

BRUCELLA ABORTUS VE BRUCELLA MELİTENSİS ENFEKSİYONLARINDA OLUŞAN ANTİKORLARIN RHİZOBİUM TROPİCİ ANTİJENİ İLE TESPİT EDİLMESİ

Zeki ARAS¹Uçkun Sait UÇAN^{1*}

Detection of Anti-brucella Antibodies in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Infections by an Antigen obtained from *Rhizobium tropici*

Geliş Tarihi: 20.08.2008

Kabul Tarihi: 25.08.2008

Özet: Brucellozisin laboratuvar teşhisinde bakteriyolojik, moleküler ve serolojik testler kullanılmaktadır. *Brucella* cinsi mikroorganizmalar, 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum* türlerinin de içinde bulunduğu *Proteobactereaceae*'nin 2a alt grubunda yer almaktadırlar. Bu çalışmada, koyun ve sığır kan serumlarında (toplam 200 serum) bulunan *B. abortus* ve *B. melitensis*'e karşı oluşmuş antikorları teşhis etmede *Rhizobium tropici* (*R. tropici*) tüm hücre antijeni kullanıldı. *R. tropici* ile *B. abortus* ve *B. melitensis* arasındaki genetik yakınlık Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) yöntemi ile araştırıldı. Hazırlanan antijenin sensitivitesi ve spesifitesi, sığır kan serumları için sırasıyla % 81.1 ve % 22.6, koyun kan serumları için ise sırasıyla % 80.1 ve % 59.5 olarak hesaplandı. RAPD-PCR analizi sonucunda, genetik benzerlik *B. abortus* ve *R. tropici* arasında % 33.3, *B. melitensis* ile *R. tropici* arasında % 46.2 ve *B. abortus* ile *B. melitensis* arasında % 72.7 olarak hesaplandı. Sonuç olarak, *B. abortus* ve *B. melitensis* ile *R. tropici* arasındaki genetik benzerlik RAPD-PCR kullanılarak ortaya konuldu. *R. tropici*'den üretilen tüm hücre antijeni ile brucellozisin serolojik teşhisinin yapılamayacağı fakat hayvanların *R. tropici*'ye karşı antikor geliştirebilecekleri ve bu antikorlarında *Brucella* serolojisinde yanlış pozitiflik sebepleri arasında yer alabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Brucellosis, *Rhizobium tropici*, seroloji

Summary: Laboratory diagnosis of brucellosis is made by serological, molecular or cultural methods. *Brucella* spp., *Agrobacterium*, *Ochrobactrum* and *Rhizobium* all belong to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria* as revealed by studies on 16S rRNA scequence analysis. *O. anthropi* has been used to diagnose brucellosis. In this study, whole cell extract from *Rhizobium tropici* (*R. tropici*) was examined for detecting antibodies to *B. abortus* and *B. melitensis* in cattle and sheep sera (200 in total), respectively. Genetic similarity between the bacteria *R. tropici*, *B. abortus* and *B. melitensis* was also investigated by RAPD-PCR. Using the sera from cattle, sensitivity and specificity were calculated as being 81.1% and 22.6%, respectively when the SAT considered as Gold Standard. RLAT's sensitivity for sheep sera (80.1%) was found being close to that of cattle sera (81.1%) while specivity of RLAT for sheep sera (59.5%) was quite higher than the figure for the cattle sera (22.6%). In conclusion, use of whole cell antigen from *R. tropici* is not practical in sero diagnosing brucellosis in cattle and sheep. It is also considered that some antibodies to *R. tropici* are also mounted in the hosts contributing misunderstanding of the positivitiness in the serology.

Key Words: Brucellosis, *Rhizobium tropici*, serology

Giriş

Brucellosis; sığır, koyun, keçi, domuz ve koç gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı, nekrotik ve yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır (Alton ve ark., 1988; Bilgehan 1992; Arda ve ark., 1997).

Gram-negatif, fakültatif ve hücre içi bakterilerden oluşan *Brucella* cinsinin içerisinde, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* (Buxton ve Fraser, 1977; Alton ve ark., 1988; Arda ve ark., 1997) ve *B. maris* (Bricker ve ark., 2000) olmak üzere 7 tür bulunmaktadır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sonuçlarına göre türler arasında % 90' dan fazla DNA homolojisi vardır (Cloeckeaert ve ark., 1999).

Brucellozisin laboratuvar teşhisinde bakteriyolojik, moleküler ve serolojik testler kullanılmaktadır (Alton ve ark., 1988; Arda ve ark., 1997; Uçan ve ark., 1999; Aras ve Uçan, 2002; Uçan ve Aras, 2007). Smooth (S) *Brucellaların* (*B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*) neden olduğu enfeksiyonlarda oluşan antikorların tespitinde outhouse membrane S-lipopolisakarit (S-LPS) kullanılmaktadır. *Brucella*'nın S-LPS'i ile bazı Gram-negatif bakteriler (*Yersinia enterocolitica* O:9 gibi) arasında serolojik çapraz reaksiyon belirlenmiş ve bu durumun da brucellozisin tanısında yanlış pozitifliklere neden olduğu bildirilmiştir (Alton ve ark., 1988).

Rhizobium spp., bitkilerin köklerinde nodüllere neden olan, atmosferik nitrojeni fikse eden, Gram-negatif ve simbiotik bakterilerdir. Yonca benzeri bitkilerin yetiştirilmesinde, elde edilen ürünü artırmak

1 Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji ABD, 42075 Konya
@: usucan@selcuk.edu.tr

amacıyla nitrojen fikzatorü olarak *Rhizobium* cinsi bakteriler kullanılmaktadır (Nap ve Bisseling, 1990).

Brucella cinsi mikroorganizmalar, 16S rRNA sekans analizi sonucuna göre Proteobactereaceae sınıfının 2a alt grubunda yer almaktadırlar. Bu alt grupta ayrıca *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Phyllobacterium* ve *Ocrobactrum* gibi bakteriler bulunmaktadır (De Lay ve ark 1987, Corbel ve Moriyon 2006). Yapılan çalışmalarda, *Brucella* spp. ile *O. anthropi* arasında genetik yakınlık olduğu (Velasco ve ark, 1997) ve çapraz reaksiyon oluştuğu gösterilmiştir (Leal-Klevezas ve ark, 2005). Ayrıca, *B. ovis* R-LPS ile *O. anthropi* R-LPS arasındaki çapraz reaksiyon da, doğal enfekte koç serumlarının her iki antijen ile test edilmesiyle gösterilmiştir (Velasco ve ark, 1997). Yapılan bir başka çalışmada ise, *Brucella* outer membran proteinlerine (Omp) karşı hazırlanmış monoklonal antikorlar (Omp10, Omp 16, Omp19) ile *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Agrobacterium* ve *Phyllobacterium* yüzey antijenleri arasındaki çapraz reaksiyon gösterilmiş ve genetik benzerlik yanında antijenik benzerliğin varlığı da vurgulanmıştır (Cloekaert ve ark, 1999). Ayrıca, keçi ve farelerde, *B. abortus* ve *B. melitensis*'e karşı enfeksiyon veya aşılama sonucu oluşmuş antikorlar *O. anthropi* antijeni ile başarılı bir şekilde teşhis edilmiştir (Young, 2000).

Rhizobium ve *Brucella* cinsi bakteriler arasındaki ortak antijenik yapının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, Omp10, Omp 16 ve Omp19 antijenik yapılarının ortak olduğu belirlenmiş (Cloekaert ve ark, 1999) fakat diğer yüzey antijenleri hakkında çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada, koyun ve sığır kan serumlarında bulunan *B. abortus* ve *B. melitensis*'e karşı oluşmuş antikorlar ile *Rhizobium tropici* tüm hücre antijeni arasındaki immünolojik ilişkiyi araştırmak ve olası bir çapraz reaksiyonu ortaya koymak amaçlanmıştır. Ayrıca, *R. tropici* ile *B. abortus* ve *B. melitensis* arasındaki genetik yakınlık Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) yöntemi ile ortaya konulmuştur.

Materyal ve Metot

Sığır ve Koyun Kan Serumları: Konya il merkezi ile ilçelerinde bulunan, aşısız ve geçmişinde *B. abortus* (sığır sürüleri) veya *B. melitensis* (koyun sürüleri) izole edilmiş 2'şer adet sığır ve koyun sürüsünden 2007-2008 yılları arasında alınan 100'er adet kan serumu kullanıldı. Toplanan sığır ve koyun kan serumları 56 °C de 30 dakika tutularak inaktive edilip, kullanılıncaya kadar -20 °C de muhafaza edildi.

SAT ve RBPT Antijenleri: Her iki testte kullanılan antijenler Pendik Veteriner ve Kontrol Araştırma Enstitüsünden temin edildi.

Standart Suşlar: Antijen hazırlamak amacıyla, *R. tropici* CIAT 899 suşu S.Ü. Ziraat Fakültesi kültür

koleksiyonundan temin edildi. RAPD-PCR' da kullanılmak üzere, *B. melitensis* 16 M suşu Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden ve *B. abortus* S99 suşu S.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD kültür koleksiyonundan temin edildi.

Serolojik Testler; Rose Bengal Plate Test (RBPT): Toplanan kan serumları ve antijen oda sıcaklığına (22 ± 4 °C) getirildikten sonra bir lam üzerine serum örneğinden bir damla (30µl) damlatıldı. Üzerine aynı miktarda antijen ilave edilip, yaklaşık 2 cm çapında bir daire oluşturacak şekilde antijen ile serum 4 dakika boyunca karıştırıldı. Süre sonunda aglütinasyonun gerçekleşmesi Brucellozis yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Serum Aglütinasyon Testi (SAT): Toplanan test serumlarının, % 0.5 fenollü fizyolojik tuzlu su (FTS) ile dilüsyonları yapıp her bir tüpteki 0.5 ml serum dilüsyonu üzerine 0.5 ml SAT antijeni ilavesiyle 1:10, 1:20,.. 1:1280 dilüsyonlar elde edildi. Tüpler 37 °C de 17-24 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirildi. 1:40 ve daha yüksek titrede 80 IU:ml'ye karşılık olan ++ (%50 berrak) pozitif reaksiyon gösteren aşısız hayvanlara ait serumlar Brusellozis yönünden pozitif kabul edildi.

***R. tropici*'den Antijen Hazırlanması:** Antijen, Lisle ve Carmichael (1974)'in bildirdiği metoda göre hazırlandı. *R. tropici* CIAT 899 suşunun ilk kültürü yapıldıktan sonra, 20 adet petri kabına dökülen Yeast-Mannitol-Agarda (Mannitol 10 g, K₂HPO₄ 0,5 g, MgSO₄ 7H₂O 0,2 g, yeast ekstrakt 0,5 g, NaCl 0,5 g, agar 15 g, distile su 1000 ml) subkültürleri yapıp 30 °C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun sonunda üreyen koloniler 20 ml PBS ile toplanıp 10 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Toplanan pelet aynı işlemle 2 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra pelet 125 g (ıslak hücre)/L olacak şekilde PBS ile süspanse edildi ve birkaç katlı steril gazlı bezden süzöldükten sonra 56 °C de 1 saat tutularak inaktive edildi. Süspansiyon, litreye 6 ml boya solüsyonu (2 g brillant green ve 1 g kristal violet 300 ml distile suda çözdürüldü) eklenerek boyandı ve packed cell volume % 6 olacak şekilde sulandırılıp cam yünü ile filtre edildi. Son olarak, % 0,01 final konsantrasyon olacak şekilde thiomersal eklendi ve koyu renkli bir şişede + 4 °C de muhafaza edildi.

***Rhizobium* Lam Aglütinasyon Testi (RLAT):** Lam üzerine 40, 20, 10 ve 5 µl serum ve aynı miktarlarda antijen damlatılarak kombinasyonlar yapıldı ve en ideal antijen-antikor miktarı belirlendi. En ideal reaksiyonun, 20 µl antijen ile 20 µl serumun karıştırılmasıyla gerçekleştiği tespit edildi ve testlerde bu miktarlar kullanıldı. Süre olarak 1, 2 ve 3. dakikalardaki aglütinasyon sonuçları ayrı ayrı kaydedildi.

RAPD-PCR Tekniği ile Genotiplendirme: *R. tropici* Yeast Mannitol Agarda, *B. abortus* S99 ile *B. melitensis* 16 M suşları da kanlı agarda (CM0271B, Oxoid) üretildikten sonra DNA ekstraksiyonunda (Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Cat. #A1120, USA) üretici firmanın belirttiği şekilde kullanıldı.

RAPD-PCR Amplifikasyonunda, 25 µl'lik reaksiyon karışımı (5µl 10x PCR buffer, 250 µM her bir dNTP (DNTP-100, Sigma), 1 U Taq polimeraz (EPO282, MBI Fermentas), 6,25 µM primer (IDT,USA), 1mM MgCl₂ ve 2,5 µl ekstrakte edilmiş DNA) kullanıldı. Kullanılan primer ve dizilimi 5' CGGCCCTGT 3' şeklindeydi. Bu karışım ısı döngü cihazında (Techne Progene, Cambridge Ltd., UK), 94 C°de 3 dakika ön denatürasyona tabi tutuldu. Sonra her döngüsü 94 C° de 1 dakika, 35 C° de 2 dakika ve 72 C° de 1 dakikalık adımlardan oluşan 10 döngü ve daha sonra her döngüsü 94 C° de 1 dakika, 50 C° de 2 dakika ve 72 C° de 1 dakikalık adımlardan oluşan 30 döngü bir reaksiyon ile çoğaltıldı. Son uzatma olarak 72 C° de 4 dakika tutulduktan sonra PZR ürünleri 0.5 µg/ml etidyum bromid ve % 1.6'lik agaroz (Prona) içeren jel ortamında elektroforez edildi. Marker olarak 100 bç'lik bandlar oluşturan marker (Vivantis) kullanıldı (Fekete ve ark, 1992; Tcherneva ve ark, 2000).

RAPD analizi sonucu elde edilen bantlardan yararlanılarak bantların varlığında bir, yokluğunda sıfır olacak şekilde veri matrisleri oluşturuldu. Elde edilen veri matrislerinden yararlanarak genetik benzerlik değerleri Nei ve Li (1985)'nin formülüne (M=NAB/NT) göre hesaplandı.

Bulgular

İncelenen toplam 100 adet sığır kan serumunun 69 adedinin RBPT ile pozitif sonuç verdiği ve SAT ile 1/40 ve üzeri (pozitif) titre verdiği tespit edildi. Test edilen 100 adet koyun serumunun ise 21 adedi RBPT ve SAT (³ 1/40) ile pozitif sonuç verdi.

RLAT ile yapılan değerlendirmede, *Brucella* negatif olan 31 adet sığır kan serumundan, 1. dakikada 2, 2. dakikada 19, 3. dakikada 24 ve 5. dakikada 30 tanesi *Rhizobium* antijeni ile aglütinasyon gösterdi. *Brucella* pozitif olan 69 adet sığır kan serumundan, aynı dakikalarda sırasıyla 3, 39, 56 ve 65 tanesi aglütinasyon gösterdi (Tablo).

Koyun kan serumlarının RLAT ile 1., 2., 3. ve 5. dakikalarda yapılan değerlendirmelerinde, *Brucella* pozitif olanların sırasıyla 1, 9, 17 ve 18 tanesi; negatif olanların sırasıyla 6, 22, 32 ve 49 tanesi *Rhizobium* antijeni ile aglütinasyon gösterdi (Tablo).

Testler sırasında antijen otoaglütinasyon yönünden de değerlendirildi ve her seferinde negatif sonuç gözlemlendi. Ayrıca, Pendik Veteriner Kontrol ve

Araştırma Enstitüsünden temin edilen *Brucella* pozitif kontrol serumuyla yapılan RLAT'de de kuvvetli aglütinasyon gözlemlendi. SAT testi *altın standart* kabul edildiğinde, RLAT'inin sensitivitesi ve spesifitesi, sığır kan serumları için sırasıyla % 81.1 ve % 22.6, koyun kan serumları için ise sırasıyla % 80.1 ve % 59.5 olarak hesaplandı.

RAPD-PCR analizi sonucunda, *B. abortus* suşundan 5, *B. melitensis* suşundan 6 ve *R. tropici* suşundan 7 adet bant amplifiye edildi (Şekil). Elde edilen veri matrislerinden yararlanarak suşlar arasındaki genetik benzerlik değeri Nei ve Li'nin (1985) formülüne (M=NAB/NT) göre *B. abortus* ve *R. tropici* arasında % 33.3, *B. melitensis* ile *R. tropici* arasında % 46.2 ve *B. abortus* ile *B. melitensis* arasında % 72.7 olarak hesaplandı.

Tartışma ve Sonuç

Brusellozisin laboratuvar teşhisinde bakteriyolojik, moleküler ve serolojik testlerden yararlanılmaktadır (Alton ve ark, 1988). Serolojik testlerde teşhis antijeni olarak değişik antijenler kullanılmaktadır. Bunlar, tüm hücreden oluşan antijenler, LPS ekstraktları, hücrenin tüm komponentlerini içeren hot saline extract (HS) ve stoplazmik protein antijenleridir (Garin-Bastuji ve ark, 1998). *O. anthropi* ile *B. melitensis* sitoplazmik protein antijenleri arasında çapraz reaksiyon belirlenmiş ve brusellozisin tanısında protein antijeni ve deri allerjeni olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Velasco ve ark, 1997).

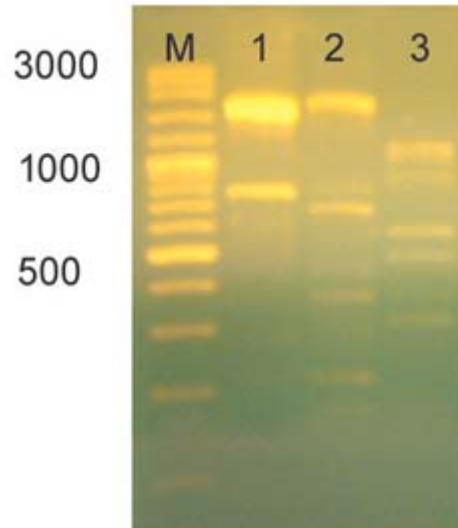
Ayrıca, *B. ovis* R-LPS ile *O. anthropi* R-LPS arasındaki çapraz reaksiyon, doğal enfekte koç serumlarının her iki antijen ile reaksiyon vermesiyle gösterilmiştir (Velasco ve ark, 1997).

Rhizobium cinsi bakterilerin antijenik yapısı ve *Brucella* cinsi bakterilerle olan ilişkisi ile ilgili çalışmalar çok sınırlıdır. Cloeckert ve ark (1999) yaptıkları çalışmada, *Brucella* Omp'lerine karşı hazırlanmış monoklonal antikorlar (Omp10, Omp 16, Omp19) ile *Rhizobium leguminosarum* yüzey antijenleri arasındaki çapraz reaksiyonu göstermiştir.

Rhizobium yüzey polisakkariti olan exopolysaccharide succinoglycan (EPS I)'ın *Brucella* LPS'i ile benzeştiği ve her iki yapının da virülens faktörü olabileceği bildirilmiştir (Doerrler ve ark, 2001). Yüksek biyogüvenlik standartlarına gerek kalmadan ve patojen olmayan bir etkenden hazırlanacak ancak brusellozisin tanısında kullanılabilir bir antijen eldesi, brusellozis için antijen üretecek laboratuvarlar için pratik bir çözüm sağlayabilir. Bu çalışmada *R. tropici* suşundan hazırlanan tüm hücre antijeni ile sığır ve koyun kan serumları aglütinasyona tabi tutuldu ve *Brucella* pozitif serum örneklerinin çoğunda çapraz reaksiyon tespit edildi. SAT testi altın standart kabul edildiğinde, testin sensitivitesi ve spesifitesi, sığır kan

Tablo. Sığır ve Koyun Kan Serumu Serolojik Muayene Sonuçları

Sığır kan serum sonuçları		<i>Rhizobium tropici</i> antijeni ile pozitif veren serum sayısı			
	Serum sayısı	1. dakika	2. dakika	3.dakika	5. dakika
RBPT (+), SAT ($\geq 1/40$)	69	3	39	56	65
RBPT(-), SAT (-)	31	2	19	24	30
Sığır serum toplam	100	5	58	80	95
Koyun kan serum sonuçları		<i>Rhizobium tropici</i> antijeni ile pozitif veren serum sayısı			
	Serum sayısı	1. dakika	2. dakika	3.dakika	5. dakika
RBPT (+), SAT ($\geq 1/40$)	21	1	9	17	18
RBPT(-), SAT (-)	79	6	22	32	49
Koyun serum toplam	100	7	31	49	67



Şekil. RAPD-PCR sonucu elde edilen bakteriyel DNA fingerprintlerinin elektroforetik (%1,6 agaroz jel) analiz sonuçları. 1, *B. abortus*; 2, *B. melitensis*; 3, *R. tropici*; M, VC 100bp Plus DNA Ladder (Vivantis).

serumları için sırasıyla % 81.1 ve % 22.6, koyun kan serumları için ise sırasıyla % 80.1 ve % 59.5 olarak hesaplandı. Brucella negatif serum örneklerinin bazılarında aglütinasyonun görülmesi, bu örneklerin alındığı hayvanların Rhizobium eklenmiş gübre kullanılarak yetiştirilen bitkilerle beslenmeleri ve bu etkenlerin immüniteyi uyarmış olmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda moleküler yöntemlerin gelişmesi ile bakterilerin genotiplendirilmesinde DNA Parmak İzi analiz yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır (Olive ve Bean, 1999; Tcherneva ve ark, 2000; Ridler ve ark 2005). Bu yöntemlerden Random Amplifiye Polimorfik DNA-PCR (RAPD-PCR) (Tcherneva ve ark, 2000), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Ridler ve ark, 2005) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Olive ve Bean, 1999) Brucella suşlarının genotiplendirmesinde başarı ile kullanılmaktadır. RAPD-PCR yönteminin, duyarlılığı ve çeşitli mikroorganizmaların identifikasyonunda başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir (Kılıç ve ark, 2003). Tcherneva ve ark (2000), RAPD-PCR'ı kullanarak *B. abortus* biovar 1 ile *B. melitensis* biovar 1, *O. anthropi* ve *Agrobacterium tumefaciens* arasındaki genetik benzerliği araştırmış ve sonucu sırasıyla % 57.1, % 42.1 ve % 25 olarak açıklamışlardır. Ayrıca, Fekete ve ark (1992) aynı yöntemi kullanarak *B. abortus* biovar 1 ile *B. melitensis* biovar 1 arasındaki genetik yakınlığı % 85 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada, *B. abortus* ile *R. tropici* arasında % 33.3 ve *B. melitensis* ile *R. tropici* arasında % 46.2 ve *B. abortus* ile *B. melitensis* arasında % 72.7 oranında genetik benzerlik tespit edildi. Tcherneva ve ark (2000) Rhizobium cinsi bakterileri bu yönden araştırmamış olsalar da Proteobactereaceae sınıfının diğer üyelerinin Brucella cinsine olan genetik yakınlığı hakkında elde ettikleri oranlar bu çalışmada tespit edilen oranlarla benzeşmektedir. Öte yandan, Gandara ve ark. (2001) DNA-DNA hibridasyon çalışmaları ile *R. tropici* ile çeşitli Brucella türleri arasında % 12 oranında bir benzerlik olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, *B. abortus* ve *B. melitensis* ile *R. tropici* arasındaki genetik benzerlik, RAPD-PCR tekniği çok güçlü bir ayırım tekniği olmamakla birlikte, bu teknik ile ortaya konmuştur. Çalışma ile *R. tropici*'den üretilen tüm hücre antijeni ile brucellozisin serolojik teşhisinin yapılamayacağı sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988). "Techniques for the Brucellosis Laboratory". INRA, Paris.

Aras, Z., Uçan, U.S. (2002). Brusellozda Serum Selenyum Düzeyleri, Vet. Bil. Derg., 18, 63-6.

Arda, M., Minbay, A., Aydın, N., Akay, Ö., İzgür, M.,

Leloğlu, N., Kahraman, M., Ilgaz, A., Diker, S. (1997). "Özel Mikrobiyoloji". Medisan Yayınevi, Ankara.

Bilgehan, H. (1992). "Klinik Mikrobiyolojik Tanı". Fakülteler Kitapevi, Barış Yayınları, İzmir.

Bricker, B., Ewalt, D.R., Macmillan, A.P., Foster, G., Brew, S. (2000). Molecular characterization of Brucella strains isolated from marine mammals. J. Clin. Microbiol., 38, 31258–1262.

Buxton, A., Fraser, G. (1977). Animal Microbiology volume 1, Blackwell Scientific Publications, Edinburgh.

Cloekaert, A., Tibor, A., Zygmunt, S.M. (1999). Brucella outer membrane lipoproteins Share antigenic determinants with bacteria of the family Rhizobiaceae. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 6, 627-629.

Corbell, M.J., Moriyon, I. (2006). Minutes, International Committee on Systematic Bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56, 1169-1170.

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.

Doerrler, W.T., Reedy, M.C., Raetz, R.C. (2001). An Escherichia coli mutant defective in lipid export. J. Biol. Chem., 276, 11461-11464.

Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Stic, R.W. (1992). Amplification fragment length polymorphism in Brucella strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. J. Bacteriol., 174, 7778-7784.

Gandara, B., Merino A.L., Rogel, M.A., Martínez-Romero, E (2001). Limited genetic diversity of Brucella spp.. J. Clin. Microbiol., 2001, 39, 235-240

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.

Kılıç, A., Yapar, M., Saraçlı, M.A., Baysallar, M., Doğanç, L. (2003). Spinal kord yaralanmalı hastalardan izole edilen Escherichia coli suşlarının Random amplifiye polimorfik DNA-PCR (RAPD) Yöntemi ile genetik analizi. Gülhane Tıp Derg., 45, 143 – 146.

Lisle, W.G., Carmichael, L.E. (1974). A Plate Agglutination for the Rapid Diagnosis of Canine Brucellosis. Am. J. Vet. Res., 35, 905-909.

Nap, J.P., Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant prokaryote symbiosis: the legume root nodule. Science, 250, 948-954.

Nei, M., Li, W.H. (1985). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction

endonucleases. Proc. Nat. Acad. Scien. USA, 76, 5269–5273.

Olive, D.M., Bean, P. (1999). Principles and Applications of methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms, J. Clin. Microbiol., June, 1661-1669.

Ridler, A.L., Leyland, M.J., Fenwick, S.G., West, D.M. (2005). Demonstration of polymorphism among *Brucella ovis* field isolates by pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Microbiol., 108, 69–74.

Tcherneva, E., Rijpens, N., Jersek, B., Herman, L.M.F. (2000). Differentiation of *Brucella* species by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. J. App. Microbiol., 88, 69–80.

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

Uçan, U.S., Güler, L., Erganiş, O., Ok, Ü., Kuyucuoğlu, Y., Gündüz, K., Durgut, R., Ataman, M.B., Civelek, T. (1999). Atlarda brusellozis üzerine karşılaştırmalı Serolojik Bir Çalışma. Veterinarium, 10(1): 20-24.

Velasco, J., Diaz, R., Grillo, M.J., Barberan, M., Marin, C., Blosco, J.M., Moriyon, 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.

Young, H. (2000). Induction of protection, antibodies and cell mediated immune responses by *Brucella abortus* strain RB51, *Ochrobactrum anthropi* and recombinants thereof. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.