



Bruselloz Tanısı ve Epidemiyolojik Çalışmalarda Moleküler Yöntemlerin Kullanılması

Oktay GENÇ¹ Gülnur SERDAR²

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun-TÜRKİYE

²Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü, Samsun-TÜRKİYE

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Oktay GENÇ; E-mail: ogenc@omu.edu.tr ; ORCID: 0000-0003-0777-6824

Atıf yapmak için: Genç O, Serdar G. Bruselloz tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2019; 16(1): 23-28.

Özet: Brusellozis, Latin Amerika, Orta doğu, Afrika ve Asya'da endemik seyreden zoonotik bir enfeksiyondur. Günümüze kadar 11 *Brucella* türü tanımlanmıştır. *Brucella* türleri içerisinde insanlarda en şiddetli enfeksiyona neden olan *B. melitensis* türü olup bunu *B. suis* ve *B. abortus* izlemektedir. *Brucella* türleri farklı sayılarda biyovarlardan oluşmakta ve immün serumlar ile aglütinasyon, bazı boyalar ve fajlara duyarlık özelliklerine göre de ayırımları yapılmaktadır. Enfeksiyon kaynağının tespiti, enfeksiyon ve/veya aşı suşlarının karakterizasyonu ve yeni türlerin ortaya konulması önceleri biyovarlara göre yapılır iken, son yıllarda Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) gibi PZR tabanlı yöntemler ile Multilokus variable number tandem repeat analysis (MLVA), Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) gibi moleküler test ve yöntemler ile yapılmaktadır. Bu derleme ile bu yöntemler ve bu alanda yapılan çalışmalar ile ilgili güncel bilgiler sunulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Brusellozis, LAMP, moleküler tanı, MLST, MLVA

Molecular Methods and Applications in Brucellosis Diagnosis and Epidemiological Studies Molecular Methods in Brucellosis

Summary: Brucellosis is an endemic zoonotic infection in Latin America, the Middle East, Africa and Asia. Up to 11 *Brucella* species are described. Among the *Brucella* species, *B. melitensis* is the most severe infectious species in humans, followed by *B. suis* and *B. abortus*. These *Brucella* species are differentiated into biovar and characterized by immunological sera and agglutination, some dyes and phage susceptibility properties. However, some biovars can not be distinguished by these methods and additional molecular tests such as Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA), Multilocus Sequence Typing (MLST) and PCR based methods such as Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) are needed for the detection of infection source. This compilation provides current information on these methods and the work done in this area.

Key words: Brucellosis, LAMP, molecular diagnosis, MLST, MLVA

Giriş

Brusellozis günümüzde hala önemli zoonotik hastalıklardan biri olarak yerini korumaktadır. Birçok ülkede eradikasyonu başarılı ise de yabani ve evcil hayvanlarda tüm kıtalarda özellikle Akdeniz bölgesinde, Ortadoğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika'da endemik olarak seyretmektedir (5,35). Brusellalar tanımlanmalarına, tür ve biyotip ayırımlarına rağmen klasik yöntemler ile suşlarının epidemiyolojik orijinleri ve suşlardaki varyasyonlar izlenememektedir (12). Saha suşlarının klonal benzerliklerinin, enfeksiyon kaynağının ve yeni *Brucella* türlerinin belirlenmesinde biyotiplendirme yöntemlerinin yeterli ayırımı sağlayamaması derlemede anlatılan moleküler yöntemlerin kavranmasına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (24,25). Bu yöntemler, LAMP ve RFLP gibi PZR tabanlı metotlar ile MLVA ve MLST gibi moleküler test ve yöntemlerdir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve "Loop Mediated Isothermal Amplification" LAMP uygulamaları

Brucella tür ve bazı biyovarlının tanımlanması etkenin üreme özelliklerine, serotiplendirme ve bakteriyofaj tiplendirme yöntemlerine göre yapılmakta, ancak epidemiyolojik araştırmalar için önemli olan suşlar arasındaki farklılıkların belirlenmesidir. Epidemiyolojik ilişkiler önceleri biyovarlara göre yorumlanır iken, yeni marker genlerin veya DNA dizilerinin belirlenmesi; PZR, PZR'ye dayalı yöntemler ile birlikte MLVA ve MLST gibi moleküler yöntemlerin kullanımını gerekli kılmıştır (6,9,17,27,34,40). *Brucella* türlerinin PZR ile belirlenmesinde saha örneklerinde, polimeraz aktivitesinin lipid, nükleaz, yüksek divalent Ca iyonları ile engellenmesi ve DNA amplifikasyon sorunlarına rağmen daha sensitiv ve kısa süreli sonuç vermesi özellikleriyle PZR tabanlı testler kültür testlerine tercih edilmektedir (31,41). *Brucella* teşhisi amacıyla ilk PZR uygulamalarından sonra çeşitli moleküler markerlar tür spesifik identifikasyon amacıyla kullanılmış-

tir (1,9,14,25,30). Brusellanın cins ve tür düzeyinde PZR ile ayırımı amacıyla çeşitli genler belirlenmiştir (7,29). Bu amaçla kullanılan bazı genler 16S rRNA, BCSP31, omp2, omp19, bp26, IS711'dir (28). Günümüze kadar PZR-tabanlı metotlara yönelik 400'ün üzerinde araştırma mevcut olup Yu ve Nielsen (42) bu çalışmaların bir kısmını yayınlamıştır. Bricker ve Halling (2), 4 *Brusella* türünü (sırasıyla *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis*) *Brusella* tür isimlerinin baş harflerinden ibaret bir sinonim "AMOS-PZR" ile ifade edilen bir yöntem ile belirlediğini bildirmiştir. Aşı suşlarının ve *B. abortus* biovar 3,5,6 ve 9'un belirlenmesi bu yöntem ile mümkün olmamıştır. Bu ayırımı yapabilmek amacıyla Bricker ve Halling (3), *B. abortus* S19 ve RB51 ayırımını AMOS-PZR'a 3 oligonükleotid ilavesi ile yapmış ve bu testi multipleks AMOS-PZR olarak adlandırmıştır. Daha sonra Garcia-Yoldi ve ark (10), çabuk ve tek bir basamakta *Brusella* ayırımını yapabilen yeni bir multipleks PZR testi geliştirmişlerdir. Genç ve ark (13) ile Terzi ve ark (36) yaptıkları çalışmalarda Lopez-Goni ve ark (19) tarafından önerilen primerlerden bazıları ile tür düzeyinde teşhis ve aşı suşu-saha suşu ayırımı çalışmalarını yapmışlardır. Elde edilen sonuçlar hem pratik olması hem de spesifik olması ile avantajlar sağlamıştır. Lopez Goni ve ark (19), *Brusella* tür ve aşı suşları *B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 ve *B. abortus* RB51 ayırımını yapabilen Bruce-ladder olarak tanımlanan bir multipleks PZR geliştirmişlerdir. Bu test, *B. canis* ve *B. suis* ayırımını da yapabilen ilave primerler ile gerçekleştirilmiştir. *Brusella* türlerinin moleküler teşhisi amacıyla "point of care" olarak adlandırılan hızlı, etkin ve duyarlı sonuçlar elde edilen LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) yöntemi geliştirilmiştir. LAMP protokolünde, zincir yer değişikliği aktivitesini sağlayan Bst DNA polimeraz enzimi ve gende 6 bölgeyi tanımlayan 4 primer çifti kullanılmaktadır (22,37). Test süresi konvansiyonel PZR'de 2-3 saat iken, bu test ile 30-60 dakikaya inmektedir. Gendeki çeşitli bölgeleri tanımlayan spesifik primerler testin spesifitesini artırır iken ilave loop primerlerinin kullanımı sensitiviteyi artırmaktadır. Ayrıca termal cykler ve jel görüntüleme gibi sofistike materyallere ihtiyaç duyulmaması testin diğer bir avantajıdır. Bu test DNA ürünleri ile birlikte fazla miktarda pirofosfat moleküllerinin birikimine neden olmakta ve bu durum Calcein ve Mangano gibi florofor boyaların ilavesi ile gösterilmektedir. Reaksiyonun başlangıcında calcein, floresans mangano iyonları tarafından söndürülür sonraki dönemlerde biriken DNA ürünleri pirofosfat moleküllerine bağlanarak floresan verir. Bu ürünler divalent Mg iyonlarına bağlanarak çoğaltılır ve çıplak gözle gözlenebildiği gibi elektroforez ve UV kaynağı ile de tespit edilmektedir. Kolorimetrik tespit ise Hidroksinaftol blue ve SYBR Green gibi boyaların ilavesi ile mümkündür, bu boya ile negatif örnekler menekşe renge, pozitif örnekler ise gökyüzü mavisine dönüşmektedir. Brusellanın LAMP ile teşhisi ilk olarak Ohtsuki ve ark (23) tarafından BCSP31 geni baz alınarak yapılmıştır. Bu

çalışmada 22 suş içerisinde 6 *Brusella* türünün 10fg konsantrasyonda tespiti mümkün olmuştur. Test 63°C de 35 dakikada gerçekleştirilmiştir. Pan ve ark (26) süt örneklerinde omp25 gen bazlı LAMP testi ile oldukça yüksek sensitivite (1.3×10^3 cfu/ml) de genomik DNA tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Multi lokus variable number tandem repeat analysis (MLVA)

Brusella enfeksiyonunun takibi açısından biyovar ve suş farklılıklarının belirlenmesi özellikle birçok biyotipin yaygın olduğu populasyonlarda önemlidir. Yüksek oranda konservasyona rağmen bu amaçla birçok farklı testin geliştirilmesi devam etmektedir. Bu alanda özellikle *B. suis*, *B. melitensis* ve *B. abortus* genom karşılaştırmaları yapılmaktadır (7). *B. melitensis*'de 3100 özel ve değişken gen belirlenmiş ve bunların bir kısmı potansiyel diyagnostik marker, bir kısmı da *Brusella* türlerinin ayırımı amacıyla kullanılmıştır. Yakın akraba *Brusella* türlerinin ayırımı amacıyla 3 *Brusella* biyovarı (*B. abortus* 941, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M) genomik sekans verileri kullanılmaktadır. Brusellanın moleküler tiplendirilmesi amacıyla birçok yöntem mevcuttur. Az sayıda polimorfizm nedeniyle çoğu genetik teknikler ile türler içerisindeki suşların ayırımı oldukça güçtür. Bu ayırım için en iyi yaklaşımlardan biri multi lokus variable number tandem repeat analysis (MLVA)'dır (39). MLVA, lokal epidemiyolojilerin ve enfeksiyon tespitinde retrospektif olarak sonuçların değerlendirilmesinde hala ilk tercih olarak önem taşımaktadır. Bu yöntem ile, mutasyon oranlarındaki sıklık, aşı ya da pasajı yapılan suşlardan orijin alan çok sayıda izolatin araştırılması mümkündür. MLVA harici diğer moleküler yöntemler biyovar düzeyinde sınırlı bilgi vermesi itibarı ile tercih edilmemektedir. *Brusella* tür ve biyovarları günümüzde 16 genetik bölge temel alınarak MLVA ile detaylı olarak tiplendirilmektedir. Şu ana kadar 8, 10, 11, 15, 16 ve son olarak da 21 lokus araştırmalarda kullanılmıştır. MLVA tiplendirilmesinde, 16 değişken tandem tekrar bölgelerinin belirlenmesi ile *Brusella* izolatlarının izlenmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir (4,18). *Brusella* MLVA veritabanı 2006 yılında Fransanın Orsay şehrinde Paris Sud Üniversitesinde geliştirilmiştir. O zamandan beri bu programa düzenli olarak yeni veriler eklenmektedir (32). Bakterilerde sıralı olarak (tandemly) tekrar sekansları minisatellit (9 bp ve üzeri) ve mikrosatellit (8 bp'e kadar tekrar ünitesi) bulunmaktadır (38). MLVA-16_{Orsay} olarak adlandırılan bu MLVA genotiplendirme sistemi, 8 adet minisatellit ve 8 adet de mikrosatellit marker içermektedir. Minisatellit markerlardan türlerin belirlenmesi, mikrosatellitlerden ise alttürlerin ayırımı amacıyla yararlanılmaktadır. Satelitleri oluşturan DNA dizileri 2 panele ayrılarak lokus numarasına göre adlandırılmaktadır. Panel-1'i oluşturan minisatellit markerlar Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45 ve Bruce55 iken, Panel 2'yi oluşturan mikrosatellitler 2A (Bruce18, Bruce19 ve Bruce21) ve

2B (Bruce04, Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce30) olarak iki grupta değerlendirilmiştir. Dünyada insan ve hayvan orijinli *Brusella* izolatlarının bulunduğu ve karşılaştırmaların yapılabildiği bir web sitesi mevcuttur (<http://mlva.u-psud.fr>) (21). MLVA16 paneli ile 2000'ün üzerinde *Brusella* izolatı ile ilgili bilgilere internet veri tabanından ulaşmak mümkündür (29). Online olarak MLVABank5.0 tutorial version 4.6 programından yararlanılarak MLVA veya CRISPR verileri girilerek genotipik çeşitlilik, yaygınlık indeksi, filogenetik ağaç çizimi ve coğrafik karşılaştırmalar (<http://mlva.u-psud.fr/>) yapılmaktadır. Genetik benzerliklere göre cluster ve gruplandırma yapılmaktadır. Cluster ve gruplandırma işlemi, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) algoritmasına ve kategorik mesafenin belirlenmesine göre yapılmaktadır. Elektroforez sonuçları BioCalculator (Bionumerics 6.5) gibi yazılım programları vasıtasıyla standart süşun ampikon büyüklüğü ile karşılaştırılarak VNTR alel Tablo'sundan yararlanılarak ilgili lokustaki tekrar ünite sayılarına dönüştürülür. Genetik diversity, Hunter-Gaston diversity index ve güven aralığı (CI) online olarak (www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl) biyoinformatik araçlarla yapılabilmektedir. İlk MLVA testi, 2003 yılında Bricker ve ark. (4) tarafından HOOF-print olarak adlandırılan hypervariable octameric oligonükleotid fingerprintler olarak ifade edilmiş ve *Brusella* cinsinin, AGGGCAGT olarak bilinen tekrar üniteyi içerdiği belirlenmiştir.

Çeşitli araştırmacılar *Brusella* aşularının biyolojik aktivitelerini araştırmak amacıyla MLVA yöntemlerinden yararlanmışlardır. Bricker ve ark (4), marker RB51 aşısı suşunda HOOF-print yöntemi ile allelik mutasyon belirleyemediklerini bildirmişler, Garcia-Yoldi ve ark (11) *B. melitensis* Rev1 aşısı suşlarının stabilitesinin ifadesi amacıyla toplam 36 aşısı MLVA ile incelemişler ve 7 farklı genotip belirlediklerini bildirmişlerdir. Bu genotiplerin Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce18 lokuslarında bir tekrar ünite değişikliğiyle karakterize olduğunu açıklamışlar ve Rev1 suşlarının genetik olarak homojen olduğunu bildirmişlerdir. Miranda ve ark (20) ise Brezilya'da üretilen *B. abortus* S-19 aşısı suşlarının genetik stabilitesini belirlemek amacıyla immünojenite, rezidüel virülens ve genetik profil özelliklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar toplam 8 aşısı suşu ile United States Department of Agriculture (USDA) referans aşısı suşu karşılaştırmalarını yapmışlardır. Araştırmada toplamda 8 suşa ait 2 batch ve referans aşısı suşu kullanmışlardır. İncelenen batch'lerin Bruce07 lokusunda 6 tekrar ünitesi, aşısı suşunda ise 5 tekrar ünitesi belirlenmişlerdir. Farklı bir profili gösterse de bu mutasyonun, aşının etkinliği üzerinde olumsuz bir etki göstermediğini bunun sadece aşısı suşu ait bir marker olarak kullanılabileceği sonucunu çıkarılmışlardır. Tüm bu araştırmalar in-vitro aşısı kontrolle-ri amacıyla MLVA'nın kullanımının önemli olduğunu göstermiştir. Benzer olarak yapılan çalışmalarda Garcia Yoldi ve ark (11), 36 Rev1 izolatı ve 16M suşları içerisinde MLVA-15 ile 11 lokusta identik profil belir-

lerken bazı izolatlarda 4 lokusta (Bruce07, Bruce09, Bruce16 ve Bruce18) farklılık belirlenmişlerdir. Aşısı suşlarının izlenmesine yönelik yapılan diğer çalışmalarda, Dorneles ve ark. (8), *B. abortus* S19 aşısı suşları içerisinde bir suşta Bruce 07 lokusunda 5 yerine altı tekrar ünitesi, RB51 aşısı suşlarında 2 grup belirlenmişler yine aynı lokusta 7 yerine 6 tekrar ünitesi tespit etmişlerdir. Her ve ark (15), 2 *B. abortus* suşunun HOOF-3 lokusunda varyasyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar toplam 9 cluster içerisinde 23 genotip tespit etmişlerdir. *B. abortus* 544 ve *B. abortus* 2308 referans suşları, 2 izolat ve 30'a kadar pasajı yapılan suşlar ile yapılan çalışmalarda; *B. abortus* 544 suşunun 4, 16 ve Hoof 3 lokuslarında değişiklik belirlenirken diğer lokuslarda ve suşlarda değişiklik belirlenmediğini bildirmişlerdir. Farklı lokuslardaki mutasyonların belirlenmesi gelecekte farklı allellerin epidemiyolojik çalışmalar için kullanılabileceğini göstermektedir. Türkiye'de gerek insanlardaki *Brusella* suşları (16) gerekse hem insan hem koyun hem de sığır suşları (33) MLVA ile tiplendirilmiştir. Kılıç ve ark (16) yaptıkları genotiplendirme sonucu 162 *Brusella* izolatının 105 genotip taşıdığını belirleyerek 73'ünün tek suşta, 32'sinin 2-8 suşta tespit edildiğini bildirmişlerdir. Sidamonidze ve ark. (33) Gürcistan ve Türkiye'deki hayvan ve insan kaynaklı suşların genotiplendirmesini yapmışlar, Türkiye'deki izolatların Doğu Akdeniz grubunda yer aldığını belirlenmişler, sadece 2 *B. melitensis* suşunun klonal benzerliğinin Türkiye ve Gürcistan için ortak olduğunu tespit etmişlerdir.

Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST): Önceleri (39) 9 housekeeping gen ile 27, bugün için ise 78 sekans tipinin belirlendiği açıklanmıştır. Sekans tiplerinin gap, aroA, glk, dnaK, gyrB, trpE, cobQ, omp25 ve int-hyp genlerine göre tanımlandığı ve çeşitliliğin en çok glk geninde olduğu bildirilmiştir. Ayırım gücünü artırmak amacıyla 9 gene ilave 12 gen ilavesi ile toplamda 21 lokusa ait gen ile 141 sekans tipinin belirlendiği bildirilmektedir. Hem 9 hem de 21 lokusa ait MLST veribankasına <http://pubmlst.org/brucella/> web adresinden ulaşılabilir (40).

Sonuç

Brusellaların tiplendirilmesinde her ne kadar farklı moleküler yöntemler mevcut ise de *Brusella* biyotiplerinin ve suşlar arasında varyasyonların belirlenmesi için en önemli yöntem MLVA olarak karşımıza çıkmaktadır. Mevcut MLVA tiplendirme yöntemleri, referans *Brusella* suşlarının veya aşısı-izolatların izlenmesi, olası mutasyonların, bulaş kaynaklarının veya coğrafik dağılımın belirlenmesi için tek metot olarak kabul görmektedir. İlave ayırıcı markerlar belirlenmeye kadar *Brusella* suşlarının genotiplendirmelerinin MLVA ile yapılması ve koleksiyonların bu doğrultuda oluşturulması *Brusella* suş/izolat bankasının geriye dönük olarak oluşumunu da sağlamış olacaktır.

Kaynaklar

1. Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2001; 83 (1): 37-44.
2. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2660-6.
3. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1995; 33(6): 1640-2.
4. Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15(4): 374-8.
5. Corbell MJ. Brucellosis: An overview. *Emerg Infect Disease* 1997; 3(2): 213-21.
6. De Massis F, Ancora M, Atzeni M, Rolesu M, Bandino E, Danzetta ML, Zilli K, Di Ginnatale E, Scacchia M. MLVA as an epidemiological tool to trace back *Brucella melitensis* biovar 1 re-emergence in Italy. *Transbound Emerg Dis*, 2015; 62(5): 463-9.
7. DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(1): 443-8.
8. Dorneles EM, de Faria AP, Pauletti RB, Santana JA, Caldeira GA, Heinemann MB, Titze-de Almeida R, Lage AP. Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). *Vaccine* 2013; 31(42): 4856-9.
9. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1990; 69(2): 216-27.
10. Garcia-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Munoz PM, Vizmanos JL, Lopez-Goni I. 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* 2006; 52(4): 779-81.
11. Garcia-Yoldi D, Le Fleche P, Miguel MJ, Munoz PM, Blasco JM, Cvetnic Z, Marin CM, Vergnaud G, Lopez-Goni I. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *J Clin Microbiol* 2007; 45(12): 4070-72.
12. Genç O, Kamber U. Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Indian Vet J* 2004; 81: 1164-5.
13. Genç O, Büyüktanır Ö, Doğancı L, Yurdusev N. *Brucella* tanısında "in-house" enzimatik immunoassay modeller ve multiplex PCR ile tür ayırımı: Ön sonuçlar. Klimik XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 2007, Antalya.
14. Güler L, Gündüz K, Ok U. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol* 2003; 93: 53-61.
15. Her M, Kang SI, Cho DH, Cho YS, Hwang IY, Heo YR, Jung SC, Yoo HS. Application and evaluation of the MLVA typing assay for the *Brucella abortus* strains isolated in Korea. *BMC Microbiol* 2009; 9: 230.
16. Kılıç S, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaslıoğlu E, Uyanık MH, Aliskan H, Yasar E, Bayramoğlu G, Arslantürk A, Vergnaud G, Kantardjiev TV. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (9): 3276-83.
17. Kumkrong K, Chankate P, Tonyoung W, Intarapuk A, Kerdsin A, Kalambaheti T. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Brucella* isolates from Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2017; 48(1): 124-42.
18. Le Fleche I, Grayon JM, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoed F, Nöckler F, Neubauer H, Guilloteau L, Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol* 2006; 6(9): 1-14.
19. Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Correa de Sa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3484-7.
20. Miranda KL, Poester FP, Minharro S, Dorneles

- EM, Stynen AP, Lage AP. Evaluation of *Brucella abortus* S19 vaccines commercialized in Brazil: immunogenicity, residual virulence and MLVA15 genotyping. *Vaccine* 2013; 31(29): 3014-8.
21. MLVA-NET for Brucella. <http://mlva.u-psud.fr>. Erişim tarihi: 19.12.2017
22. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E63.
23. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J App Microbiol* 2008; 104: 1815-1823.
24. OIE2009. Bovine brucellosis. http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCCELLA.pdf Erişim tarihi: 10.01.2017.
25. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 2006; 7(5): 507-16.
26. Pan W, Wang JY, Shen HY, Zhao MQ, Ju CM, Dong XY, Yi L, Chen JD. Development and application of the novel visual loop-mediated isothermal amplification of *Omp25* sequence for rapid detection of *Brucella* sp. *J Anim Vet Advances* 2011; 10(16): 2120-6.
27. Piao D, Liu X, Di D, Xiao P, Zhao Z, Xu L, Tian G, Zhao H, Fan W, Cui B, Jiang H. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. *BMC Microbiology* 2018; 18 (7): 1-6.
28. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3):1290-3.
29. Ratushna VG, Sturgill DM, Ramamoorthy S, Reichow SA, He Y, Lathigra R, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM, Gibas CJ. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiol* 2006; 6(13): 2180-6.
30. Rijpens N, Jannes G, Asbroeck MV, Rossau R, Herman LMF. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(5): 1683-88.
31. Rossen L, Norksov P, Holmstrom K, Rasmussen OF. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 1992; 17: 37-45.
32. Scholz HC, Vergnaud G. Molecular characterization of *Brucella* species. *Rev Sci Tech* 2013; 32 (1): 149-62.
33. Sidamonidze K, Hang J, Yang Y, Dzavashvili G, Zhgenti E, Trapaidze N, Imnadze P, Nikolich MP. Genome sequences of human and livestock isolates of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from the country of Georgia. *Genome Announc* 2017; 5(6): 1-3.
34. Sun M, Jing Z, Di D, Yan H, Zhang Z, Xu Q, Zhang X, Wang X, Ni B, Sun X, Yan C, Yang Z, Tian L, Li J, Fan W. Multiple locus variable number tandem repeat and single nucleotide polymorphism based *Brucella* typing reveals multiple lineages in *Brucella melitensis* currently endemic in China. *Front Vet Sci* 2017;4: 1-10.
35. Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlu S. Investigation of bovine brucellosis in the northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod* 2008; 40(4): 281-6.
36. Terzi G, Büyüktanır Ö, Genç O, Gücükoğlu A., Yurdusev N. Detection of *Brucella* antibody and DNA in cow milk by ELISA and PCR methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*,16(Suppl-A). 2010; 47-52.
37. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008; 3(5): 877-82.
38. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) analysis Stackebrandt E ed. In: *Molecular Identification, Systematics and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer,. 2006; pp: 83-104.
39. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Inf Gen Evol* 2009; 9(6): 1168-84.
40. Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Smallbone JE, Gopaul KK, Perrett LL. Extended multi-locus sequence analysis to describe the global population structure of the genus *Brucella*: Phylogeography and relationship to biovars. *Front Microbiol* 2016; 7: 2049.
41. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63 (10): 3741-51.
42. Yu WL, Nielsen K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J* 2010; 51(4): 306-13.