

BRUCELLA SUŞLARININ İDENTİFİKASYONU VE BİYOTİPLENDİRİLMESİZeki Aras¹@ Mehmet Ateş¹ Uçkun Sait Uçan¹**Identification and Biotyping of Brucella Strains****Geliş Tarihi: 13.10.2009****Kabul Tarihi: 22.10.2009**

Özet: Dünyanın önemli zoonoz hastalıklarından olan Brusellozis; hayvanlarda genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olmakta, endemik olduğu ülkelerde ekonomiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu derlemede hayvanlarda brusellozisin teşhisi ve etkenlerin tiplendirilmesi ile ilgili moleküler metotlar aktarıldı. Serolojik metotlar derlemenin kapsamı dışındadır.

Anahtar sözcükler: Brusellozis, Teşhis, Biotiplendirme.

Summary: As an important zoonosis which has been problematic in most countries on the World Brucellosis causes infertility and abortion by infecting genitals of animals. It effects national economies negatively in the countries which the disease is endemic. Molecular methods for typing and identification in diagnosis of the Brusellosis are reviewed. Serological methods are excluded.

Key words: Brusellosis, Diagnosis, Biotyping.

GİRİŞ

Brusellozis; sığır, koyun, keçi, domuz, köpek ve koç gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı, nekrotik ve yangısal infeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır (Buxton ve Fraser, 1977; Arda ve ark., 1997; Bilgehan, 2000; Garin-Bastuji ve ark., 2005; Köylü ve ark., 2009).

Brucella cinsi mikroorganizmalar, 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre *Proteobactereaceae* sınıfının α -alt grubunda yer almaktadırlar. Bu alt grupta ayrıca *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Phyllobacterium* ve *Ochrobactrum* gibi bakterilerde bulunmaktadır (De Lay ve ark., 1987; Moreno ve ark., 1990; Corbel ve Moriyon, 2006). Meyer ve Shaw tarafından düzenlenen *Brucella* cinsi, 6 türe ayrılmıştır: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* ve *B. canis* (Nicoletti, 2002). *B. melitensis* 3, *B. abortus* 7 ve *B. suis* 5 biyotipe sahip iken diğer türler için herhangi bir biyotip bildirilmemiştir (Buxton ve Fraser, 1977; Alton ve ark., 1988; Garin-Bastuji ve ark., 1998; OIE, 2009). Son yıllarda, henüz yukarıdaki sınıflandırmaya eklenmemiş olsa da çeşitli kaynaklardan yeni *Brucella* türleri izole edilmiştir. Deniz memelilerinden (fok, yunus balığı) izole edilen iki tür önce *Brucella maris* (Jahans ve ark., 1997) daha sonra da *Brucella*

ceti sp. nov. ve *Brucella pinnipedialis* sp. nov. (Foster ve ark., 2007) olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca, *Microtus arvalis* türü farelerden ve topraktan *Brucella microti* izole edilmiştir (Scholz ve ark., 2008).

Brusellozis'de görülen klinik belirtiler enfeksiyonun teşhisi için yeterli değildir. Hastalığın tanısında, etken izolasyonu ve identifikasyonunu ile moleküler teknikleri kapsayan direkt yöntemler ile serolojik ve alerjik testleri kapsayan indirekt yöntemlerden yararlanılır (Aras ve Uçan 2002; OIE 2009). Fakat etken izolasyonunun her zaman mümkün olmaması nedeniyle sıklıkla serolojik testlerden yararlanılmakla beraber *etken izolasyonu* "altın standart" olarak kabul edilmektedir. (Alton ve ark., 1988; İyisan ve ark., 2000; Aras ve Uçan, 2008; OIE, 2009).

2. Brucella İzolatlarının İdentifikasyonu**2.1. Bakteriyoskopi**

Fötusun mide içeriği, fotal akciğer, fotal karaciğer, vaginal akıntı, kotiledon veya plasenta örneklerinden hazırlanmış sürme ve tuşe preparatlar Modifiye Ziehl-Neelsen (Stamp) veya Köster yöntemleriyle boyanarak direkt mikroskopik muayene ile *Brucella* morfolojisine sahip mikroorganizmalar aranır. Boyamada zayıf asit-fast

@ e-mail: zekiaras@hotmail.com

¹ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Kampüs, 42075, Konya.

özelliğe sahip olan *Brucella*'lar mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görünürler (Buxton ve Fraser, 1977; Alton ve ark., 1988). *Chlamydomphila abortus* veya *Coxiella burnetti* gibi diğer abort etkenleri yanlış pozitifliğe neden olabileceğinden sonuç kültür ile teyit edilmelidir. Süt ve süt ürünlerinin muayenesinde, etken miktarı genelde düşük olduğundan ve yağ moleküllerinin görüntüyü engelleyeceğinden bu metodun sensitivitesi düşüktür (Alton ve ark., 1988; Garin-Bastuji ve ark., 1998; OIE, 2009; Garin-Bastuji ve ark., 2005).

2.2. Kültür

2.2.1. Temel Besiyerleri

Brucella'ların izolasyonunda, temel besiyeri olarak, *Brucella*, Trypticase soy, Tryptone soy, Nutrient besi yerleri ile Kanlı, Columbia ve Patato agarlar kullanılabilir gibi laboratuvar ortamında nutrient agarda (agar 20 g, pepton 10 g, NaCl 5 g, meat ekstrakt 5g, distile su 1000 ml, pH 7.8) hazırlanabilir.

Tablo 1. *Brucella*'ların diğer Gram negatif bakterilerden ayrımı (Alton ve ark., 1988; Garrido-Abellan ve ark., 2001).

Testler	<i>Brucella</i>	<i>B.bronchiseptica</i>	<i>C.fetus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Y.enterocolitica</i>
Morfoloji	Küçük kokobasil	Küçük kokobasil	Virgül şeklinde	Diplokok	Diplokok	Basil
37 C Hareket	-	+	+	-	-	-
20 C Hareket	-	-	-	-	-	+
MacConkey'de laktoz ferment.	-	-	-	v ^a	v	-
Glikoz içeren agarda asit teşkili	- ^b	-	-	-	v	+
Hemoliz	-	+	-	v	v	-
Katalaz	+	+	+	v	+	+
Oxidaz	+ ^c	+	+	+	-	-
Üreaz	+ ^d	+	-	v	v	+
Nitrat indirgemesi	+ ^e	+	+	v	-	+
Sitrat kullanımı	-	+	-	-	v	-
S- <i>Brucella</i> antiserumu ile aglütinasyon	+ ^f	-	-	-	-	+
R- <i>Brucella</i> antiserumu ile aglütinasyon	+ ^g	-	-	-	-	-

^a- Genus içinde pozitif ve negatif türler

^b- *B. neotomae* bazen (+)

^c- *B. ovis*, *B. neotomae* ve bazende *B. abortus*'un bazı suşları (-)

^d- *B. ovis* ve bazende *B. abortus*'un bazı suşları (-)

^e- *B. ovis* (-)

^f- *B. ovis*, *B. canis* ve diğer türlerin R suşları hariç.

^g- *B. ovis*, *B. canis* ve diğer türlerin R suşları pozitif.

Bifazik besiyeri olan Castaneda vasatı da, kan, diğer vücut sıvıları veya süten *Brucella* izolasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Alton ve ark., 1988; OIE, 2009). Özellikle *B. abortus* biyotip 2 ile *B. suis*'in izolasyonlarında bu besiyerlerine % 2-5 *Brucella* antikorlu içermeyen sığır veya at serumu katılmalıdır. Serum ilavesinin *B. melitensis*'in üremesini de arttırdığı bildirilmektedir (Alton ve ark., 1988; Garin-Bastuji ve ark., 2005). Diğer faydalı besiyerleri ise Serum dekstroz ve Gliserol dekstroz agarlardır. Serum dekstroz agar genellikle biyotiplendirmeler de koloni morfolojisinin gözlemlenmesi için kullanılmaktadır (Alton ve ark., 1988; OIE, 2009).

2.2.2. Selektif Besiyerleri

Saha örneklerinin genellikle kontaminantları da içermeleri ve bunların *Brucella* etkenlerini örtecek şekilde üremeleri sebebi ile temel besiyerleri yerine selektif besiyerleri etken izolasyonunda tercih edilmektedir (Marin ve ark., 1996; Garin-Bastuji ve ark., 1998). *Brucella* haricindeki diğer

Brucella Suşlarının...

mikroorganizmaların üremelerini engellemek için temel besiyerlerine çeşitli antibiyotikler eklenerek selektif besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla, günümüzde yaygın bir şekilde Farrell selektif besiyeri kullanılmaktadır (OIE, 2009). Temel besiyeri olan serum dekstroz agarın her litresine 100 mg *cycloheximide*, 25 000 IU basitrasın, 5 000 IU polimiklin B sülfat, 20 mg vankomisin, 5 mg nalidiksik asit ve 100 000 IU nistatin ilave edilerek Farrell selektif besiyeri hazırlanmaktadır (Farrell, 1974; Alton ve ark., 1988; OIE, 2009). Bu besiyerinde kullanılan basitrasın ve nalidiksik asit miktarlarının *B. melitensis*'in bazı suşlarının üremesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Marin ve ark., 1996). Ayrıca, Farrell besiyeri *B. ovis*'in üremesini de engellemektedir. Bunlardan dolayı atık vakalarında etken izolasyonunun sensitivitesini arttırmak için Farrell ve modifiye Thayer-Martin besiyerleri birlikte kullanılmalıdır (Marin ve ark., 1996).

2.2.3. İdentifikasyon ve Biotiplendirme

Brucella türüne ait suşların birçoğu (*B. abortus*, *B. ovis*) üreme sırasında % 10 CO₂'e ihtiyaç duyarken, *B. melitensis*, *B. canis* ve *B. suis* suşlarının CO₂ ihtiyacı yoktur. *Brucella* kolonileri, uygun besiyerine ekilmelerinden itibaren yaklaşık 2 günlük inkübasyon periyodu sonunda görünür hale gelirler. Kültürün negatif olarak değerlendirilmesi için 8-10 gün beklenmelidir. Dört günlük koloniler, 1-2 mm çapında, düz kenarlı, sarı bal renginde ve şebnem tanesi görünümündedirler. Eskiye koloniler

koyu bir renk alarak büyürler. Kolonilere yukarıdan bakıldığında konveks ve inci beyazı rengindedirler (Buxton ve Fraser, 1977; Alton ve ark., 1988; Arda ve ark., 1997; Bilgehan, 2000; OIE, 2009).

Brucella morfolojisine sahip tüm koloniler Gram boyama yöntemi (veya Stamp yöntemi) ile değerlendirilmelidirler. Gram negatif kokobasiller veya kısa çomaklar şeklinde görülen bakterilere ait kolonilerden, anti-*Brucella* poliklonal serumu ile lam aglütinasyon testi yapılır ve pozitif sonuç veren koloniler *Brucella* olarak kabul edilir (Alton ve ark., 1988; OIE, 2009). *Brucella* türlerinin identifikasyonunda ayrıca üreaz, oksidaz, katalaz, nitrat indirgeme, sitrat, indol ve Voges Proskauer testleride kullanılır. *Brucella*'ların diğer Gram negatif bakterilerden ayrımı tablo 1'de verilmiştir (Alton ve ark., 1988; Arda ve ark., 1997; Garrido-Abellan ve ark., 2001).

Smooth *Brucella* türleri üreme süresince dissosiyeye olma eğilimindedirler. Bir kültürün koloni morfoljisindeki değişiklik, antijenitesi ve infektivitesinde değiştirmektedir. Özellikle aşı ve antijen üretiminde S kolonilerin seçimine dikkat edilmelidir. S-tipinde olmayan koloniler, monospesifik serum veya smooth *Brucella* fajları ile tiplendirilemediğinden, tiplendirme için smooth koloniler seçilmelidir. Koloni morfoljisini belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. İlk olarak Henry tarafından 1933 yılında bildirilen yöntemde, koloniler 45 °C'lik açı ile oblik ışıkta stereskopik

Tablo 2. *Brucella* türlerinin ayrımı (Alton ve ark., 1988).

Türler	Koloni Morfolojisi	Serum Gereksinimi	Faj Duyarlılığı			Oksidaz	Üreaz	Konakçı
			Tb Fajı		R/C			
			RTD	10 ⁴ xRTD	RTD			
<i>B. melitensis</i>	Smooth	-	-	-	-	+	+ ^a	Koyun,,keçi
<i>B. abortus</i>	Smooth	- ^b	+	+	-	+ ^c	+ ^d	Sığır
<i>B. suis</i>	Smooth	-	-	+	-	+	+ ^e	Domuz vb
<i>B. neotomae</i>	Smooth	-	- ^f	+	-	-	+ ^e	Çöl ağ. ratı
<i>B. ovis</i>	Rough	+	-	-	+	-	-	Koç
<i>B. canis</i>	Rough	-	-	-	+	+	+ ^e	Köpek

a- Değişik oranlarda, bazı suşlar hızlı pozitifdir.

b- *B. abortus* biyotip 2 hariç (genelde ilk izolasyonunda serum gereksinimi vardır).

c- *B. abortus* biyotip 3 hariç.

d- Referans suş 544 hariç ve ara sıra saha suşları negatiftir.

e- Hızlı oranda pozitifdir.

f- Çok ince bir plak oluşur.

mikroskop altında incelendiğinde S koloniler mavi-yeşil refle verirken dissosiyasyon koloniler donuk sarı renkte görünürler. Diğer bir metotta, koloniler % 0.01'lik nötral akriflavin ile emülsifiye edilirler. S koloniler homojen bir şekilde süspansiyon olurken, dissosiyasyon koloniler aglutinasyon olurlar. Kolonilerin kristal violet boya solüsyonu ile boyandığı yöntemde ise, S koloniler boya almazken non-smooth koloniler kırmızımsı bir renge boyanırlar ve yüzeylerinde ki çatlaklar el merceği ile görülebilir (Alton ve ark., 1988).

Tür identifikasyonu, faj duyarlılığı ve bazı biyokimyasal testlere (üreaz, oksidaz gibi) dayanmakta iken ayrıca referans laboratuvarlarınca gerçekleştirilen oksidatif metabolik testler ile de yapılabilmektedir. *Brucella* türlerinin ayrımı tablo 2'de verilmiştir (Alton ve ark., 1988; Arda ve ark.,

1997; Garin-Bastuji ve ark., 1998; Plommet ve ark., 1998). Tb, Wb ve Iz fajları smooth *Brucella* türlerinin ayrımında ve R/C fajı *B. canis* ve *B. ovis*'in lizisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tb fajı stabil olduğundan referans faj olarak kabul edilmektedir (Alton ve ark., 1988; OIE, 2009).

B. melitensis, *B. abortus* ve *B. suis* türlerinin biyotip seviyesindeki identifikasyonu 4 ana testle yapılmaktadır. Bu testler, CO₂ ihtiyacı, H₂S üretimi, boya (tiyonin ve bazik fuksin) duyarlılığı ve monospesifik A ve M antiserumları ile aglutinasyondur. *Brucella* türlerine ait biyotiplerin ayrımı tablo 3'e verilmiştir (Alton ve ark., 1988; Corbel, 1991; Arda ve ark., 1997; Garin-Bastuji ve ark., 1998; Plommet ve ark., 1998; OIE, 2009).

Yeni izole edilen etkenlerin ilk izolasyonundan hemen sonra CO₂ ihtiyacı olup olmadığı kontrol edilmelidir. *B. abortus*'un bazı

Tablo 3. *Brucella* biyotiplerinin ayrımı (Alton ve ark., 1988).

Türler	Biyotip	CO ₂ İhtiyacı	H ₂ S Üretimi	Boya Duyarlılığı		Monospesifik Serumla Aglutinasyon		
				Tiyonin	Bazik Fuksin ^a	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^c	+	-	+	+	-	-
	2	+ ^c	+	-	-	+	-	-
	3	+ ^c	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^c	+	-	+ ^b	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	+,-	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	-	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- ^d	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	-	+	- ^e	-	+	-	-	
<i>B. ovis</i>	+	-	+	- ^d	-	-	+	
<i>B. canis</i>	-	-	+	- ^d	-	-	+	

^a - Boya konsantrasyonu, 20 µg/ml Serum dextroz agar (1:50 000).

^b - ABD, Kanada ve İngiltere'de izole edilen bazı suşlar negatiftir.

^c - İlk izolasyonda genellikle pozitifdir.

^d - Suşların çoğu negatiftir.

^e - 10 µg/ml tiyonin konsantrasyonunda üreme şekillenir. 54

Tablo 4. *B. melitensis* Rev1 ve *B. melitensis* biovar 1 suşlarının ayrımı (Alton ve ark; 1988).

Suş	Koloni büyüklüğü	Besiyerlerinde üreme			
		Tiyonin 20µg/ml	Bazik Fuksin 20 µg/ml	Penisilin 5 iu/ml	Streptomisin 2,5 µg/ml
Biovar 1	Büyük	+	+	+	-
Rev-1	Küçük	-	-	-	+

Tablo 5. *B. abortus* S19 ve *B. abortus* biovar 1 suşlarının ayrımı (Alton ve ark; 1988).

Suş	CO ₂ ihtiyacı	Besiyerinde üreme		
		Tiyonin blue 2µg/ml	i-erythritol 1 mg/ml	Penisilin 5 iu/ml
Biovar 1	+ a	+ a	+	+ a
S19	-	-	-	-

^a - ilk izolasyonda genellikle pozitifdir

biyotipleri sadece ilk izolasyonlarında CO₂'e ihtiyaç duymalarına karşın her zaman bir stabiliteye sahip değildirler. Boya ve diğer testlerde kullanılacak atmosferin belirlenmesi için önce CO₂ gereksinimi belirlenmelidir. H₂S testinde de kültür SDA içeren bir tüpe ekilip tüpün pamuğuna kurşun asetatlı kağıt yerleştirilir. Kağıt 4 gün boyunca günlük değiştirilerek renk değişikliği kontrol edilmelidir (Alton ve ark., 1988).

Boya duyarlılık testlerinde başlıca serum dekstroz agar, trypticase soy agar ve tryptose soy agarlar kullanılmaktadır. Kültürün serum gereksinimi olmasa bile, serum eklenmiş boyalı besiyeri (serum üremeyi iyileştirebilir) ile serum eklenmemiş olanının üremeleri de karşılaştırılmalıdır. Agar çeşidi kullanılacak boya konsantrasyonu etkilemektedir. Serum dekstroz agara 20 µg/ml (1:50 000) oranında bazik fuksin ve tiyonin eklenmektedir. Genellikle *B. melitensis* kültürleri, *B. abortus* ve *B. suis* kültürleri kadar bolca üreme göstermemektedir. Safranin O duyarlılık testi, *B. suis*'in ayrımında kullanılmaktadır. 100 µg/ml oranında safranin varlığında, *B. suis* suşlarının çoğu inhibe olurken, *B. melitensis* ve *B. abortus* (biovar 2 hariç) suşları etkilenmezler (Alton ve ark., 1988).

S ve R forma sahip *Brucella* kültürleri kendilerine uygun antiserumlar ile aglütine olurlar. Smooth forma sahip bakteriler A, M veya her iki

monospesifik antiserum ile aglütinasyon verirler. Rutin tiplendirme testlerinde monospesifik A, M ve Rough antiserumları birlikte kullanılmaktadır. *B. melitensis*'in biyotip 1'inde M antijeni, biyotip 2'sinde A antijeni dominant iken biyotip 3'ünde A ve M antijenleri eşit miktarda bulunmaktadır. *B. ovis* ve *B. canis* R antijeni taşımaktadırlar. Dominant yüzey antijeninin monospesifik antiserumlarla belirlenmesinde tüp ve lam aglütinasyon testlerinden yararlanılmaktadır (Alton ve ark., 1988; Garrido-Abellan ve ark., 2001).

Canlı aşı suşları olarak kullanılan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev-1, arasına süt veya patolojik materyallerden izole edilmektedir. Gebe hayvanlarda, *B. melitensis* Rev-1 suşu ile aşılanmalarından sonra atıklar oluştuğu bildirilmiştir. *B. melitensis* Rev-1 suşunun streptomisin içeren besiyerinde üremesi orijinalliğini göstermesine karşın, streptomisine bağımlı mutant suşlarında oluşabilmektedir. *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunun saha suşundan ayrımı tablo 4'te, *B. abortus* S19 aşı suşunun saha suşundan ayrımı tablo 5'te gösterilmiştir (Alton ve ark., 1988; OIE, 2009). Ayrıca, *B. abortus* RB51 aşı suşu, R koloni morfolojisine sahip olması ve Rifampisin (250 µg/ml) varlığında üremesi ile identifiye edilmektedir (OIE, 2009).

Hızlı bakteriyel identifikasyon sistemlerinde kullanılan Gram negatif enterik ve nonenterik

identifikasyon kitleri (API gibi) ile *Brucella*'lar Klevezas ve ark., 1995; Romero ve ark., 1995; Da *Moraxella phenylpyruvica*, *Hamophilus* ve *Neisseria*

Tablo 6. *Brucella* türlerinin PZR-RFLP metodu ile ayrımı (Al Dahouk ve ark., 2005).

<i>Brucella</i> Türleri	Gen Bölgesi					
	<i>Omp2</i>	<i>Omp25</i>	<i>Omp31</i>	<i>DnaK</i>	<i>Ery</i>	<i>RpsL</i>
<i>B. abortus</i>	+	-	NA	-	S19	-
<i>B. melitensis</i>	+	+	-	16M	-	Rev-1
<i>B. suis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>	+	-	+	-	-	-
<i>B. ovis</i>	+	+	+	-	-	-
<i>B. neoteomae</i>	+	-	-	-	*	-
<i>B. maris</i>	+	*	*	*	*	-

NA: Amplifiye olmamış; *: test edilmemiş; 16M: *B. melitensis* biyotip 1; S19: *B. abortus* aşısı suşu; Rev-1: *B. melitensis* aşısı suşu.

olarak yanlış identifiye edilebilirler (Bilgehan, 2000; Fındık, 2005).

2.3. Moleküler İdentifikasyon Yöntemleri

2.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR metodu ilk olarak 1987 yılında Mullis ve Faloona tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllar, birçok araştırmacı *Brucella*'ları teşhis etmek için PZR temelli çeşitli metotlar geliştirmiştir (Bricker, 2002; Aras 2009).

Brucella türlerini cins düzeyinde identifiye etmek için, ilk PZR metodu Fekete ve arkadaşları tarafından 1990 yılında geliştirilmiştir. Araştırmacılar, *B. abortus* S19 suşunun 43-kDa OMP'sini kodlayan gen bölgesinin 635 bp (baz pair)'lik bir kısmını dizayn ettikleri primerlerle amplifiye etmişlerdir. Yöntemin, tüm *Brucella* türleri ve biyotipleri için geçerli ve oldukça hassas olduğunda bildirmişlerdir (Bricker, 2002). Daha sonraki yıllar, *Brucella* cinsi bakterilerin hepsinde bulunan 16S rRNA, 16S-23S, BCSP31 ve *omp2* gen bölgelerini çoğaltmaya yönelik birçok PZR metodu geliştirilmiştir (Baily ve ark., 1992; Herman ve De Ridder, 1992; Leal-

Costa ve ark., 1996; Rijpens ve ark., 1996).

Brucella türlerini tür düzeyinde identifiye etmek için geliştirilen ilk PZR metodu Bricker ve Halling (1994) tarafından AMOS-PZR ismiyle rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bir IS (Insertion sequences) elementinin (IS711) *B. canis* haricinde diğer *Brucella* türlerinin tamamında en az bir tane bulunduğunu ve kromozom üzerinde sayı ve yerleşim yerlerinin oldukça stabil olduğunu bildirmişlerdir. Bu metot, multipleks olarak kullanılan 5 adet primer ile *B. abortus* biyotip 1, 2 ve 4, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* biyotip 1'i tür düzeyinde identifiye edebilmektedir (Bricker ve Halling, 1994). Daha sonra metot modifiye edilerek aşısı suşları olan *B. abortus* S19 ve RB51'e yönelik primerlerde prosedüre eklenmiştir (Ewalt ve Bricker, 2000). Bricker ve ark (2003) AMOS PZR tekniğini modifiye ederek *B. abortus* tür spesifik PZR (BaSS PZR) yöntemini geliştirmişlerdir. Gupta ve ark (2006), *B. melitensis*'in *omp31* gen bölgesinin çoğaltan yeni bir single-step PZR metodu geliştirmişlerdir. Bu gen bölgesinin *B. abortus*'ta bulunmamasından dolayı yeni yöntemin *B. melitensis* için oldukça hassas ve özgül olduğunu bildirmişlerdir. Keid ve ark (2009), *Brucella* ssp. 16S-23S rRNA bölgesini belirlemeye

Brucella Suşlarının...

yönelik hazırladıkları primerlerle köpek kan örneklerinden *B. canis*'i tür düzeyinde tanımladıkları ettiklerini bildirmişlerdir.

Garcia-Yoldi ve ark (2006) geliştirdikleri multipleks PZR yöntemi ile *Brucella*'ya ait 7 türü ve 3 aşısı suşunu moleküler olarak tanımladılar. Tür veya biyotipe özel primerlerini başarmışlardır. Tür veya biyotipe özel primerlerini *omp31*, *omp25b*, *wboA*, *wboB*, *IS711*, *ery* ve *rpsL* gen bölgelerine yönelik dizayn etmişlerdir. Imaoka ve ark (2007), *BCSP31*, *omp31*, *omp2a* ve *omp2b* gen bölgelerine yönelik hazırladıkları primerleri kullandıkları Combinatorial PZR tekniği ile *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. canis*'i başarı ile tanımladılar.

2.3.2. Moleküler Biyo-tipendirme Metotları

Brucella tür ve biyotiplerinin moleküler tipendirme ve tanımlanması amacıyla, DNA üzerindeki polimorfizmi belirlemek için, PZR-RFLP veya Southern blot analizi gibi metotlar kullanılmaktadır (Garin-Bastuji ve ark., 1998). *Omp* gen bölgelerinin yeterli miktarda polimorfizm içermelerinden dolayı *Brucella* türlerinin tipendirilmesinde en çok kullanılan gen bölgeleri olmuştur. *Omp2a*, *Omp2b*, *Omp25*, *Omp31*, *DnaK*, *Ery* ve *RpsL* gen bölgeleri PZR-RFLP yöntemi ile çoğaltılıp enzimlerle kesilerek *Brucella* türlerinin ayrımında başarı ile kullanılmıştır (Garin-Bastuji ve ark., 1998; Al Dahouk ve ark., 2005). Spesifik primerle çoğaltılıp, restriksiyon enzimleri ile kesilen gen bölgeleri ve ait oldukları tür veya biyotip tablo 6'da verilmiştir (Al Dahouk ve ark., 2005).

Kaynaklar

Al Dahouk, S.A., Tomaso, H., Prenger-Berninghoff, E., Splettstoesser, W.D., Scholz, H.C. (2005). Neubauer H. Identification of *Brucella* species and isotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 191-196.

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA, Paris.

Anonim: *Brucellosis* (2009) OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.9.9, <http://www.oie.int.htm>. Erişim tarihi: 15.09.2009.

Aras Z (2009) Koyun Atıklarından izole edilen *Brucella melitensis* suşlarının Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD) yöntemi ile genetik

analizi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Aras, Z. ve U.S. Uçan, "Brusellozis'de Serum Selenyum Düzeyleri", *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 18 (3-4), 63-66 (2002).

Aras, Z., Uçan, U.S. (2008). "*Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* Enfeksiyonlarında Oluşan Antikorların *Rhizobium tropici* Antijeni ile Tespit Edilmesi". *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 24, 1, 47-52.

Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M., Leloğlu, N., Kahraman, M., Ilgaz, A., Diker, S. (1997). *Özel Mikrobiyoloji*. Medisan Yayınevi, Ankara.

Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.*, 95, 271-275.

Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji*. Barış Yayınları, İzmir.

Bricker, B.J., Ewalt, D.R., Halling, S.M. (2003). *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiology*, 3, 15, 1-13.

Bricker, B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 90, 435-446.

Bricker, B.J., Halling, S.M. (1994). Differentiation of *brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *brucella melitensis*, *brucella ovis* and *brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 11, 2660-2666.

Buxton, A., Fraser, G. (1997). *Animal Microbiology volume 1*. First Edition. Blackwell Scientific Publications, Edinburgh.

Corbel, M.J., Moriyon, I. (2006). International committee on systematic bacteriology-subcommittee on the taxonomy of *brucella*, minutes of the meeting, 5-7 July 1994. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, 56, 1169-1170.

Corbel, M.J. (1991). Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 5, 1066-1068.

Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiebaud, M., Dubray, G. (1996). Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 267-275.

- De Lay, J., Mannheim, W., Segers, P., Lievens, A., Denijin, M., Vanhoucke, M., Gillis, M. (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 35-42.
- Ewalt, D.R., Bricker, B.J. (2000). Validation of the abbreviated brucella AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of brucella abortus field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 8, 3085-3086.
- Farrell, I.D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *B. abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.*, 16, 280-286.
- Fındık, D. (2005). Bruselloz tanısında sorunlar. XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 16-20 Kasım, 2005, Antalya.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2688-2693.
- Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., de Miguel, M.J., Munoz, P.M., Vizmanos, J.L., Lopez-Goni, I. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all brucella species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev.1. *Clinical Chemistry*, 52, 4, 779-781.
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M., Marin, C., Albert, D. (2005). The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. 6th International Sheep Veterinary Congress, 17-21 Haziran, 2005, Crete, Greece.
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M., Grayon, M., Verger, J.M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.*, 29, 255-274.
- Garrido-Abellan, F., Duran-Ferrer, M., MacMillan, A., Minas, A., Nicoletti, P., Vecchi, G. (2001). Brucellosis in sheep and goats. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. 12 July, 2001, European Commission.
- Gupta, V.K., Verma, D.K., Singh, K., Kumari, R., Singh, S.V., Vihan, V.S. (2006). Single-step PCR for detection of *Brucella melitensis* from tissue and blood of goats. *Small Ruminant Research*, 66, 169-174.
- Herman, L., De Ridder, H. (1992). Identification of brucella spp. by using the polimerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2099-2101.
- Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T., Yamaha, A. (2007). Simultaneous detection of the genus brucella by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60, 137-139.
- İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Düzgün, S.G., Ersoy, Y., Eskiizmirli, S., Güler, L., Gündüz, K., Işık, N., İçyerioğlu, A.K., Kalender, H., Karaman, Z., Küçükayan, U., Özcan, C., Seyitoğlu, Ş., Tuna, İ., Tunca, T., Üstünakın, K., Yurtalan, S. (2000). Türkiye'de sığır ve koyunlarda brucellosis'in seroepidemiolojisi. *Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 31, 1, 21-75.
- Jahans, K.L., Foster, G., Broughton, E.S. (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet. Microbiol.*, 57, 373-382.
- Keid, L.B., Soares, R.M., Vasconcellos, S.A., Megid, J., Salgado, V.R., Richtzenhain, L.J. (2009). Comparison of agar gel immunodiffusion test, rapid slide agglutination test, microbiological culture and PCR for the diagnosis of canine brucellosis. *Research in Veterinary Science*, 86, 22-26.
- Köylü, Ö., Z. Aras ve U.S. Uçan (2009) Konya İlinde Risk Altında Bulunan İnsanlarda *Brucella canis* İnfeksiyonunun Serolojik Sıklığı, İnfeksiyon Dergisi, 24, (Basımda)
- Leal-Klevezas, D.S., Martinez-Vazouez, I.O., Lopez-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P. (1995). Single-Step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 12, 3087-3090.
- Marin, C.M., Alabart, J.L., Blasco, J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two brucella selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2, 426-428.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the Alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.*, 172, 7, 3569-3576.
- Nicoletti, P. (2002) A Short history of Brucellosis. *Vet. Microbiol.*, 90, 5-9.
- Plommet, M., Diaz, R., Verger, J.M. (1998). Brucellosis. In "Zoonoses", Ed. Palmer, S.R., Soulsby, L., Simpson, D.I.H., Oxford University Press, Oxford.

***Brucella* Suşlarının...**

Rijpens, N., Jannes, G., Asbroeck, M.V., Rossau, R., Herman, L.M.F. (1996). Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 5, 1683-1688.

Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., Lopez-Goni, I. (1995). Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 3, 65-617.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Flèche, P.L., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Krüger, M., Lodri, C., Pfeffer, M. (2008). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 8, 1316-1317.

Uçan, U.S., Z. Aras and M. Zorlutuna (2009) Detection of Canine Brucellosis by a Rapid Agglutination test using *Rhizobium tropici* as antigen, *Revue de Medecine Veterinaire* (Accepted for Publication).

Uçan, U.S. ve Z. Aras (2007) "Konya ve Sivas illerindeki Bazı Sürülerdeki Koçlarda *Brucella ovis* Enfeksiyonunun Seroprevalansı", *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 23 (3-4), 35-38.