

## Atık fetus mide içeriklerinden konvansiyonel kültürel yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu ile *Brucella* spp.'nin teşhisi

H. Kaan MÜŞTAK<sup>1</sup>, Elçin GÜNAYDIN<sup>2</sup>, Uğur KÜÇÜKAYAN<sup>1</sup>, Asiye DAKMAN<sup>2</sup>

Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, <sup>1</sup>Yetiştirme Hastahkları Laboratuvarı; <sup>2</sup>Kanatlı Hastahkları Araştırma ve Teşhis Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

**Özet:** Brusellosis, *Brucella* türlerinin neden olduğu oldukça bulaşıcı, zoonotik bir enfeksiyondur. Brusellozisin teşhisinde, serolojik ve konvansiyonel kültürel yöntemlerin yanı sıra farklı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları da kullanılmaktadır. Bu çalışmada 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi fetal atık mide içeriğinden bakteriyolojik kültür ve PZR ile *Brucella* spp.'nin belirlenmesi ve her iki teşhis yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda her iki yöntemle de benzer pozitif ve negatif sonuçlar elde edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Brucella* spp., fetus, konvansiyonel kültürel yöntem, mide içeriği, PZR

### Diagnosis of *Brucella* spp. by conventional cultural method and polymerase chain reaction in stomach contents of aborted fetuses

**Summary:** Brucellosis is a contagious, zoonotic infection caused by *Brucella* species. Beside the serological and conventional cultural methods, different polymerase chain reaction (PCR) applications can be used in diagnosis of brucellosis. The aim of this study was to compare bacteriological culture and PCR methods used for the detection of *Brucella* spp. in stomach contents of the 31 bovine, 8 ovine and 1 caprine aborted fetuses. At the end of the study, same positive and negative results were obtained from both methods.

**Keywords:** *Brucella* spp., conventional cultural method, fetus, PCR, stomach content

Brusellozis dünyada ve ülkemizde çiftlik hayvanları açısından ekonomik önem arz eden, insan sağlığı açısından da tehdit unsuru oluşturan, oldukça yaygın zoonotik bir enfeksiyondur (AYDIN ve PARACIKOĞLU, 2006). Bu nedenle, enfeksiyonun hızlı ve güvenilir bir şekilde teşhisinin yapılabilmesi, ülke hayvancılığı ve insan sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Sığır ve koyunlarda brusellozis, *Brucella* genusu içerisinde bulunan, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* gibi farklı *Brucella* türleri tarafından oluşturulur. Brusellozisin rutin teşhisinde, serolojik ve bakteriyolojik testler gibi konvansiyonel yöntemlerden (HESTERBERG ve ark., 2008) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi moleküler tekniklerden faydalanılmaktadır (HINIĆ ve ark., 2009).

Konvansiyonel yöntemlerden bakteriyolojik kültür ile brusellozisin teşhisi her zaman mümkün olmamaktadır. Bunun nedenleri; *Brucella*'nın zor üreyen bir bakteri olması, izolasyon için zenginleş-

tirilmiş besi yerleri ve özel inkubasyon koşullarına gereksinim göstermesi, identifikasyon sürecinin uzun zaman alması, marazi maddelerin zamanında ve uygun şartlarda laboratuvara ulaştırılmaması olarak sıralanabilir. Serolojik metotlar ise, numune (kan serumu, süt serumu vb.) alımının kolaylığı, rahat uygulanabilirliği, kısa sürede sonuç alınabilmesi, sensitivitesinin yüksek olması nedeniyle brusellozisin teşhisinde daha çok kullanılmaktadır. Ancak sürü içerisindeki tüm hayvanlar teşhis edilebilir düzeyde antikor yanıtı oluşturmamakta, aşı ve doğal enfekte hayvanların ayrımı yapılamamakta ve mikroorganizmanın diğer bakterilerle çapraz reaksiyon vermesi yanlış pozitif sonuçların alınmasıyla neticelenebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı enfeksiyonun serolojik teşhisinde en az iki testin birlikte uygulaması gerekmektedir (ALTON ve ark., 1988).

1987'den beri *Brucella* spp.'nin teşhisi için çok sayıda farklı primer çifti kullanılmış ve sayısız PZR tekniği geliştirilmiştir. *Brucella* spp.'nin teş-

hisinde kullanılan ilk PZR tabanlı testlerde cins-spesifik bölgenin identifikasyonu amaçlanmıştır (FEKETE ve ark., 1990). Bu amaçla, IS711 olarak tanımlanan insersiyon sekansı (BRICKER ve HALLING, 1994), 16S rRNA geni (HERMAN ve DE RIDDER, 1992), 16S-23S rRNA operonu (ROMERO ve ark., 1995), 31 kDA dış membran proteini (MAYFIELD ve ark., 1988), 43 kDA dış membran proteini (FEKETE ve ark., 1990), omp-2 dış membran proteini (LEAL-KLEVEZAS ve ark., 1995) PZR çalışmalarında kullanılmıştır. Daha sonraları, *Brucella* türlerinin ve/veya biyovaryolarının ayrımı için çeşitli PZR teknikleri geliştirilmiştir (ADONE ve ark., 2001). Konvansiyonel PZR teknikleri dışında son yıllarda gerçek zamanlı PZR (Real-Time PCR) kullanımı da laboratuvarlarda yerini almaktadır (HINIĆ ve ark., 2009). PZR ile *Brucella* spp.'nin teşhisi ilk zamanlar izolatlardan elde edilen purifiye DNA'lerden gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda fetal atıklar ve maternal dokular (ÇETİNKAYA ve ark., 1999), kan (GUARINO ve ark., 2000), süt (ROMERO ve LOPEZ-GONI, 1999), nazal sekret (SREEVATSAN ve ark., 2000), semenden (AMIN ve ark., 2001) elde edilen DNA'larla da PZR uygulamaları yapılmıştır.

Bu çalışmada, brusellozis şüphesiyle, 2008-2009 yılları arasında, soğuk zincirde Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarına gönderilen 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi fetal atığına ait mide içeriğinden kültür ve *Brucella abortus*'un 16S rRNA sekansından elde edilen cins-spesifik primerler kullanılarak yapılan PZR (ROMERO ve ark., 1995) ile *Brucella* spp.'nin teşhisi gerçekleştirildi.

*Brucella* türlerinin izolasyonları için atık fetüslere ait mide içeriklerinin izolasyon çalışması, Serum-Dekstroz agarda gerçekleştirildi. Daha sonra agar pleytler, %10 CO<sub>2</sub>'li etüvde, 37°C'de, 4-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra şüpheli koloniler, koloni morfolojisi, Gram boyama, oksidaz, katalaz, üreaz ve nitrat redüksiyon gibi biyokimyasal özellikler dikkate alınarak *Brucella* spp. yönünden incelendi (ALTON ve ark., 1988).

Bakteriyoloji ve PZR'de pozitif kontrol olarak atık fetus mide içeriklerinden izole edilen ve Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde tiplendirilen *B. abortus* ve *B. melitensis* suşları kullanıldı.

Ekstraksiyon öncesi fetal atıkların mide içerikleri 1 saat boyunca 65°C'de inaktive edildi. İnaktivasyon sonrası ticari bir DNA ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın önerdiği şekilde (Qiagen Blood Tissue Kit, Qiagen; 69506) ekstraksiyon gerçekleştirildi.

Daha önce Romero ve ark. (1995) tarafından kullanılan *Brucella abortus* 16S rRNA sekansından elde edilen cins-spesifik F4, R2 primerleri kullanıldı (Tablo 1).

PZR için Romero ve ark. (1995)'nin bildirdikleri yöntem modifiye edilerek uygulandı. PZR reaksiyonu Fermentas Taq DNA Polymerase (rekombinant) Kit (Ürün No: EP0402) ile gerçekleştirildi. PZR'de kullanılan reaksiyon hacimleri şu şekildedir: 2.5 µl PCR buffer (MgCl<sub>2</sub> ihtiva etmemektedir), 0.5 µl dNTP (10 mM), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), her primerden 1 µl (20 pmol/µl), 2 µl templeyt, 16 µl deiyonize su olmak üzere toplam reaksiyon hacmi 25 µl'dir. PZR reaksiyonu parametreleri sırasıyla şu şekildedir: 95°C'de 2 dk ön denaturasyonu takiben 35 siklus boyunca 95°C'de 30 sn denaturasyon, 55°C'de hibridizasyon, 72°C'de 30 sn ekstensiyon ve ardından 72°C'de 10 dk final ekstensiyon.

10 µl PZR ürünü, ethidium bromide ile boyanan %1.5'lük agaroz jelde (Seakem; Seakem LE agarose, 50004L) 30 dk boyunca 100 V'da yürütüldü. DNA bantları UV transluminatör (Ultraviolet Products/UVP) ve jel dökümantasyon sistemi (Bitech Image Master-VDS Fujilim Termal Imagine System FTI-500) yardımı ile görüntülendi. Oluşan PZR ürünlerinin büyüklüğü yaklaşık 905 bp olarak belirlendi.

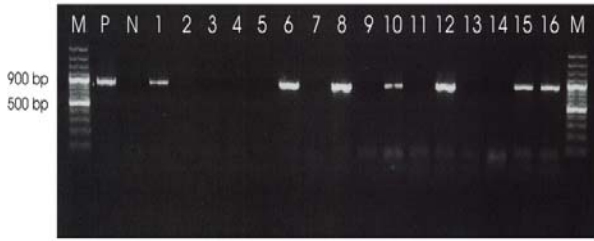
**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan primerler.

Primer	Sekanslar (5'-3')	Lokalizasyon
F4	TCG AGC GCC CGC AAG GGG	63-79
R2	AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA	947-966

**Tablo 2.** PZR ve konvansiyonel kültür yöntemi ile elde edilen sonuçların hayvan türlerine göre dağılımı.

Hayvan türü	Mide içeriği	Pozitif örnek sayısı / %		Negatif örnek sayısı / %	
		Bakteriyoloji	PZR	Bakteriyoloji	PZR
Sığır	31	15 / 48.4	15 / 48.4	16 / 51.6	16 / 51.6
Koyun	8	3 / 37.5	3 / 37.5	5 / 62.5	5 / 62.5
Keçi	1	-	-	1 / 100	1 / 100

Soğuk zincirde gönderilen 31 adet sığır, 8 adet koyun ve 1 adet keçi olmak üzere toplam 40 adet fötal atık mide içeriğinden yapılan bakteriyolojik kültür ve PZR sonucunda; sığır örneklerinin 15'i (%48.4) ve koyun örneklerinin 3'ü (%37.5) her iki yöntemle de pozitif bulunmuştur. Keçi örneğinden yapılan incelemede ise her iki yöntemle de pozitiviteye rastlanmamıştır (Tablo 2) (Şekil 1).



**Şekil 1.** PZR ile elde edilen bazı pozitif ve negatif sonuçlar. M: 100 bp marker (Fermentas, Letonya); P: Pozitif kontrol; N: Negatif kontrol; 1, 6, 8, 10, 12, 15, 16: Pozitif örnekler (905 bp); 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13, 14: Negatif örnekler.

Buna göre, her iki yöntemle de toplam 18 adet pozitif ve 22 adet negatif sonuç elde edilmiştir. Bakteriyolojik kültür ile karşılaştırıldığında PZR'nin sensitivite ve spesifitesi %100 olarak bulunmuştur.

Brucellozisin teşhisinde sperma, kan, fötal iç organlar gibi materyaller kullanılarak konvansiyonel kültürel yöntem ve farklı PZR uygulamalarının karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Ancak fötal mide içeriğinden PZR ile *Brucella* spp.'nin teşhisi ve konvansiyonel kültürel yöntem ile karşılaştırılmasına ilişkin az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Güler ve ark. (2003)'nin koyun atık fetus mide içeriklerinden brucellozisin teşhisinde, bakteriyolojik kültür ve PZR yöntemini karşılaştırdıkları bir çalışmada bakteriyolojik kültür ile pozitif sonuç alınan 39 mide içeriğinin 38'inde PZR ile pozitif sonuç elde ederek, PZR'nin spesifite ve sensitivitesini %97.4 olarak tespit etmişlerdir. Aynı

çalışmada bakteriyolojik kültür ile negatif sonuç alınan mide içeriklerinden yapılan PZR ile de aynı sayıda negatif sonuç alınmış ve PZR'nin spesifite ve sensitivitesi negatif örnekler için %100 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu spesifite ve sensitivite değerleri bizim çalışmamızdaki değer ile benzer bulunmuş ve PZR'nin, brucellozisin teşhisinde rutin olarak kullanılabilceği fikri desteklenmiştir. Konvansiyonel kültüre göre mide içeriklerinden direkt yapılan PZR'nin daha kısa zamanda sonuç vermesi brucellozisin teşhisinde önemli bir avantaj olarak belirlenmiştir.

Ülkemizin brucellozis hastalığı için endemik bölge olduğu bilinmektedir. Bu nedenle farklı hayvan türlerinde ve daha fazla örnek sayısı ile *Brucella* spp.'nin tür düzeyinde teşhisi, bununla beraber serolojik olarak belirlenmesinde sıkıntılarla karşılaşılacak aşılı ve aşısız hayvanların ayırımının yapılabilmesi için bundan sonraki çalışmalarda farklı moleküler tekniklerin kullanıldığı çalışmalar hedeflenmektedir.

## Kaynaklar

1. Adone R, Ciuchini F, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, (2001). Use of polymerase chain reaction to identify *Brucella abortus* strain RB51 among *Brucella* field isolates from cattle in Italy. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 48(2), 107-113.
2. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
3. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK, (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet Microbiol. 83(1), 37-44.
4. Aydın N, Paracıkoğlu J, (2006). Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Matbaacılık ve Yayıncılık, p. 145-163.
5. Bricker BJ, Halling SM, (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.
6. Çetinkaya B, Öngör H, Muz A, Ertaş HB, Kalender HM, Erdoğan HM, (1990). Detection of *Brucella* species

- DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR.* Vet Rec. 144, 239-240.
7. **Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR,** (1990). *Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction.* J Appl Bacteriol. 69(2), 216-227.
  8. **Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzza A, Gallo P,** (2000). *Detection of Brucella species in buffalo whole blood by gene-specific PCR.* Vet Rec. 147, 634-636.
  9. **Güler L, Gündüz K, Ok Ü,** (2003). *Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples.* Vet Microbiol. 93, 53-61.
  10. **Gürtürk K, Alan M, Boynukara B, Solmaz H, Aksakal A,** (1998). *Van ve yöresinde koyunlarda brusellozis üzerine etiyolojik ve serolojik incelemeler.* Ulusal Sığır ve Koyun Yavru Atma Sempozyumu, 6-8 Ekim, Pendik.
  11. **Herman L, De Ridder H,** (1992). *Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction.* Appl Environ Microbiol. 58(6), 2099-2101.
  12. **Hesterberg UW, Bagnall R, Perrett K, Bosch B, Horner R, Gummow B,** (2008). *A serological prevalence survey of Brucella abortus in cattle of rural communities in the province of KwaZulu-natal, South Africa.* J S Afr Vet Assoc. 79(1), 15-18.
  13. **Hinić V, Brodard I, Thomann A, Holub M, Miserez R, Abril C,** (2009). *IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of Brucella spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology.* BMC Vet Res. 14(5), 22.
  14. **Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M,** (2008). *Detection of Brucella by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases.* Iranian J Publ Health. 37(4), 96-102.
  15. **Leal-Klevezas DSL, Vazques IOM, Merino AL, Soriano JPM,** (1995). *Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals.* J Clin Microbiol. 33, 3087-3090.
  16. **Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB,** (1988). *The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic Brucella abortus protein.* Gene. 63(1), 1-9.
  17. **Romero C, Gamazo C, Pardo M, López-Goñi I,** (1995). *Specific detection of Brucella DNA by PCR.* J Clin Microbiol. 33(3), 615-617.
  18. **Romero C, Lopez-Goni I,** (1999). *Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of Brucella sp. by PCR.* Applied Environ Microbiol. 3735-3737.
  19. **Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P, Yurtsever SG,** (2009). *Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations.* Pol J Microbiol. 58(1), 15-9.
  20. **Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR,** (2000). *A multiplex approach to molecular detection of Brucella abortus and/or Mycobacterium bovis infection in cattle.* J Clin Microbiol. 38(7), 2602-2610.

*Geliş Tarihi / Received:* 15.12.2008

*Kabul Tarihi / Accepted:* 25.12.2009

*Yazışma adresi / Corresponding author*

*Dr. H. Kaan Müştak*

*Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,*

*Yetiştirme Hastalıkları Laboratuvarı,*

*06020, Etlik, Ankara, Türkiye*

*E-posta: kaanmustak@gmail.com*