemiş keçi sütünü tüketmesi engellenerek hastalık insidansında dramatik azalma sağlanmıştır (6).

Traum 1914 yılında ABD'nin Indiana eyaletinde prematüre doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden *Brucella suis*'i *(B. suis)* saptamıştır. Bunları, Avustralyalı ve Yeni zellanda'da epididimisli koçlardan *Brucella ovis (B. ovis),* ABD'nin Utah eyaletinde orman kenesinden *Brucella neotomae (B.neotomae)*, Rusya ve Alaska'da ren geyiğinden *Brucella rangiferi tarandi*'nin izole edilmesi takip etmiştir (2).

1994 yılında İngiliz araştırmacılar İskoç sahillerindeki deniz memelilerinin leşlerinden, bu araştırmadan bağımsız olarak Amerikan araştırmacılar ise Kaliforniya'da yakalanan bir yunusda daha önce bilinmeyen bir Brusella organizması izole etmişler, bu izolatların ayırıcı metabolik profilleri, boya sensitiviteleri ve faj sensitiviteleri birbirinin aynı bulunmuş ve ***Brucella maris (B. maris)*** olarak adlandırılmıştır (11).

Ülkemizde ilk defa 1915 yılında Kuleli Hastanesinde bir askerde Hüsamettin Kural ve Mahmut S. Akalın tarafından ***Brucella melitensis (B.melitensis)***, 1931 yılında Zühtü Berke sığırlardan; 1943 yılında Golem, 1944 yılında ise Köylüoğlu ve Aktan koyun ve keçilerden ***Brucella*** cinsi bakterileri bulmuşlardır (2). Hastalığa ülkemizde ilk olarak Malta Adasında saptandığından 'malta humması' veya "Akdeniz humması" olarak anıldığı gibi, klinik seyirdeki tipik ateş trasesine göre "dalgalı humma", ***B. melitensis***'in koyunlardan insanlara bulaşması nedeniyle "koyun hastalığı", hastalığın hayvanlardan insanlara bulaşması nedeniyle de halk arasında "mal hastalığı" gibi isimler de verilmiştir (6).

2.3. Epidemiyoloji

Brucella türleri fakültatif, hüçre içi paraziterlerdır ve doğal yaşam ortamlarını belirli hayvan türleri oluşturur (5). Hayvanlardan doğrudan ya da dolaylı olarak insanlara geçebilir. ***Brucella abortus (B. abortus)*** esas olark sığırlarda bulunur ancak deve, buffalo, bizon ve yak gibi hayvanlarda da bulunur. Hastalığa süt havyanı yetiştirilen hemen her ülkede sıkça rastlanmaktadır. Hastalık yavru atmaya, infertiliteye, genital organ infeksiyonlarına ve süt veriminin azalmasına neden olan bu hastalıkta fetüs, yavru zarları, uterus akıntıları, infekte süt ve sperma, bulaşık yem ve sular, atlarda cidago yaraları ve sığırlarda hygromalardan gelen akıntılar gibi maddeler hastalığa kaynaklık eder (12). Bruselloz hayvanlarda kronik bir enfeksiyona yol açar ve yaşam boyu sürebilir. Hayvan sürülerinde hastalık, hasta hayvanların bulaşık salgı ve çıktılarıyla direk ve indirek olarak diğerlerine bulaşmakta, ayrıca erkek hayvanların genitallerinde yerleşmiş bulunan bakteriler sperm ile dişi hayvana geçmektedir. Ergin ve gebe dişi hayvanlar bruselloza daha duyarlıdır. Enfeksiyon etkeninin gebe hayvanlarda uterusa, erkeklerde testise yerleşme eğilimi daha fazladır. Erkek hayvanlarda sterilite nedenidir. Gebe hayvanlarda kotiledonlarda yerleşen bakterinin

meydana getirdiği enfeksiyon, yavrunun yeterli beslenmesini engeller ve anne karnında ölmesine dolayısı ile anne hayvanın düşük yapmasına neden olur. Dişilerde ayrıca, meme dokusu ve supramamal lenf düğümleri de uterus yanı sıra enfekte olurlar. Meme dokusu enfeksiyonu durumlarında ise etken başlangıçta devamlı, daha sonraları da aralıklı olarak ve uzun bir süre sütle dışarı çıkar. Ayrıca enfekte keçilerde ***B. melitensis'***in vajinal yolla salgılanmasının 33 haftayı geçen bir süre devam ettiği gösterilmiştir. Genelde keçiler hayatları boyunca enfekte olmaya devam ederler. Her ne kadar anaç koyunlar ortalama 6 aylık bir süre içinde enfeksiyondan kurtulma gibi bir eğilim gösteriyorlarsa da, enfekte hayvanların% 20'sinin daha uzun bir süre bakteriyi taşıdığı bildirilmiştir (13).

Bruselloz bir sürüden diğer bir sürüye enfekte veya enfeksiyöz etkene maruz kalmış hayvanların sürüye sokulmaları, brusellozisten ari bir sürünün hastalıklı sürü ile aynı merada otlatılması, ayrıca köpek ve kediler, kuşlar, yabani hayvanlar atık yavru ve yavru zarlarını bir meradan diğerine taşıyarak dolaylı olarak bulaşmada rol oynarlar (14). Enfekte boğa veya koçların semenlerinde de etken bulunur ve çiftleşme ile bulaşma gerçekleşir. Ayrıca enfekte annelerden yavrularına anne karnında veya doğum sonrası enfekte ağız sütü yada enfekte diğer hayvanların sütleri ile beslenme sonucu bulaşma görülebilir (15). Hayvanlarla direkt temas halinde olan veteriner hekimler, çiftçi, hayvan yetiştiricisi, kasap, çoban, et sanayisinde çalışanlar ve laboratuvar çalışanları da risk grubunu oluşturmaktadır (16).

Bulaşma yolları;

- İnfekte hayvanlardan direkt temas yoluyla,
- Pastörize edilmemiş ve kontamine süt ve süt ürünlerinin oral yoldan alınmasıyla,
- Solunum yoluyla,
- Oküler veya oral mukozadan penetrasyonla
- *Brucella* aşılamaları sırasında cilt yoluyla direkt inokulasyonla.
- İnsandan insana bulaşma nadirdir.
- Su ile geçiş gösterilememiştir (17).

Testisleri iltihaplı olan infekte boğalar da hastalığın bulaşmasına neden olabilirler. Boğalar infeksiyonu mekanik olarak nakletmelerinin yanı sıra kendilerinin de infekte olması sonucu, infekte sperma aracılığı ile sağlam dişilere bulaştırabilirler (3). Doğal infeksiyon öncelikle ***B. melitensis***'den ileri gelir. Sporadik olaylarda ise infeksiyonun

etkeni *B.abortus*'dur. Son yıllarda, *Brucella* vektör ve rezervuarları üzerinde çeşitli ülkelerde yapılan araştırmalarda, değişik familyalara bağlı türlerin hastalığın yayılmasında rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Hastalığın naklinde sinek, sivrisinek tahtakurusu, kene, pire gibi artropodalarla yabani tavşan, sıçan, fare gibi kemiricilerin de rolü olduğu bildirilmiştir (4,18). Brusellozis ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda ihbarı mecburi bir hastalıktır. Brusellozis; Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyada en yaygın zoonotik hastalık olarak kabul edilmiştir (19). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; dünyada her yıl 500.000 yeni olgu saptanmakta olup, Orta Doğu, Asya'nın batısı, Akdeniz ülkeleri, Afrika ve Latin Amerika'nın bir bölümünde endemik seyir göstermektedir. Türkiye'de bu endemik bölgelerin içinde yer almaktadır. Norveç, Belçika, Hollanda, Finlandiya, Yeni Zelanda, Kanada, İngiltere ve Avustralya gibi bazı ülkelerde hastalık eradike edilmiştir (15,20). Brusellozis, sınır komşularımız olan Gürcistan, Suriye, İran, Irak ve Ermenistan'da yüksek insidansta görülmektedir. Bu ülkeler son yıllarda, dünyada insan brusellozun en önemli odağı olarak görülmektedir. Bu ülkelerde hastalık kontrol altına alınmaktan çok uzak görünmekte, sürekli artış göstermekte, ciddi bir halk sağlığı problemi olarak görünmektedir. Nüfuslarının çoğu hayvancılıkla uğraştığından dolayı, ülke ekonomilerinde de önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (21).

İnsan brusellozunun gerçek insidansı bilinmemektedir. İnsan brusellozunun belirlenmesi aşağıda sıralanan nedenlerden dolayı dünyanın birçok bölgesinde çok zordur:

— Dünyanın birçok bölgesine ait çok önemli anlamlı istatistiksel ve demografik bilgi yoktur.

— Birçok ülkede hastalık bildirme sistemi yoktur.

— Birçok ülkede bruselloz bildirilmesi zorunlu hastalık grubunda değildir.

— Hastalığın kontrol altına alındığı ülkelerde ve diğer ülkelerde bruselloz gözden kaçırılabilir, bu nedenle gerçek hasta sayısı bilinmemektedir (13).

2.4. Bakteriyolojik Özellikler

2.4.1. *Brucella* Türleri

Brucella, *Ochrobactrum* ve *Mycoplana Brucellaceae* ailesine aittir. *Mycoplana* türleri; insan hastalıklarıyla ilgisi olmayan toprak organizmalarıdır. *Ochrobactrum anthropi* de bir toprak organizmasıdır ve fırsatçı insan patojenlerindendir. *Brucellaceae*, *Protobacteria* filumunun *Alphaproteo bacteria* sınıfının *Rhizobiales* bölümünün üyesidir. *Rhizobiales'*in diğer üyeleri arasında insanlarda hastalık yapan *Bartonella*'da bulunur (5).

Hastalık yapan Brusella türleri aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır (3,6,11,12,22).

2.4.1.1. *Brucella abortus*

Sığırların enzootik yavru atma hastalığının etkenidir. Koyun, keçi ve insanlara da bulaşır. Serolojik ve biyoşimik birbirinden farklı 9 biyotipi bulunur.

2.4.1.2. *Brucella melitensis*

Koyun ve keçilerde hastalık oluşturur. Monospesifik serumlarla ortaya konabilen 3 biyotipi bulunmaktadır. Etken sığırlarda aktif bir hastalığa neden olduğu gibi insanlar için çok önemli bir zoonozun da nedenidir.

2.4.1.3. *Brucella suis*

Etkenin 4 biyotipi bulunmaktadır. İlk üç tip domuzlarda brusellozis'in başlıca etkenidir. Biyotip-2 epizootolojik çalışmalar sonucu Avrupa tavşanlarında, biyotip-3 ise ren geyiklerinde oldukça patojendir. Koyun ve keçilerde de hastalık oluşturabilir.

2.4.1.4. *Brucella ovis*

Koçlarda epididimitis hastalığını oluşturur. İnsanlarda bu etkenden ileri gelen bir hastalık görülmemiştir.

2.4.1.5. *Brucella neotomae*

A.B.D.'de ağaç ratlarından izole edilmiş olup, insan ve evcil hayvanlarda hiç bir hastalığa neden olmadığı bildirilmiştir.

2.4.1.6. *Brucella canis*

Köpeklerde brusellozis etkenidir.

Deniz memelilerindeki Brusella suşlarını tanımlamaya yönelik 1990'ların ortalarından itibaren birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların birisinde, bu izolatlar için *"B. Maris"* önerilmiştir. Diğerlerinde ise suşların konak özgürlüklerine göre "*B. delphini*", "*B. pinnipedia*e" ve "*B. cetaceae"* isimleri önerilmiştir. Ancak bu isimlerden hiç birisi geçerlilik kazanmamıştır (5).

2.4.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Brucella türleri 0.5-0.7 µm eninde, 0.06-1.5 µm boyunda kok,kokobasil veya kısa çomaklar şeklinde gram negatif bakterilerdir.Kapsülsüz ve haraketsizdir.Tek olarak yada daha az sıklıkla ikili olarak görülürler (2,7,22). Küçük olduklarından moleküler hareket nedeniyle, yerlerinde titreşirler (braunien hareket) (2). Bazı kökenler (*B.abortus ile B.suis*'in bir çok biovarları) üreye bilmek için özellikle primer izolasyonlarında CO_2 'e gereksinim duyarlar (2,7,22). Etkenler 20–40°C arasında ürerlerse de, ortalama 37°C ve PH 6.6-7.4 optimum üreme koşullarını oluşturur. Etkenlerin izolasyonları ve üretilmeleri için genelde katı besiyerleri kullanılır (22,23). S koloni yapan türlerde R koloni yapan varyantlar olabildiği gibi, doğada sadece R koloni yapan türlerde (*B. canis ve B. ovis*) vardır (7). Hücre içi şartlara uyum sağlamıştır. Besin ihtiyaçları kompleksdir. Bazı suşlar aminoasit, vitamin, tuz ve glukoz içeren besiyerlerinde üretilebilirler. İnsan veya hayvan kaynaklı taze örnekler Tripticase Soy Agar (TSA) veya Kan kültür besiyerlerinde üretilirler (24). Besi yerlerine glukoz, ascites karaciğer ekstresi, kan, serum veya protein katılması üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Brucella etkenlerinin kültürleri için, genellikle katı besi yerleri kullanılır. Çünkü katı besi yerleri koloni oluşmasını sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlarlar. Bazı suşlar (*B. abortus* biyotip-II) zorunlu serum gerektirirler. Hemolitik değildirler. Üremeleri ancak 2 günden sonra fark edilir ve maksimal gelişme 5-7 günde tamamlanır. 2-3 günlük koloniler, yuvarlak, konveks, kenarları düzgün ve 0.5 mm çapındadırlar. Yansıyan ışıkta hafif mavimsi-yeşil bir refle verirler (S formu). 6-7 günlük bir süre sonunda koloniler matlaşır ve dissosiye olmaya başlarlar. R koloni formundakiler yassı, daha büyük çapta, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Sıvı besiyerinde yavaş ürerler. Homojen bir bulanıklık ve dipte de yumurta akı benzeri tortu yaparlar (18).

Brusella karbonhidratları kullanır fakat sınıflandırmada kullanılacak miktarda asit ve gaz oluşturmaz. İnsanları enfekte eden dört tür de katalaz ve oksidaz yaparlar. Birçok suş H_2S oluşturur. Nitratları nitrite indirgerler. Brucella ısıtmaya ve asitlere orta derecede hassastır (24). Brusella grubu mikroorganizmalar, genellikle indol, jelatin, metil red ve VP reaksiyonları yönünden negatif bir durum göstermelerine karşılık nitrat ve katalaz pozitiftir. Şekerli besiyerlerinde gözle görülebilecek bir asit oluşumu sağlayamazlar. Suşların çoğunluğu oksidaz pozitif olup, üreaz testi hepsinde pozitiftir. Sitratlı besi yerlerinde üreme göstermezler (18).

Çizelge 2.1. Brusella genusu türlerinin ve biyotiplerinin ayırıcı karakterleri (3)

Biyotip	CO2 ihtiyacı	H2S	Boyalı Vasatta büyüme			Aglutinasyon			Tb,RTD(xx) faj duyarlılık	Oksidatif Olarak Metabolize Edilen Substratlar										
			B.fücsün	Thionin		Mono spesifik serum		R. koloni anti-serum		L.alanin	L.aspar	L.gul.asit	L.arab	L.D.galak	D.riboz	D.glukoz	L.eritrit	D-ksiloz	L.alginimn	L Lizin
				a	b	A	M													
B.melitensis																				
1	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
3		-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
B.abortus																				
1	d	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
2	d	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3	d	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
4	d	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
7	-	d	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
8	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
9	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B.suis																				
1	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
B.neotomea	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	d	+	+	+	-	-
B.ovis	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B.canis	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d	-	+	+

+ Garantili Boyalar(National Aniline Division,Allied Chemical and Dye Co., New York) a:1/25000 b:1/50000

xx RDT: Rutin Test Dilusyonu

xxx DL: citrulline ve DL-ornithine ile aynı reaksiyonları verir.

Brusella cinsi bakteriler, bir çok aminoasiti içeren kompleks besiyerlerine ihtiyaç gösterirler. Tiamin, nikotinamid, biyotin ihtiyaçları üremeleri için esastır. Kan ve serum üremeleri olumlu etki yapar. ***Brucella spp***. için temel enerji üretim kaynağı oksidatif metabolizmadır (23).

B. abortus'un bazı tipleri ve ***B. ovis*** üremeleri için %10 CO2' ye ihtiyaç gösterirler. Koloniler küçük, kabarık, S tarzında (***B. ovis*** ve ***B. canis*** hariç) ve saydam renkli olup, şebnem tanesi görünümdedirler (22,25). Tüm ***Brucella spp***. katalaz pozitiftirler, eritrositleri lize etmezler, indol ve asetil metil karbinol (Voges-Proskauer) oluşturmazlar, metil red ve o-Nitrophenyl-Beta-D-galactopyranoside (ONPG) negatifdirler, sitratlı besiyerlerinde üremezler. ***B. neotomae*** dışında, besiyerlerinde karbonhidratlardan asit oluşturmazlar. ***B. ovis, B. neotomae*** ve ***B. abortus***'un bazı suşları hariç tüm ***Brucella*** türleri oksidaz pozitifdir. H2S ve üreaz aktiviteleri değişkendir. ***B. ovis*** hariç diğer türler nitratları indirgerler (22,23).

Çizelge 2.2. Brusella türlerinin farklı ortamlarda yaşam süreleri (17)

Ortam	**Yaşam Süresi**
Toprakta	10 hafta
Ahır tozlarında	6 hafta
Güneş ışıksız nemli toprakta	2 ay
Suda	10 hafta
Kontamine çiğ sütte 1–8ºC	180 gün
Düşük yapmış hayvan fetusunda	75 gün
60ºC	10 dakika
% 0,1 fenolde	15 dakika
Mide asidi	Öldürür
Isı, iyonize radyasyon, dezenfektanlara	Hassas
Pastörizasyon	10-15 dakika

Brusella cinsi mikroorganizmalarda, bugüne kadar bir plazmidin varlığı saptanmamıştır. Bakteride pilus bulunmamaktadır ve dolayısıyla konjugasyonda bildirilmemiştir. ***Brucella spp***. Faj infeksiyonunu takiben bazı antibiyotiklere direnç geliştirdiklerinden transdüksiyon yaptıkları kabul edilmektedir. Doğal koşullar altında,

nadir de görülse, etkenlerin transformasyona uğradıkları bildirilmiştir (26). Brusellalar 60ºC de 10 dakikada ,%1 fenol eriğinde 15 dakikada ölürler.Süt içinde 17 gün, tereyağında 142 gün, %10 tuz içeren salamura peynirinde 45 gün düşük yapmış hayvan fetusunda 75 gün yaşar (25,27). Hayvanların barındığı ahır tozlarında 6 hafta, suda 10 hafta canlılığını sürdürebilirler (25). Isıya, iyonize radyasyona duyarlıdır (28). Karanlık yerlerde, doku, süt, gübre ve uterus akıntılarında uzun süre canlı kalabilirler. Dezenfektan ve antibiyotiklere değişik derecede duyarlıdırlar. Etkenler %0,1 sublimede birkaç dakikada, %2 formalin ve %1 lizol içinde 15 dakikada ölürler. Brucella türlerinin çoğu gentamisin, tetrasiklin ve rifampisine duyarlıdır. Birçok brusella suşu polimiksin, sefalosporin, basitrasin, linkomisin ve nistatine dirençlidir (3,23,29).

2.4.3. Antijenik Yapıları

B. melitensis, B. abortus ve *B. suis*, A (abortus) ve M (melitensis) olarak isimlendirilen ısıya dayanıklı, aglütinasyon reaksiyonlarından sorumlu, yüzey antijenlerine sahiptir (2). Bu ortak antijenik faktörler değişik Brusella suşları arasında değişiklik gösterir. Brusella mikroorganizmalarında yüzeysel olarak yerleşen iki antijenin (A ve M) oranları birbirinden farklıdır. Bu oran *B. abortus ve B. suis'*te A/M:20/1 olmasına karşılık, *B. Melitensis'*te A/M:1/20'dır. M antijeni *B. melitensis'*te fazla orandadır. A antijeni ise *B. abortus* ve *B. Suis'de B. melitensis*'teki M antijeni oranında olmasına karşılık her iki tipte de M antijeni düşük süzeyde olup, *B. suis*'de biraz fazladır. Esasen *B. suis* antijenik yapı olarak *B. abortus*'a benzer. *B. suis, B. melitensis*'ten monospesifik (absorbe olmuş) A ve M antiserumları kullanılarak yapılan aglutinasyon ile ayırt edilebilir. *B. suis*'in *B. abortus*'tan serolojik olarak ayırt edilmesi mümkün değildir (2,3,22).

Brusellaların *Salmonella*'ların Vi antijenlerine benzeyen, L antijenleri de gösterilmiştir. daha çok b.abortus tiplerinde bulunmuş olan L antijeni, yeni izole edilen bakterilerde var olup, onların immun serumlarla aglutinasyonuna engel olmaktadır. Bu olay, serumlar 100ºC 'de yarım saat sonra ortadan kalkmaktadır. Brusella cinsi bakteri antijenlerinin *Francisella tularensis* ve *Vibrio cholera* gibi bakteriler ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır (2).

2.4.4. Üremeleri için Gerekli Besiyerleri ve Özellikleri

Genellikle yavaş ve güç üreyen brusellaların besi yerlerinde üremeleri zordur. Özellikle ilk izolasyonlarında besiyerlerine glukoz, asit sıvısı ve serum katılması üreme üzerine olumlu etki yapar (1,25). *B. abortus* biyotip 2 ve *B.ovis*, üremeleri için besiyerine %5-10 oranında katılmış seruma ihtiyaç gösterirler (26). *Brucella spp.*'in yeterli bir reasyon sağlanmadıkça sıvı besiyeriyerlerinde üremeleri zayıftır. Statik inkubasyondan 7 gün sonra " smooth" suşlar dipte hafif bir tortu bırakarak homojen bir bulanıklık yaparlar. "Non-smooth" suşlar dipte granuler bir tortu ve üstte pelikül oluştururlar. *Brucella spp.*'in statik inkubasyonda sıvı besiyerinde üretilmesi, "smooth" formdan "non-smooth" forma geçişe yani dissosiasyona neden olur (30).

Brucella spp.'in izolasyonunda bugüne kadar birçok besiyeri geliştirilmiştir. Organizmalaın üretilmesinde en çok kullanılan temel besiyerleri serum-dextrose agar, serum–tryptose agar ve serum-tyrticase agardır. Bunların her biri ayrıca kullanılan selektif besiyerlerine temel teşkil ederler. Brusellaların kontamine materyallerden izolasyonunda diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe etmek amacıyla temel besiyerlerine çeşitli antibiyotiklerin ve boyaların katılması ile birçok selektif besiyerleri geliştirilmiştir (23). Morgan; temel besiyerine % 0.5 oranında katılan Tween-40'ın, *B. abortus* biyotip 2'nin üretiminde serumun yerini alacağını bildirmiş ve basitrasin, polimiksin ve aktidion eklenen Serum Dekstroz Agarın (SDA) bütün Brusella türlerinin üremesini teşvik eden en ideal besiyeri olduğunu bildirmiştir (31).

2.4.5. Besiyerlerindeki İnkübasyon Süreleri ve Görünümleri

Brusella kolonileri uygun katı besiyerlerine ekilmelerinden itibaren yaklaşık 3 günlük bir inkubasyondan sonra gözle görünür hale gelirler. Selektif besiyerlerine ekim üremeyi bir süre geciktirebilir. Koloni oluşumu 4. günde gözlenmez ise kültürlerin negatif olarak değerlendirilmesinden önce 8-10 günlük bir inkubasyona bırakılması önerilmektedir. Koloniler 3-4 günlük inkubasyon sonrasında indirekt güneş ışığında incelendiklerinde 1-2 mm çapında, sarı bal renginde, şeffaf, düz kenarlı ve şebnem tanesi görünümündedir. Zamanla daha koyu bir renk alarak büyürler, ancak şeffaftırlar. Kolonilere yukardan bakıldığında konveks ve inci beyazı rengindedir (23,32). Gram boyamada, gram negatif kokobasiller veya kısa çomaklar şeklinde görülen bakterilerin kolonilerinden brusellaya özgü antiserumlarla lam aglutinasyon testi uygulanır. Pozitif

aglutinasyon testi, izolatın brusella olduğunun ilk kanıtıdır. Bundan sonra yapılacak işlemler tür ve biyotip tanısına yöneliktir (23).

2.4.6. Koloni Morfoloji Özellikleri

"Smooth" Brusella türleri üreme sürecinde çoğu zaman dissosiye olma eğilimi gösterirler. Bir kültürün koloni morfolojisindeki değişiklik, antijenitesindeki ve infeksiyon oluşturma kabiliyetindeki değişiklikle yakından ilişkilidir. izole edilen suşların tür ve biyotip tanısında kültürün koloni morfolojisi son derece önemlidir. Her zaman "non-smooth" koloni yapısına sahip *B. ovis* ve *B. canis* dışında, diğer türler taze olarak izole edildiklerinde genellikle "smooth" (S) koloni yapısına sahiptir. "Non-smooth" kültürleri monospesifik A ve M antiserumları ve S brusella fajları ile tiplendirmek mümkün olmadığından, tiplendirme için S koloniler seçilmesi gerekmektedir (33). "Non-smooth" koloniler "rough" (R), mukoid (M) ve intermedir (I) koloni tipleri olarak ayrılırlar. I kolonileri S kolonilerinden ayırmak zordur ancak hafifce opaktır ve akriflavinle aglutinasyon reaksiyonlarında çok ince granüller oluştururlar. M kolonilerine öze ile dokunulduğunda ipliksi bir uzama gösterirler, koloniler şeffaf ve grimsi renktedirler. R kolonileri kuru, opak ve granüler görünümdedir ve sarımsı bir renge sahiptirler.Disosiyasyon derecesine göre tuzlu suda otoaglutinasyon gösterirler. "Non-smooth" brusella organizmaları notral PH değerlerinin altında kolayca oto aglutine olurlarken alkali pH değerlerinde stabil kalırlar (3). Brusella cinsi mikroorganizmalarda dissosiyasyon değişik metotlarla saptanmaktadır. Bunlardan en basit olanı %0.1'lik akriflavin solusyonunda kolonilerin emulsifiye edilmeleridir. S koloniler homojen bir emulsiyon gösterirlerken,"non-smooth" koloniler derhal aglutine olurlar. Bir diğer metot da kolonilerin kristal viyole boya solusyonu ile boyanmalarıdır. S koloniler bu metotla boya almazlar buna karşın, dissosiye koloniler kırmızı ve morun çeşitli tonlarında boyanırlar ve yüzeyleri radial çatlaklar gösterir. Disosiyasyon kontrolünde koloniler ayrıca stereoskopik mikroskopta, 45 ºC açı ile oblik ışıkta mavi- yeşil refle verirler, disosiye koloniler ise donuk sarı bir renk gösterirler (26).

2.4.7. Tür İdentifikasyonu

Tür identifikasyonu başlıca iki ana yöntemle tayin edilir. Bunlardan ilki Tibilisi (Tb) fajı ile lizisdir. İkinci yöntem ise, monometrik metotlarla izolatın 14 çeşit amino asit ve karbonhidratı oksidasyon ile metabolize etme kabiliyetlerinin incelenmesidir. Oksidatif metabolik testler zaman alıcı, yetişmiş elemana ihtiyaç gösteren ve pahalı testler olduğundan ancak referans laboratuarlarında taksonomik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır (34). İlk stabil brusella fajının 1950'de eski SSCB'de izolasyonundan sonra, birçok brucella fajı bildirilmiştir. Rusyanın Tbilisi eyaletinde izole edilip Tb adı verilen faj son derece stabil olduğundan referans faj olarak tür tayininde geniş çapta kullanılmaktadır (35).

Bu güne kadar çalışılan tüm brusella fajları DNA fajları olup Pedoviridae ailesine aittir ve konakçı afinitesine göre 6 gruba ayrılmışlardır. Grup 1 fajlarının prototipi olan Tb fajı Rutin Test Dilüsyonu (RTD)'ında sadece "smooth" *B. abortus* kültürlerini lize ederken, 10.000xRTD'nda *B. suis* ve *B. neotoma*'yı "lysis from without" denilen bir fenomenle lize etmektedir. Grup 2 fajlarının temsilcisi Firenze fajıdır ve *B. abortus*, *B. neotoma* ve *B. suis* biyotip 4'e karşı aktifdir. Grup 3 fajları Weybidge fajı ile temsil edilir. Bu faj *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. suis*'i lize eder, ancak *B. melitensis*'in çoğu suşlarını lize etmez. Grup 4 fajlarının protipi olan Berkeley fajı ilk olarak 1976 yılında Douglas ve Elberg tarafından izole edilmiştir. Bu faj tüm "smooth" brusella suşlarını lize etmektedir. Grup 5 fajları "rough" suşları lize eder. R ve bunun türevi olan R/O fajları stabil değildirler. Ancak *B. canis* Mex 51 üzerinde pasajla elde edilen faj R/C son derece stabildir ve "rough"dur ve suşlar için referans bir faj olarak kabul edilmektedir. Grup 6 fajı sadece Hindistandan izole edilen izatnagar fajını içerir. Bu faj *Brucella* spp.'in tüm "smooth" suşlarını aynı zamanda *B.melitensis ve B. suis*'in "rough" suşlarını lize etmektedir (26).

2.4.8. Biyotip Düzeyinde İdentifikasyonlar

Brucella türlerinin biyotip düzeyindeki identifikasyonları testler ile yapılmaktadır. Bunlar;

CO_2 gereksinimi, Hidrojen sulfür (H_2S) üretimi,

Bazik fuksin ve tiyonin boyaları ile inhibisyona duyarlılık,

Monospesifik A, M ve R anti-serumları ile aglutinasyondur (22,32,33).

2.4.8.1. CO_2 Gereksinimi ve H_2S Üretimi

B.abortus'un bazı biyotipleri genellikle ilk izolasyonlarında ve *B.ovis* her zaman üremeleri için %5-10 CO_2'e ihtiyaç gösterirler (9,10). Yeni izole edilen suşların kültür pasajlarına başlamadan önce CO_2'e olan ihtiyacının kontrol edilmesi, aksi halde takip eden pasajlarda bu gaza olan ihtiyacın yitirilebileceği ve H_2S testinin de ilk pasajlarda uygulanmasını ve kurşun asetatlı kâğıtların 4 gün süreyle hergün değiştirilerek kontrol edilmesi gerektiği bildirilmektedir (23,36).

2.4.8.2. Bazik Fuksin ve Tiyonin Boyalar ile İnhibisyona Duyarlılıklar

Temel besiyerlerine 1/50000 konsantrasyonunda katılan bazik fuksin ve tiyonin'in varlığında *Brucella spp.*'in üreme kabiliyetlerinin belirlenmesi, biyotiplendirmede kullanılan testlerdendir (14,25). Bu boyalar, kömür katranından elde edilmekte; bakterilerin bu maddelerle doğada karşılaşmaları pek mümkün olmamakta ve muhtemelen bu boyaların kimyasal yapılarının memeli dokularında bulunan bazı maddelere benzerlik gösterdiği bildirilmektedir (37). Esendal ve ark. tiyonin 40, 20 ve 10 mikrog/ml ve bazik fuksinin 20 ve 10 mikrog/ml konsantrasyonundaki solusyonlarına emdirilmiş disklerin kullanımının, *Brucella spp.* üzerinde bu boyaların bakteriyostatik etkilerinin incelenmesinde güvenilir bir metod olduğunu bildirmişlerdir (38).

2.4.8.3. Antiserumlarla Aglutinasyonlar

Tüm "smooth" brusella suşları anti-A anti-M veya her iki monospesifik anti-serum ile aglutine olurlar.Bu iki yüzey antijeninin "smooth" suşlarda dağılımının kantitatif bir farklılık göstermesi, A ve M monospesifik antiserumların biyotiplendirmede kullanımının temelini oluşturmuştur (39). A ve M antijenleri türlere ve biyotiplere göre farklı orandadırlar. *B. abortus*'un biyotip 1,2,3 ve 6; *B. suis*'in biyotip 1,2,3; *B. melitensis*'in biyotip 2 ve *B. neotomae*'nin A antijeni dominant iken *B. abortus*'un biyotip 4,5,9; *B. suis*'in biyotip5 ve *B. melitensis*'in biyotip 1'inde M antijeni dominanttır.

2.5. Patogenez

Brusella bakterisi, gastrointestinal sistem, deri nadiren de solunum yolu ve ya diğer mukoza yüzeylerinden alındıktan sonra ilk üremesini bölgesel lenf bezlerinde yapar. Oral yolla alınımda mide asidinin yetersizliği veya herhangi bir ilaç yada diyetle nötrelize edilmiş olması bakterinin geçişini kolaylaştırır (2). *B. melitensis* mide asidine *B. abortus*'tan oranla daha dayanaklıdır. *B. melitensis* serumun bakterisit etkisine dirençlidir ve bu etkenin diğer türlere göre daha virülent olmasını açıklar (7). Brusellozis'in en önemli özelliği bir retikulo-histiositer sistem hastalığı olması ve belli organ ve dokulara yerleşmesidir (3). Vücuda girdikten sonra, lenfatik kanallar ve bölgesel lenf bezleri aracılığı ile ana lenf damarına (ductus thoracicus) oradan da kan dolaşımına katılır. Kanda bakteriemi sonucu kan yoluyla parankimatöz organlara taşınır. Lenf dokusu, karaciğer, dalak, kemikiliği ve retiküloendotelieal sistemin diğer kısımlarında mikroorganizmaların neden olduğu granulamatöz lezyonlar abse formlarına dönüşebilir. Brucella fakültatif intraselüler patojenler olup konakçının fogoistik hücreleri içinde çoğalabilir. Lezyonlarda hücre içinde bulunur (6,24). Brusella infekte ettiği konakta hem hücresel hemde humoral immun yanıtı meydana getirir. Hücresel immuniteye klasik patolojik yanıt granülomlardır. Akut infeksiyonda önce IgM sınıfı antikorlar meydana gelir. Bunlar ilk haftada saptanan anikorlardır. IgG sınıfıdan antikorlar hastalığın ikinci haftasında başlayarak artiş gösterirler. IgG sınıfı antikorlar tedavi edilmeyen olgularda en az bir yıl yüksek kalır. Tedaviye yanıt veren olgularda ise tedavi başlangıcından tibaren 6.aya doğru kaybolurlar yada minimale inerler. Bazı olgularda düşük titredeki IgM ler aktif infeksiyon olmaksızın aylar yada yıllarca devam ederler.IgG antikorlarının titresindeki hızlı düşüşün tedaviye yanıtın bir göstergesi olabileceği düşünülmektedir.Bu antikorların titrelerinin devam etmesi yada yeniden yükselerek ortaya çıkması nüksü akla getirmelidir (7).

Brusellalar büyük eklem ve vertebralara yerleşerek buralarda bir dizi patolojik değişikliklere neden olur. En çok tutulan periferik eklemler kalça, diz ve dirseklerdir. Spondilite de çok yaşlılarda raslanır ve paraspinal apse gelişebilir.

Brusella bakteriyemisi sırasında, etken meninkslere ve endokarda yerleşebilir. Brusella endokarditi, önceden valvül lezyonu olan veya prostetik valvülü olan hastalarda daha sık oluşur. İnsan plasantasında eritrotil bulunmaması nedeniyle, Bursella'ya bağlı düşük riski diğer bakteriyel enfelsiyonlarınkinden yüksek değildir.

Overler ve endometrriyumun tutulumu daha nadirken genç erişkin erkek hastalarda testis, epididim ve veziküloseminallere yerleşim sonucu akut orşit ve epididimit geşişimi sıktır. Hastalığın seyri sırasında görülebilen vaskülit, eritema nodosum ve çeşitli cilt döküntüleri, immun komplekslere bağlı olrak açıklamaya çalışılmıştır. Bazı hastalarda antinükler antikor (ANA) veya romatoid faktör (RF) pozitifliği saptanmıştır (2)

Etken, özellikle memelerde, gebe uterusta, lenf düğümlerinde, testislerde ve seyrek olarak da eklem, tendo kılıfları ve Bursalara yerleşir (18). Endokardit sonucu ölüm ortaya çıkabilir, mortalite % 5 civarındadır. Kronik nörolojik hastalıklara neden olabilir bu ise mortal seyreder. Yaşlılarda kronik enfeksiyon oluşur (24).

2.6. Klinik Belirti ve Bulgular

Hastalığın inkubasyon süresi 2-3 hafta olmakla birlikte, bir hafta ile birkaç ay arasında değişir (27). Hastalık genellikle halsizlik, iştahsızlık, etraf ağrıları ve subfebril ateşle, yani genel infeksiyon belirtileri ile başlar (7,40) Brusellozda belirti ve bulgular nonspesifiktir, herhangi bir organ veya sistemi tutabilir. Hastalık altta yatan hastalık olup olmamasına, kişinin immun durumuna ve bakterinin türüne bağlıdır. Klinik olarak akut, subakut veya kronik olabilir.

Akut brusellozda genellikle kırgınlık, başağrısı ve anoreksi görülür. Yoğun terleme, üşüme, ateş ve zayıflama vakaların %90'ından fazlasında görülür. Kilo kaybı miyalji ve artralji, sırt ağrısı görülür (7,29,40-42).

Ondülan ateş, brusellozda karekteristik olmasına rağmen etkilenen hastaların çoğunda görülmez. Daha çok öğleden sonra yükselen intermittan veya remittan ateş olur. Ateş üşüme titreme ile 38-39 ºC'a kadar yükselir. Her gün yarım derecelik artışla 40-41 ºC'a kadar yükselebilir ve genellikle gece yarısından sonra bol terleme ile düşer. Bazen 7-10 gün bu şekilde devam eden ateş, yükseldiği gibi yavaş yavaş düşerek 37 ºC'a iner 3-5 günlük ateşsiz dönemi takiben başlangıçtaki gibi ateşin yükseldiği görülür. Buna ondülan ateş denir (42).

2.6.1. Kas İskelet Sistemi Bulguları

Ateşle birlikte en önemli ikinci bulgu kas ve eklem ağrılarıdır. Osteoartikuler komplikasyonlar vaka serilerinde %10-%80 olarak rapor edilmiştir (7,28,40). Hastalığın

ilerleyen dönemlerinde ateş ve terleme azalırken, hareket sistemi bulguları ön plana çıkar. Hastalığın geç dönemlerinde, yakınmaların non spesifik olması nedeniyle tanı koymak güçleşir. Hastaların bir kısmı nörotik olduğu düşünülerek psikiyatri kliniklerine dahi gönderilebilirler. Kas ağrıları bazen erken dönemde çıkar ve tek bulgu olabilir. Eklem bulguları hastalığın 3. ve 4. haftasında en sıktır. Spontan ağrı dışında hareketle de duyarlılık artar. Tedavide başlandıktan sonra kısa süre içinde şikâyetler azalır veya kaybolur. Tedavinin erken kesildiği veya yeterli dozda uygulanmadığı durumlarda şikayetler tekrar ortaya çıkabilir. Bruselloz tüm eklemleri tutabilmekle birlikte daha çok sakroiliak, kalça, omuz, diz, el ayak bileklerini tutar. Spondilit genellikle hastalığın 1-2. ayında ortaya çıkar, ateşle ilgili değildir. Spondilit brusellozlu hastaların %10-65 inde görülür (7,11,29). Yaşlı hastalarda sık görülen spondolit parasipinal abse ile sonlanabilir (7). Hastalığın seyri sırasında vertebralarda meydana gelen harabiyet, abseleşmeye neden olabilir. Spondilitle beraber sakroiliit, norobruselloz, genç erişkin hastalarda orşit, epididimit görülebilir.

Radyolojik değişiklikler en çok vertebra korpuslarının kenarlarında dikkat çekicidir. İntervertebral aralıklarda daralma %90 vakada saptanabilir. İleri dönemde füzyon meydana gelebilir. Yine radyolojik olarak vertebra korpusunun ön üst köşesinde güve yeniği manzarası şeklinde osteoporoz görülebilir(pedro-pons arazı), osteofit ve sindesmofitler oluşabilir. Bazen subperiostal ve subkondral abseler teşekkül edebilir.

Sakroiliit, hastalarda erken dönemde başlayabildiği gibi, tek başına veya yaygın artrit ve ateş atakları ile birlikte olabilir. Radyolojik olarak eklem aralığı düzensizleşebilir. “Akdeniz koksaljisi” adı da verilir (7,11,29).

2.6.2. Cilt Bulguları

Hastalığın yüksek ateşle seyrettiği toksik dönemlerde nadir olgularda yaklaşık %5’inde makülopopüler veya eritematoz deri döküntüleri görülebilir. Eritema, nodozum, papül, raş ve ülser gibi belirtilerin yanında petişi, purpura ve kütanöz vaskülit deri lezyonları oluşabilir (6,7). Abort yapan hayvanların plesantasına müdahele eden Veteriner Hekim, teknisyen ve hayvan bakıcılarının ön kollarında bruselloza bağlı dermatitler görülebilir (6).

2.6.3. Kan Bulguları

Hastalığın seyri sırasında anemi, lökopeni, trombositopeni, pansitopeni oluşabilir, lokalize veya jeneralize lenfadenopati görülebilir (11,29). Vakaların %75'de kemik iliğinde granulomların olduğu fakat bunlar küçük ve sınırlıdır (11).

2.6.4. Hepatobiliyer Sistem Bulguları

Karaciğer RES organlarının en büyüğü olduğu için Brusellozda karaciğer tutulumu ile daima karşılaşmak mümkün olabilir. Akut brusellozda karaciğer enzimlerinde hafif artış ile beraber hepatosplenomegali hastaların % 50'sinde görülür. Bu bulgular granülomatöz veya nonspesifik hepatite bağlıdır. Ancak brusellozda karaciğer ve dalağın etkilenmesi genelde hafiftir ve antimikrobiyal tedavi ile düzelir.

Brusella hepatitinde etiyolojik bulgu spektrumu çeşitlidir. Karaciğerde görülen değişiklikler etken *Brucella* türüne göre değişir. *B. abortus* enfeksiyonu sarkoidozdan ayrılamayan granülom ile karakterizedir. Buna karşılık, *B. melitensis*'de lezyonlar, mononükleer hücrelerin çevrili olduğu küçük nekroz odaklarından viral hepatite benzeyen yaygın nonspesifik inflamasyona kadar değişir. Diğer olgularda epiteloid granülomlar bildirilmiştir. Bruselloma olarak da tanımlanan granülamatöz lezyon brusellozun endemik olduğu bölgelerde sık görülür.

Brusellozda izlenen hepatit antimikrobiyal tedavi ile düzelir ve diğer nedenlerin olmadığı durumlarda (Hepatit C veya alkolizm) inflamasyon şiddetli olsa dahi siroz gelişmez. Cerrahi müdahale gerektiren süpüratif karaciğer apsesi *B. suis* ve *B. melitensis* enfeksiyonlarında bildirilmiştir. Brusellozda nadiren spontan peritonit ve akut kolesistit görülür (6,7,11).

2.6.5. Sindirim Sistemi Bulguları

Brusellozlu hastalarda anorexia, bulantı, kusma karın ağrısı, diyare veya konstipasyon gibi gastrointestinal sistem belirtileri %70 oranında görülebilir. *B. melitensis*'in yol açtığı kolit ve ileit olguları bildirilmiştir. Patolojik lezyonlar içinde peyer plaklarında inflamasyon bulunabilir. Brusellozlu hastalarda dalak ve karaciğer büyüklüğü genellikle birlikte bulunur. *B.abortus* granülomatöz hepatit yaparken, *B.melitensis* infeksiyonunda periportal mesafelerde mononükleer hücre infiltrasyonu ile

safra akımının bozulması ve sarılık gelişimi görülebilir. Hastalarda karaciğer fonksiyon testleri yükselebilir (7,11,29,41).

2.6.6. Sinir Sistemi Bulguları

Bruselozda nörolojik belirtiler menejit, ensefalit meningo vasküler komplikasyonlar, parenkimatöz disfonksiyonlar, periferik nöropati/radikülopati ve psikozdur. Beyiniçi ve epidural apseli olgular nadiren bildirilmiştir. Santral sinir sistemi tutulumu olguların %5'inden azında görülür ve genellikle akut veya kronik menenjit şeklindedir. Bazen menejit tek klinik belirti oldğu halde bazen hastalığın geç döneminde ortaya çıkar **(7)**. Hastaların bir kısmında kas ve eklem ağrılarının yanı sıra başağrısı da bulunur. Bazı olgularda menenjite ait klinik bulgular da tabloya ilave olabilir. Bu hastalarda beyin omurilik sıvısının (BOS) incelemesinde daha çok lenfositlerin hakim olduğu pleositoz, protein artışı vardır. Glukoz düzeyi normal veya hafif azalmıştır. BOS kültüründe etkenin üretilmesi mümkündür fakat tanı, BOS'da spesifik antikorların bulunması ile de konabilir. Nadiren menenjitle birlikte ensefalitte oluşabilir. (11,29,30). Kronik bruselloz vakalarında, psikatrik bozukluklar; depresyon, kronik bayılma, amnezi ve hatta intihar bile gelişebilir (30).

2.6.7. Kalp Damar Sistem Bulguları

Brusellada olguların %2'sinden azında endokart görülmekle birlikte bruselloza bağlı ölümlerin yarısından sorumludur. Endokartan ziyade daha çok aort ve mitral kapaklar tututulur (7). Endokardit şüphesi olan vakalarda ekokardiyografi ile valvüllerin durumu incelenmelidir. Bu vakalarda antimikrobik tedavi yetersiz kalabileceğinden, cerrahi girişim gerekebilir. Diğer kardiyovasküler sistem bulguları arasında miyokardit ve perikarditte sayılabilir. Akut brusellozda nadiren derin ven trombozu da görülebilir (4).

2.7.7. Solunum Sistem Bulguları

Bruselloz olguların yaklaşık dörtte birinde (1/4) solunum semptomları vardır (7). İnhalasyon yolu ile infeksiyonun alındığı yada bakteriyemi ile yayıldığı durumlarda; bronşit, bronkopnömoni, akciğerde soliter ve multiple nodül, akciğer absesi, hiler

lenfadenopati ve plevral effüzyon, ampiyem meydana gelebilir (6,7,11,40). Yapılan balgam kültürlerinde *Brucella* spp. identifikasyonu nadirdir (11).

2.7.8. Üreme ve Boşaltım Sistem Bulguları

İnsanlarda nadir görülen komplikasyonlardır. Erkeklerde tek taraflı epididimo-orşit görülebilir. İnterstiyel nefrit, eksüdatif glomerülonefrit ve IgA nefropatisi bildirilmiştir.Testisler yada epididimis lenfosit ve plazma hücreleri infiltre edilmiş seminiferous tubullerinde atrofi vardır.Kadınlarda salpingitis,cevicitis ve pelvis abseleri nadir rapor edilmiştir.Orşitis erkeklerin %20'sinde rapor edilmiştir (11). Çok nadir olrak kronik renal abselerde tanımlanan kalsiyum depositleri tuberkülozu taklit edilebilir. (7,11,29).

2.6.9. Göz Lezyonları

Brusellozlu hastalarda çok çeşitli göz bulguları bildirilmiştir. Üveitis kronik brusellozlu 71 hastanın 14'de yani %20'sinde götülmüştür. Üveitis genellikle geç komplikasyondur. Kronik iridosiklitis, numuler keratitis, multifokal choroiditis ve optik neuritis diğer bulgulardır. Brusella üveitis bir non infeksiyöz immun yanıttır ve sistemik kortikosteroidlere iyi yanıt verir (11).

2.6.10. Hayvanlarda Görülen Bulgular

Brusellozis'in inkubasyon süresi 10-250 gün arasında değişir. Sığırlarda başlıca klinik bulgular yavru atma, kısırlık, mastitis ve orşitis'tir. Abortus (yavru atma) en belirgin semptomdur. Genellikle gebeliğin 6-8. aylarında meydana gelir. Plasentanın içeride kalması, ölü doğum ve sütün azalması abortus sonunda görülen bulgulardır (12). Aydın ve ark. (18) kitaplarında, koyun ve keçilerde, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde yavru atmalar görüldüğünü belirtmiştir. İnfekte hayvanlarda abortusların dışında mastitis, genel düşkünlük, zayıflama, bronşite bağlı kısa öksürük, eklem şişkinlikleri ve topallık tespit edilebilir. Bazı olaylarda plasenta içeride kalabilir ve septisemilere ve kısırlığa yol açabilir. Abortusdan önce hastalık etkeni süt ve idrarla dışarı çıkar. Abortusdan sonra ise uterus akıntıları ile saçılır. Akut olaylarda mastitis, topallık ve higroma görülen belirtiler arasındadır. Mastitis olaylarında memelerin klinik görünüşü normal olmasına rağmen sütün fiziksel yapısında değişiklikler şekillenebilir. Süt,

sağılınca kolayca pıhtılaşır. Süt salgısı önemli ölçüde azalır ve sütün renginde de değişmeler gözlenir (3). Otopside, plasenta üzerinde akut, subakut veya kronik bir yangı gözlenir. Plasentalar kalınlaşmış ve fibrinli bir irinle örtülmüştür. Bazen kan lekeleri görülür, uterusta fibrinli bir iltihap bulunur. Atık fötüsün mide ve bağırsaklarında iltihaplar gözlenir ve içinde kirli-sarıbeyaz renkte sümüksü bir sıvı bulunur. Dalak ve lenf bezleri şişkindir. Üzerinde küçük beyaz nekroz odakları vardır. Erkeklerde testis, testisi saran katman ve testis kordonunda değişik derecede nekrozlu ve irinli bir iltihap görülür (18).

2.7. Tanı ve Ayırıcı Tanı

Dikkatli bir annemnez bruselloz tanısının konulmasına yardımcı olmakla birlikte, laboratuvar bulguları önem taşır. Laboratuvar kan tetkiklerinde; lölosit sayısı normal olmakla birlikte, bazen lökopeni bazen de 10000/mm3'in üzerinde lökositoz saptanabilir. Hastanın lökosit förmülünde hafif bir lenfomonositoz bulunabilir. Bazı kronik vakalarda anemi, trombositopeni de görülebilir. Eritrosirt sedimentasyon hızı genellikle orta derece artmıştır, akut eklem romatizmasındaki yüksek değerler ulaşmaz. Lökosit sayısı genellikle normaldir veya azalmıştır. Nadiren 10.000/mm3'ün üstüne çıkar. Hastanın lokosit formülünde hafif bir lenfomonositoz bulunabilir. Bazı vakalarda anemi ve trombositopeni de görülebilir. Eritosit sedimantasyon hızı genellikle orta derecede artmıştır. Başlangıç humoral immun cevap, IgM sınıfı antikorların artışı ile karakterizedir. Yaklaşık 7-14 gün sonra bunu I gG sınıfı ankorların artışı izler. İyileşme döneminde IgG sınıfı antikorların düzeyi birkaç ay içersinde düşer, buna karşılık IgM sınıfı antikorlar infeksiyondan yıllar sonra bile serumda düşük düzeyde kalabilir. IgG sınıfı antikorların kalıcı olması veya IgG düzeyinin düştükten sonra tekrar yükselmesi peristan infeksiyonu veya relapsı düşündürür.

İdrar incelemesi sonucu normaldir veya hastanın yüksek ateşli olduğu dönemde febril albüminüri bulunabilir. Böbrek tutulumu olduğu zaman;idrar dansitesi düşebilir, proteinüri belirginleşir, idrar sedimentinde eritrosit,lokosit ve silendirler görülebilir (6). Brusellozda hayvanlarda yavru atmadan başka her hangi bir klinik bulguya rastlanmaz. Sürüde abortus olaylarının gebeliğin son dönemlerinde artması brusellosisten şüphelendirir.Kesin teşhis için laboratuvar analizleri gerekmektedir (3).

2.8. Laboratuar Muayeneleri

Hastalığın kesin teşhisi, yeni atılmış fötüslardan alınan marazi maddeler, kan, serum, süt, plasenta, sperma, vajinal sıvı, idrar ve organlarda tekniğine göre uygun olarak alınan materyallerle laboratuarda yapılacak bakteriyolojik ve serolojik muayeneler sonucu konulur (3,12,18,22).

2.8.1. Bakteriyoskopi

Fötüsün midesinden, plasenta, kotiledonlar, uterus akıntıları, cerahat, eksudatlar, organlar v.b. otopsi materyallerinden frotiler yapılarak Ziehl-Neelsen ve Köster yöntemleriyle boyanarak muayene edilir. Brusellalar mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görünürler. Brucella etkenlerini ayırmada Gram ve Stamp gibi diğer boyama tekniklerinden de yararlanılır (3,12,18,22).

2.8.2. Kültür

Brusellozis'li hayvanlardan alınan çeşitli marazi maddelerden (fötüsün midesinden, plasenta, kotiledonlar, uterus akıntıları, cerahat, eksudatlardan) insanlarda infekte dokulardan apse içeriklerinden, kemik iliğinden ve kandan besiyerlerine ekimler yapılır. Genellikle katı besi yerleri kullanılır. Çünkü katı besi yerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlar. Brucella'ların izolasyonunda Serum dekstroz veya Tween dekstroz agar ve kontaminasyondan şüpheli materyalin kültüründe ise antibiyotik katılmış besi yerleri kullanılır. Ekiminler 2 şer adet yapılır sonra etkenin üremesi için petri kutuları % 10 CO_2'li etüve yerleştirilirler ve 1 hafta süre ile üremeye bırakılırlar. Üreyen koloniler morfolojik, kültürel, biyokimyasal, boya testleri, hayvan inokulasyonu ve serolojik yönlerden muayene edilerek etkenin kesin identifikasyonu yapılır (3,12,43,44).

2.8.3. Hayvan Deneyi

Elde edilen kültürler ve kontaminasyon ihtimali olmayan marazi maddeler kobaylara intraperitoneal olarak, kontamine olan materyal ise subkutan veya kas içi olarak şırınga edilirler. Süt ve idrar gibi kontamine materyaller için kobay inokulasyonu direk kültür yöntemine oranla daha iyi sonuç vermektedir (3,12). Brucella'ların

izolasyonunda ender olmakla birlikte 4-7 günlük embriyolu tavuk yumrtasına inokulasyon da kullanılmaktadır (3).

2.8.4. Serolojik Testler

Brusellozis'in laboratuarda teşhisi, genellikle seroloji üzerine dayanmaktadır. Hayvanlarda serolojik reaksiyonlar arasında uygunsuzluk nedeniyle sadece bir serolojik yoklama infekte fertlerin saptamak mümkün olmadığından en az iki hafta aralıklarla 3 serolojik test metodun uygulanmasıyla birlikte allerjik muaynelerin yapılması bütün araştırmacıların ortak görüşü olduğu ifade etmiştir (3). Çok duyarlı ve spesifik olduğu zaman bir infeksiyonun indirek tanısında serolojik testler önemlidir. Kros reaksiyondan infeksiyon nedeni ile hatalı nadirdir (43).

2.8.4.1. Aglütinasyon Testleri

Kan ve kan serumu, süt serumu, vaginal mukus ve semina plazma ile aglütinasyon yapılabilmektedir.

1. Çabuk aglutinasyon testleri: Bu testlerde seri olarak sulandırılmış fikse edilmiş bakterilerin kayfi maktarı kullanılmaktadır. PH gibi çevresel faktörlerden etkilenirler (43).

Rose Bengal testi (RBT): Küçük sağlık birimlerinde veya polikliniklerde bruselloz tanısının kısa sürede konulmasını sağlayan B.abortus 99 suşunun boyalı antijen olarak kullanıldığı bir lam aglutinasyon testidir. Lam üzerine 0.003 ml antijen ve aynı miktarda hasta serumu damlatılır.4 dakika süre ile karıştırılıp aglutinasyon olup olmadığı değerlendirilir (23,44). Özellikle akut brucellosisi çabuk tanımaktadır.Düşük oranda yalancı pozitif sonuç alınabilir (43).

Spot test (ST): Özel yöntemle boyanmış antijenlerle tam kanda tanı da kullanılır.

Gerek RBT gerekseST'in sonuçları tüp aglütinasyon deneyi ile denetlenmelidir. Bu testler ancak ön araştırma(tarama testi) olarak kulanılırlar (23,43).

2. Mikro aglütinasyon testi: Değişik boyalarla boyanmış Brucella antijenleri ile mikropleytler kullanılarak yapılır ve SAT'a göre daha az antijen ve kısa inkübasyon zamanı gerektirir (43).

3. Makro aglütinasyon testi (Serum tüp aglitinasyon (STA): Brusellozun serolojik tanısında en basit, ucuz ve kullanışlı yöntem serum aglutinasyon (STA) olan

“Wright testi”dir. Aglutine olmuş total antikor miktarını gösterir. Kullanılan antijen *B. Abortus*’un S kolonilerinden hazırlanan fenolle inaktive edilmiş standart süspansiyondur (suş 1119-3 pH:7,2-7,4). Yalancı pozitif reaksiyonlar yersinia, kolera veya tularemie bağlı olabilir. Yalancı negatif ve pozitif reaksiyonlar 1/320'den çok dilüe edilmiş serumlarla kaçınılabilir. Aktif infeksiyonu olan kişilerde aglütinasyon titresi genellikle 1/160 veya üzerindendir. IgG sınıfı antikorların zaman içersinde azalması iyi prognostik cevabı gösterir (3,23,43).

Redüktan ajanların varlığında STA testi spesifik IgG antikorlarını ölçebilir. Hasta serumunun 2 Merkaptoetanol muamele edilmesiyle IgM sınıfı antikorların aglutine olma özelliği ortadan kalkar. Böylece saptanan aglutinasyon IgG sınıfı antikorlara aittir (23,44,45).

2.8.4.2. Sütle Yapılan Ring Testi (Halka Testi)

Bu test için hematoxylene ve Triphenyl tetrazolium’la boyanmış iki çeşit antijen kullanılır. Genellikle inek sütleri için hematoxylene, koyun ve keçi sütleri için ise tetrazolium’la boyanan antijenler kullanılmaktadır. Süt kısmı ile krema arasında kırmızı renkte bir halkanın teşekkülü pozitif reaksiyonu gösterir. Bu yöntemle bir sürüdeki infekte hayvanı ayırmak mümkündür (3).

2.8.4.3. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT)

Tüpte yapılan yavaş aglütinasyona oranla daha spesifiktir. Kompleman fiksasyon testi (KFT) en sensitif ve en spesifik konvansiyonel serolojik yöntem olması nedeniyle bruselloz tanısında doğrulama testi olarak kabul edilmektedir.

STA testi sonuçlarının yetersiz kaldığı veya negatif olduğu inkübasyon dönemi, geç kronik safha veya aşılanmalarda KFT önemli bir tanı yöntemidir (44,45).

2.8.4.4. Coombs (Antiglobulin) Testi:

Bu yöntem tek reseptöre sahip incomplete antikorların antiglobulin serum aracılığı ile, antijenle birleşip flakonlar teşkil ederek çökmesi esasına dayanır (3,44,45). Testin uygulanışı, şüpheli serum ve antijenden başka her hayvan türü için özel olan antiglobulin gerektiğinden bu test uygulaması güç bir testir (3). Brusella Coombs testi bazen subakut bruselloz olgularında klinik olarak bruselloz düşünülmekle birlikte

brusella aglutinasyon testi yalancı negatif sonuç verebilmektedir. Bu hastaların serumları blokan antikorlar açısından araştırılmalıdır. Aglutinasyon deneyinde aglutinasyon vermeyen tüplerdeki bakteriler tuzlu su ile üç kez yıkanıp küçük tüplerde yeniden süspansiyon hazırlandıktan sonra her tüpün üzerine birer damla Coombs serumu (anti insan serum globulini) damlatılır. Tekrar etüve kaldırılarak 24 saat sonra yeniden değerlendirilir. SAT'de nadir de olsa yersinia, tularemi ve kolera antikorları varlığında yalancı pozitif sonuçlar alınabilir (29).

2.8.4.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA, oluşturulan antijen-antikor kompleksine, enzim ile işaretli anti-gammaglobulin bağlanarak ve enzimin etkilediği substratın eklenmesi ile renk oluşumuna dayanan bir testtir. Tüm bakterinin, soluble antijenlerin (örn; S-LPS veya nativ hapten polisakkaridi) veya hücre ekstraklarına (dış membran, sitoplazmik proteinler) karşı anti-Brusella antikorlarını saptamada yararlı olabilir. Antijen veya antikor belirlenmesi için uygulanılan duyarlı bir yöntemdir. Bu testte, enzimle işaretli monoklonal antikorlar kullanılmaktadır. Bu nedenle tek serum örneğinde IgG, IgM ve IgA sınıfı antikorlar araştırılarak, hastalık evresi belirlenebilmektedir (43,45).

2.8.4.6. Flöresan Antikor Tekniği (FAT)

Sölüsyonda küçük solubl ve floresans işaretlenmiş bir antijen ile antikor birleşme reaksiyonudur. Düşük oranda depolarize ışık gerektirir (43). Spesifik ve duyarlı olan bu test de, özellikle sığır brusellozun teşhisinde son zamanlarda oldukça çok kullanılan bir tekniktir (3,44).

2.8.5. Bakteriyofaj Testi

Günümüze kadar gübre, fötus, Brusella stok kültürleri ve insan kanından çeşitli araştırmacılar tarafından çok sayıda faj izolasyonu yapılmıştır. Fakat Rusya'da izole edilmiş olan Tibilisi veya kısaca Tb denilen faj referans olarak tip tayininde geniş çapta kullanılmaktadır. Ayrıca Weybridge ve Berkelay fajları da son zamanlarda referans faj olarak kullanılmaktadır (3).

2.8.6. Alerjik Testler

Arda M'ye göre (3), bazı ülkelerde sığır, koyun, keçi ve domuz Brusellozunu ortaya çıkarmak için alerjik testler kullanılmaktadır. Bazı ülkelerde serolojik testler ile birlikte kullanılmaktadır. Alerjik testler koyun ve keçilerde sığırlardan daha iyi sonuç verir.

2.8.7. Moleküler Teknikler

Bruselloz tanısında PZR kültür ve serolojik testlerden daha duyarlıdır. Tüm materyaller için uygun bir testtir ayrıca tanı amaçlı kullanılabileceği gibi; tiplendirmelerde, epidemiyolojik çalışmalarda da kullanılır. Uygulanması kolay ve hızlıdır.16S rRNA gen dizisini temel alan PZR metodları güvenilir sonuçlar vermiştir. DNA düzeyinde Brusella'ya en yakın bakteri *Ochrobacterum*'dur, çapraz reaksiyon olabilir ancak çok nadirdir, ayrıca bu bakteri ile enfeksiyon çok nadirdir (45,46).

Brusella enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda akut vakalarda erken tanı ve doğru tedavi, risk gruplarının zamanında aşılanması ve salgın suşlarının genotiplendirilerek salgının kaynağı, bakterinin insan ve hayvan popülasyonlarındaki hareketinin izlenmesi ve bulaş yolunun belirlenmesi, bölgelerde hakim genotiplerin ortaya çıkarılması, bu genotiplerin eradikasyonu için aşı ve tedavi seçeneklerinin araştırılması, kısaca genotipik sürveyans hayati önem taşır. Bu güne kadar fenotipik yöntemlerle yapılan tanı ve tiplendirmenin epidemiyolojik sürveyans için beklentileri karşılamıyor olması sebebi ile geniş çaplı ve kullanılabilir sonuçlar üreten çalışmalar yapılamamıştır. *Brucella* suşlarını genom düzeyinde tiplendirmek adına birçok moleküler yöntem denenmiştir. PCR-RFLP, RAPD-PCR, multiplex PCR ve single nucleotide polymorphisms (SNP) bu yöntemler arasındadır. Son yıllarda *M. tüberculosis* gibi zor mikroorganizmaların klonal düzeyde tiplendirilmesinde başarı ile kullanılan, multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analizi yöntemi ile hastane enfeksiyonlarında salgın analizinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yönteminde *Brucella* türleri arasındaki genotipik ilişkinin araştırılmasında kullanılabileceği gösterilmiştir.

2.8.7.1. Restriction Fragment Lengrh Polimorphism(RFLP)

Brucella türleri arasındaki yüksek DNA homolojisi, Brucella suşlarını tür düzeyinde ayırt etmeye olanak tanımaz. PZR ve PZR fingeprintig ile çalışmalar bu konuda yardımcıdır. Türe özel RFLP genusun üyelerini ayırmada kullanılabilir (45).

2.8.7.2. Multipleks PZR ve Real-Time PZR

Değişik biyolojik ajanlara spesifik primer setlerden hazırlanan bir kokteyl tekbir tüple çalışabilir. *Leptospira ssp.* ve *Brucella ssp.* için hazırlana mPZR deneyi %100 sensitivite %93 spesifite göstermiştir (45,46). 2001'de Redkar ve arkadaşları tarafından bruselloz tanısında real-time PZR tekniği geliştirilmiştir (47).

Brucella tanımlamasında real-time PZR gerekli zamanı çok kısaltır. FRET proplar yeni generasyon amplikonlarla spesifiteyi yükselterek hibridize olurlar. Jel elektroforez ve DNA dizi çalışmalarına ihtiyaç yoktur. Şüpheli bruselloz olgusu karşısında çoğu zaman en az iki kan kültürü alınmakta ve pek çok serolojik test uygulanmaktadır. Bu testler için gerekli materyal personel gideri aşağı yukarı in-house PZR deneylerindeki kadardır. Sonuçta PZR oldukça sensitif, spesifik, uygulanması kolay ve hızlıdır. Ayrıca laboratuvar infeksiyonları da önlenmiş olur (45-47).

2.8.7.3. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Pulsed-field gel elektroforesiz ilk kez Schwartz ve Cantor tarafından tanımlanmıştır (48). Bu metot genomik DNA'nın kesici restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanarak PFGE tarafından fragmentlerin ayrılması ve band örneklerinin canlandırılıp yorumlanması esasına dayanır. Geleneksel jel elektroforesiz 50 kilobaza kadar olan DNA fragmentlerini ayrıştırabilirken PFGE fragmentleri 10 megabaz büyüklüğündeki fragmentleri ayrıştırabilir (49). PFGE infeksiyon etkeni izolatların karşılaştırılmalarında kullanılan bir metot olup bakteri suşlarının tanımlanmasında nadiren kullanılır. Son yıllarda izolatlar arası benzerlik ya da farklılıkların tespitinde mevcut en tartışmasız ayırıcı metottur. PFGE de temel özellik bir homojen elektrik alanının çoklu elektrot ve farklı voltajlar kullanarak üretilmesidir (50). Bakteri yoğunluğu ve yaşı, DNA nın kalite ve konsantrasyonu, agaroz konsantrasyonu, yıkama işlemi, kesici enzimin miktarı ve özelliği, bafırın sertliği, voltaj ve pulse zamanı ve sıcaklık gibi bir çok faktör PFGE deki görüntü kalitesini etkiler (51). PFGE metodu ile

katı ve sıvı besi yerinde üretilen bakteriler yoğunlukları ayarlandıktan sonra düşük erime ısılı agaroza karıştırılıp küçük 10 kalıplar içerisine dökülmektedir. Kalıplardan bloklar halinde alınan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE de kırılmamış DNA gereklidir. Liziz işlemini takiben agaroz blokları yıkanarak karbonhidrat vb. kontaminantlar uzaklaştırılır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde kalır. Agaroz içindeki bakteriyal DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturabilen bir restriksiyon enzimi ile kesilir. Daha sonra içinde DNA parçaları bulunan kalıplar hazırlanarak jel içerisindeki uygun çukurlara yerleştirilir ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulur. Bu elektrik akımı 1 ile 800 kilobazlık DNA segmentlerinin ayırt edilmesini sağlar. Elekroforez işlemi bitince jel etidiyum bromür ile boyanarak her bir izolata ait bant profilleri görünür hale gelir (48).

Bu profiller software yada bir istatistik programı ile yorumlanabilir (Şekil 1).

Bakterinin agaroz ile (agaroz kalıbı içerisinde) birleştirilmesi
↓
Hücrelerin liziz ve proteolizi (DNA izolasyonu)
↓
Yıkama (enzim ve deterjan kalıntılarının uzaklaştırılması)
↓
Genomik DNA nın kesici enzim (RE) tarafından restriksiyonu
(Uygun ısı ve sürede inkubasyon)
↓
Fragmentlerin PFGE tarafından koşturulması
(Elektroforez)
↓
Ethidium bromid ile boyama
↓
UV altında gözlemlemek
↓
Band desenlerinin analiz ve kaydı

Şekil 2.1. PFGE yönteminin pratik adımları (49)

Geniş kullanımından, yüksek ayırt etme gücüne sahip olmasından ve çok iyi epidemiyolojik uygulamalarından dolayı PFGE son 20 yıldır bakteriyel patojenlerin alt tiplemelerinde altın standart olarak kullanılmaktadır (52). Özellikle PFGE aynı türe ait bakterilerin tiplenmesinde PZR ve klasik elektroforezde yapılan RFLP'ye göre yüksek ayırt edici güce sahiptir (53).

2.8.7.3.1. PFGE Kullanım Alanları

1-Salgın araştırmalarında, salgınların kaynağı ve yayılma yollarının belirlenmesinde

2-Hastaların epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında

3-Hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonların belirlenmesinde

4- Re-aktivasyonun yeni bulaştan ayırt edilmesinde

5-Laboratuar kontaminasyonlarının belirlenmesinde

6-Dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının tespit edilmesinde kullanılır.

2.8.7.4. Variable Number Tandem Repeats (VNTR)

VNTR (Variable Number Tandem Repeats- Değişken Sayılı Ardışık Tekrarlar) markörleri, farklı uzunlukta tekrar dizilerini içeren mikrosatellit ve minisatellit markörleri içermektedir. Minisatellitler genomda 4–20 kb büyüklüğü arasında değişen ve çoklu lokus problarıyla hibridize olan markörlerdir (54). Tekrar ünitelerinin sayılarındaki varyasyon nedenleri arasında eşit olmayan krossing-over veya gen dönüşleri (gene conversion) ana nedenler arasında görünmektedir. Minisatellit bölgelerindeki yüksek mutasyon oranları polimorfizm oranlarını artırmakta ve popülâsyonlardaki bireylerin çoklu lokus profillerini farklılaştırmaktadır (55). Minisatellitlerin temel avantajları yüksek polimorfizm ve tekrarlanabilirliktir. Benzer büyüklükte elde edilen DNA parçacıkları homolog olmama ihtimali ve band profillerinin lokuslar veya alleller açısından yorumlanamaması dezavantajları arasında sayılabilir.

Genomda bir lokusta arka arkaya gelen rastgele tekrar dizilerine kısa ardışık tekrarlar (STR-“Short Tandem Repeat”) denilmektedir. STR’lerin 1–6 bç tekrarlarından oluşmuş markörlere mikrosatellit markörler veya basit dizi tekrarları (SSR-“Simple Sequence Repeat”) olarak isimlendirilmektedir (56,57). Genomda 9–100 bç arasında değişen rastgele dizi tekrarları ise minisatellit markörler veya değişken ardışık nükleotid tekrarlar (VNTR-“Variable Number of Tandem Repeats) olarak tanımlanmaktadır. Mikrosatellitlerin tekrar sayısı genelde 100’den minisatellitlerin tekrar sayısı ise 1000’den daha azdır (57). Mikrosatellitler prokaryot ve ökaryot genomun herhangi bir

bölgesinde bulunabilmektedir. Prokaryotlarda birçok biyolojik fonksiyona sahip olduğu halde ökaryot hücrelerde rolü tam olarak bilinmemektedir (58).

Son zamanlarda, *B. melitensis ve B. suis* genomik sekansları tam olarak yayınlanmıştır (59). Fakat *B. abortus*'un genomik sekansları henüz tamamlanmıştır (60). Bu verileri aramak için yararlı olabilir ve DNA sekansının değişken bölgeleri teşhis, tanımlama ve farklılaşmaları belirlermeyi mümkün kılmıştır.

2.9. Tedavi

Bruselloz tedavisi antimikrobik tedavi, istirahat, semtomatik tedavi ve destek tedavisi olmak üzere dört bölümde ele alınabilir.

Antimikrobik tedavi semptomları hafifletir, hastalığın seyrini kısaltır, kimi kez yaşamıda tehdit edebilen komplikasyonların görülme sıklığını ve şiddetini azaltır (6,7,61). Brusella bakterileri Retikulo Endotel sistem (RES) organlarına (dalak, karaciğer, lenf bezleri, kemik iliği) ve fagositoz yapan hücreye yerleşip çoğalan patojenlerdir. Bu özellikleri ankor ve antibiyotik etkilerinden korunmalarını sağlar. Bu nedenle antimikrobik kemoterapide mutlaka hücre icine penetre olabilen antimikrobik ajanlar kullanılmalı ve nüksün önlenmesi amacıyla tedavi süresi uzun tutulmalıdır.

Ateş düşene kadar yatak istirahati şarttır. Akut ağır seyirli buruselloz vakaları mutlaka hastaneye yatırılarak tedavi edilmelidir.

Kas iskelet sistemi bulguları gösteren hastalarda nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların kullanılması semptomatik rahatlamayı sağlar.

Özellikle çok ağır seyirli vakalarda bozulan sıvı-elektrolit dengesi mutlaka korunmalı, malnütrasyon durumlarında protein, enerji ve vitamin gereksinimleri karşılanmalıdır. Destek tedavisi antimiksobik tedaviye yanıtı kolaylaştırı ve iyileşmeyi hızlandırır (61).

Brusellozda tedavi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün de önerdiği şekilde ikili, bazı durumlarda da üçlü kombine antibiyotik uygulanması şeklindedir. Tek antibiyotik kullanımının tedavi başarısızlığına yol açma nedenleri; hızlı direnç gelişimi ve bakterinin intraselüler olarak çoğalabilmesi nedeniyle tek ilacın yetersiz kalarak relapsa yol açmasıdır (6).

Brusella bakterilerine invitro etkili antibiyotikler tetrasiklinler, beta-laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ)

rifamisin ve fluorokinolonlardır. İnvitro etkili olmalarına karşın penisilinler, kloramfenikol, eritromisin, 1. ve 2. kuşak sefalosiporinler tedavide etkisizdir. Yapılan çalışmalarda Brusellalara karşı en etkili antibiyotiklerin tetrasiklinler olduğu ortaya konulmuştur. Tetrasiklinler brusella suşlarının büyük bir kısmını 0,1µg/ml'den düşük konsantrasyonlarda inhibe ederler. Klinikte yapılan ilk çalışmalar oral olarak kullanılan tetrasiklinin streptomisin+sulfadiazin kombinasyonundan da ha etkili ve daha az toksik olduğunu göstermiştir. (61).

Brusellozun klasik tedavisi tetrasiklin (oral, 2 gr/gün, 3-6 hafta) ve streptomisin (1 gr/gün, 2-3 hafta) olarak kabul edilmiştir. Bu tedavi ile nüks oranı %1-10 ortalama %2 civarında olup, tedavinin tekrarı ile şifa sağlandığı bildirilmiştir (61).

Brusella tedavisinde, antimikrobiyal tedaviye ilaveten hastanın semptomlarına yönelik olarak analjezik ve antiinflamatuvar ilaçlardan da yararlanılabilinir. Kortikosteroidler norobruselloz vakalarında, antimikrobiyal tedavinin yanında beyin ödemini gidermek, yapışıklıkları önlemek amacıyla önerilebilir (11,29).

2.10. Korunma

İnsanlarda brusellozun önlenmesi, evcil hayvanlarda brusellozun kontrolü ve eredikasyonuna bağlıdır. Bu sebebten veteriner hekimlerin ve tıb hekimlerinin işbirliği çok önemlidir (6). Hayvanlarda Brucella enfeksiyonundan korumak için yapılması gerenler;

2.10.1. Sürüye İnfeksiyonu Sokmamak

Süreye dışardan kontrolsüz ve muaynesiz herhangi bir çift tırnaklı hayvanı sürüye hatta yapılabilirse meraya koymamak gerekir.

2.10.2. Reaktörleri Elimine Etmek

Sürüde bulunan reaktör hayvanlar, serolojik testlerle belirlenerek sürüden ayrılmalı ve şartlı kesime sevk edilmelidir.

2.10.3. Hijyenik Tedbirler

Hastalar sürüden çıkarıldıktan sonra barınaklar iyi bir dezenfeksiyona tabi tutulur. Kontamine materyallerin yok edilmesi infekte sütler kullanılmamalıdır (3,12).

2.10.4. Hayvanları Bağışık Kılmak

Brucellosis infeksiyonlarında doğal direnç ve aşılamak süretiyle bağışıklık oluşmaktadır. Ergin sığırlar infeksiyona karşı değişik derecelerde doğal bağışıklıga sahiptirler. Hayvanlar genellikle bir yada iki defa yavru atarlar ve doğal bağışıklık kazanırlar. fakar bu hayvanlar portör olarak kalırlar. Günümüzde burcellaya karşı çok sayıda aşı bulunmaktadır. Brucella aşılarını iki büyük kategoride tanımlamak mümkündür.

2.10.4.1. Aglutinojen Aşılar

İnaktif ve canlı olmak üzereiki şekilde hazırlanmaktadır. İnaktif aşılar içersinde H38 aşısı en yaygın olanıdır. *B. melitensis* suşundan elde edilmiş adjuvantlı bir aşı olup özellikle koyun ve keçi gibi küçük ruminantların aşılanmasında kullanılmaktadır. Canlı aşılar içersinde en yaygın olan ise S19 aşısıdır. S-formundaki *B. abortus* S19 suşunun süspansiyonundan ibaret bir aşıdır. Hayvanlar 4- 6 aylıkken aşılanmalıdır. Bundan başka attenüe edilmiş *B.melitensis*'den hazırlanan immunojen gücü yüksek ve daha çok koyun ve keçilerin aşılamalarında kullanılan Rev-1 aşısı bulunmaktadır. Aglutinojen aşılar iyi bir immunojen güce sahip oldukları gibi uzun süre bağışıklık da sağlarlar. Fakat bu aşılar, aşılı bir organizmada aglutinasyon veren antikorların oluşmasına neden olurlar. Bu durum profilaksi yönünden sakınca yaratmaktadır (3).

2.10.4.2. Aglutinojen Olmayan Aşılar

Genellikle çeşitli fiziko-şimik yöntemlerle inaktive edilmiş ve R formundaki bakterilerden hazırlanmışlardır. Bu gibi aşılar proflaksi yönünden, serolojik testleri etkileyecek aglutinasyon veren antikor oluşturmadıkları için yarar sağlarlar. Bu amaçla ilk sırada önerilen 45/20 R aşısı bulunmaktadır. Bu aşı R formunda öldürülmüş *B. abortus* suşunun yağlı adjuant içindeki emülsiyonudur. Özellikle sığırlarda kullanılmaktadır. son zamanlarda S 19 aşısı yerine, bakterilerin aglutinojen site'lerinin tümünü hiperimmun serunla saturasyonu ile P.B. adı verilen aglutinasyon antikoru oluşturmayan yeni bir aşı geliştirilmiştir (3).

Özellikle kırsal kesimde yaşayan halk bilinçlendirilmeli, çiğ sütten peynir ve yağ yapımı önlenmelidir. Sütün paztörize edilerek tüketilmesi, peynirlerin salamura yapılıp

teneke üzerinde ve satış yerlerinde yapılış tarihlerinin belirtilmesi, infeksiyonun epidemik olduğu yörelerde kaşar ve tulum peynirinin tüketilmemesi önerilir. Hastalığın temas yoluyla bulaşanı önlemek için; mezbaha işçileri, Veteriner Hekimler, hayvan sağlık teknisyenleri, hayvan bakıcıları, et paketleyicilerinin hayvan atıkları ile temas etmemeleri ve eldiven giymeleri önerilmektedir (6).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile Bölgemizde *Brucella* klinik izolatlarının klonal ilişkilerini ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğini araştırmayı amaçladığımız çalışmamıza, 2013-2014 yıllarındaAdana Veteriner KontrolEnstitüsü Müdürlüğü laboratuvarına bağlı bulunan 9 ilden gelen Bruselloz şüpheli 51 keçi, 49 koyun ve 18 sığıra ait fötal dokular (dalak, karaciğer, akciğer) ve fötus mide içeriği ile plesanta (özellikle kotiledonlar), vaginal atık ve sıvı örneklerinden izole edilen ve fenotipik olarak tür identifikasyonları Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarında bulunan VITEK 2 (BioMerieux, Durham, North Carolina, USA) otomatize sisteminde, biyotip tayinleri de İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarında yapılan 118 *Brucella spp.* izolatı dahil edildi.

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Brucella Referans Laboratuvarında biyotiplendirme; CO_2 gereksinimi, H_2S üretimi, Christensen's üre agar ve Rustagian-Stuart üre buyyondaki üreaz aktivitesi, 20 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonda bazik fuksin (Sigma-B 0904, ABD) ve tiyonin (Merck, Almanya) içeren besiyerinde üreme (boya duyarlılık testi), Tbilisi (Tb) ve Berkeley (Bk) fajı ile lizis ve monovalan A ve M antiserumlarıyla aglütinasyon testlerini içeren klasik biyotiplendirme şeması kullanılarak tiplendirildi. *B. melitensis* (bv 1: 16M, ATCC 23456; bv 2: 63/9, NCTC 10508; bv 3: Ether, NCTC 10505), *B. abortus* (bv 1: 544, ATCC 23448; bv 2: 86/8/59, NCTC 10501; bv 3: Tulya, ATCC 23448), *B.suis* 1330 bv 1 (NCTC 10316) ve *B.melitensis* Rev-1 referans suşları tür ve biyotip tayininde kontrol suşları olarak kullanıldı.

İzolatların tür düzeyinde genotipik identifikasyonu ve arasındaki klonal ilişkinin moleküler olarak incelenmesi Ç.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında Multi Locus Variable Tandem Repeat Analysis (MLVA) ve Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile yapıldı.

3.1.1. İzolatlar

Brusellöz şüpheli büyük ve küçükbaş hayvanlara ait atık (abort) örneklerinden izole edilerek Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarında bulunan VITEK 2 (BioMerieux, Durham, North Carolina, USA) otomatize sisteminde tür düzeyinde identifikasyonları ve İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuarında da biyotip tayinleri yapılan 118 *Brucella spp.* izolatı mikrobanklarda -80°C'de saklandı ve gerektiğinde kültür ortamında çoğaltıldı.

3.1.2. Kültür Ortamında Çoğaltma

Her örnek ikişer adet Brusella selektif agar besiyerine ekilerek, biri aerobik şartlarda, diğeri ise %10 CO_2 içeren etüvde 4 gün süre ile 37ºC'de inkube edildi. Dördüncü günde koloni oluşumu olmazsa tekrar inkubasyona bırakılarak 8-10 gün sonra kontrol edildi.

Üreme sonrasında mikroskobik inceleme ile gram negatif olarak tespit edilen izolatların tür identifikasyonu VITEK 2 (BioMerieux, Durham, North Carolina, USA) otomatize sisteminde kullanıcı talimatları doğrultusunda incelendi.

3.1.2.1. Brusella Selektif Agar Besiyeri

Besiyerinin hazırlanması aşağıdaki gibidir:

3.1.2.1.1. Brucella Medium Base (CM0169-Oxoid, Lot:1337100 İngiltere)

Pepton	:10 gr
Lab-Lemco tozu	: 5 gr
Glukoz	: 10 gr
Sodyum Klorid	: 5 gr
Agar	: 15 gr

45 gr Brucella medium Base 1 lt distile suda eritilerek hazırlandı. PH 7,4'e (+0,2; -0,2) ayarlarlanarak otoklavda 121ºC'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklavdan çıkan besiyerine 56ºC'de Brucella Sellective Supplement (SR0083A-Oxoid) ilave edildi. Daha sonra besi yerine 45-50ºC'de % 7 At serumu (GE Healthcare, PAA, Avusturya) ilave edildi. Ilıkken petri kutularına 12,5'er ml döküldü.

3.1.2.1.2. Brucella Selective Supplement (SR0083A-Oxoid)

Polymyxin B (as SO4)	: 2.500 IU	Nalidxxic acid	: 2,5 mg
Bacitracin	: 12.500 IU	Nystatin	: 50.000 IU
Cycloheximide	: 50 mg	Vancomycin (as HCl)	: 10 mg

1:1 Methanol:Steril distile su oranında 10 ml hazırlandı. 15 dakika 37ºC'de bekletidi.

3.1.2.1.3. At serumu

At serumu (GE Healthcare, PAA, Avusturya, lot:B12211-2820) 56ºC'de yarım saat su banyosunda çözürüldü. Otoklavdan çıkan besiyeri 45-50ºC'ye soğutuldu ve steril % 7 at serumu ilave edildi.

3.2. Genotipik İnceleme

Brucella izolatlarının biyotiplendirme ile yapılan tür düzeyinde identifikasyonu PCR ile doğrulandı.

3.2.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu

Brucella izolatları 2ml (10 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA) TE buffer içerisinde McFarland 5 bulanıklık ayarına göre ayarlandı. Öncelikle -20°C'de donduruldu. Sonra süspansiyon 95°C'de 10 dakika kaynatıldı ve 13000 g x10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernant PCR'da DNA ekstraktı olarak kullanıldı.

3.2.2. AMOS-ERY-PCR Yöntemiyle Brucella İzolatlarının Tür Düzeyinde İdentifikasyonu

Çalışmaya dahil edilen 118 izolata ait DNA ekstraktları kullanılarak tür identifikasyonuna yönelik PBa, PBm, PBo, PBs, PIS711, ERY1 ve ERY2 primerleri ile multipleks PCR uygulandı (Çizelge 3.1) (62). Referans suş olarak B.melitensis 16M ve B.abortus S19 suşları kullanıldı.

3.2.2.1. AMOS-ERY-PCR Yönteminin Uygulanması

Her bir örnek için aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı:

PCR master mix 2X (Thermo Scientific)	: 12,5 µl
Saf su	:10,18 µl
Primer PIS711 100pmol/µl	:0,28 µl
Diğer Primerler 100pmol/µl	:0,04 µl
Genomik DNA	:2 µl
Toplam hacim	:25 µl

Çizelge 3.1. AMOS-ERY-PCR primer dizileri (62)

Primer	Gen dizilimi 5'-3'
PBa	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC
PBm	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA
PBo	CGGGTTCTGGCACCATCGTCG
PBs	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTCAGG
PIS711	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT
ERY1	CGCCTGCGTGACCTCCAGCTTACCC
ERY2	GGCCATGACACGCGGCATATAACC

Hazırlanan karışım PCR döngülerini gerçekleştirmek amacıyla termal döngü cihazına (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Thermal Cycler) alındı ve ısı döngüleri aşağıdaki şekilde ayarlandı:

Ön denatürasyon	95°C 10 dk	
Denatürasyon	94°C 30 sn	30 döngü
Bağlanma	60°C 30 sn	
Uzama	72°C 2 dk	
Son uzama	72°C 2 dk	

Elde edilen amplikonlar 1 µg/ml etidyom bromid içeren % 1'lik agaroz jelde yürütüldü. Tank güç kaynağına (Bio-rad) bağlandı ve 100 volt akımda 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra DNA bantları jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 1500 Imaging System ayrım gücü: 1708X1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) ile incelendi.

3.2.3. Klonal İlişkinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Klonal İlişkinin Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Yöntemi ile Belirlenmesi

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile belirlenmesi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. İdentifiye edilen izolatları saf olarak elde etmek için %5 koyun kanlı besiyerine ekimleri yapıldı ve 4 gün süre ile 37ºC'de inkube edildi. Referans suş olarak *B.melitensis 16M* ve *B.abortus S19* suşları kullanıldı.

3.2.3.1.1. PFGE'de Kullanılan Solüsyonlar

PFGE analizinde kullanılan solüsyonların hazırlanışı ve yöntemin uygulanışı aşağıdaki gibidir:

Hücre Süspansiyon Tamponu (pH=8.0)

NaCl (SIGMA N-9888) : 5,844gr

Tris-HCl (SIGMA T-3253) : 0,1576 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) : 0,3722 gr

Ultrapure su ile 100ml'ye tamamlandı ve pH 8.0'a ayarlandı.

Lizis Solüsyonu (pH=8.0)

Trıs-HCl (SIGMA T-3253) : 0,788 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) : 1,861 gr

N-lauryl-Sarcosine (AMRESCO 0719-500) : 1 gr

Ultrapure su ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH 8.0'a ayarlandı. Her örnek solüsyonuna Proteinaz K (1 mg/ml) eklendi.

10xTE Solüsyonu (pH=7,6)

Tris-HCl (SIGMA T-3253) : 1,576 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) : 0,372 gr

Ultrapure su ile 100 ml'ye tamamlandı.

10xTBE Solüsyonu (pH=8,4)

Tris-base (SIGMA T-1503) : 108 gr

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500) : 55 gr

EDTA (AMRESCO 0105-500) : 7,44 gr

Ultrapure su ile 1000ml'ye tamamlandı.

3.2.3.1.2. Örneklerin Hazırlanması

Brucella olarak identifiye edilerek toplanan örneklerden taze saf koloni elde etmek için %5 koyun kanlı agar kullanıldı. Saklamak için ise kanlı brain heart infusion broth ve yumuşak dik jelöz besiyerleri kullanıldı.

%5 Koyun Kanlı Agar Besiyeri

Kanlı agar (LAB M MC2) : 45gr

Et ekstresi (MERCK 1.03979) : 10gr

Pepton (DIFCO 63928JB) : 10gr

NaCl (MERCK 2.06400) : 5gr

Agar (LAB M MC2) : 15gr

Hazırlanan karışım suda ısıtılarak eritildi ve 950 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 15 dakika steril edildi. Besiyerinin içine soğumaya yakın 50 ml koyun kanı ilave edildi. 15-18 ml olarak 9cm'lik petri plaklarınaa dağıtıldı.

Kanlı Brain Heart InfusionBroth

Calf Brain : 200 gr/L

Beef Heart : 250 gr/L

Proteose Peptone : 10 gr/L

Dextrose : 2gr/L

Sodium Chloride : 5 gr/L

Disodium Phosphate : 2,5 gr/L

Hazır olarak bulunan ve yukardaki maddeleri içeren Brain heart İnfusion Broth hazırlandı. Brain Hearth Infusion Broth'un %10'u kadar gliserol hazırlandı. İkisi ayrı

ayrı 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Otoklavdan çıktıktan sonra ikisi karıştırıldı. Karışıma soğumaya yakın %7 oranında koyun kanı ilave edildi ve karışım ependorflara dağıtılır.

Yumuşak Dik Jelöz

Et ekstresi (MERCK1.03979)	: 0,3 gr
Pepton (DIFCO63928JB)	: 1 gr
NaCl (MERCK1.06400)	: 0,5 gr
Distile su	: 100 ml
Agar (LAB M MC2)	: 1 gr

Karışım 121°C' de 15 dakika otoklavda steril edildi. Tüplere dik olarak döküldü ve donmaya bırakıldı.

3.2.3.1.3. PFGE Yönteminin Uygulanması

1. Saf kültür halinde üreyen koloniler öze ile 2 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi. Bakteri yoğunluğu McFarland 7 olarak ayarlandı (Densitometer-Biosan, Letonya).

2. HST'den alınan 9 ml içerisinde 0,2 gr low metling agar (BIO-RAD 161-3113EDU) eklendi ve mikrodalga fırında eritildi (BEKO MD1505).Üzerine 1ml %10 SDS eklendi.

3. Bu karışımdan 150µl ependorf tüplere dağıtıldı ve 55°C'deki kuru ısı bloğunda beklemeye alındı.

4. Daha sonra bakteri süspansiyonundan 150µl alınarak, bekleyen 150µl agaroz-SDS karışımı ile pipetaj aracılığı ile homojen olarak karıştırıldı.

5. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından agaroz kalıp aparatına dağıtıldı. Kalıplar agaroz katılaşıncaya kadar +4°C'de bekletildi.

6. Her agaroz kalıp için 0,5 ml Lizis solüsyonu hazırlandı. Lizis solüsyonuna alınan kalıplar 56°C'de bir gece çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi (Memmert Wne-14 Waterbath).

7. Daha sonra her örnek 4ml TE tamponunda buz üzerinde her yıkama 1 saat olmak üzere 5 kez buzdolabında bekletilerek yıkandı.

8. Son olarak örnekler +4°C'de saklandı.

9. Agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesildi.

10. Parçalardan biri, 100µl 1x uygun enzim tamponu içine alınarak buz üzerinde 45 dakika bekletildi. Daha sonra bu tampon boşaltıldı.

11. Her agaroz kalıbı için enzim karışımı hazırlandı.

12. 30U XbaI içeren 100 µl buffer eklenerek ve 45 dakika buz üzerinde bekletildikten sonra bir gece 37°C'de restriksiyon yapıldı.

13. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

14. Enzimle kesilen kalıplar %1'lik PFGE agaroza yüklendi.

15. Sonra 2 litre 0,5x TBE buffer hazırlandı. İçerisinden 100 ml ayrılarak kalan tampon elektroforez tankına döküldü.

16. Ayrılan 100 ml tampon içine 1,1 gr pulsed-field certified (Bio-Rad) agaroz eklenerek %1,1'lik agaroz hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi.

17. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı. Uygun enzim ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirildi.

18. Tarağın kenar ve ortasındaki dişlerine marker (Lambda Ladder PFGE Marker) kalıplar yüklendi ve agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

19. Agaroz dikkatli ve yavaş bir şekilde hava kabarcığı oluşturmadan kaset içine döküldü.

20. Oda ısısında 20 dakika katılaşmaya bırakıldı. Dikkatlice tarak çekildi ve elektroforez tankına yerleştirildi.

21. Daha sonra CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez koşulları ayarlandı (Swich time: 0.5-10s, 24 saat, 6V/cm, 14°C, 0.5xTBE).

22. Elektroforezden sonra jel, 5µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml ultra pür su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Boyadan sonra dekolorizasyon için jel, 500 ml saf su içerisinde 10 dakika bekletildi.

23. UV ışığı altında görüntülendi. Gel Logic 1500 Imaging System (ayırım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.



Şekil 3.1. PFGE tankı ve soğutucu.



Şekil 3.2. Gel logic 1500 imaging system

3.2.3.1.4. PFGE Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen PFGE bant profillerinin, Gel Compar II version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) yazılım programı kullanılarak, Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ile dendrogramı oluşturuldu. Suşlar arasındaki ilişki bantlara dayalı "Dice" benzerlik katsayısına göre, bant ve profil toleransı %1.5 alınarak hesaplandı. %85 bant benzerliği olan suşlar klonal ilişkili bir küme olarak değerlendirildi ve kümeler büyük harf (A, B, C ve s.) ile isimlendirildi.

3.2.3.2. Klonal İlişkinin Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) Yöntemi ile Belirlenmesi

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin Multi Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis-16 (MLVA-16) yöntemi ile belirlenmesi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Yöntem için identifiye edilen

izolatlardan elde edilen DNA ekstraktı kullanıldı. Hedeflenen lokusların tespiti için literatürde belirtilen primerler sentezlendi (63,64). Referans suş olarak *B.melitensis 16M* ve *B.abortus S19* suşları kullanıldı.

3.2.3.2.1. MLVA Yönteminin Uygulanması

Her bir suşa özgü 16 lokusun VNTR sayısının belirlenmesi için 4'ü dubleks (Bruce6-12, Bruce45-55, Bruce8-42 ve Bruce11-43), 8'i singlepleks (Bruce4, Bruce7, Bruce9, Bruce16, Bruce18, Bruce19, Bruce21 ve Bruce30) olmak üzere 12 PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Çizelge 3.2) (65). PCR için reaksiyon karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

Dubleks PCR		PCR	
dH2O	: 8,5µl	dH2O	: 8,5µl
2X PCR Master mix	: 12,5 µl	2X PCR Master mix	: 12,5 µl
PrimerF1	: 0,25 µl	PrimerF	: 0,5µl
PrimerR1	: 0,25 µl	PrimerR	: 0,5µl
PrimerF2	: 0,25 µl	DNA	: 3 µl
PrimerR2	: 0,25 µl	Toplam	: 25 µl
DNA	: 3 µl		
Toplam	: 25 µl		

Çizelge 3.2. MLVA-16 yönteminde kullanılan primer dizileri

Allel Adı	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
Bruce04	CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	CGATCTGGAGATTATCGGGAAG
Bruce06	ATGGGATGTGGTAGGGTAATCG	GCGTGACAATCGACTTTTTGTC
Bruce07	GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAAA
Bruce08	ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC
Bruce09	GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG
Bruce11	CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG
Bruce12	CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC
Bruce16	ACGGGAGTTTTTGTTGCTCAAT	GGCCATGTTTCCGTTGATTTAT
Bruce18	TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG
Bruce19	GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT
Bruce21	CTCATGCGCAACCAAAACA	GATCTCGTGGTCGATAATCTCATT
Bruce30	TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG
Bruce42	CATCGCCTCAACTATACCGTCA	ACCGCAAAATTTACGCATCG
Bruce43	TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCCTGCCCATAAAC
Bruce45	ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG
Bruce55	TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT

Hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdaki thermal cycler'da aşağıda belirtilen ısı, döngü, süre ve sayısında amplifiye edildi:

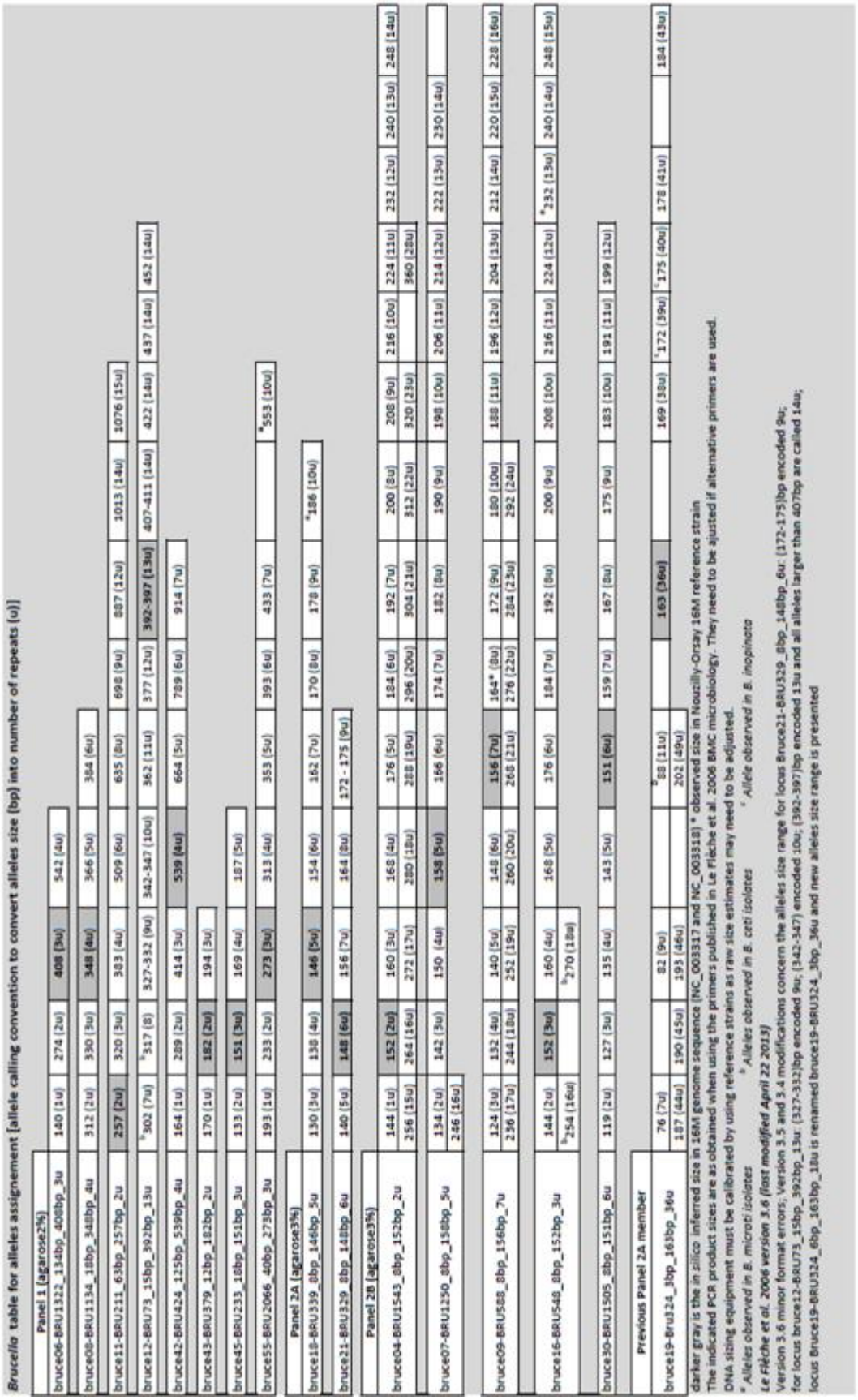
96° C 5dak.
96° C 30 sn.
60° C 30 sn. } 30 siklus
72° C 1dk.
72°C 5 dak.
+4 °C ∞

Amplikonlar büyüklüklerine göre 100 Voltta, 2-4 saat, etidyum bromürlü %2,5-4,5'lik agaroz (SIGMA) jel elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel görüntüleme sistemi (ayırım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) ile görüntülendi. Bant büyüklüğünün tespitinde 10 ve 50bp'lik marker (TrackIt-İnvitrogen, Fermentas) kullanıldı.

3.2.3.2.2. MLVA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Elde edilen MLVA bantları büyüklükleri ve tekrar sayıları MLVA databazında yayımlanan çizelgeye göre belirlendi (http://mlva.u-psud.fr/brucella/spip.php?article93 Erişim tarihi: 21.10.2014) (Çizelge 3.3). Oluşan bant profilleri http://insilico.ehu.es/dice_upgma/ (Erişim tarihi: 16.04.2015) sitesi kullanılarak, Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ve şuşlar arasındaki ilişki bantlara dayalı "Dice" benzerlik katsayısına göre değerlendirildi ve dendrogram oluşturuldu. % 80 bant benzerliği olan suşlar klonal ilişkili bir küme olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.3. MLVA-16 yöntemi ile allel belirlenmesi için tekrarlanan ünite sayıları ve amplikon büyüklükleri (http://mlva.u-psud.fr/brucella/spip.php?article93)



Brucella table for alleles assignement [allele calling convention to convert alleles size (bp) into number of repeats (u)]

| | | |

4. BULGULAR

Bölgemizde *Brucella* klinik izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin MLVA ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile tespit edilmesi ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yaptığımız çalışmada, fenotipik olarak biyotiplendirilmiş olan 118 hayvan kaynaklı *Brucella* izolatı AMOS-ERY-PCR yöntemiyle tür düzeyinde identifiye edildikten sonra genotipik ilişkileri PFGE ve MLVA-16 yöntemleri ile araştırıldı.

Fenotipik identifikasyon ve biyotiplendirme sonucunda izolatlardan 26'sı (%25.7) Rev-1 aşı suşu, üçü (%3.0) biovar 1, 72'si (%71.3) de biovar 3 olmak üzere 101'inin (%85.6) ***B. melitensis***, üçü (%17.6) biyotiplendirilememiş, 14'ü (%82.4) de biovar 3 olmak üzere 17'sinin (%13.4) ise ***B. abortus*** olduğu belirlenmiştir.

AMOS-ERY-PCR ile izolatların 101'i ***B. melitensis***, 17'si de ***B. abortus*** olarak tespit edildi ve biyotipleme sonuçları ile aynı olduğu görüldü.

İzolatların klonal ilişkisinin PFGE yöntemi ile incelenmesi sonucunda; ***B. melitensis*** izolatlarının tamamı %92.9'un üzerinde birbiriyle benzerlik göstererek A kümesi içerisinde 17 alt kümede (A1-17), ***B. abortus*** izolatları da kendi aralarında %94.9'un üzerinde benzerlik göstererek B kümesi içerisinde 4 alt kümede (B1-4) değerlendirildi. Sonuç olarak, toplam 21 genotip tespit edildiği ve ayırt edici gücünün yüksek olduğu (HGDI=0,899) görüldü (Şekil 4.1, Çizelge 4.1 ve 4.5).

PFGE yöntemi ile, ***B. melitensis*** izolatları içerisinde en baskın genotipin 29 (%28.7) izolatla A5 olduğu, onu 13'er (%12.9) izolatla A6 ve A15 olduğu, ***B. abortus*** izolatlarında ise 11 (%64.7) izolatla B2'nin baskın olduğu tespit edildi. Böylece, 26 B. melitensis Rev-1 aşı izolatının yarısının A15 genotipinde toplandığı görüldü (Şekil 4.1, Çizelge 4.1 ve 4.5).

Çizelge 4.1. PFGE yöntemi ile *Brucella* izolatlarının allel durumları ve HGDI değerleri

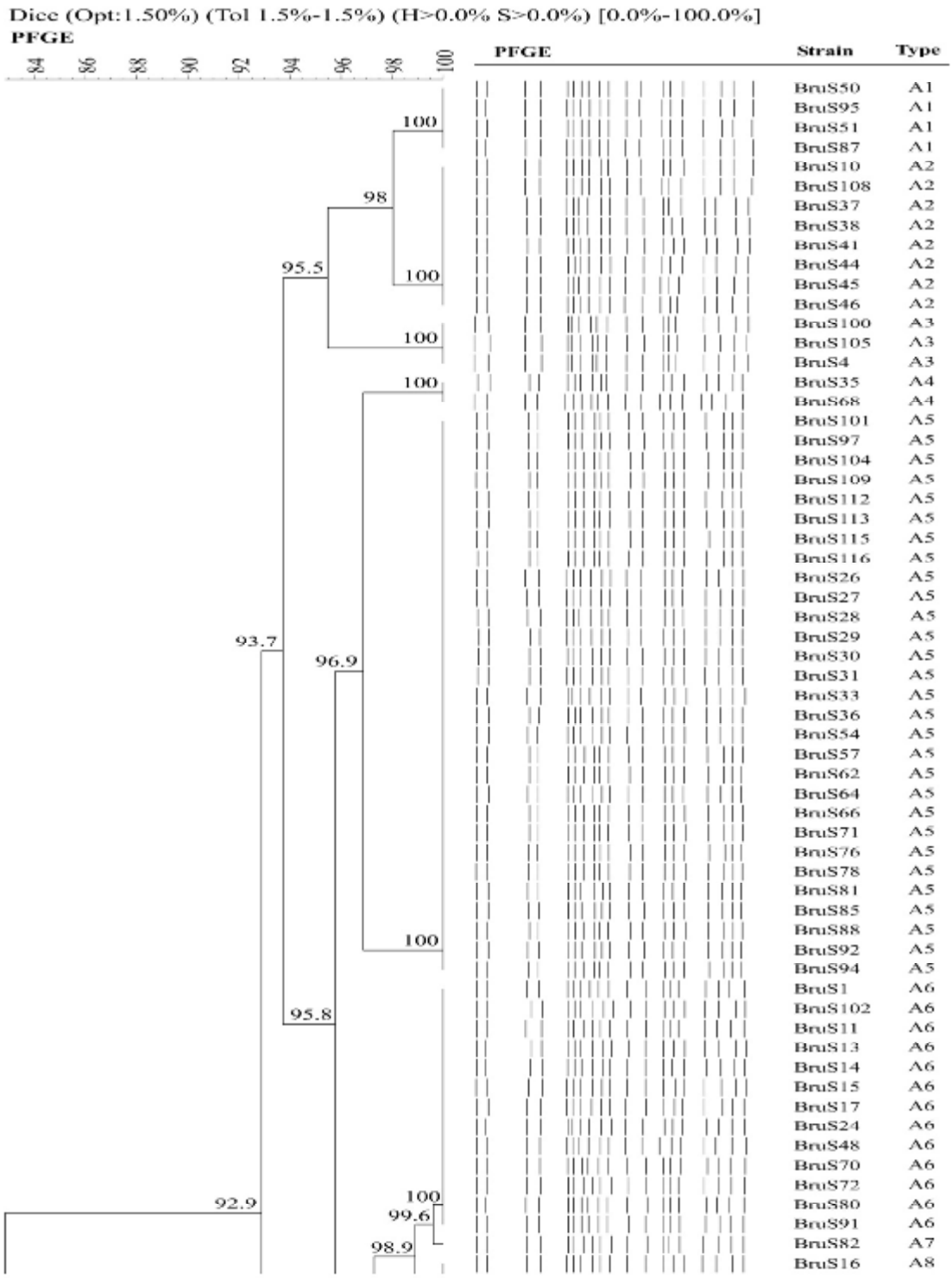
İzolat	İzolat Sayısı	Allel Sayısı	Allellere Ait İzolat Sayıları	HGDI*
B.melitensis	101	17	4,8,3,2,29,13,1,3,2,4,6,3,1,3,13,2,4	0,8737
B.abortus	17	4	3,11,1,2	0,5662
Brucella spp.	118	21	4,8,3,2,29,13,1,3,2,4,6,3,1,3,13,2,4,3,11,1,2	0,899

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

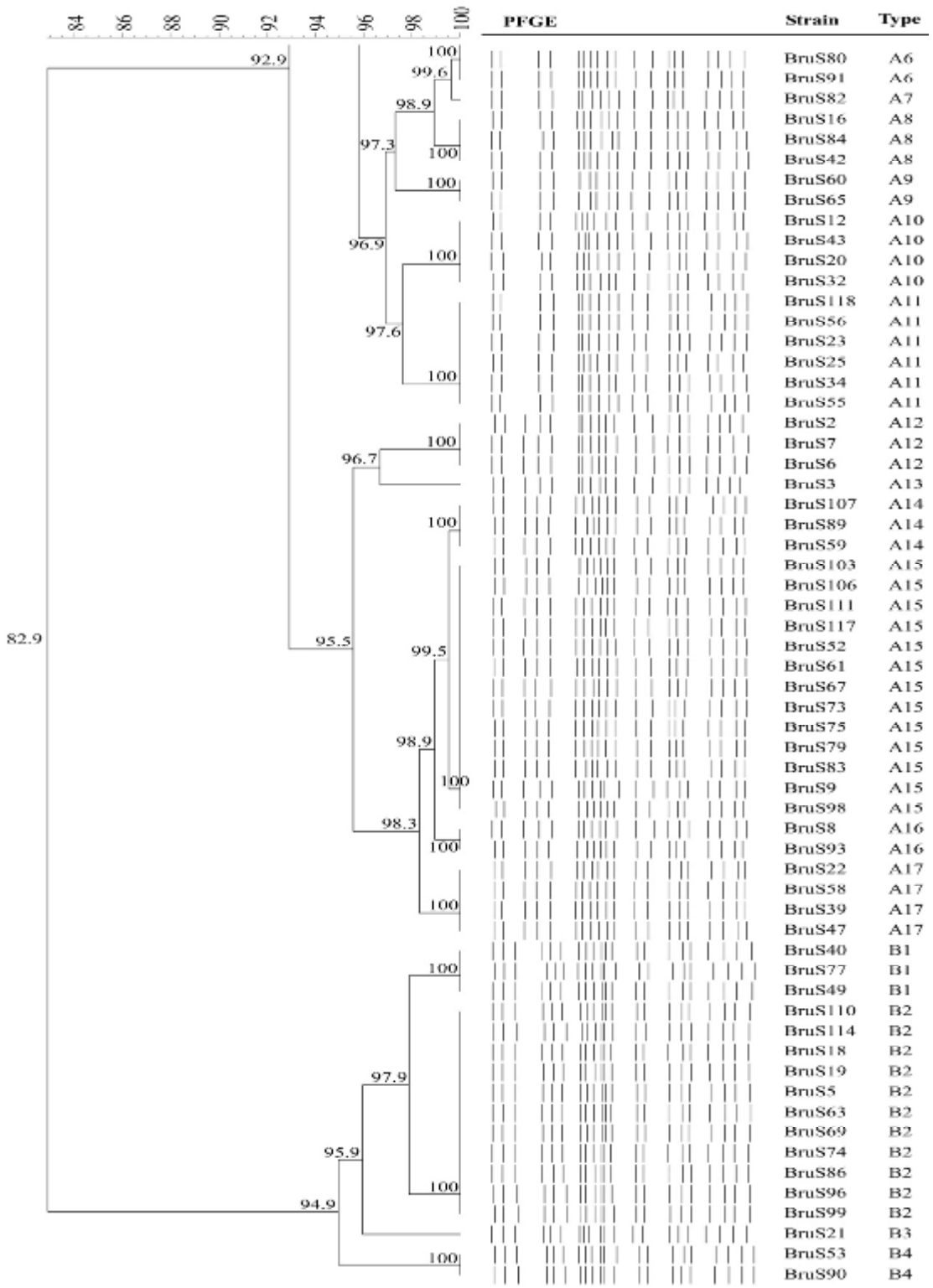
İzolatların klonal ilişkisinin MLVA-16 yöntemi ile incelenmesi sonucunda; toplam 28 genotip tespit edildi ve ayırt edici gücünün oldukça yüksek olduğu belirlendi (HGDI=0,9071). Bunlardan 23'ünün ***B. melitensis*** (HGDI=0,8816), 5'inin ise B. abortus'a (HGDI=0,6838) ait olduğu görüldü (Şekil 4.2, Çizelge 4.2-4.4). ***B. melitensis Rev-1*** aşı suşu olarak izole edilen 26 suşun tamamının MLVA profilinin aynı olduğu ve en baskın genotip olduğu, diğer izolatlarla %50'den fazla farklılık gösterdiği, ayrı-ayrı değerlendirildiğinde ise, diğer ***B. melitensis*** izolatları ile ancak %55, ***B. abortus*** izolatları ile de %60 benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.2 ve 4.3, Çizelge 4.5).

MLVA yönteminde 118 ***Brucella*** izolatı için Panel 1 ve Panel 1+2A'nın her ikisi ile de altı genotip (genotiplere ait izolat sayıları: 4, 1, 62, 8, 26 ve 17) tespit edildi ve HGDI değerleri 0,6544 olarak düşük bulundu. Panel 2B'deki lokusların ayırt edici güçlerinin daha yüksek olduğu ve HGDI değerlerinin 0,5312 ile 0,6555 arasında değiştiği, böylece, en ayırt edici lokusun Bruce04 (HGDI=0,6555) olduğu, onu da Bruce30 (HGDI=0,6532) ve Bruce16'nın (HGDI=0,6529) izlediği görüldü (Çizelge 4.4).

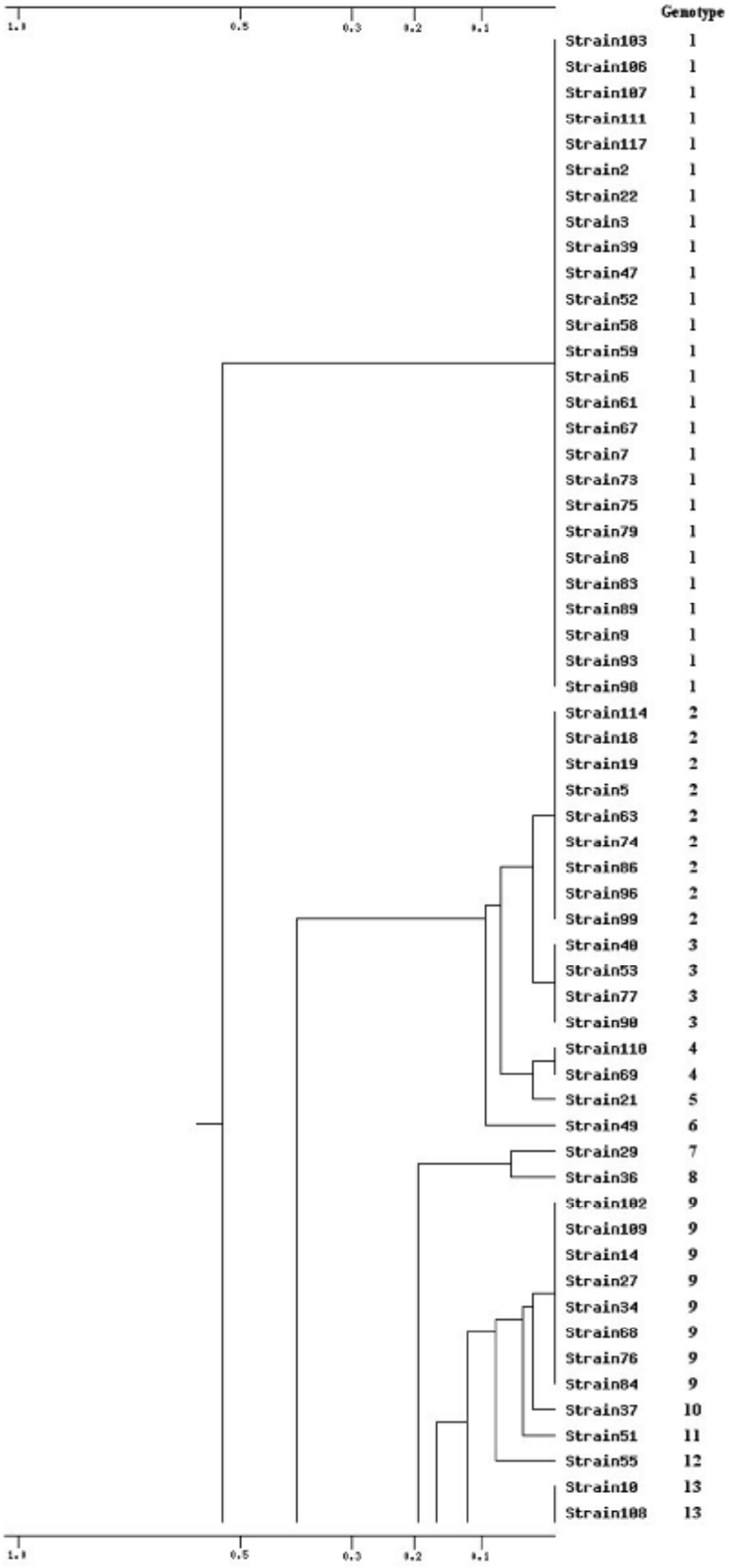
PFGE ve MLVA sonuçları birlikte değerlendirildiği zaman 51 genotip tespit edildiği ve ayırt edici gücünün çok daha yüksek olduğu (HGDI=0,9631) görüldü. MLVA sonucunda tek genotipte toplanan ***B. melitensis Rev-1*** aşı izolatlarının PFGE ile 6 genotipe ayrıldığı (A12-17), PFGE sonucunda A11 genotipinde toplanan 6 ***B. melitensis*** izolatının ise 5 MLVA genotipine (9, 12, 16, 20 ve 24) ayrıdığı tespit edildi. Sonuç olarak, en baskın genotipin hem MLVA 1 hem de PFGE A15 tiplerine ait olan genotip 3 (13 ***B. melitensis Rev-1*** aşı izolatı) olduğu, onu MLVA 16 ve PFGE A05 tiplerine ait olan genotip 31 (11 ***B. melitensis*** izolatı) ile MLVA 15 ve PFGE A05 tiplerine ait olan genotip 28'in (10 ***B. melitensis*** izolatı) takip ettiği belirlendi (Çizelge 4.5).



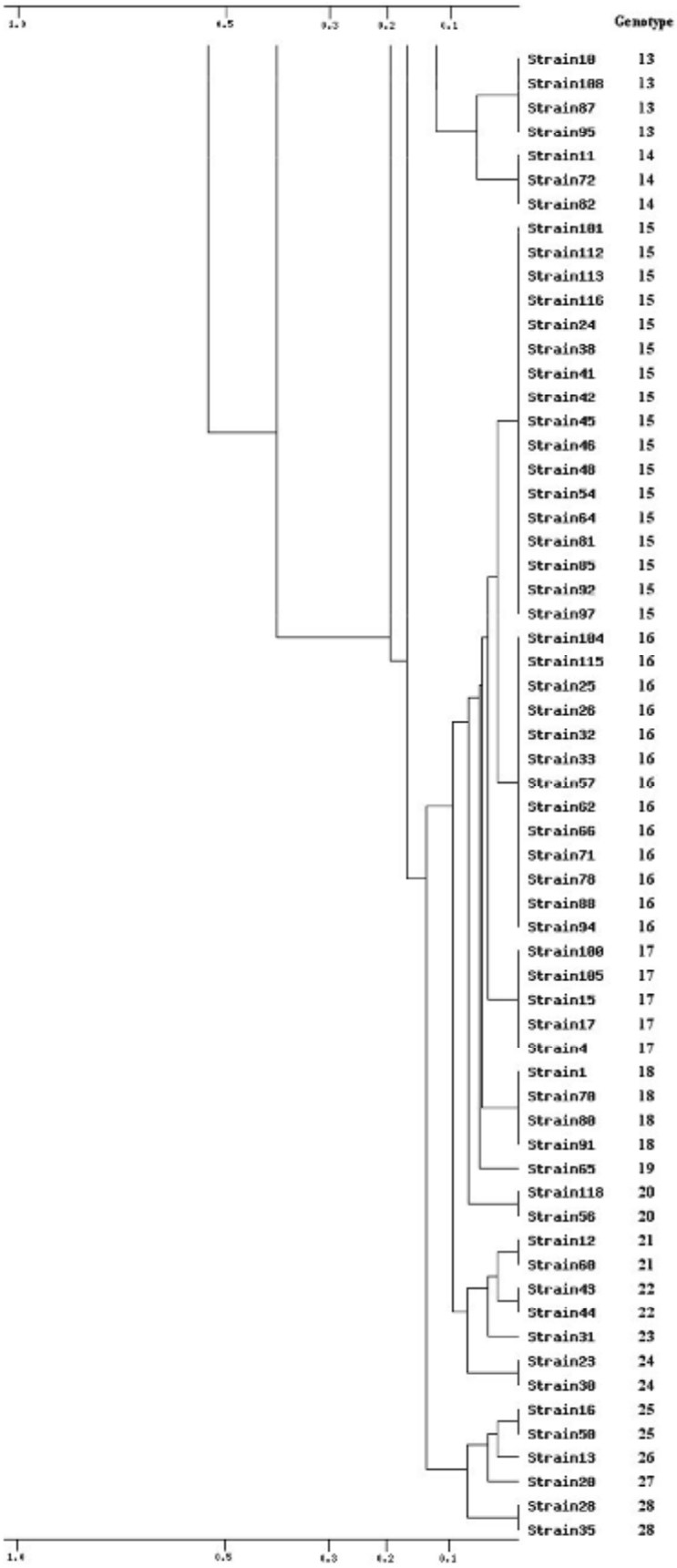
Şekil 4.1. PFGE bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı



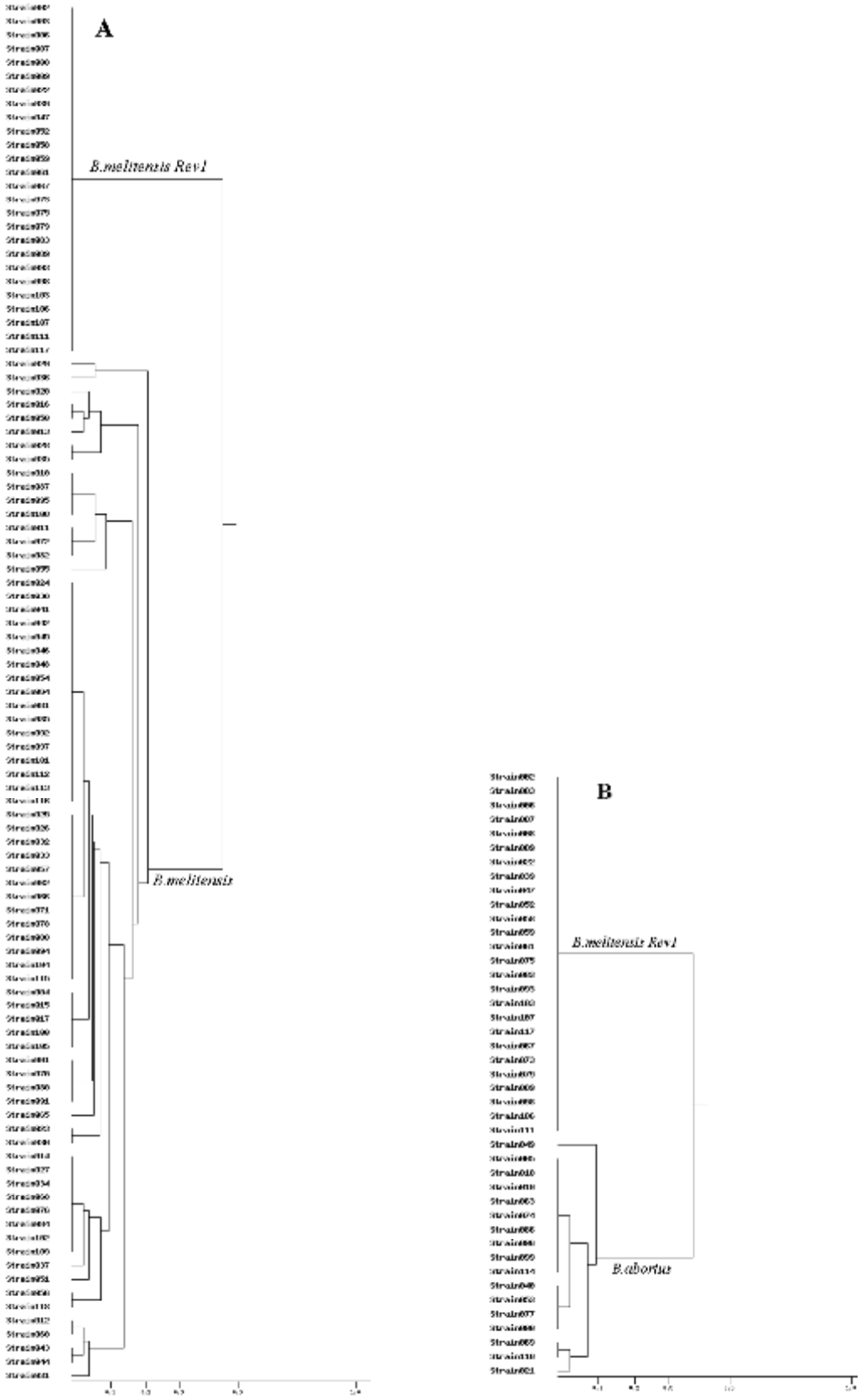
Şekil 4.1. Devamı. PFGE bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı



Şekil 4.2. MLVA-16 bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı



Şekil 4.2. Devamı. MLVA-16 bant profillerine göre 118 *Brucella* izolatının dendrogramı



Şekil 4.3. *B. melitensis Rev-1* izolatlarının; (A) diğer *B. melitensis* ve (B) *B. abortus* izolatları ile klonal ilişkilerinin MLVA dendrogramında gösterilmesi

Çizelge 4.2. MLVA-16 sonucunda 101 *B. melitensis* izolatının allel durumları ve HGDI değerleri

Lokus	Allel sayısı	Tekrar sayısı (izolat sayısı)	HGDI*
Panel 1			
Bruce 06	2	1(75), 2(26)	0,3861
Bruce 08	2	4 (30), 5(71)	0,4218
Bruce11	2	2(27), 3(74)	0,3956
Bruce12	1	13	0
Bruce42	2	3(75), 4(26)	0,3861
Bruce43	2	2(93), 3(8)	0,1473
Bruce45	1	3	0
Bruce55	2	2(75), 3(26)	0,3861
Panel 2A			
Bruce 18	2	4(75), 8(26)	0,3861
Bruce 19	2	36(26), 40(75)	0,3861
Bruce21	2	7(26), 8(75)	0,3861
Panel 2B			
Bruce 04	3	2(30), 3(44), 4(27)	0,657
Bruce 07	3	4(42), 5(55), 6(4)	0,5343
Bruce09	2	3(75), 4(26)	0,3861
Bruce 16	3	4(26), 5(28), 6(47)	0,6467
Bruce 30	3	3(16), 4(50), 5(35)	0,6158
Toplam	23**		0,8816

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

**Allellere ait izolat sayıları: 26,1,1,8,1,1,1,4,3,17,13,5,4,1,2,2,2,1,2,2,1,1,2.

Çizelge 4.3. MLVA-16 sonucunda 17 *B. abortus* izolatının allel durumları ve HGDI değerleri

Lokus	Allel sayısı	Tekrar sayısı (izolat sayısı)	HGDI*
Panel 1			
Bruce 06	1	2	0
Bruce 08	1	5	0
Bruce11	1	3	0
Bruce12	1	12	0
Bruce42	1	2	0
Bruce43	1	2	0
Bruce45	1	3	0
Bruce55	1	1	0
Panel 2A			
Bruce 18	1	6	0
Bruce 19	1	44	0
Bruce21	1	8	0
Panel 2B			
Bruce 04	1	2	0
Bruce 07	3	4(3), 5(1), 6(13)	0,4044
Bruce09	1	5	0
Bruce 16	1	5	0
Bruce 30	3	3(12), 4(1), 5(4)	0,4706
Toplam	5**		0,6838

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

**Allellere ait izolat sayıları: 9,4,2,1,1.

Çizelge 4.4. MLVA-16 sonucunda toplam 118 *Brucella* izolatının allel durumları ve HGDI değerleri

Lokus	**Allel sayısı**	**Tekrar sayısı (izolat sayısı)**	**HGDI***
Panel 1			
Bruce 06	2	1(75), 2(43)	0,4672
Bruce 08	2	4 (30), 5(88)	0,3824
Bruce11	2	2(27), 3(91)	0,3559
Bruce12	2	12(17), 13 (101)	0,2487
Bruce42	3	2(17), 3(75), 4(26)	0,5312
Bruce43	2	2(110), 3(8)	0,1275
Bruce45	1	3	0
Bruce55	3	1(17), 2(75), 3(26)	0,5312
Panel 2A			
Bruce 18	3	4(75), 6(17), 8(26)	0,5312
Bruce 19	3	36(26), 40(75), 44(17)	0,5312
Bruce21	2	7(26), 8(92)	0,3465
Panel 2B			
Bruce 04	3	2(47), 3(44), 4(27)	0,6555
Bruce 07	3	4(45), 5(56), 6(17)	0,6138
Bruce09	3	3(75), 4(26), 5(17)	0,5312
Bruce 16	3	4(26), 5(45), 6(47)	0,6529
Bruce 30	3	3(28), 4(51), 5(39)	0,6532
Toplam	28**		0,9071

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

**Allellere ait izolat sayıları: 26,9,4,2,1,1,1,1,8,1,1,1,4,3,17,13,5,4,1,2,2,2,1,2,2,1,1,2.

Çizelge 4.5. MLVA ve PFGE yöntemlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda belirlenen 51 genotipin 118 *Brucella* izolatına dağılımı

Genotip	MLVA-16 Tipi	Bru06	Bru08	Bru11	Bru12	Bru42	Bru43	Bru45	Bru55	Bru18	Bru19	Bru21	Bru4	Bru7	Bru9	Bru16	Bru30	PFGE Tipi	İzolat (Sayı)	Kaynak (Sayı)
1	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A12**	*B.melitensis Rev1*(3)	keçi(3)
2	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A13**	*B.melitensis Rev1*(1)	keçi(1)
3	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A14**	*B.melitensis Rev1*(3)	keçi(2), koyun(1)
4	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A15**	*B.melitensis Rev1*(13)	keçi(13)
5	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A16**	*B.melitensis Rev1*(2)	keçi(2)
6	**1**	2	4	2	13	4	2	3	3	8	36	7	2	4	4	4	5	**A17**	*B.melitensis Rev1*(4)	keçi(2), koyun(2)
7	**2**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	6	5	5	3	**B02**	*B.abortus*(9)	keçi(3), sığır(6)
8	**3**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	6	5	5	5	**B01**	*B.abortus*(2)	sığır(2)
9	**3**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	6	5	5	5	**B04**	*B.abortus*(2)	sığır(2)
10	**4**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	4	5	5	3	**B02**	*B.abortus*(2)	sığır(2)
11	**5**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	5	5	5	3	**B03**	*B.abortus*(1)	koyun(1)
12	**6**	2	5	3	12	2	2	3	1	6	44	8	2	4	5	5	4	**B01**	*B.abortus*(1)	sığır(1)
13	**7**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	2	4	3	6	5	**A05**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
14	**8**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	2	4	3	6	4	**A05**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
15	**9**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	5	**A04**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
16	**9**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	5	**A05**	*B.melitensis*(3)	koyun(3)
17	**9**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	5	**A06**	*B.melitensis*(2)	koyun(2)
18	**9**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	5	**A08**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
19	**9**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	5	**A11**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
20	**10**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	5	4	**A02**	*B.melitensis*(1)	sığır(1)
21	**11**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	4	3	6	4	**A01**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
22	**12**	1	5	**2**	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A11**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
23	**13**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	6	3	5	3	**A01**	*B.melitensis*(2)	koyun(2)
24	**13**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	6	3	5	3	**A02**	*B.melitensis*(2)	koyun(2)
25	**14**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	3	**A06**	*B.melitensis*(2)	koyun(2)
26	**14**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	3	**A07**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
27	**15**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A02**	*B.melitensis*(4)	koyun(3), sığır(1)
28	**15**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A05**	*B.melitensis*(10)	keçi(10)
29	**15**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A06**	*B.melitensis*(2)	keçi(2)
30	**15**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A08**	*B.melitensis*(1)	sığır(1)
31	**16**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	6	4	**A05**	*B.melitensis*(11)	koyun(10), sığır(1)
32	**16**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	6	4	**A10**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
33	**16**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	6	4	**A11**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
34	**17**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	6	3	**A03**	*B.melitensis*(3)	koyun(3)
35	**17**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	6	3	**A06**	*B.melitensis*(2)	koyun(2)
36	**18**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	5	3	**A06**	*B.melitensis*(4)	koyun(4)
37	**19**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	5	3	5	4	**A09**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
38	**20**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	4	4	3	5	4	**A11**	*B.melitensis*(2)	keçi(2)
39	**21**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	3	4	3	6	4	**A09**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
40	**21**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	3	4	3	6	4	**A10**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
41	**22**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A02**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
42	**22**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A10**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
43	**23**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	3	5	3	5	4	**A05**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
44	**24**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	4	5	3	5	4	**A05**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
45	**24**	1	5	3	13	3	**3**	3	2	4	40	8	4	5	3	5	4	**A11**	*B.melitensis*(1)	sığır(1)
46	**25**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	5	4	**A01**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
47	**25**	1	5	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	5	4	**A08**	*B.melitensis*(1)	keçi(1)
48	**26**	1	**4**	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	5	4	**A06**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
49	**27**	1	**4**	3	13	3	2	3	2	4	40	8	3	5	3	6	4	**A10**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
50	**28**	1	**4**	3	13	3	2	3	2	4	40	8	2	5	3	5	4	**A04**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)
51	**28**	1	**4**	3	13	3	2	3	2	4	40	8	2	5	3	5	4	**A05**	*B.melitensis*(1)	koyun(1)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, Bölgemizde *Brucella* klinik izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin MLVA ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemleri ile tespit edilmesi ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğinin incelenmesi amaçlamıştır. Bu amaçla, Adana Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen havyan kökenli 118 *Brucella* izolatı arasındaki genotipik ilişki MLVA ve PFGE yöntemleri ile incelendi. Sonuç olarak, yöntemlerin kabul edilebilirliklerinin yanısıra *Brucella* genotiplerinin bölgemizdeki dağılımı irdelenmiş oldu.

Brusella enfeksiyonlarının kontrol ve eradikasyonunda akut vakalarda erken tanı ve doğru tedavi, risk gruplarının zamanında aşılanması ve salgın suşlarının genotiplendirilerek salgının kaynağı, bakterinin insan ve hayvan popülasyonlarındaki hareketinin izlenmesi ve bulaş yolunun belirlenmesi, bölgelerde hakim genotiplerin ortaya çıkarılması, bu genotiplerin eradikasyonu için aşı ve tedavi seçeneklerinin araştırılması, kısaca genotipik sürveyans hayati önem taşır. Bu güne kadar fenotipik yöntemlerle yapılan tanı ve tiplendirmenin epidemiyolojik sürveyans için beklentileri karşılamıyor olması sebebi ile geniş çaplı ve kullanılabilir sonuçlar üreten çalışmalar yapılamamıştır. Son yıllarda *M. tüberculosis* gibi zor mikroorganizmaların klonal düzeyde tiplendirilmesinde başarı ile kullanılan, Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) analizi yöntemi ile hastane enfeksiyonlarında salgın analizinde altın standart olarak kabul edilen Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) yönteminin de *Brucella* türleri arasındaki genotipik ilişkinin araştırılmasında kullanılabileceği gösterilmiştir (55,63-67). Dünyada değişik *Brucella* türlerinin bu iki yöntemle birlikte araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmakla beraber (66,67), çalışmamız Türkiye'de hayvan kökenli Brucella izolatlarının klonal ilişkilerinin MLVA ve PFGE yöntemleri ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Fenotipik identifikasyon ve biyotiplendirme sonucunda izolatlarımızdan 26'sı (%25.7) Rev-1 aşı suşu, üçü (%3.0) biovar 1, 72'si (%71.3) de biovar 3 olmak üzere 101'inin (%85.6) *B. melitensis*, üçü (%17.6) biyotiplendirilememiş, 14'ü (%82.4) de biovar 3 olmak üzere 17'sinin (%13.4) ise *B. abortus* olduğu belirlenmişti. AMOS-ERY-PCR ile izolatların 101'i *B. melitensis*, 17'si de *B. abortus* olarak tespit edildi ve

biyotipleme sonuçları ile aynı olduğu görüldü. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada koyun ve keçilerden en sık *B. melitensis biovar 3*, sığırlardan da en sık *B. abortus biovar 3* izole edildiği bildirilmiştir (69-74). Böylece, bölgemizdeki biyotip dağılımının Ülkemizin diğer bölgelerinden farklılık göstermediği gözlenmiş oldu.

Bazı gelişmiş ülkelerde bruselloz hayvanlar arasında tamamen eradike edilmiş olmakla birlikte, ülkemizde hayvanlar arasında oldukça yaygın bir hastalıktır. Özellikle Ankara ovasında, Konya yöresinde, güneydoğu Anadolu'da Diyarbakır ve Urfa yörelerinde hayvanlarda yaygındır (6,7). Ayrıca insan sağlığı açısından taşıdığı risk hastalığın önemini daha da artırmaktadır. İnsanlarda uzun süren bir hastalığa sebep olan bruselloz fizik yetersizliği ve iş gücü kaybı ile sonuçlanırken, tedavi ve hastane giderleri de önemli bir ekonomik kayba sebep olmaktadır.

Bruselloz ülkemizde hem hayvanlarda hem de insanlarda ihbarı mecburi bir hastalıktır. Gıda tarım ve hayvancılık bakanlığının hayvanlardaki brusellozisle mücadele proğramına rağmen hastalık artmakta hem hayvan endüstrisini hem de insan sağlığını etkilemesiyle ülke ekonomisine ciddi zararlar vermektedir. Brusellozis hastalığıyla mücadele kapsamında hayvanların aşılanması çalışması son derece önemlidir. Genellikle enfeksiyon hastalıkları hayvanların düzenli aşılanmasıyla kontrol altına alınabilmektedir (9).

Kilic ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada, Ülkemizin değişik bölgelerinden izole ettikleri B. melitensis biovar 3 izolatlarını ve bir *B. abortus biovar 3* izolatını çalışmamızda kullandığımız MLVA-16 yöntemi ile incelemişler ve MLVA profilleri bizim bulgularımızla farklılık gösterse de, büyük ölçüde uyum içerisinde olduğu görüldü (65).

Ayrıca, en baskın MLVA genotipi olarak tespit ettiğimiz ve önceden fenotipik olarak *B. melitensis Rev-1* aşı izolatı olarak identifiye edilmiş olan 26 *B.melitensis* izolatımızın MLVA-16 allel profilinin daha önce bildirilen *B. melitensis Rev-1* profillerinden farklı olduğu gözlendi. Bu izolatların çalışmamızda tespit edilmesinin, Türkiye'de bazı bölgelerde sürüden koçun ayrılmaması sebebi ile aşılama öncesi hayvanların gebe olabilmesi veya aşı suşu ile fenotipik özellikleri benzer olan yeni hakim bir genotipin ortaya çıkması ihtimallerinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Özellikle de, daha önce bildirilmemiş farklı bir genotipik yapıya sahip olmasının bu düşüncemizi desteklediği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, MLVA-16 yönteminin bölgesel hakim olan genotiplerin belirlenmesinde ayırt edici olduğu gözlendi. Ayrıca, elde edilen sonuçlar Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve ilgili kuruluşlarla paylaşıldı.

Genotiplendirme sonucunda tüm bölgelerde hakim olan genotip tespit edilmesiyle, bu genotip aşı çalışmalarında prototip olarak kullanılabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bölgemizde *Brucella* klinik izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin MLVA-16 ve PFGE yöntemleri ile tespit edilmesi ve bu yöntemlerin uygulanabilirliğinin incelenmesi amacıyla yaptığımız çalışma sonucunda;

1. AMOS-ERY-PCR ile izolatların 101'inin *B. melitensis*, 17'sinin ise *B. abortus* olarak tespit edildiği ve biyotipleme sonuçları ile uyumlu olduğu,
2. PFGE yöntemi ile toplam 21 genotip tespit edildiği ve ayırt edici gücünün yüksek olduğu (HGDI=0,899),
3. MLVA-16 yöntemi ile toplam 28 genotip tespit edildiği ve ayırt edici gücünün PFGE'ye göre daha yüksek olduğu (HGDI=0,9071),
4. MLVA-16 yönteminde panel 2B'deki lokusların daha ayırt edici oldukları,
5. *B. melitensis Rev-1* aşı suşu olarak izole edilen 26 suşun tamamının MLVA profilinin aynı olduğu ve en baskın ve istikrarlı MLVA genotipi olduğu,
6. PFGE ve MLVA sonuçları birlikte değerlendirildiği zaman toplam 51 genotip tespit edildiği ve ayırt edici gücünün çok daha yüksek olduğu (HGDI=0,9631) ve en baskın genotipin hem MLVA 1 hem de PFGE A15 tiplerine ait olan genotip 3 (13 *B. melitensis Rev-1* aşı izolatı) olduğu, onu MLVA 16 ve PFGE A05 tiplerine ait olan genotip 31 (11 *B. melitensis* izolatı) ile MLVA 15 ve PFGE A05 tiplerine ait olan genotip 28'in (10 *B. melitensis* izolatı) takip ettiği tespit edildi.

Sonuç olarak, MLVA-16 ve PFGE yöntemlerinin bölgesel hakim olan genotiplerin belirlenmesindeki ayırt edici güçleri ayrı-ayrı da yüksek iken, ikisinin birlikte kullanılmasının daha da etkili olduğu, ancak iki yöntemin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmasının daha da maliyetli ve zahmetli olması sebebiyle, özellikle salgın dönemlerinde baskın genotiplerin tespit edilerek aşı çalışmalarında değerlendirilebileceği kanaatine varıldı. Çalışmada elde edilen sonuçlar Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ve ilgili kuruluşlarla paylaşıldı.

KAYNAKLAR

1. **İzgür M, Akay Ö, Arda M, Erdeğer J.** Sığır Brucellosis'inin Teşhisinde EDTA ve 56°C'de Aglutinasyon Testlerinin Kullanılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **1992;** 39(1-2):191-200.

2. **Baysal B.** Brucella. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, Eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi, **1999:**571-577.

3. **Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Karaman M, Akay Ö,** et al. *Brucella İnfeksiyonları. Özel Mikrobiyoloji* 4. Baskı. Medisan Yayınevi **1997:** 110-124.

4. **Erol İ.** *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Pozitif Yayınları, **2007**.

5. **Lindquist D, Chu MC, Probert WS.** Francisella and Brucella. In: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA, Eds. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: American Society of Microbiol, **2007:**815–34.

6. **Sözen TH.** Bruselloz. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002:**636-642.

7. **Sümerkan B**. Brucella türleri. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğana M, Eds. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, **2002:**1647-1652.

8. **Terzi G.** The Investigation of Brucella Antibody with Milk Ring Test and Aglutination Test in Milk Collected from Samsun Region. *TAF Prev Med Bull*. **2006;** 5(3):196-203

9. **Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı.** Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Brusellanın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi Genelge NO:2012/03, **2012**.

10. **Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJA.** Brucellosis -- New Aspects of an Old Disease. *J Appl Microbiol*, **2005;** 98(6):1270-1281.

11. **Edward JY**. *Brucella* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennet JE Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases.* 5th Ed. Philedelphia: Churchill Livingstone, **2000:**2386-2393.

12. **Kahraman M, Carlı KT, Şen A, Ülgen M, Çetin C.** *Genel Hayvan Hastalıkları*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi yayınları, yayın no:487, **2007:**44

13. **Altan N.** Bruselloz Epidemiyolojisi. 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongre Kitabı. İzmir-Türkiye, 20-23 Nisan, **1987:**179-185.

14. **Bercovich Z**. The Use of Skin Delayed-Type Hypersensitivity as an Adjunct Test to Diagnose Brucellosis in Cattle: *Vet. Quart*. **2000;** 22(3):123-30.

15. **Şimşek H**. Bruselloz. *Aylık Epidemiyoloji Raporu*. **2004:** Nisan-Haziran 3(2): 89-91.

16. **Young EJ.** Human brucellosis: *Infect Dis*. **1983:** 5: 321-42**.**

17. **Kaynar T.** Brucella sunumu. Samsun SSK Bölge Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları Kliniği. **2008**.

18. **Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esendal Ö, Paracıkoğlu J, Akan M.** *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar).* Ankara: İlke-Emek yayınları, **2006:**57-53,145-163.

19. **Yurtalan S.** Türkiye'deki Brucella abortus Hastalığı Kontrolünün Ekonomik Önemi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, **1999;** 30(2):35-41.

20. **Shapiro DS and Wong J**. *Brucella.* In: Murray P. Eds. *Manual of ClinicalMicrobiology.* Washington, DC: American Society for Microbiology Press, **1999:**625-631.

21. **İzgür M.** Veterinerlik Yönünden Bruselloz. *I. Ulusal Zoonoz Kongresi Kitapcığı* Erzurum Aralık.23-28. **2007:**3-6.

22. **Bekar M.** Gram negatif mikroorganizmalar, genel karakterleri ve tanı yöntemleri. *Etlik Vet Mikrobiol Derg*, **2003;** 14:31-429.

23. **Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş , Tümbay E, Mete Ö.** *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* 1.Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi.**1999:** 571-577.

24. **Özkuyumcu C.** Brucella Ders Notları **2007:**p. 1-7.
http://www.mikrobiyoloji.info/Ders/brucella2007.pdf
Erişim tarihi: 08.04.2015.

25. **Joklik WK.** Brucella İn: *Zinsser Microbiology* 20th Ed. Appleton and Lange Connecticut, **1992:** pp:609-14.

26. **Corbel MJ.** Microbiology of the Genus Brucella. In:Young EJ, Corbel MJ, Eds. *Brusellosis: clinical and Laboratory Aspects*, Florida USA: Crc Pres Inc, **1989:** 54-67

27. **Baron EJ, Finegold SM.** Gram Negative Facultatively Anaerobic Bacilli and Aerobic Coccobacilli. *Bailey and Scott's Diagnostik Microbiology* 8th.Ed. The CV Mosby Company **1990:** pp:408-30.

28. **Gürler N.** Bruselloz'da Bakteriyolojik Tanı Yöntemleri. *Klimik Derg* **1990:** 3(1): 21-22.

29. **Sözen TH.** Bruselloz, Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları* .Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; **1996:**486-491

30. **Eduardo G, Carlos C. Brucella. In:** Sherwood L, Gorbach MD, John G. Barlett MD, Neil R.Blackow MD. *Infectious Diseases* 2nd.Ed, Philephia: Wb Saunders Company, **1998:**1837-1845.

31. **Morgan WJB**. Comparison of Various Media for the Growth and Isolation of Brucella. *Res Vet Sci*, **1960:**1(1):47-52

32. **Meyer ME**. Evolutionary Development and Taxanomy of the Genus Brucella. In: Adams LG, ed. *Advances in Brusellosis Research*, 1st. Ed, Texas USA: A&M University Pres, Collage Station, **1990:**12-35

33. **Corbel MJ, Macmillan AP. Bovin Brucellosis**, OIE Manuel Amendment 2 **1995:** 3.2.1

34. **Limet JN, Bosseray N, Garin-Bastuji B, Dubray G, Plommet M**. Humoral Immunity in Mice Mediated by Monoclonal Antibodies Against the A and M Antigens of Brucella. *J Med Microbiol*, **1989:** 30:37-43

35. **Morgan WJB**. Reviews of the Progress of Dairy Science. *J Dairy Res*, **1970;** 37:303-359

36. **Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Woods G, Schreckenberger P.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbology.* 6th. ed. Baltimore. **2006:**482-491

37. **Moyer NP, Holcomp LA, Hausler WJ.** Brucella İn: Balovvs A. Eds. *Manual of Clinical Microbiolgy.* 5th Ed. American Society of Microbiology. **1991:**457-462.

38. **Esendal ÖM, Yardımcı H, Yıldırım M, İlha n Z, Altay G, İzgür M.** Brucella Türlerinin İdentifikasyonunda Boya Emdirilmiş Disklerin Kullanılması. *III. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*. Bursa-Türkiye, 23-25 Eylül, **1998:**9-10

39. **İyisan AS, Akmaz Ö, Gökçen Düzgün S ve ark.** Türkiyede sığır ve koyunlarda Brusellosizin sero epidemiyolojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* **2000;** 31:21–75.

40. **Black FT**. Brusellozis. In:Cohen J, Powderly WG, Eds. *Infectious Diseaes.* 2nd Ed. St Louis: Mosby Company, **2004:**1665-1667.

41. **Armstrong D, Cohen J.** Brucella spp. In: *Infectious Disease*. London: The CV Mosby Company, **1999;** 8(20):3-5.

42. **Ataman-Hatipoğlu Ç,Kınıklı S,Tülek N,et al.** Bir Eğitim Hastanesinin İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniğinde İzlenen 202 Bruselloz Olgusunun Epidemiyolojik Verilerinin İrdelenmesi. *Klimik Derisi,* **2005:**18(3):94-98

43. **Yaylı G.** Brusellozun Laboratuvar Tanısında Sorunlar. *Klimik Dergisi* **2003:** 16(1):211-213.

44. **Cengiz AT, Dolapçı Gİ.** Brucella'ları Özellikleri ve Brusellozda Tanı Yöntemleri. *AnkaraÜniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* **1997:** 50(1):41-46.

45. **Fındık D.** Bruselloz Tanısında Sorunlar. *Klimik Dergisi* **2005:** 18(1):102-105.

46. **Dahouk SA, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H.** The Detection of Brucella spp. Using PZR-ELISA and Real-Time PZR Assays. *Clin Lab* **2004:** 50:387-94.

47. **Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V.** Real-time detection of Brucella abortus, Brucella melitensis and Brucella suis. *Mol Cell Probes*, **2001;** 15(1):43-52.

48. **Schwartz D., Saffran W, Welsh, J, Haas, R, Goldenberg M, Cantor,C.R.** New Techniques for Purifying Large DNAs and Studying Their Properties and Packaging. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, **1983;** 47:189-195.

49. **Kaufmann ME.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Medicine*, **1998;** 15:33-50**.**

50. **Chu, G., Vollrath, D, Davis, R.W.** Separation of Large DNA Molecules by Contour Clamped Homogeneous Electric Field. *Science*, **1986;** 234:1582.

51. **Cooper K.** *PFGE: General overview and Troubleshooting Tips*. http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PFGE_troubleshooting.pdf Erişim tarihi: 08.04.**2015**.

52. **Baeck GW, Kim JH, Gomez DK, Park SC.** Isolation and Characterization of *Streptococcus sp*. From Diseased Flounder (*Paralichthys olivaceous*) in Jeju Island. *J Vet Sci*, **2006;** 7:53–58.

53. **Olive DM, Bean P ()** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. **1999;** 37(6):1661-9.

54. **Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL.** Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, **1985;** 314:67-73.

55. **Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff ve ark.,, 1987**. Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, 235, 1616-1622.

56. **Weber JL, May PE.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, **1989;** 44:388–396.

57. **Liu BH**. *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis*. Boca Raton, FL: CRC Press, **1997**.

58. **Bennett P.** Demystified… Microsatellites. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, **2000;** 53(4):177–183,.

59. **DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N and Overbeek R.** The genome sequence of the facultativeintracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002;** 99:443-448.

60. **Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF,Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM and Fraser CM.** The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002;** 99:13148-13153.

61. **Özsüt H**. Bruselloz Tedavisi. *Klimik Dergisi*, **2005;** 3(1):26-29.

62. **Ocampo-Sosa, A. A., J. Agüero-Balbin, and J. M. García-Lobo.** Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Vet Microbiol*, **2005;** 110**:**41-51.

63. **Al Dahouk S, Le Flèche P, Nockler K, Jacques I, Grayon M, et al**. Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis. *J Microbiol Methods*, **2007;** 69:137-145

64. **Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nockler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G.** Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol*, **2006;** 6:9.

65. **Kilic S, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslioglu E, et al.** Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. *J Clin Microbiol*, **2011;** 49:3276–3283

66. **Li ZJ, Cui BY, Chen H, Chen JD, Zhao HY, Piao DR, Jiang H, Zhang L, Tang X, Ke CW, Yao Z, Tian GZ.** Molecular typing of Brucella suis collected from 1960s to 2010s in China by MLVA and PFGE. *Biomed Environ Sci*, **2013;** 26(6):504-8.

67. **Céspedes S, Salgado P, Valenzuela P, Vidal R, Oñate AA.** Characterization of genomic island 3 and genetic variability of Chilean field strains of Brucella abortus. *J Clin Microbiol*, **2011;**49(7):2461-9.

68. **Banai, M., M. Abramson, I. Mayer, K. Chechik, G. Hoida, O. Zamir, S. Bardenstein, A. Cohen, and M. Davidson.** Problems associated with the persistence and possible horizontal transfer of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in connection with serological surveillance in Israel. *In:* B. Garin-Bastugi and A. Benkirane Eds. *FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev.1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle*. Maison-Alfort – France: Centre National d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires, **1995:**69-76.

69. **Gürbilek SE, Baklan EA, Aksoy HY.** Türkiye'de 2007 ve 2008 Yılları Arasında İzole Edilen Brusella Suşlarının İdentifikasyonu ve Faj Duyarlılıklarının Saptanması. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, **2014;** 3(2):67-72.

70. **Bolca Z, Gündeş S, Erdenliğ S, Öztürk R, Sümerkan B, Akata F. ve Vahaboğlu H.** İnsan kaynaklı Brusella türü mikroorganizmaların tiplendirilmesi amacı ile uygulanan metotların karşılaştırılması ve biyotipleri ile faj tipleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi. *Flora*, **2002;** 7(3):157-170.

71. **Buyukcangaz E, Sen A, Kahya S.** Isolation and biotyping of Brucella melitensis from aborted sheep and goat fetuses. *Turk J Vet Anim Sci*, **2009;** 33(4):311-316.

72. **Erdenlig S, Sen A.** Koyun atıklarından izole edilen *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Vet Mikrobiol Derg*, **2000;** 31(2):31-42.

73. **Erdenlig S, Iyisan AS, Baklan EA, Aksoy HY.** Biovar distrubution of Brucella isolates from livestock in Turkey, 1999 to 2006. In: Proceedings of the15 th. International Congress of Mediterrenean Federation for Health and Production of Ruminants. Kusadası-Turkey, 15-19 May, **2007:**27.

74. **Sahin M, Genç O, Unver A, Otlu S.** Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, **2008;** 40:281-286.

ÖZGEÇMİŞ

Nizip/Gaziantep'te 1975 yılında doğdu. 1999 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni bitirerek Veteriner Hekim ünvanı aldı ve aynı Fakültede Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine Araştırma Görevlisi olarak başladı. Bu eğitimini 2002 yılında tamamlayarak Mikrobiyoloji Uzmanı oldu. 2002-2008 yılları arasında Kayseri İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğünde Veteriner Hekimlik ve İlçe Müdürlüğü görevlerinde bulundu. 2010-2014 yılları arasında Adana Veteriner Kontrol Enstitü Müdürü olarak görev yaptı. 2015 Ocak ayı itibari ile Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nde Genel Müdür Yardımcısı olarak görev yapmaktadır. Evli olan Süleyman ASLAN iyi derecede İngilizce bilmektedir.