

## Brusellozis Şüpheli Sürülerdeki İneklerden Alınan Klinik Örneklerden *Brucella* spp Tanısı İçin PCR ve Bakteriyolojik Kültür Yöntemlerinin Karşılaştırılması\*\*

Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK<sup>1\*</sup>, Osman Yaşar TEL<sup>1</sup>, Oktay KESKİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 18.05.2015

Kabul Tarihi: 30.06.2015

**Özet:** Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde brusella infeksiyonu olduğu düşünülen sürülerdeki ineklerden alınan 68 adet kan (akyuvar kısmı), serum, süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin tanısı için bakteriyolojik kültür ve PZR yöntemlerinin karşılaştırılması hedeflendi. Serum örneklerinin Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) antijeni ile aglutinasyon testinde 35 örnek (% 51,4) ve süt örneklerinin Süt Ring Testi (SRT) ile analizinde ise 39 süt örneği pozitif bulundu (% 57,4). Süt örneklerinden 15 (% 22) adet *Brucella* spp. izolasyonu gerçekleşti. Tüm izolatlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlandı. Akyuvar kısmından ve vajinal sıvılardan *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadı. Klinik örneklerin tümünün DNA ekstraksiyonlarının ardından yapılan cins spesifik PZR sonucu, süt örneklerinin 11'inden (% 16,2) ve akyuvar örneklerinin 6'sından (% 8,8) 223 bp'lik DNA amplifikasyonu saptanırken, vajinal sıvıların hiçbirinden DNA amplifikasyonu gerçekleştirilemedi. Serolojik olarak negatif inekler kültürel ve moleküler yönden negatif bulundu. İzole edilen *Brucella* kültürlerine yapılan Bruce ladder multipleks PZR sonucu 15 izolatın tümü *B.abortus* profili gösterdi. Bakteriyel kültür altın standart olarak alınarak, süt örneği için PZR duyarlılığı % 78,9 ve özgüllüğü % 100 olarak belirlendi. Sonuç olarak, kan ve vajinal sıvılardan bakteriyel izolasyonun yapılamaması ve PZR duyarlılığının bu örneklerde düşük olmasının nedeninin, hastalığın doğası gereği etkenin aralıklı olarak süt ve vajinal akıntılar ile atılmasına ve kanda bakteri yükünün hastalığın evrelerine göre değişebilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle gerek kültür ve gerekse DNA amplifikasyonu için kan, süt ve vajinal sıvı örneklerinin etkeni atık materyallere göre daha az taşıyabileceğinin akılda tutulmasının ve hastalığın kesin tanısı için bakteriyel serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin kombine olarak kullanılmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella abortus*, PZR, süt, *Brucella* spp. izolasyonu, teşhis

### Comparison of PCR and Bacteriological Culture to Diagnose *Brucella* Species in Clinical Samples Collected from Cows in Brucellosis Suspected Herds

**Abstract:** In this study, we compared PCR and bacteriological culture methods to detect *Brucella* species in milk, blood (buffy coat) and vaginal swabs collected from cows in suspected herds in Şanlıurfa Province. Of 68 sera and milk samples tested, 35 sera (51.4%) and 39 milk samples (57.4%) were positive by Rose Bengal Plate Test (RBPT) and Milk Ring Test (MRT), respectively. A total of 15 (22%) *Brucella* spp. were isolated from the milk samples. All the isolates were identified as *B. abortus* biotype 3. We failed to isolate *Brucella* spp. from both buffy coat portion of blood samples and vaginal swabs. After DNA extractions from the clinical samples, a genus specific PCR was used to detect DNA in milk, buffy coats and vaginal swabs. PCR products with a molecular size of 223 bp were obtained from 11 milk (16.2%) and 6 buffy coats (8.8%) samples. No amplification could be made from vaginal swabs. Neither bacterial isolation nor DNA amplification was ever detected from serologically negative animals. All isolates were revealed *B.abortus* by Bruce ladder multiplex PCR. Compared with culture, sensitivity and specificity of milk PCR were determined as 78.9% and 100%, respectively. According to the results, we thought that low sensitivity of cultural isolation and PCR in blood, milk and vaginal swabs materials could be due to intermittent shedding of the agent through milk and vaginal secretions and variation of bacterial load in the blood according to the stages of infection. Therefore, it was concluded that combination of bacteriological, serological and molecular methods could be very useful for definitive diagnosis of the disease, especially in samples with low bacterial load.

**Keywords:** *Brucella abortus*, PCR, Milk, *Brucella* spp. isolation, diagnosis

### Giriş

Brusellozis birçok hayvan türünü etkileyen ve ekonomiye ciddi olarak zarar veren zoonotik bir enfeksiyondur. *Brucella* cinsinin günümüzde, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella microti* ve *Brucella inopinata* olmak üzere 10 türü bulunmaktadır. Bu sınıflandırma konakçı tercihi ve

biyokimyasal ve üreme özelliklerine dayanmaktadır (Scholz ve ark., 2008; OIE, 2012).

Hastalığın tanısında serolojik, bakteriyolojik, kültürel ve moleküler yöntemler değişen başarı oranları ile kullanılmaktadır. Etkenin izolasyon ve identifikasyonu hastalığın tanısında altın standart olarak kabul edilmektedir. Klasik biyotiplendirme prosedürü CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S ve üreaz üretimi,

bazik fuksin ve tiyinin boyalarına duyarlılık, monospesifik A ve M ve Rough antiserumlar ile aglütinasyon ve *Brucella* fajları ile lizis testlerini kapsamaktadır (Alton ve ark., 1988; Corbel, 1989). Etken klinik materyallerde aynı yoğunlukta bulunmamakta özellikle kan, süt ve vajinal sıvı gibi etkenin göreceli olarak daha az bulunduğu örneklerden etkenin izolasyonu daha bir önem kazanmaktadır. Hastalığın moleküler tanısında etkenin farklı tür, biyotip ve suşlarını tanımlayan çok sayıda PZR tabanlı test tanımlanmıştır (Baily ve ark., 1992; Bricker ve Halling, 1994; Garcia-Yoldi ve ark., 2006; Mayer-Scholl ve ark., 2010). Bakteriyolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin birbirlerine göre çeşitli avantajları bulunmaktadır.

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde brusella enfeksiyonu olduğu düşünülen sürülerdeki ineklerden alınan 68 adet kan (akyuvar kısmı), serum, süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin tanısı için bakteriyolojik kültür ve PZR yöntemlerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

## Materyal ve Metot

**Suşlar ve klinik materyal:** Referans *B. abortus* 544, *B. melitensis* 16M, *B. abortus* S19 suşları laboratuvarımız kültür koleksiyonundan ve *B. suis* 1330 ve *B. microti* DNA ları AHVLA, Weybridge, İngiltere'den temin edildi. Çalışma materyalini 68 hayvandan alınan serum, kanın akyuvar kısmı, süt ve vajinal sıvı oluşturdu. Örnek alınan sığırların daha önce *B. abortus* S19 aşısı ile aşılanmadıkları bilgisi alındı.

**Serolojik yöntemler:** Serum örnekleri Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) antijeni ile ve süt örnekleri Süt Ring Testi (SRT) ile analiz edildiler.

**Bakteriyel identifikasyon:** Bakteriyel izolasyon için süt, kanın akyuvar kısmı ve vaginal sıvı örnekleri kullanıldı. Ekim materyallerinin katı selektif besi yerine ekimden önce içine amfoterisin B (1 µg/ml), vankomisin (20 µg/ml), % 1 dekstroz ve % 5-10 serum ilave edilen zenginleştirme sıvı besiyerine ekildiler. Ekilen örnekler % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 6 hafta süre ile inkübe edildi. Bu süre zarfında selektif besiyerine her hafta pasaj yapıldı. Altı hafta boyunca üreme görülmeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi. Selektif besi yeri olarak içine selektif *Brucella* supplement (SR0083A) katılan serum dekstroz agar kullanıldı (Farrell's besiyeri). Fakat 'Farrell's medium'da kullanılan 'nalidilixic asit' ve 'bacitracin' konsantrasyonları bazı *B. abortus* ve *B. melitensis* suşları üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduğundan, selektif besi yeri için ayrıca modifiye edilmiş Thayer-Martin besiyeri kullanıldı (OIE, 2012). Üreyen koloniler klasik

biyotiplendirme prosedürüne göre biyotiplendirildi (Alton ve ark., 1988).

***Brucella* izolatlarına cins spesifik ve multipleks PZR (Bruce ladder) uygulanması:** Kanın akyuvar kısmı, süt ve vaginal sıvılardan genomik DNA ekstraksiyonu ticari kit (DNeasy Blood& Tissue Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak üreticinin kullanım talimatlarına uygun olarak yapıldı. Kültürlerden bakteri DNA izolasyonu için test ve kontrol suşlarının bir öze dolusu kültürü 200 µl steril distile suda süspanse edildi. Daha sonra 99°C'de 10 dakika tutulan kültürler ısı ile inaktivasyonlarının ardından 12.000 g ile 20 saniye santrifüj edildiler ve kalıp DNA için bu supernatantlar kullanıldı. Bütün *Brucella* türlerinde olduğu gösterilen ve 31 kDa'luk BCSP31 proteinini kodlayan bir gen üzerinde bulunan 223 bp'lik PZR hedef dizisi cins spesifik DNA amplifikasyonu için Baily ve ark. (1992) tarafından tanımlanan protokole uygun olarak yapıldı. Bu amaçla B4 F (5' TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3') ve B5 R (5' CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG 3') (Sigma Aldrich) primerleri bu hedef dizisini çoğaltmak için kullanıldı. Multipleks PZR, Mayer-Scholl ve ark., (2010) bildirdiği yöntemle yapıldı. Bu amaçla 25 µl reaksiyon hacmi 2x Qiagen Multiplex Master Mix (Qiagen, Almanya), 9 primer çiftinin her birinden 0.2µM ve 1µl kalıp DNA içerdi. Amplifikasyonlar örneklerin 95°C'de 15 dakikalık denaturasyonun ardından, denaturasyon, primer birleşmesi ve uzaması adımları sırası ile 94°C'de 30 saniye, 58°C'de 90 saniye ve 72°C'de 180 saniye olarak ve 30 döngü olarak gerçekleşti. Amplikonlar % 1,5 olarak hazırlanan agoroz jelde 100 V'da koşuruldu ve ardından ayrılan bantlar UV ışığı altında görüntülendi.

## Bulgular

Şanlıurfa ilinde brusella enfeksiyonu olduğu düşünülen sürülerdeki 68 inekten alınan kan (akyuvar kısmı), serum, süt ve vaginal sıvı örneklerinden brusellozisin serolojik, bakteriyolojik ve moleküler tanısı için sırası ile RBPT, SRT, klasik bakteriyel izolasyon ve *Brucella* biyotiplendirme, cins spesifik ve multipleks PZR yöntemleri uygulandı. Serum örneklerinin RBPT antijeni ile aglütinasyon testinde 35 örnek (% 51,4) ve süt örneklerinin Süt Ring Testi (SRT) antijeni ile analizinde ise 39 süt örneği (% 57,4) pozitif bulundu. Süt örneklerinden 15 (% 22) adet *Brucella* spp. izolasyonu gerçekleşti. Tüm izolatlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlandı. Akyuvar kısmından ve vaginal sıvılardan *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadı. Klinik örneklerin tümünün DNA ekstraksiyonlarının ardından yapılan cins spesifik PZR sonucu, süt örneklerinin 11'inden (% 51,4)

16,2) ve akyuvar örneklerinin 6'sından (% 8,8) 223 bp' lik DNA amplifikasyonu saptanırken, vaginal sıvıların hiçbirinden DNA amplifikasyonu gerçekleştirilemedi. Serolojik olarak negatif ineklerin hiçbirinden ne bakteriyel izolasyon ne de *Brucella* DNA amplifikasyonu saptandı (Tablo 1.).

İzole edilen *Brucella* kültürlerine yapılan Bruce ladder multipleks PZR sonucu 15 izolatin tümü *B.abortus* profili gösterdi (Şekil 1.) Bakteriyel kültür altın standart olarak alınarak, süt örneği için PZR duyarlılığı % 78,9 ve özgüllüğü % 100 olarak belirlendi.

**Tablo 1.** Klinik örneklerin brusellozis yönünden serolojik, bakteriyolojik ve moleküler test sonuçları.

Saklama no	Örnek no	RBPT* sonuç	SRT** sonuç	Kültür sonuç	Bscp31 gen spesifik PZR			Bruce ladder PZR
					süt	Akyuvar kısmı	Vajinal sıvı	
1	9095	-	+	-	-	-	-	-
2	8641	-	+	-	-	-	-	-
3	0832	+	+	-	+	-	-	-
4	7311	-	-	-	-	-	-	-
5	8706	-	+	-	-	-	-	-
6	8687	-	-	-	-	-	-	-
7	7283	+	+	+	+	+	-	<i>B. abortus</i>
8	0969	-	-	-	-	-	-	-
9	8540	-	-	-	-	-	-	-
10	9042	-	-	-	-	-	-	-
11	2503	-	-	-	-	-	-	-
12	4302	-	-	-	-	-	-	-
13	2400	-	-	-	-	-	-	-
14	0239	-	-	-	-	-	-	-
15	15	+	+	-	-	-	-	-
16	16	+	+	+	-	+	-	<i>B. abortus</i>
17	078	-	-	-	-	-	-	-
18	6039	-	-	-	-	-	-	-
19	6365	-	-	-	-	-	-	-
20	067	-	+	-	-	-	-	-
21	3003	-	-	-	-	-	-	-
22	4951	+	++	+	+	+	-	<i>B. abortus</i>
23	2669	-	-	-	-	-	-	-
24	5761	-	-	-	-	-	-	-
25	7983	-	+	-	-	-	-	-
26	6794	-	-	-	-	-	-	-
27	9366	-	-	-	-	-	-	-
28	5042	-	+	-	-	-	-	-
29	3448	-	-	-	-	-	-	-
30	5572	-	-	-	-	-	-	-
31	8390	-	-	-	-	-	-	-
32	xx071	-	-	-	-	-	-	-
33	3681	+	++	+	+	+	-	<i>B. abortus</i>
34	1684	-	++	-	-	-	-	-
35	Küpesiz	-	-	-	-	-	-	-
36	114	-	-	-	-	-	-	-
37	59585028	+	++	+	+	-	-	<i>B. abortus</i>
38	63694569	+	++	+	-	-	-	<i>B. abortus</i>
39	63666307	+	++	-	-	-	-	-
40	59588222	+	-	-	-	-	-	-
41	63666205	+	++	-	-	-	-	-
42	59594667	+	++	-	-	-	-	-
43	59576615	+	+	+	+	-	-	<i>B. abortus</i>
44	59564856	+	+	-	-	-	-	-
45	59581124	+	++	+	+	-	-	<i>B. abortus</i>
46	59580309	+	+	-	-	-	-	-
47	22877958	+	+	+	-	-	-	<i>B. abortus</i>
48	63666226	+	++	-	-	-	-	-
49	63653321	+	+	-	-	-	-	-
50	59591105	+	++	-	-	-	-	-
51	59564898	+	++	-	-	-	-	-
52	59575182	+	++	-	-	-	-	-
53	63666219	+	++	+	+	+	-	<i>B. abortus</i>
54	59575139	+	++	-	-	-	-	-
55	63666203	+	-	-	-	-	-	-
56	59590755	+	+	-	-	-	-	-
57	59575139	+	++	+	-	-	-	<i>B. abortus</i>
58	5956117	+	++	+	-	-	-	<i>B. abortus</i>

59	59575182	+	-	-	-	-	-	-
60	59584258	+	++	-	-	-	-	-
61	4061	+	++	+	+	-	-	<i>B. abortus</i>
62	1262	++	++	+	+	-	-	<i>B. abortus</i>
63	4452	+	-	-	-	-	-	-
64	5297	++	+	-	-	-	-	-
65	4930	-	+	-	-	-	-	-
66	5572	-	-	-	-	-	-	-
67	5776	-	-	-	-	-	-	-
68	4334	++	++	+	+	+	-	<i>B. abortus</i>
<b>Toplam</b>	29 (-)	35(+)	39(+)	15(+)	11(+)	6(+)	0	15
<b>%</b>	% 42,6	% 51,4	% 57,4	% 22	% 16,2	% 8,8	% 0	% 22

\*RBPT: Rose Bengal Pleyt Test

\*\*SRT: Süt Ring Testi

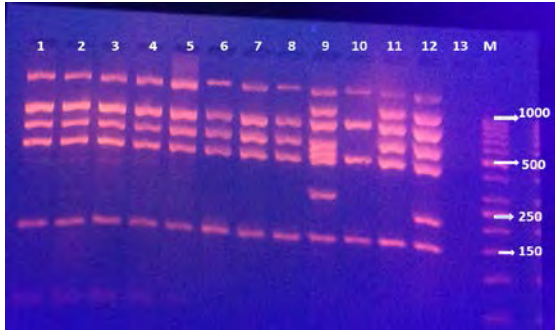
## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde brusella infeksiyonu olduğu düşünülen sürülerdeki ineklerden alınan 68 adet kan (akyuvar kısmı), serum, süt ve vajinal sıvap örneklerinden *Brucella* etkenlerinin tanısı için bakteriyolojik kültür ve PZR yöntemlerinin karşılaştırılması hedeflendi. Serum örneklerinin 35(% 51,4) adedi RBPT antijeni ile pozitif reaksiyon gösterdi ve süt örneklerinin 39 adedi (% 57,4) SRT antijeni ile pozitif bulundu. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün Türkiye'de Bruselloz ve Tüberkülozun Kontrol Stratejisinin Belirlenmesi Projesi 2011 yılı raporuna göre, brusellozun sığır sürülerinde fert prevalansı % 2,7, sürü prevalansı % 7,8, koyun sürülerinde fert prevalansı % 3,4, sürü prevalansı % 22,5 olarak bildirilmiştir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012). Ülkemizde sığır brusellozunun 2011 yılında yapılan seroprevalans çalışmasında seropozitiflik oranı birey bazında % 2,6 ve sürü bazında % 6,9 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda pozitiflik oranlarının bu kadar yüksek bulunması alınan 68 örneğin brusellozis açısından infeksiyon riski taşıyan sürülerden alınmış olmasına bağlandı. Süt örneklerinin 15'inden (% 22) *Brucella* spp. izolasyonu gerçekleşti. Türkiye'de sığırlardan izole edilen izolatların yaklaşık % 95'inin *B. abortus* biyotip 3 olduğu bildirilen daha önceki çalışmalarla uygun olarak tüm izolatlar *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlanıldı.(Erdenliç ve ark., 2007; İca ve ark., 2008; Şahin ve ark., 2008). Çalışmada izolasyon için kan yerine, *Brucella* türlerinin infekte hayvanda kanda lökositler içinde bulunması nedeniyle kanın akyuvar kısmı kullanıldı. Böylece fagosite edilmiş olarak daha konsantre olarak bulunma ihtimali ve dolayısı ile izolasyon duyarlılığının artırılması için düşünüldü. Ancak ne kanın lökosit fraksiyonundan ne de vaginal sıvaplardan *Brucella* spp. izolasyonu yapılamadı.

Klinik örneklerin DNA ekstraksiyonlarının ardından yapılan cins spesifik PZR sonucu, süt örneklerinin 11'inden (% 16,2) ve akyuvar örneklerinin 6'sından (% 8,8) 223 bp'lik DNA

amplifikasyonu saptanırken, vaginal sıvapların hiçbirinden DNA amplifikasyonu gerçekleşmedi. Kanın lökosit fraksiyonundan *Brucella* spp. izolasyonu yapılamazken etkenin moleküler olarak saptanmasının nedeni, etkenin lökositler içinde bulunduğundan bu hücrelerin lizisi olmadan bakterilerin kültür ortamında izolasyonunun yapılamaması olabilir. Bu nedenle kanın akyuvar kısmına ait örneklerin izolasyonu öncesi örneklerin birkaç kez dondurulup çözülmesi izolasyonun duyarlılığını artırabilir. Bu ihtimalin değerlendirilmesine yönelik sonraki çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. İzole edilen *Brucella* kültürlerine yapılan Bruce ladder multipleks PZR sonucu 15 izolatın tümü *B. abortus* profili göstererek klasik yöntemler ile paralel sonuç gösterdi.(Şekil 1.) Bakteriyel kültür altın standart olarak alınarak, süt örneği için PZR duyarlılığı % 78,9 ve özgüllüğü % 100 olarak belirlendi. Sütten *Brucella* DNA sının izolasyonu etkenin hücre içi bir ajan olması ve sütün yağ tabakasına yüksek affinite duyması nedeni ile genellikle zor bir prosedürdür. Sütten *Brucella* spp. mikroorganizmalarının PZR ile saptanmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmış ve değişik başarı oranları ile kullanılmıştır (Güler ve ark.; İlhan ve ark., 2008; Romero ve Lopez-Goni, 1999; OIE, 2012). Sunulan çalışmada, kültür pozitif 15 süt örneğinin 11 adedinde PZR pozitif sonuç alınmış ve 4 süt örneğinden etken moleküler olarak saptanamamıştır. Bunun nedeninin, etkenin süt örneğinde çok az sayıda olması ve/veya DNA ekstraksiyonundaki olası herhangi bir problemten kaynaklanabileceği düşünüldü. Çalışmada alınan süt örnekleri 6 hafta süre ile zenginleştirme besiyerinde inkübe edilmiş ve her hafta farklı iki katı selektif besi yerine ekim yapılmış ve bu sürenin sonunda üreme görülmeyen süt örneği izolasyon açısından negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle çalışmada kültür duyarlılığı artırılmış az sayıda mevcut olma ihtimali olan örneklerde bu şekilde etken üretilmiş olabilir. Diğer taraftan, bir süt örneğinde izolasyon yapılamamışken etkenin

moleküler olarak saptanmasının nedeninin etkenin canlı olmamasına veya örnekleme öncesi kematerapötik kullanımına bağlı olabileceği düşünüldü.



**Şekil 1.** Test ve referans suşlara uygulanmış multipleks PZR (Bruce ladder) sonuçları. M: 100 bp ladder, 1-7: *B. abortus* test izolatları, 8: *B. abortus* 9: *B. microti*, 10: *B. abortus* S19, 11: *B. melitensis*, 12: *B. suis*, 13: Negatif kontrol

Sonuç olarak, lökosit fraksiyonu ve vaginal sıvaplardan bakteriyel izolasyonun yapılamaması ve PZR duyarlılığının bu örneklerde düşük olmasının nedeninin, hastalığın doğası gereği etkenin aralıklı olarak süt ve vajinal akıntılar ile atılmasına ve kanda bakteri yükünün hastalığın evrelerine göre değişebilmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle gerek kültür ve gerekse DNA amplifikasyonu için kan, süt ve vajinal svap örneklerinin etkeni atık materyallere göre daha az taşıyabileceğinin akılda tutulmasının ve hastalığın kesin tanısı için bakteriyel serolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin kombine olarak kullanılmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988: Bacteriological methods. In: "Techniques the Brucellosis Laboratory", INRA, France.
- Anonim, 2012: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Brusellanın Konjunktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi. <http://www.tarim.gov.tr/Documents/Mevzuat/Genelgeler/BRUCELLA.pdf>, Erişim tarihi: 26.03.2015.
- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG, 1992: Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95, 271-275.
- 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.

- Corbel MJ, 1989: Microbiology of the genus *Brucella*. In "Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects" Ed.; Young EJ, Corbel MJ, editor. 1<sup>st</sup> ed. CRC Press, BocaRaton, FL, USA.
- Erdenlig S, Iyisan AS, Baklan EA, Aksoy HY, 2007: Biovar distribution of *Brucella* isolates from livestock in Turkey, 1999 to 2006. In: Proceedings of the 15 th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants. FEMESPRUM, Kuşadası, Turkey, pp.27-28.
- Garcia-Yoldi D, Marin CM, De Miguel MJ, Munoz PM, Vizmanos JL, 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* Rev1. *Clin Chem*, 52, 779-781.
- Güler L, Gündüz K, Ok U, 2003: Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol*, 93,53-61.
- Ica T, Aydın F, Erdenliğ S, Güler L, Büyükçangaz E, 2008: Characterisation of *Brucella abortus* biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b. *The Veterinary Record*, 29, 660-662.
- İlhan Z, Aksakal A, Ekin IH, Gulhan T, Solmaz H, Erdenlig S, 2008: Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Lett in Appl. Microbiol*, 46(3), 301-306.
- Mayer-Scholl A, Draeger A, Göllner C, Scholz HC, Nöckler K, 2010: Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Methods*, 80,112-114.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kamper P, Neubauer H, Cloeckert A et al., 2008: *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58 (2), 375-382.
- Office International des Epizooties 2012: Bovine Brucellosis Chapter 2.4.3. In "Manuel of the Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals". 7<sup>th</sup> ed. OIE, Paris, France.
- Romero C, Lopez-Goni I, 1999: Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 65, 3735-3737.
- Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlı S, 2008: Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Product*, 40,281-286.

\*\*Bu araştırma makalesi XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresinde, (21-24 Ekim 2014, Kemer/Antalya ) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

**\*Yazışma Adresi:** Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail:sevilerdenlig@yahoo.com