

## Alfa-proteobacteria Grubuna Ait Bazı Bakteri Cinslerinden İzole Edilen Antijenlerin Brusellozisin Serolojik Tanısında Potansiyel Uygulanabilirliğinin Araştırılması

Ahmet Selman Mızraklıdağ<sup>1,a</sup>, Sevil Erdenliğ Gürbilek<sup>2,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-8593-8529, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-0377-2650

Geliş Tarihi: 09.02.2021

Kabul Tarihi: 31.05.2021

**Özet:** Brusellozis insanlarda ve hayvanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan, halk sağlığını tehdit eden ve hayvancılık endüstrisine ciddi ekonomik kayıplara neden olan zoonoz bir enfeksiyondur. Bu çalışmada, *Brucella* suşları ile filogenetik yakınlığı bulunan alfa-Proteobacteria sınıfına ait *Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium* ve *Rhizobium tropici* türlerinden hazırlanan antijenlerin brusellozisin serolojik tanısında *Brucella* antijeni yerine kullanılıp kullanılmayacağına ortaya konulması amaçlandı. Çalışmada, test serumlarına pozitif ve negatif kontroller ile birlikte indirekt ELISA uygulandı. Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozisi açısından test edilen antijenlerin hiçbirisi güvenilir düzeyde sensitivite ve spesifite göstermedi. Çalışmada, sadece R-LPS taşıyan *O. intermedium* antijeni ile ve sadece koyun ve köpeklerde kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanılama performansı alındı. Sonuç olarak, proteobakterilerin  $\alpha$ -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozisin indirekt teşhisinde bazı çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği saptandı. Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B. canis* ve *B. ovis* enfeksiyonlarında kullanıma potansiyeli bulunabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa-Proteobacteria, *Brucella*, Seroloji.

### Evaluation of Potential Usage of Antigens Prepared from Some Bacterial Genera of Alpha-Proteobacteria in Serologic Diagnosis of Brucellosis

**Abstract:** Brucellosis is an important zoonosis that cause serious infections in man and animals. This infection constitutes a risk for public health and big economical losses in animal industry. Serological tests have been intensively used for serologic diagnosis of brucellosis because these tests are quicker and more practical than culturing of the causative organisms. Antigens used in serological tests are prepared from virulent *Brucella* strains. In this regard, to use antigens prepared from bacterial strains that are not virulent for human and genetically close to *Brucella* spp. in the serological diagnosis of the disease will be a desired approach. These organisms have much lower virulence than *Brucella* and generally they are considered as saprophytic bacteria and some of them are opportunistic pathogen like *O. anthropi*. In this study, we planned to search the possibility of usage of antigens prepared from three bacterial species of alpha-Proteobacteria (*Ochrobactrum anthropi*, *O. intermedium*, *Rhizobium tropici*) which are filogenetically close to *Brucella*. As conclusion, none of the antigens yielded acceptable sensitivity and specificity for cattle and human brucellosis. Only sheep and dogs sera against *O. intermedium*, which is a rough species and carry R-LPS instead of S-LPS, showed diagnostic performance in acceptable ranges. When considering all the results of the study, it was thought that some members of alpha Proteobacteria might cause cross reaction in the serologic diagnosis of brucellosis and cause false positive reactions and this should be remembered when evaluating the serologic diagnosis of brucellosis. On the other hand, pure antigens from *O. intermedium* might have the potential to be used in *B. ovis* and *B. canis* infections and it was thought that the future works in this field might be needed.

**Keywords:** Alpha-Proteobacteria, *Brucella*, Serology.

### Giriş

Filogenetik açıdan *Brucella* türleri, *Rhizobiaceae* grubunun *Ochrobactrum* ve *Rhizobium* genuslarının da içinde yer aldığı *Proteobacteria* sınıfının  $\alpha$ -2 alt grubunda yer almaktadır. *Brucella* türleri arasındaki DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla türler

arasında %90'dan fazla DNA homolojisinin olduğu saptanmıştır (Vizcaino ve ark., 2000). DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarında *Ochrobactrum* genusunun *O. anthropi* ve *O. intermedium* olarak iki türe ayrıldığı bildirilmiştir. *O. intermedium*'un

*Brucella* genusuna, *O. anthropi*'den daha fazla genetik ve antijenik benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Velasco ve ark., 1997; Velasco ve ark., 1998). Bu benzerlik, bazı araştırmacıları biyogüvenlik sağlama açısından, *Brucella* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanılan antijenlerin yerine bu benzer *Proteobacteria* cinslerindeki bakterilerden elde edilen antijenlerin kullanılma olasılığı ile ilgili çalışmalara yöneltmiştir. Zira önemli bir zoonoz olan brusellozis tanısında kültür yöntemi, zaman alıcı ve laboratuvar personeli için enfeksiyon riski taşımaktadır. Ancak serolojik testler için hazırlanan antijenler virulent *Brucella* suşlarından hazırlanmakta ve bu suşlar ile çalışan laboratuvar personeli için bir risk oluşturmaktadır. Delpino ve ark. (2004), *O. anthropi*, *Agrobacterium tumefaciens* ve *Sinorhizobium meliloti* kökenli sitosolik ve membran antijenleri ile brusellozisi insan, sığır, köpek ve koyun serumlarının ELISA reaktivitesini değerlendirmişler ve *B. canis* ile infekte köpeklerde *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* ve *Ochrobactrum* için sırası ile %58, %88 ve %84 sensitivite elde ettiklerini açıklamışlardır. Araştırmacılar sağlıklı insan, sığır ve koyun serumlarının bu antijenlere yüksek reaksiyon göstermesi nedeniyle, *O. anthropi*, *A. tumefaciens* ve *S. meliloti* orijinli sitosolik ve membran protein antijenlerinin *Brucella* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların indirekt teşhisinde insan, sığır ve koyunlarda tanısız bir fayda sağlamadığını bildirmişlerdir. Da Costa (1996) ve Cloeckart ve ark. (1999), yaptıkları çalışmada *Brucella* dış membran lipoproteinleri *Omp 10*, *Omp 16* ve *Omp19'a* yönelik spesifik monoklonal antikörlerin çoğunun ELISA'da *O. anthropi* (LMG 3331), *O. intermedium* (LMG 3301) ve *Phyllobacterium rubiacearum* ile kuvvetli çapraz reaksiyon verdiklerini, bu yanıtın *Rhizobium* ve *Agrobacterium* için daha zayıf olduğunu bildirmişlerdir. Ancak monoklonal antikörlerin hiçbiri S-LPS ile çapraz reaksiyon veren *Yersiniaenterocolitica*, *Escherichia coli* O:157 veya *Salmonella* Urbana gibi bakterilerle çapraz reaksiyon vermemiştir.

Aras ve Uçan (2008), *R. tropici* ile pleyt test antijeni hazırlamışlar ve *Brucella* ile enfeksiyon olma şüphesi olan sürülerden 100 koyun ve sığır serumunu hazırladıkları antijen ve *B. abortus* S99 suşundan hazırlanmış Rose-Bengal pleyt test (RBPT) antijeni ile aglütinasyon yönünden test etmişlerdir. *Brucella* serum tüp aglütinasyon (SAT) antijeni ile yapılan aglütinasyon testini gold standart olarak kabul ettiklerinde, *R. tropici* antijeninin koyunlarda sensitivite ve spesifitesini sırası ile %80,1 ve %59,5; sığırlarda %81,1 ve %22,6 olarak bulmuşlardır. Bu bulguların ışığında *R. tropici* tüm hücre antijeni ile yapılan aglütinasyon testinin sığır ve koyunlarda brusellozisin serolojik tanısında kullanılmayacağını, ancak bu hayvanların *R. tropici*'ye karşı antikör

geliştirdiklerinden yanlış pozitiflik yönünden göz önünde bulundurulmaları gerektiğini bildirmişlerdir.

Son yıllarda *O. anthropi*'nin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonlarda artış olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyonlar her ne kadar immunsupresif hastalarda (organ transplantı, AIDS ve kanser hastaları gibi risk grupları) daha sık görülse de immün sistemi baskılanmamış kişilerde de bu mikroorganizmanın etken olduğu farklı klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir (Holmes ve ark. 1998; Xu ve ark. 2003; Vila ve ark., 2016).

Bu çalışmada, *Brucella* genusunun en yakın akrabası olan alfa-*Proteobacteria* grubundaki *Rhizobium* ve *Ochrobactrum* genuslarında bulunan bakterilerden elde edilen antijenlerin; insan, sığır, koyun ve köpek brusellozisinin indirekt teşhisinde kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesidir.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmanın etik kurul raporu, Dolvet Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Yetki numarası: 2016/7) alınmıştır.

**Bakteriyel Suşlar:** Çalışmada kullanılan *Ochrobactrum anthropi* (LMG 3331: ATCC muadili 49188'dir) ve *Ochrobactrum intermedium* (LMG 3301) standart suşları ve *B. abortus* S99 suşundan elde edilmiş smooth lipopolisakarit (S-LPS) antijeni Animal Plant Health Agency (APHA) (Hayvan Bitki Sağlığı Ajansı), Weybridge, İngiltere'den temin edilmiştir. *Rhizobium tropici* standart suşu ise Selçuk Üniversitesi Prof. Dr. Uçkun Sait UÇAN tarafından temin edilmiştir. *B. abortus* S99 standart antijen suşu Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda bulunmaktadır.

**Serum Örnekleri:** Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Serum Bankası'nda bulunan, daha önceki çalışmalarda kullanılmış ve brusellozis yönünden doğruluğu kültür ile doğrulanmış 30 sığır, 24 koyun, 22 köpek ve 20 insan serumu, çalışmada *Brucella* antijeni ile birlikte diğer test antijenlerinin ELISA ile değerlendirilmesinde, pozitif kontroller olarak kullanıldı. Aynı şekilde brusellozis yönünden negatif anamnezi olan ve klasik serolojik yöntemlerle negatif bulunan 17 sığır, 23 koyun, 25 köpek ve 27 insan serumu çalışmada, her bir test antijeni için eşik değerinin belirlenmesinde kullanıldı.

**Antijen Üretimi:** Antijen olarak tüm test suşlarından ham LPS izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, Yi ve Hackett (2000) tarafından bildirilmiş olan tri-reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Kısaca, test suşları serum dekstroz agar (SDA)'da üretildikten sonra, üreyen koloniler PBS ile toplanarak su banyosunda 80°C'de 90 dakika bekletilerek inaktive edildi. Bakteri süspansiyonu, +4

°C'de 3.500 rpm'de santrifüj edilerek, üstteki besiyeri uzaklaştırıldı ve alttaki bakteri pelleti toplandı. Toplanan her bir gram bakteri pelleti için 2 ml tri-reagent kullanıldı. Karışım oda ısısında 10-15 dakika tam bir homojenizasyon için bekletildi. Bu sürenin sonunda, faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri pelleti için karışıma 200 µl kloroform eklendi. Süspansiyon vortekste hızlıca karıştırılarak 10 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra 12.000 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Böylece su ve organik fazlar ayrıldı. Su fazı yeni bir ependorf tüpe transfer edildi. Organik fazın üstüne 100 µl distile su eklendi ve karışım tekrar 12.000 g'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazı bir önceki su fazı ile kombine edildi ve elde edilen bu tri-reagent ile ekstrakte edilen LPS çözeltisi, -20 °C'de muhafaza edilen %95'lik etanol içinde hazırlanan 0.375 M magnezyum klorid ile karıştırıldı. Bu karışım 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan pellet 200 µl distile su içinde süspanse edildi. Daha sonra küçük miktarlarda steril PCR tüplerine taksim edilerek -20 °C'de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

**İndirekt ELISA (i-ELISA):** Çalışmada kullanılacak her bir ELISA antijeni için, kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonlar (checkerboard) yapıldı. ELISA solid faz antijeni 0.1 µg/kuyucuk olacak şekilde 0.05 M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı maxisorp polistiren pleytlere

(NUNC, 692620) blank (kör) kuyucuklar hariç diğer tüm kuyucuklarına 100 µl konuldu. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler +4 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. Ardından pleytler % 3'lük yağsız süt tozu içeren PBS solüsyonu ile 2 saat bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytler %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Primer antikor bağlanması aşamasında, her hayvan türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 yağsız süt tozu içeren PBS/T solüsyonu içinde 1:50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl konuldu. Pleytler oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini belirlenen dilüsyonda tüm kuyucuklara 100 µl ilave edildi. İnkübasyonu ve yıkama aşamalarını takiben üzerine 100 µl substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eklendi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek, ELISA okuyucuda (VERSAmax 3.13/B2573), 490 nm'de okundu. Her bir ELISA modeli için eşik değeri negatif kontrollerin OD değerlerinin ortalaması artı 2 standard sapma olarak belirlendi.

**Sensitivite ve Spesifisite Saptanması:** Her bir antijenin her bir konakçı türü için sensitivite ve spesifisitesi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

**Sensitivite** =  $\frac{\text{Brusella pozitif serumlar}}{\text{Brusella pozitif serumlar} + \text{Yanlış negatifler}}$

**Spesifisite** =  $\frac{\text{Brusella negatif serumlar}}{\text{Brusella negatif serumlar} + \text{Yanlış pozitifler}}$

## Bulgular

*O. anthropi*, *O. intermedium*, *R. tropici* ve *B. abortus* S99 suşlarından elde edilen ham lipopolisakkarit (LPS)'e karşı koyun, inek, insan ve köpeklerin *Brucella* (+) ve *Brucella* (-) serumları ile yapılan i-ELISA'da elde edilen OD değerlerinin aritmetik ortalaması Tablo 1'de sunulmuştur. Alınan sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, antijenlere karşı ortaya çıkan serolojik reaksiyon, homolog bakteri antijeni ile karşılaştırıldığında heterolog bakteri antijenleri için düşük bulundu. Ancak *Brucella* dışındaki diğer bakteriler kendi aralarında karşılaştırıldığında, en kuvvetli serolojik reaksiyonu insanlardaki sonuçlar hariç, *O. intermedium* gösterdi. Brusellozisin serolojik teşhisinde, testin tanısıl performansı pozitif ve negatif serumlar arasındaki OD farkına bağlı olduğundan, yine *O. intermedium* koyunlarda ve köpeklerde bu farkın diğerlerine göre en fazla olduğu bakteri olarak belirlendi.

Her bir ELISA için eşik değeri sağlıklı insan/hayvanlardan elde edilen OD değerleri kullanılarak hesaplandı. Her bir tür için değerlendirildiğinde, test antijenlerinin koyun, insan, sığır ve köpek brusellozisinin tanısında vermiş olduğu sensitivite ve spesifisite değerleri sırası ile Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4 ve Tablo 5'de sunuldu.

## Tartışma ve Sonuç

*Brucella* türleriyle bazı alfa-*Proteobacteria* üyeleri arasında yakın genetik ve antijenik yakınlık olduğu, bu yakınlığın çeşitli serolojik testlerde çapraz reaksiyonlar olarak da ortaya konulduğu birçok kaynakta bildirilmektedir (Aras ve Uçan, 2008; Delpino ve ark., 2004; Ducrotoy ve ark., 2018; Velasco ve ark., 1997; Velasco ve ark., 1998). Çoğu *Brucella* türünün yüksek patojenik potansiyeline karşılık, çoğu alfa-*Proteobacteria* sağlıklı bireyler için ya patojenik değildir ya da çok sınırlı bir patojenite göstermektedir. Özellikle *O. anthropi* ile immün

yetmezliği olan bazı hastalarda infeksiyonlar oluşturmadığı bildirilmektedir (Xu ve ark., 2003). bildirilse de sağlıklı bireyler için bir risk

**Tablo 1.** Test edilen antijenlerin canlı türlerindeki i-ELISA'ya ait OD değerleri

	KOYUN (+)	KOYUN (-)	İNEK (+)	İNEK (-)	İNSAN (+)	İNSAN (-)	KÖPEK (+)	KÖPEK (-)	BLANK	BLANK
A	0,5383	0,1969	0,4267	0,7821	0,5700	0,5743	0,5291	0,4380	0,0418	0,0436
İ	1,0019	0,3864	0,7517	0,5288	0,2997	0,2245	0,6728	0,2636	0,0422	0,0525
T	0,5809	0,1977	0,2512	0,6785	0,3455	0,2553	0,3432	0,4229	0,0420	0,0403
B	2,4027	0,5221	2,1950	0,4637	2,1607	0,3313	1,0663	0,3981	0,0410	0,0422

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

**Tablo 2.** Koyun brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Koyun (+)	Koyun (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5383	0,1969	0,386	42	92
İ	1,0019	0,386	0,546	71	84
T	0,5809	0,1977	0,369	40	100
B	2,4027	0,5221	0,682	92	92

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

**Tablo 3.** İnsan brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnsan (+)	İnsan (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5700	0,5743	0,687	0	100
İ	0,2997	0,2245	0,365	0	100
T	0,3455	0,2553	0,398	0	100
B	2,1607	0,3313	0,513	100	93

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

**Tablo 4.** Sığır brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	İnek (+)	İnek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,4267	0,7821	0,945	0	100
İ	0,7517	0,5288	0,648	0	100
T	0,2512	0,6785	0,823	0	100
B	2,1950	0,4637	0,578	100	100

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

**Tablo 5.** Köpek brusellozisinin tanısında bazı alpha-*Proteobacteria* ham LPS antijenlerinin kullanıldığı ELISA modellerinin tanısal performansı

	Köpek (+)	Köpek (-)	Eşik değeri (cut off)	Sensitivite (%)	Spesifisite (%)
A	0,5291	0,4380	0,521	7,3	100
İ	0,6728	0,2636	0,332	69	78
T	0,3432	0,4229	0,512	0	100

B	1,0663	0,3981	0,497	76	85
---	--------	--------	-------	----	----

(+): Pozitif serum (-): Negatif serum A: *O. anthropi* İ: *O. intermedium* T: *R. tropici* B: *B. abortus*

Ortak antijenik determinatlardan kaynaklanan çapraz reaksiyonlar, bazı önemli bakteriyel enfeksiyonların indirekt teşhisinde önemli sorunlara neden olmaktadır. Ancak çapraz reaksiyon veren türlerden biri patojenik değilse, bu çapraz reaksiyonun patojen olanın oluşturduğu enfeksiyonun saptanması noktasında tanısıl bir yararı olabilir. Bu hipotezden hareketle bu çalışmada, *Brucella* türleriyle enfekte olmuş insan ve hayvanlardan alınan, doğrulanmış pozitif serumlar ve sağlıklı birey ve hayvanlardan alınan negatif kontrol serumları, *O. anthropi*, *O. ntermedium*, *R. tropici* ve *B. abortus* S99 suşlarından elde edilen ham LPS antijenlerine karşı in house indirekt ELISA ile test edildi. Çalışma rough ve smooth suşlardan hazırlanan antijenler ile yapıldığından, sadece smooth *Brucella* suşları ile değil, rough suşlar olan *B. ovis* ve *B. canis* enfeksiyonlarının teşhisinde kullanıma kapasiteleri de araştırıldı. Ayrıca testlerin validasyonunda sadece sığır ve koyun değil, köpek ve insanlardan alınan serumlar da kullanıldığından, hastalığın serolojik tanısında alfa-*Proteobacteria* grubundaki 3 ayrı bakterinin kullanılması çok geniş kapsamlı olarak değerlendirildi.

Çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, *Brucella*-enfekte serumlar ile test edilen alfa 2 *Proteobacteria* üyeleri düşük reaktivite gösterdi. Oysa, Velasco ve ark. (1997), *B. melitensis* ve *O. anthropi* kökenli sitosolik proteinlerin ve membran antijenlerinin çok geniş çaplı çapraz reaksiyon verdiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanında, az oranda çapraz reaksiyonun dış membran proteinleri (OMPs) ve LPS (sadece kor ve lipid A bölgesi) seviyesinde de ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Bunun nedeni çalışmamızda kullandığımız antijenin ham olmasına rağmen, yani bir miktar OMPs taşımaya rağmen büyük oranda LPS tabakası olmasıdır. Çalışmada protein yerine LPS antijeninin seçilmesinin nedeni, smooth *Brucella* türlerine maruz kaldıktan sonra gelişen serolojik yanıtın büyük bir oranda S-LPS tabakasına karşı olmasıdır. Ayrıca S-LPS'ye karşı oluşan antikörler bugün için kullanılan standard serolojik testlerin temelini oluştururlar (Aras ve Uçan, 2008). Çalışmada ham LPS antijenlerine karşı ortaya çıkan en yüksek serolojik reaksiyon, tahmin edilebileceği gibi *B. abortus* S99 ham LPS antijenine karşı saptandı. Bunu çok daha düşük yoğunlukta olmak üzere *O. ntermedium*, *O. anthropi* ve *R. ropici* antijenleri izledi. En yüksek reaksiyonun *O. intermedium* olması bu türün rough LPS taşıyor olması ile açıklanabilir. Çünkü R-LPS'de, S-LPS'den farklı olarak O-polisakkarit ya indirgenmiş ya da tamamen yıkılmış olabilir. Dolayısıyla R-LPS'de

daha geniş bir kor polisakkariti mevcuttur (Ducrotay ve ark., 2018). Ayrıca DNA hibridizasyon çalışmaları *O. intermedium*'un *Brucella* genusuna *O. anthropi*'den daha yakın olduğunu göstermiştir (Holmes ve ark., 1998). Velasco ve ark. (1998) tüm hücre ekstraktlarını kullanarak yaptıkları western blot analizinde, *O. anthropi* LMG3301'in (*O. intermedium*'un sinonimi) *Brucella* antijenlerine *O. anthropi* LMG 3331'den daha yakın olduğunu ve ayrıca yaptıkları konvensiyonel fenotipik karakterizasyon çalışmalarında da, bu yakınlığı saptadıklarını bildirmişlerdir. *O. intermedium*'un çalışmamızda daha yüksek reaktivite göstermesi, araştırmacıların bu bulguları ile uyum göstermektedir. Ayrıca, *O. intermedium*'un tür olarak koyun ve köpeklerde daha yüksek reaktivite vermesi, pozitif ve negatif kontrol serumları arasında bir fark oluşturmasının nedeni koyun ve köpeklerin rough türler olan *B. ovis* ve *B. canis*'in doğal konakçıları olmasına büyük oranda bağlı olabilir. Çalışmamızda koyun brusellozisinin tanısında *O. intermedium* ham LPS antijeninin kullanıldığı ELISA modelinin sensitivitesi %71, spesifisite ise %84 olarak bulundu. *R. tropici* ELISA modelinde ise sensitivite %40, spesifisite %100 olarak tespit edildi. Köpek brusellozisiyle ilgili olarak *O. intermedium* için sensitivite %69, spesifisite %78 olarak belirlendi. Uçan ve Aras (2008), koyunlarda *R. tropici* ile hazırlanan lam aglütinasyon testinde sensitiviteyi %80,1 ve spesifisiteyi %59,5 olarak bulmuştur. Sonuçların farklı çıkmasının nedeni, kullanılan testin ve kontrol serumlarının farklı olmasıyla ilgili olabilir. Zira çalışmada antijen olarak tüm bakteri değil onun bazı dış membran proteinlerini de içeren ham LPS tabakası ELISA ile test edildi. Ayrıca kullanılan serumlar pozitif ve negatifliği önceden teyit edilmiş serumlardı. Bütün bunlar alınan farklı sonuçların nedeni olabilir.

Sonuç olarak, sığır ve insan brusellozisi açısından test edilen antijenlerin hiçbiri istenilen düzeyde yüksek sensitivite ve spesifisite göstermedi. Bu türlerde kontrol serumları yüksek reaksiyon gösterdiklerinden eşik değeri çoğu zaman pozitif kontrol ortalamasının üstüne çıktı. Böylece spesifisite %100, sensitivite ise 0 veya 0'a yakın düzeyde belirlendi. Özellikle sığırlarda negatif kontrollerin *R. tropici* ve *O. anthropi* için yüksek OD değeri göstermesi, bu hayvanların çoğu bitki patojeni ve toprak bakterisi olan bu türlere fazlaca maruz kalmış olmalarıyla ilgili olabilir. İnsanlarda *B. abortus* dışındaki tüm bakteri türleri negatif kontrollere genel olarak düşük bir reaktivite gösterdi. Bu durum, insanların söz konusu bitki

patojenleriyle düşük düzeyde temas halinde olmasıyla açıklanabilir.

Çalışmada, sadece rough bir tür olan ve dolayısı ile S-LPS yerine R-LPS taşıyan, O-polisakariti ya indirgenmiş ya da tamamen yıkılmış olan *O. intermedium* antijeniyle, sadece koyun ve köpekte kısmen kabul edilebilir sınırlarda bir tanısal performans alınmıştır. Bu grup bakteri antijenlerinden alınan sonuçlar *Brucella* antijenleri ile benzer sonuçlar alınmış olsaydı, biyogüvenlik açısından neredeyse risk oluşturmayan bu bakteriler ile antijen üretimi yapılabilecekti.

Çalışmada alınan tüm sonuçlar dikkate alındığında, proteobakterilerin  $\alpha$ -2 alt grubunda yer alan mikroorganizmaların brusellozis serolojik tanısında birtakım çapraz reaksiyonlara neden olabileceği ve bu durumun yanlış pozitiflik yaratabileceği akılda tutulmalıdır. Ancak brusellozis serolojik teşhisinde kullanılan antijenler tüm bakteriden hazırlandıkları için, daha ziyade anti-LPS antikörlerini saptayacağından, rough olmayan  $\alpha$ -2 proteobakterilerin yanlış pozitiflik için fazla bir sorun yaratacağı düşünülmektedir. Öte yandan bu grup bakterilerden hazırlanan daha saf antijenlerin, *B. canis* ve *B. ovis* infeksiyonlarında kullanıma potansiyelini artırabileceği ve bu yönde yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16148 proje numarası ile Yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir. Destekleri için kuruma teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

Aras Z, Uçan US, 2008: *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* Enfeksiyonlarında Oluşan Antikorların *Rhizobium tropici* Antijeni ile Tesbit Edilmesi. *Vet Bil Derg*, 24 (1), 47-52.

Cloekaert A, Tibor A, Zygmunt SM, 1999: *Brucella* outer membrane lipoproteins Share antigenic

determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. *Clin Diagn Lab Immuno*, 6, 627-629.

Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiébaud 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.

Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC, 2004: Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha Proteobacteria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11 (5), 868-873.

Ducrotoy MJ, Munoz PM, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I, 2018: A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev Vet Med*, 151, 57-72.

Holmes B, Popoff M, Kiredjian M, Kersters K, 1998: *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. from human clinical specimens and previously known as Group Vd. *Int J of Syst Bacteriol*, 38,406-416.

Velasco J, Diaz R, Grilló MJ, Barberán M, Marín C, Blasco JM and Moriyón I, 1997: Antibody and delayed-type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella* spp. *Clin Diagn Lab Immunol*, 4, 279-284.

Velasco J, Romero C, López-Goñi I, Leiva J, Díaz R, Moriyón I, 1998: Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov. a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int J Syst Bacteriol*, 48,759-768.

Vila A, Pagella H, Bello GV, Vicente A, 2016: *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system. *J Infect Dev Ctries*, 10 (4), 432-436.

Vizcaino N, Cloekaert A, Verger J, Grayon M, Fernandez-Lago L, 2000: DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microb Infect*, 2 (9),1089-1100.

Yi EC, Hackett M, 2000: Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram negative bacteria. *Analyst*, 125 (4), 651-6.

Xu J, Moore JE, Millar BC, Crowe M, McClurg R, Heaney LG, 2003: Identification of a novel alphaproteobacterium causing bacteremia in immunocompetent patient. *J Infect*, 47, 167-169.

\*Yazışma Adresi: Sevil Erdenliğ Gürbilek  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD,  
Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: serdenlig@harran.edu.tr