

AHMET MURAT SAYTEKİN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

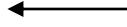
DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak.



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**RUMİNANT ATIKLARINDA BRUSELLA TÜRLERİNİN
MULTİPLEKS PCR VE KONVANSİYONEL YÖNTEMLER
İLE TANISI, YÖNTEMLERİN BİRBİRLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

AHMET MURAT SAYTEKİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYYAL AK**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2017



DOKTORA TEZİ ONAYI

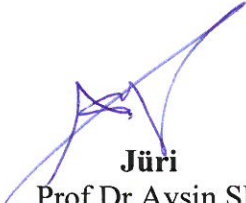
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Programında Doktora öğrencisi Ahmet Murat SAYTEKİN tarafından Prof.Dr. Seyyal AK'ın danışmanlığında hazırlanan Ruminant Atıklarında Brusella Türlerinin Multipleks PCR ve Konvansiyonel Yöntemler ile Tanısı,Yöntemlerin Birbirleri ile Karşılaştırılması” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 20 /06/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı-Danışman

Prof.Dr.Seyyal AK

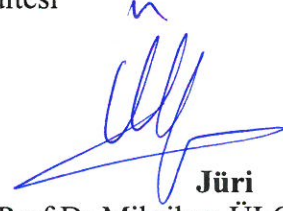
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim



Jüri

Prof.Dr.Ayşin ŞEN

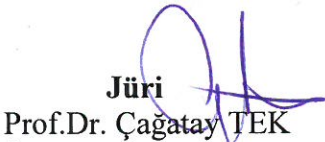
Uludağ Üniversitesi,Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr.Mihriban ÜLGEN

Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof.Dr. Çağatay TEK

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı



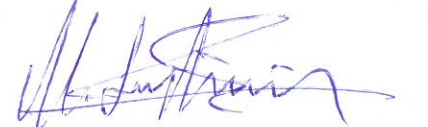
Jüri

Prof.Dr. Arzu Funda BAĞCIGİL

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



AHMET MURAT SAYTEKİN

İTHAF

Tez çalışmamı, yetişmemde sonsuz emek ve özveri sahibi olan aileme, hocalarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince tüm sabrı, hoşgörüsü, bilgi ve deneyimi ile yardımlarını ve bilgisini esirgemedi beni destekleyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, danışman hocam Prof. Dr. Seyyal AK'a,

Tez çalışmam süresince bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. N. Yakut ÖZGÜR'e, Prof. Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e, Prof. Dr. Serkan İKİZ'e, Dr. Kemal METİNER'e, Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, Dr. Belgi Diren SIĞIRCI'ya, Dr. Baran ÇELİK'e, Dr. Cemal ADIGÜZEL'e ve teknisyenimiz Gülten KARAKUZ'a, ayrıca her türlü destekleri ile her zaman yanımda olan Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e, E. Ayhan BAKLAN'a, Dr. M. Sencer KARAGÜL'e, örnek temini konusunda yardımcı olan M. Engin MALAL'a, Orbay SAYI'ya, Dr. Yasin GÜLCÜ'ye, Dr. Uğur KÜÇÜKAYAN'a, çalışmaya verdikleri her türlü katkı için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü ile Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğüne tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TANIM	3
2.2. TARİHÇE	3
2.3. ETİYOLOJİ	5
2.4. EPİDEMİYOLOJİ	8
2.5. PATOGENEZ	12
2.6. KLİNİK BULGULAR.....	15
2.7. TANI.....	16
2.7.1. Direkt Tanı	16
2.7.1.1. Bakteriyoskopi	16
2.7.1.2. Kültür	16
2.7.1.3. Moleküler Yöntemler	25
2.7.1.4. Hayvan Deneyleri.....	32
2.7.2. İndirekt Tanı.....	33
2.7.2.1. Serolojik Testler	33
2.7.2.2. Hücresel Bağışıklık Testleri	36
2.8. KORUMA VE KONTROL	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Gereç	42

3.1.1. İnceleme Örnekleri.....	42
3.1.2. İzolasyon Besiyerleri.....	42
3.1.2.1. Serum Dekstroz Agar (SDA)	42
3.1.2.2. Farrell's Besiyeri.....	42
3.1.2.3. Cita Besiyeri.....	43
3.1.3. İdentifikasyon Besiyerleri	43
3.1.3.1. Penisilin Besiyeri	43
3.1.3.2. Streptomisin Besiyeri	43
3.1.3.3. Eritritol Besiyeri.....	44
3.1.3.4. Tiyonin Besiyeri.....	44
3.1.3.5. Bazik Fuksin Besiyeri	44
3.1.3.6. Safranin Besiyeri.....	45
3.1.4. Diğer Besiyerleri	45
3.1.4.1. Christensen Besiyeri.....	45
3.1.4.2. %15 Gliserinli Triptik Soy Broth.....	46
3.1.5. Morfolojik, Serolojik, Biyokimyasal ve Faj Test Gereçleri.....	46
3.1.5.1. Bakteri Saflığı ve Morfolojisinin Belirlenmesi.....	46
3.1.5.2. Antiserumlar.....	46
3.1.5.3. Biyokimyasal Test Gereçleri.....	46
3.1.5.4. Fajlar	46
3.1.6. Standart Suşlar	46
3.1.7. Moleküler Yöntem Gereçleri	47
3.1.7.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu Gereçleri	47
3.1.7.2. İnceleme Örneği için DNA Ekstraksiyon Kitleri	47
3.1.7.3. Tür Spesifik Multipleks DNA Amplifikasyonu (m-PCR) Gereçleri	48
3.1.7.4. Cins Spesifik Bcsp31 DNA Amplifikasyonu (Bcsp31 PCR) Gereçleri.....	49
3.1.8. Elektroforez ve Görüntüleme.....	50
3.1.9. Diğer Gereçler.....	51
3.2. Yöntem.....	51
3.2.1. Etken İzolasyonu.....	51
3.2.2. Cins Düzeyinde İdentifikasyon.....	51
3.2.2.1. <i>Brucella</i> Anti A + M Poliserum ile Aglütinasyon	51
3.2.2.2. Katalaz Testi.....	52

3.2.2.3. Oksidaz Testi.....	52
3.2.2.4. Üreaz Testi	52
3.2.3. Etkenin Tür Seviyesinde İdentifikasyonu ve Biyotiplendirilmesi	52
3.2.3.1. Karbondioksit (CO ₂) İhtiyacının Belirlenmesi.....	52
3.2.3.2. Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Gaz Çıkışının Belirlenmesi.....	52
3.2.3.3. Penisilin, Streptomisin, Eritritol, Tiyonin, Bazık Fuksin ve Safranin Varlığında Üreme.....	52
3.2.3.4. Faj Testleri	53
3.2.3.5. <i>Brucella</i> A ve M Monospesifik Antiserumlar ile Aglütinasyon	53
3.2.4. Moleküler Yöntemlerle Etken İdentifikasyonu.....	53
3.2.4.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu	53
3.2.4.2. İnceleme Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu	53
3.2.4.3. Kültürden Tür Spesifik DNA Amplifikasyonu (m-PCR)	54
3.2.4.4. İnceleme Örneklerinden Tür Spesifik DNA Amplifikasyonu (m-PCR).....	54
3.2.4.5. İnceleme Örneklerinden Cins Spesifik Modifiye Bcsp31 DNA Amplifikasyonu.....	55
3.2.5. Minimum Tespit Limitinin Belirlenmesi	56
3.2.6. İstatistiksel Analiz.....	56
4. BULGULAR.....	58
4.1. İzolasyon ve Cins Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları	58
4.2. Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları	58
4.3. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon Sonuçları	62
4.3.1. Kültürden m-PCR Sonuçları	62
4.3.2. İnceleme Örneklerine Uygulanan Direkt m-PCR Sonuçları.....	62
4.3.2.1. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Standardizasyonu İçin Uygulanan Deneme Sonuçları	62
4.3.2.2. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Sonuçları.....	64
4.3.3. İnceleme Örneklerinden Cins Spesifik Modifiye Bcsp31 PCR Sonuçları.....	66
4.4. Kullanılan Üç Yöntem İle İncelenen Örneklerden Elde Edilen Pozitiflik Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	72
4.5. Minimum Tespit Limiti Çalışmasının Sonuçları	76
4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları	78
4.6.1. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR için Sensitivite ve Spesifite Sonuçları.....	78

4.6.2. Modifiye Bcsp31 PCR için Sensitivite ve Spesifite Sonuçları	81
5. TARTIŞMA	84
KAYNAKLAR	93
ETİK KURUL KARARI	108
ÖZGEÇMİŞ	109



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: <i>Brucella</i> türlerinin çevrede ve çeşitli materyallerde canlı kalma süreleri (Garrido-Abellan ve ark. 2001)	7
Tablo 2-2: <i>Brucella</i> türlerinin hayvansal süt ürünlerinde canlı kalma süreleri (Garrido-Abellan ve ark. 2001).....	8
Tablo 2-3: <i>Brucella</i> türlerinin bazı Gram negatif bakterilerden ayırt edilmesinde önemli testler (Alton ve ark. 1988).....	20
Tablo 2-4: <i>Brucella</i> türlerinin ayırt edici özellikleri (OIE Böl. 2.1.4. 2016).....	22
Tablo 2-5: <i>Brucella</i> türlerine ait biyotiplerin ayırıcı karakteristik özellikleri (OIE Böl. 2.1.4. 2016).....	23
Tablo 2-6: <i>B. abortus</i> S-19 aşı suşunun tipik <i>B. abortus</i> biyotip1 saha suşlarından ayırımı (Alton ve ark. 1988).....	24
Tablo 2-7: <i>B. melitensis</i> Rev-1 aşı suşunun tipik <i>B. melitensis</i> biyotip1 saha suşlarından ayırımı (Alton ve ark. 1988)	25
Tablo 3-1: Hedef türlerin saptanmasında tür spesifik multipleks PCR primerleri*	49
Tablo 3-2: Cins spesifik Bcsp31 PCR primerleri	50
Tablo 3-3: 2x2 tablosu ve veri analizi	57
Tablo 4-1: Kültür yöntemi ile tür ve biyotip düzeyinde identifikasyon sonuçları.....	59
Tablo 4-2: İnceleme örneklerinden kullanılan yöntemle göre elde edilen sonuçlar	67
Tablo 4-3: İdentifikasyonda kullanılan yöntemlerle tanı sonuçlarının, sayısal karşılaştırılması.....	72
Tablo 4-4: Kültür ile Modifiye Mayer-Scholl m-PCR ve Modifiye Bcsp31 PCR yöntemlerinin karşılaştırılması	76
Tablo 4-5: Atıklar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar ..	78
Tablo 4-6: Organlar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	79
Tablo 4-7: Akciğerler için modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	79
Tablo 4-8: Karaciğerler için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	80
Tablo 4-9: Fetüs mide sıvıları için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	80

Tablo 4-10: Atıklar için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	81
Tablo 4-11: Organlar için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar.....	81
Tablo 4-12: Akciğerler için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar.....	82
Tablo 4-13: Karaciğerler için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar.....	83
Tablo 4-14: Fetüs mide sıvıları için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar	83



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: Kültürlerden Ekstrakte Edilen DNA'lar ile m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği	62
Şekil 4-2: İnceleme Örneklerinden Ekstrakte Edilen 5 µl DNA İle 25 Döngülü Direkt m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği	63
Şekil 4-3: İnceleme Örneklerinden Ekstrakte Edilen 5 µl DNA İle 30 Döngülü Direkt m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği	64
Şekil 4-4: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (A).....	65
Şekil 4-5: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (B).....	65
Şekil 4-6: Modifiye Bcsp31 PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (A)	66
Şekil 4-7: Modifiye Bcsp31 PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (B)	66
Şekil 4-8: Kültürlerden m-PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü	77
Şekil 4-9: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü.....	77
Şekil 4-10: Modifiye Bcsp31 PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü	78

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ATCC	American Type Culture Collection
BCSP	Brucella cell surface salt extractable protein
Bp	Baz çifti (Base pair)
BPAT	Buffered Plate Agglutination Test
CFU	Colony Forming Unit
CFT	Komplement Fiksasyon Testi (Complement Fixation Test)
CO ₂	Karbondioksit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DN _{az}	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotitfosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fg	Femtogram
FFTS	Fenollü Fizyolojik Tuzlu Su
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMS	Fetüs Mide Sıvısı
FPA	Florasan Polarizasyon Testi (Fluorescence Polarisation Assay)
FPSR	False-Positive Serological Reaction
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
GKGM	Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ S	Hidrojen Sülfür

HOOF-Prints	Hypervariable Octameric Oligonucleotide Fingerprints
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IU	İnternasyonal ünite (International Unit)
Iz ₁	İzatnagar1
KCl	Potasyum Klorür
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Monopotasyum Fosfat
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
MLSA	Multiple Locus Sequence Analysis
MLVA	Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRT	Süt Halka Testi (Milk Ring Test)
NaCl	Sodyum Klorür
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanogram
nM	Nanomolar
O ₂	Oksijen
OPS	O-Polysaccharide
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
pg	Pikogram
pH	Power of hydrogen
pmol	Pikomol
R	Rough
RBT	Roz Bengal Pleyt Testi (Rose Bengal Plate Test)

RID	Reverse Radial İmmunodiffusion
rpm	Revolutions per minute
RTD	Rutin Test Dilüsyonu
S	Smooth
SAT	Serum Aglütinasyon Testi (Serum Agglutination Test)
SDA	Serum Dekstroz Agar
S-LPS	Smooth Lipopolysaccharide
SNP _s	Single Nucleotide Polymorphisms
TAE	Tris-asetat EDTA
TAT	Tüp Aglütinasyon Testi (Tube Agglutination Test)
Tb	Tibilisi
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
Tris-HCl	Tris-Hidroklorik asit
TSA	Triptik Soy Agar
Wb	Weybridge

ÖZET

Saytekin, A.M. (2017). Ruminant atıklarında *Brucella* türlerinin multipleks PCR ve konvansiyonel yöntemler ile tanısı, yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ABD, Doktora Tezi, İstanbul.

Bu çalışmada, ruminant atık örneklerinden, bruselloz etkenlerinin tür ve cins düzeyinde hızlı tanımlanmasını sağlayan direkt PCR yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygulanabilirliklerinin saptanması amaçlandı. Bu amaçla 166 ruminant atığına ait 137 akciğer, 137 karaciğer ve 52 fetüs mide sıvısı olmak üzere toplam 326 örnek incelendi. İnceleme örneklerine, ilk aşama olarak etken izolasyonu ve identifikasyonu ile kültürden tür spesifik multipleks PCR (m-PCR) uygulandı. Ayrıca, direkt inceleme örneklerine bu çalışmada modifiye edilen ve ismi “Modifiye Mayer-Scholl” olarak adlandırılan PCR ile ufak değişikliklerle düzenlenen cins spesifik Bcsp31 PCR olmak üzere toplam dört farklı yöntem uygulandı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon, standart yöntem olarak kabul edilerek moleküler yöntemlerin sensitivite ve spesifiteleri hesaplandı. İnceleme örnekleri atık seviyesinde değerlendirildiğinde (n=166), Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemi için sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla %94,11 ve %98,76, direkt cins spesifik Bcsp31 PCR için değerler ise sırasıyla %95,29 ve %98,76 olarak tespit edildi. Tüm organ örnekleri dikkate alındığında ise (n=326), Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemi için sensitivite ve spesifite değerleri sırasıyla %85,38 ve %98,06 direkt cins spesifik Bcsp31 PCR yöntemi için sırasıyla %83,62 ve %98,06 olarak hesaplandı. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifite değerleri atık düzeyinde değerlendirildiğinde, “testlerin tanısal gücü yüksek”, organ düzeyinde değerlendirildiğinde “klinik olarak yararlı” olduğu bulundu. Bu çalışmada yapılan değişikliklerle geliştirilen ve “Modifiye Mayer-Scholl” olarak adlandırılan yöntem ile direkt klinik örneklerden *Brucella* türlerine ait DNA’ların belirlenerek tür düzeyinde identifikasyonlarının tanısal gücü yüksek düzeyde yapılabileceği ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Modifiye Mayer-Scholl, Bcsp31, Bruselloz, PCR

ABSTRACT

Saytekin, A.M. (2017). Diagnosis of *Brucella* species in ruminant fetuses by multiplex PCR and conventional methods and compare these methods with each other. Istanbul University, Institute of Health Science, Microbiology Department. Doctoral Thesis. Istanbul.

In this study, it was aimed to develop direct PCR methods allowing quick identification of *Brucella* spp. from aborted fetus samples in genus and species level and to determine the applicability of the methods. For this purpose, a total of 326 specimens consisted of 137 lungs, 137 livers and 52 fetal stomach fluid from 166 aborted ruminant fetuses were examined. In first stage, bacterial isolation and identification method (culture) and species specific m-PCR method from cultures were applied to the test samples. Also two different methods, one of them was modified in this study namely Modified Mayer-Scholl m-PCR (method A) and another one was modified with minor changes called genus specific Bcsp31 PCR (method B) were applied to clinical samples directly. Totally four different methods were applied and their results were compared. Sensitivities and specificities of the molecular methods were calculated by considering culture as gold standard. Sensitivity and specificity for method A according to the number of fetuses were 94.11% and 98.76%, respectively. For B, sensitivity was 95.29% and specificity was 98.76%. Sensitivity and specificity for method A based on the number of organ samples were 85.38% and 98.06%, respectively. For B, sensitivity was 83.62% and specificity was 98.06%. In conclusion, when the sensitivity and specificity results of the PCR methods used in this study are evaluated based on the fetuses, the diagnostic power of the PCR methods was found to be high. When they are evaluated based on the organs, the methods were found to be clinically useful. It has been shown that direct m-PCR method called modified Mayer-Scholl developed in this study could be used at high diagnostic level for species-level identification.

Key words: Modified Mayer-Scholl, Bcsp31, Brucellosis, PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bruselloz, *Brucella* cinsindeki türlerin evcil ve vahşi hayvanlarda oluşturduğu kronik, bulaşıcı ve zoonoz karakterde bir hastalıktır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sıklıkla rastlanılan hastalık, yetiştiricilerimizin ekonomik kayıplarına neden olmasının yanında, sürdürülebilir hayvancılığımızı da olumsuz etkilemektedir (Aydın 1997 pp. 110-125; Gezgen ve Şeker 2014). Zoonoz olması sebebi ile yılda yaklaşık 500,000 insan bu hastalıktan etkilenmektedir. Ayrıca hastalık, Latin Amerika, Ortadoğu, Afrika, Asya ve Akdeniz Havzası olmak üzere dünyanın birçok bölgesinde endemik olarak devam etmektedir (Avila-Calderon ve ark. 2013, Kaynak: Pappas ve ark. 2006 pp. 91-99).

Brusellozun laboratuvarda kısa zamanda ve doğru olarak tanısı oldukça önemlidir. Bu sebeplerle, tanı metodları da hastalıkla mücadele, koruma ve kontrol stratejilerine uygun olarak geliştirilmekte ve artan ihtiyaçlara cevap verebilecek nitelikte; yeni, güvenilir, daha az maliyetli, pratik, bulaş açısından çalışan personel ve çevre için daha güvenli, kısa zamanda sonuçlanabilen, spesifitesi yüksek testler için çalışılmaktadır. Bu durum, brusellozun moleküler yöntemlerle cins düzeyinde tanısında, eskiden günümüze çok büyük ilerlemeler sağlamıştır. (Bricker 2002; Yu ve Nielsen 2010). Ayrıca, biyolojik savaş ve tarım terörizmi açısından yeni bir döneme girilmiş olunması, tanıda oldukça spesifik, hassas ve hızlı sonuç veren test ihtiyacını arttırmaktadır (Bricker 2002).

Bruselloz tanısı için, konvansiyonel bakteri izolasyonu ve identifikasyonu altın standart yöntem olarak kabul edilse de, bunun için uzun zaman, yoğun emek, teknik altyapı (Biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvar) ve deneyimli personel gereksinimi vardır (Bricker 2002; Yu ve Nielsen 2010). Aşamalar karmaşıktır ve test süresi boyunca laboratuvar personeli zoonoz etkenin potansiyel riski altındadır (Bricker 2002).

Ülkemizde hastalığın tanısı daha çok serolojik olarak antijen antikor reaksiyonunun saptanması ve/veya bakteriyolojik olarak etkenin cins düzeyinde identifikasyonu ile yapılabilmekte, moleküler yöntemler ise oldukça sınırlı olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca, bruselloz ile mücadelede yoğun ve kitlesel aşılama stratejilerinin yürütülüyor olması, atık vakalarının en kısa zamanda ve aşı suşlarının da ayrımını yapabilecek şekilde değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır (Kaynak-Onurdağ ve ark. 2016). Tür ve biyotip düzeyinde identifikasyon epidemiyolojik izlenebilirliği sağlar. Bu durum mücadele stratejilerinin oluşturulmasında da oldukça önemlidir.

Çalışmada, direkt ruminant atıklarından bruselloz etkenlerinin tür düzeyinde hızlı ve kolay tanımlanmasını sağlayan bir PCR yönteminin geliştirilmesi, cins düzeyinde tanı yapan PCR yönteminin düzenlenmesi, geliştirilen yöntemlerin konvansiyonel bakteriyolojik yöntemle karşılaştırılması, yöntemlerin birbirlerine uyumluluğu, üstünlüğü, avantajları, dezavantajları ve konvansiyonel kültür yöntemine göre kullanılan direkt PCR yöntemlerinin sensitivite ve spesifitelerinin belirlenmesi ile kullanılabilirliklerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TANIM

Bruselloz, *Brucella* türlerinin uterus, meme, testis gibi genital organlara yerleşmesi sonucunda nekrotik yangısal reaksiyonlarla ortaya çıkan, evcil ve vahşi hayvanlarda yavru atmalara ya da infertiliteye neden olan, retikülohistiositer, kronik ve bulaşıcı bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Gezgen ve Şeker 2014). *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* türlerinin çoğunlukla sebep olduğu bruselloz, aynı zamanda insan ve hayvanlarda bu hastalık için genel bir isim olarak kullanılmaktadır (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Bruselloz etkenleri, evcil hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara neden olurlar. Etkenler, infekte ettikleri hayvanların sütleri, sütlü yiyecekler ve hatta et ile insanlara da bulaşabildikleri ve infekte edebildikleri için halk sağlığı yönünden de önemli bir grubu oluşturmaktadır (Aydın 1997 pp. 110-125).

2.2. TARİHÇE

Brusellozun tanımı, abort olguları ile ilgili kadim kaynaklardan farklı olarak, en eski kayıtlardan birinde Jeffrey Alien Marston tarafından 1859 yılında yapılmıştır. Yazar kendi eserinde, hastalığı tifoid ateşten farklı olarak tarif etmiştir (Nicoletti 2002). 1887 yılında David Bruce, Malta'da ölen bir askerin dalağından izole ettiği etkeni *Micrococcus melitensis* olarak isimlendirmiş ve insanlardaki Malta Ateşi hastalığı etkeninin bu mikroorganizmalar olduğunu ortaya koymuştur (Aydın 1997 pp. 110-125; Nicoletti 2002; Songer ve Post 2012 pp. 200-207). Daha sonra Malta'lı bir doktor olan Themistocles Zammit ve ekibi, 1905 yılında Malta'daki keçilerin en az %10'nun kan ve sütlerinden etkeni izole etmiştir (Nicoletti 2002). Böylece etkenin insanlara sütle bulaşabileceği gösterilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125).

Danimarkalı bir bilim insanı olan veteriner patolog ve bakteriyolog Profesör L.F.Bang, 1895 yılında yavru atmış bir sığırın fetal membranları ile uterus sıvısından Gram negatif basilleri izole etmiş ve bu farklı etkeni *Bacillus abortus* olarak isimlendirmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Nicoletti 2002; Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Domuzlarda bruselloz, ilk defa Hutty tarafından 1909'da Macaristan'da bildirilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125). Daha sonraları, Amerika'da Traum 1914

yılında etkeni aborte domuz fetüsünden izole etmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Nicoletti 2002).

1918 yılında Evans, *B. melitensis* ve *B. abortus*'un morfolojik, fizyolojik ve serolojik yönlerindeki ayrıntıları belirtmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125).

1920 yılında da Meyer ve Shaw, bu iki etkeni bir grupta birleştirerek Bruce'nin ismine izafeten *Brucella* adını vermişlerdir (Scholz ve ark. 2010).

1929 yılında Huddleson, *Brucella suis* ismini vererek etkeni tanımlamıştır (Scholz ve ark. 2010).

1952 yılında Mc Farlane ve arkadaşları, ilk defa Yeni Zelanda'da koçlarda epididimis, tunika vajinalis, orşit ve vezikula seminalisten etkeni izole etmişlerdir (Aydın 1997 pp. 110-125). 1956 yılında Buddle ve Boyes, Avusturalya ve Yeni Zelanda'da epididimitisli koçlardan izole edilen etkenin *Brucella melitensis*'in bir varyantı olduğunu ortaya koymuşlar ve daha sonra etken, *Brucella ovis* olarak isimlendirilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Nicoletti 2002; Scholz ve ark. 2010).

1957 yılında *Brucella neotomae* ilk defa Stoenner ve Lockman tarafından dağ farelerinden izole edilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Scholz ve ark. 2010).

Brucella canis, köpeklerin bulaşıcı abort etkeni olarak 1968 yılında Carmichael ve Bruner tarafından izole ve identifiye edilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Scholz ve ark. 2010).

Brucella türlerinin deniz memelilerinden ilk izolasyonu 1994 yılında İskoçya'da bir fokbalığından, bir domuzbalığından ve bir yunusbalığından, aynı yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde ise bir şişeburunlu yunusbalığından yapılmıştır. Daha sonraları izolasyon sayısı ve konakçı hayvan çeşitliliği artmıştır. Atlantik beyaz yanlı yunusbalığı, çizgili yunusbalığı, minke balinası, balonlu fokbalığı, boz fokbalığı, pasifik liman fokbalığı, halkalı fokbalığı, grölland fokbalığı ve bir avrupa su samurundan izolasyon yapılmıştır. Ayrıca deniz memelileri suşlarının etkeni olduğu insan bruselloz olguları da tespit edilerek bildirilmiştir. Sonraları deniz canlıları kaynaklı izolatların aynı olmadığı görülmüş, 2001 yılında Cloeckert ve arkadaşları tarafından suşlar ayrılıp isimlendirme çalışmaları yapılsa da o zamanlar geçerli bir bildirim yapılmadığı için 2007 yılında deniz memelilerinden izole edilenler *Brucella ceti* sp. ve

yüzgeçayaklılardan izole edilenler ise *Brucella pinnipedialis* sp. olarak belirlenmiş ve isimlendirilmiştir (Foster ve ark. 2007).

2008 yılında, Çek Cumhuriyetinde yapılan ilk izolasyon ve takip eden çalışmalar neticesinde tarla faresinden tespit edilen yeni tür, *Brucella microti* sp. olarak isimlendirilmiştir (Scholz ve ark. 2008a). Sonraları bir kez topraktan (Scholz ve ark. 2008b) ve kızıl tilkilerin mandibular lenf nodüllerinden izolasyon bildirilmiştir (Scholz ve ark. 2009).

2010 yılında klinik bruselloz semptomları gösteren 71 yaşındaki bir kadın hastanın göğüs implant infeksiyonundan izole edilen suş, *Brucella inopinata* sp. olarak isimlendirilmiştir (Scholz ve ark. 2010).

2014 yılında Teksas'da bir hayvan tedavi merkezinde, ölü doğum yapan bir babuna ait serviks sıvabından izole edilen suş, *Brucella papionis* sp. olarak isimlendirilmiştir (Whatmore ve ark. 2014).

Ülkemizde ilk bruselloz olgusu, Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından 1915 yılında Kuleli Askeri Hastanesi'nde tedavi gören bir askerde tespit edilmiştir. Hayvanlarda ise 1931 yılında laboratuvar muayenesi sonucunda ilk bruselloz olgusunu ortaya koyan Berke olmuştur. 1943 yılında Golen, insan ve hayvanlarda brusellozun varlığını serolojik yöntemlerle ortaya koymuştur. 1944 yılında Aktan ve Köylüoğlu koyunlarda *B. melitensis*'i ilk defa Bandırma merinos çiftliğinde saptamışlardır (Aydın 1997 pp. 110-125).

2.3. ETİYOLOJİ

Taksonomik olarak Alfa-Proteobacteria sınıfı, Rhizobiales takımı, Brucellaceae ailesinde yer alan ve konak hücrelerinde fakültatif hücre içi yerleşim gösterebilen *Brucella* türleri, Gram-negatif, hareketsiz, kokobasil yada küçük çomak şekilli bakterilerdir (Garrity 2005; Songer ve Post 2012 pp. 200-207; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Mikroskop sahasında genellikle tek tek gözükseler de, çiftler yada küçük gruplar halinde de bulunabilirler. Uzunlukları 0,6 µm'den 1,5 µm'ye ve genişlikleri 0,5 µm'den 0,7 µm'ye kadar değişiklik gösterebilir. Morfolojileri değişmez ve eski kültürler hariç pleomorfik formlar görülememektedir. Spor oluşturmazlar ve kapsülsüzdürler. Modifiye Ziehl-Neelsen boyama metodu ile kırmızıya boyanırlar (Alton ve ark. 1988; Garrity 2005).

Filogenetik tanıma göre, taksonomistler bu cinsin *Brucella melitensis* isimli tek bir türden oluştuğunu ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte tarihi geçmiş, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomae*' den oluşan 6 klasik türün akılda kalmasına neden olmuştur. Her bir tür, infeksiyon için ana rezervuar olarak görev yapan öncelikli bir konağa sahiptir. Bunlar A ve M lipopolisakkarit antijenlerine karşı hazırlanan monospesifik antiserumlarla aglütinasyon ve diğer fenotipik özellikleri temel alınarak daha fazla biyotipe ayrılmıştır (Tablo 2.5) (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Brucella türleri, dezenfektanlara ve sıcaklığa karşı dayanıksızdırlar. Pastörizasyon işlemi ile ölürlür. Karanlık yerlerde, doku, süt veya uterus akıntıları içinde uzun zaman canlı kalabilirler. Etkenler, %0,1 süblimedde bir kaç dakikada, %2 formalin ve %1 lizol içinde 15 dakikada ölürlür (Aydın 1997 pp. 110-125). Otoklav sterilizasyonu ile 121 °C de inaktive olurlar. Ayrıca, dezenfeksiyon amacı ile farklı kimyasalların kullanımı da tavsiye edilmektedir. %2 formaldehit solüsyonu, %2,5 sodyum hipoklorid, %20 taze sönmüş kireç süspansiyonu veya %2-3 kostik soda etkisi altında, 1 saatte yok olurlar. Etkenler, uygun sıcaklık ve pH şartları altında, su, atık fetüs ve zarlarında, gübre, yün, saman, barınak, dışkı ve kıyafetlerde bir kaç ay canlılıklarını sürdürebilirler. *Brucella* türlerinin dondurulmuş etlerde canlılığı yıllarca sürebilse de, taze ette canlılığı oldukça kısa sürmektedir. Bunun sebebi her gram ette bulunabilecek organizma sayısının azlığı ve hızlıca düşen et pH'sına bağlanmaktadır. Yine de mezbaha çalışanları ve kasapların çalışmaları sırasında, özellikle bakterinin yoğun olarak bulunabileceği meme bezi, üreme organları ve lenf düğümleri ile direkt temaslari, koruyucu ekipmanlar ile engellenmelidir. Etkenlerin farklı koşullar altında çevrede ve çeşitli materyallerde canlı kalma süreleri Tablo 2.1'de, çeşitli gıda maddelerinde canlı kalma süreleri ise Tablo 2.2'de gösterilmiştir (Garrido-Abellan ve ark. 2001).

Tablo 2-1: *Brucella* türlerinin çevrede ve çeşitli materyallerde canlı kalma süreleri (Garrido-Abellan ve ark. 2001)

Çevre / Materyal	Şartlar	Canlı Kalma Süresi
Direkt Güneş Işığı	< 31 °C	4 Saat 30 Dakika
Su	-4 °C	4 Ay
Su (Laboratuvar)	20 °C	2,5 Ay
Su (Göl)	37 °C, pH = 7,2	< 24 Saat
Su (Göl)	8 °C, pH = 6,5	> 2 Ay
Toprak	Laboratuvarda Kurumuş	< 4 Gün
Toprak	18 °C de Kurumuş	69-72 Gün
Toprak	Islak	< 7 Gün
Toprak	Nemli ortam	> 2 Ay
Toprak	Sonbahar (%90 Nem)	48-73 Gün
Toprak	Şubat (Hızlı Kurumuş)	72 Gün
İdrar	37 °C, pH = 8,5	16 Saat
İdrar	8 °C, pH = 6,5	6 Gün
Çiğ Süt	25-37 °C	24 Saat
Çiğ Süt	8 °C	48 Saat
Çiğ Süt	-40 °C	2,5 Yıl
Peyniraltı Suyu	17-24 °C	< 5 Gün
Peyniraltı Suyu	5 °C	> 6 Gün
Gübre / Tezek	Yaz Mevsimi	24 Saat
Gübre / Tezek	25 °C	1 Ay
Gübre / Tezek	Kış Mevsimi	2 Ay
Gübre / Tezek	8 °C	1 Yıl
Gübre / Tezek	-3 °C	3 Ay
Sıvı Gübre	Yaz Mevsimi	3 Ay
Sıvı Gübre	Kış Mevsimi	6 Ay
Sıvı Gübre	Tank İçinde	1,5 Ay
Sıvı Gübre	Tank İçinde (12 °C)	> 8 Ay
Yün	Depo İçinde	4 Ay
Saman		Birkaç Gün yada Ay
Toz		3-44 Gün
Tahta Ağıl çiti yada zemini		4 Ay
Mera	Güneş ışığı	< 5 Gün
Mera	Gölge	> 6 Gün

Tablo 2-2: *Brucella* türlerinin hayvansal süt ürünlerinde canlı kalma süreleri (Garrido-Abellan ve ark. 2001)

Ürün	<i>Brucella</i> Türü	Sıcaklık (°C)	pH	Canlı Kalma Süresi
Süt	<i>Brucella abortus</i>	71,7	-	5-15 Dakika
Süt	<i>Brucella abortus</i>	38	4,00	< 9 Saat
Süt	<i>Brucella abortus</i>	25-37	-	24 Saat
Süt	<i>Brucella abortus</i>	0	-	18 Ay
Krema	<i>Brucella abortus</i>	4	-	6 Hafta
Krema	<i>Brucella melitensis</i>	4	-	4 Hafta
Dondurma	<i>Brucella abortus</i>	0	-	30 Gün
Tereyağı	<i>Brucella abortus</i>	8	-	142 Gün
Peynir Çeşitleri	<i>Brucella abortus</i>	-	-	6-57 Gün
Peynir Çeşitleri	<i>Brucella melitensis</i>	-	-	15-100 Gün
Feta	<i>Brucella melitensis</i>	-	-	4-16 Gün
Pecorino	<i>Brucella melitensis</i>	-	-	< 90 Gün
Roquefort	<i>B. abortus</i> ve <i>B. melitensis</i>	-	-	20-60 Gün
Camembert	<i>Brucella abortus</i>	-	-	< 21 Gün
Erythrean	<i>Brucella melitensis</i>	-	-	44 Gün
Cheddar	<i>Brucella abortus</i>	-	-	6 Ay
Beyaz Peynir	<i>Brucella melitensis</i>	-	-	1-8 Hafta
Peyniraltı Suyu	<i>Brucella abortus</i>	17-24	4,3-5,9	< 4 Gün
Peyniraltı Suyu	<i>Brucella abortus</i>	5	5,4-5,9	> 6 Gün

2.4. EPİDEMİYOLOJİ

Hastalık, Akdeniz ülkeleri, Afrika, Orta Doğu, Hindistan, Orta Asya, Orta ve Güney Amerika’da yüksek derecede endemiktir. Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada’da uygulanan eradikasyon programları sonucunda hemen hemen elimine edilmiştir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Türkiye’de coğrafik durum bulaşıcı hastalıkların yayılımı için her zaman bir risk faktörüdür. Ülkemizi çevreleyen komşularımızda bruselloz endemiktir. Doğu ve Güneydoğu komşularımız ise yüksek hastalık prevalansları sebebi ile bizim için en yüksek riski oluşturur. İllegal hayvan hareketleri ve kaçakçılıkla mücadele ayrıca önlem alınması gereken unsurlardır. Bölgedeki tüm ülkelerin işbirliği içinde hareket etmesi ile kontrol ve eradikasyon stratejilerinin başarıya ulaşabileceği düşünülmektedir (Yumuk ve O’ Callaghan 2012).

Sığır brusellozu genellikle *B. abortus*’a ait biyotiplerden kaynaklanır. Güney Avrupa, Afrika ve Batı Asya’nın bazı ülkelerinde olduğu gibi, küçükbaş hayvanlarla

birlikte kapalı tutulan sığırlar için bruselloz, *B. melitensis*'ten de kaynaklanabilir. Seyrek olarak, sığırların meme bezlerinde görülen kronik infeksiyonlar *B. suis* kaynaklı olabilir. Ancak sığırlardaki *B. suis*'in abortlara sebep olduğu ve başka hayvanlara da bulaştığı henüz rapor edilmemiştir (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Sığırlarda bruselloz genel olarak ineklerin bir hastalığıdır. Boğalar infekte olabilir ancak etkeni çiftleşme ile kolayca bulaştırmadıkları bildirilmiştir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Koyun ve keçilerde bruselloz, büyük ölçüde *B. melitensis* biyotiplerinden kaynaklanmıştır. Çok nadir olarak sporadik bazı vakalarda hastalıktan *B. abortus* ve *B. suis* türleri sorumlu olmuştur. Akdenizde küçükbaş brusellozu endemik olsa da, hastalık tüm dünyada yaygındır. Meksika hariç Kuzey Amerika, Kuzey ve Orta Avrupa, Güneydoğu Asya, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın hastalıktan arı olduğu kabul edilmiştir. Epidemiyolojik ve patolojik olarak *B. melitensis* infeksiyonu, sığırlardaki *B. abortus* infeksiyonlarına çok benzer (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Tüm dokular, kültürler ve potansiyel kontamine materyaller, BSL3 seviyesindeki laboratuvarlarda çalışılmalıdır (OIE Böl. 2.7.2. 2015). Çünkü organizma, *Brucella* türlerinin en virulent olarak kabul edilir. İnsan bruselloz vakalarının çoğundan sorumlu olmuştur. Zaman zaman deve ve alpakalardan izole edilmiştir. Etkene bağlı hastalık, Orta Doğu, İber yarımadası, Çin, eski Sovyetler Birliği, Afrika'nın bazı kısımları ve Latin Amerika'da endemiktir. Önemli risk faktörleri ise kontamine genital akıntılarla temas ve çiğ süt içilmesidir. Çiftleşme ile bulaşma, sığır brusellozuna göre daha yaygındır. Irk duyarlılığı koyunlarda değişken olsa da keçiler çok daha duyarlıdır. Bazı hayvanlar infeksiyondan kendiliğinden iyileşse de büyük bir kısmı kronik taşıyıcı olarak kalmaktadır (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

B. abortus ve *B. melitensis* infeksiyonları ayrıca tek ve çift hörgüçlü develerde, Güney Amerika devegilleri arasında yer alan lama, alpaga, guanaco ve vicuna türlerinde raporlanmıştır. İlave olarak evcil bufalo, Amerikan ve Avrupa bizonları, yak, elk/wapiti, Afrika bufalosu ve çeşitli Afrika antilop türlerinde de bruselloz tespit edilmiştir. Bu hayvanlardaki tüm hastalık belirtileri, evcil ruminantlardaki belirtiler ile benzerdir. Ayrıca *B. melitensis* infeksiyonu, evcil ruminantlar ile yakın ilişki içinde olabilecek vahşi ruminantlarda da görülmektedir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Domuzlarda bruselloz, genellikle *B. suis* biyotip1, 2 veya 3 kaynaklıdır. Oldukça nadir olarak *B. melitensis* ve *B. abortus* kaynaklı domuz brusellozları da gözlenmiştir.

Güney Amerika ve Güneydoğu Asya’da prevalans yüksektir. Diğer ülkelerde hastalık görülse de, prevalansı düşüktür. Amerika Birleşik Devletleri’nin bazı güney eyaletlerinde, Avustralya ve bir kaç Okyanusya ülkesinde, yaban domuzlarından *B. suis* biyotip1 izole edilerek hastalık etkeni olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu ülkelerde yaban domuzu avcıları ve hayvan ürünlerini işleyen insanlarda da brusellozun görüldüğü rapor edilmiştir. *B. suis* biyotip2 kaynaklı infeksiyonlar, biyotip1 ve biyotip3 kaynaklılara göre konak çeşitliliği, dağılımı ve patojenitesi bakımından farklılık gösterir. Avrupa’da biyotip2, İskandinavya ile Balkan coğrafyası arasında geniş bir bölgede dağılım göstermektedir. Kıta Avrupa’sında ise yaban domuzlarında biyotip2 prevalansı yüksektir. Bugüne kadar, insan bruselloz etkeni olarak çok nadir rapor edilmişlerdir. Hastalık, yaban domuzları veya yaban tavşanlarının temizlenmesi veya derilerinin yüzülmesi işlemleri ile uğraşan avcılarda görülmüştür. Avrupa yaban tavşanlarının, biyotip2 infeksiyonunun evcil çiftlik hayvanlarına bulaşmasında rezervuar rol oynadığı düşünülmektedir. Yine çok nadir olarak Avrupa’da, yaban domuzlarından sığır ve koyunlara bulaşmış ve klinik belirtilerin olmadığı *B. suis* biyotip2 infeksiyonları raporlanmıştır (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

B. ovis infeksiyonları Avusturalya, Yeni Zelanda ve Güney Afrika’da raporlandığı gibi Amerika ve Avrupa ülkelerinde de bildirimi yapılmıştır. Büyük olasılıkla koyun yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede hastalık bulunmaktadır (OIE Böl. 2.7.9. 2015). Etkeninin gösterdiği yüksek derecedeki konak spesifitesi nedeni ile hastalık, koyunlarda görülür. Dişilerde her ne kadar abortlara sebep olsa da öncelikle erkekleri etkiler. Hastalık en çok koçtan koça çiftleşme içgüdüğü ile direkt olarak yada infekte koçlar tarafından döllen koyunlarla çiftleşme sonucu indirekt olarak bulaşır (Songer ve Post 2012 pp. 200-207; OIE Böl. 2.7.9. 2015). Hastalığın rapor edildiği ülkelerde hastalık önemli derecede ekonomik kayıplara sebep olabilir (Lopez ve ark. 2006).

Brucella canis, köpek yetiştirme ve bakımevlerindeki köpeklerden izole edilmiştir. Ancak tilki ve çakallarda da hastalık rapor edilmiştir. İnfeksiyon çoğunlukla atık fetüsler, vajina akıntıları, süt, semen yada idrardan aerosolize olan organizmaların solunumu yada mevcut organizmaların sindirim yolu ile alınmasından kaynaklanır. Erkek köpeklerde bruselloz, orşitten daha çok epididimitin eşlik ettiği infertilite semptomları ile kendini göstermektedir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Brusellozlu hayvanlarda etkenler, retiküloendotelial sistem ve üreme sisteminin hücreleri içinde bulunarak ömür boyu kronik infeksiyonlara sebep olurlar. Böylece hasta hayvanlar rezervuar olarak kalırlar (Songer ve Post 2012 pp. 200-207). Brusellozlu ineklerin çoğu, yavru attıktan sonra haftalarca ve hatta aylarca sütleri ile etkeni çıkarır. Yavru atıldıktan veya doğduktan sonra doğum akıntıları ile etken genelde 1-2 hafta süre boyunca saçılabilir, bu durum 6 ay veya daha uzun bir süre de devam edebilir. Hastalık etkenleri, en çok gebe hayvanların uterus içeriği, fötüs ve fötal membranlar, süt, idrar ve erkek hayvanlarda semen ile saçılır. Bulaşma başlıca sindirim sistemi, sağlam yada portantreli deri, konjunktiva, çiftleşme, memelerin kontaminasyonu ve solunum yolu ile olabilir. Sağlıklı sürülerdeki ilk infeksiyonlar, genelde dışarıdan alınan hasta hayvanların fark edilmeden sürü içine sokulması ile görülür. Buzağı yada atık fetüslerin başka hayvanlarca yalanması, köpekler tarafından atık fötüs ve yavru zararlarının yenilmesi, kontamine çiğ sütün direkt olarak yada bu sütlerden pastörizasyon işlemi yapılmadan elde edilen ürünlerin insanlar tarafından tüketilmesi, infeksiyöz aerosollerin solunması, kontamine meralardaki gıda veya suların tüketimi, infekte uterus akıntıları veya idrarla bulaşık kuyruğun diğer hayvanların deri ve konjunktivalarına etkeni ulaştırması, infekte sütün yerde olduğu ortamlarda sağlam hayvan memelerinin bu sütle teması, infekte erkeklerin mekanik olarak veya sperma içeriği ile hastalığı bulaştırmaları, yine değişik hayvan ailelerine ait türlerin hastalığın yayılmasında vektör (bazı artropodlar ve kemiriciler) ve rezervuar (bazı kuşlar ve yabani ruminantlar) rol oynaması, olası bulaş senaryoları içinde gösterilmiştir (Aydın 1997 pp. 110-125; Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Brucella türleri, konak dışında, çevrede uygun koşullarda uzun süre canlı kalabilirler. Karkas ve dokularda 0 °C de 6 aya, toz ve toprakta 125 güne kadar, dışkıda 1 yıl boyunca canlılıklarını sürdürebilirler. %1 sodyum hipoklorit, fenol bileşikler, %70 etanol, iyodoforlar, gluteraldehit ve formaldehit içeren dezenfektanların çoğuna duyarlıdırlar (Aydın 1997 pp. 110-125).

İnsanlarda, *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*, hastalık etkenleridir. Çok nadir olarak *B. canis* infeksiyonları rapor edilmiştir. *B. ovis* ve *B. neotomae* kaynaklı infeksiyonlar ise insanlarda henüz rapor edilmemiştir. Bir adet deniz memelisi izolatu kaynaklı insan bruselloz vakasında ise laboratuvar kazası sonucu etkenin insana geçtiği rapor edilmiştir. Bu izolata ait bir sekans parçası olan ST27, Peru ve Yeni Zelanda'daki

3 insandan izole edilen suşlar ile ilişkili olarak bulunmuştur. Bu 3 insanın deniz memelileri ile herhangi bir temaslarının olmadığı ancak her üç hasta için ortak noktanın çiğ balıkla temasları olduğu saptanmıştır. Ayrıca Mısır’da bir kedibalığında *B. melitensis* biyotip2 suşunun varlığı bildirilmiştir. Tüm bunlar, enfeksiyonun yeni kaynaklarının balıklar olabileceğini düşündürmektedir. Çiğ süt ve bu sütlerden yeterli ısı işlem uygulanmadan yapılan ürünler insanlar için enfeksiyon kaynağını oluştururlar. Her ne kadar pastörizasyon, insanları hastalıktan korusa da, hayvan sahiplerinin çiğ süt tüketme alışkanlıkları ve aileleri ile birlikte enfekte hayvanlarla direkt temas halinde olmaları, hastalıkla ilgili riskleri devam ettirmektedir (Yumuk ve O’ Callaghan 2012). Aşı uygulamalarında meydana gelen aksaklıklar da insanlar için bir risk faktörüdür. Sindirim sistemi yolu ile enfeksiyon oluşabilmesi için 5000 adet *B. melitensis* yeterli iken *B. abortus* ve *B. suis* türleri için bu sayı 10^6 - 10^7 adet civarı olmuştur. Hastalığın inhalasyon yolu ile bulaşması için *B. melitensis* için 1300 adet jerm gerekirken *B. abortus* ve *B. suis* türleri için bu rakam 100 adet altındadır (Aydın 1997 pp. 110-125).

2.5. PATOGENEZ

Brucella türleri, retiküloendotelyal sistem hücrelerinin fakültatif hücre içi parazitleridir. Etkenlerin virulansları, etken türüne, suşuna ve enfekte edici bakteri miktarına göre değişiklik gösterir (Garrido-Abellan ve ark. 2001). Hastalığın bir retikülo-histiositer sistem hastalığı olması ve belli organ yada dokulara yerleşmesi patogeneze için önemlidir (Aydın 1997 pp. 110-125). *Brucella* türlerinde diğer patojenlerden farklı olarak ekzotoksin, sitolizin, fimbria, kapsül yada apoptoz indükleyici gibi klasik olmayan virulans faktörleri tanımlansa da, etkenin gerçek virulansı, konak hücrelerini istila etme ve içinde kalma yetenekleri ile ilgilidir. Etkenler birincil fagozomun lizozomla birleşmesini önleyen yada bundan kaçan mekanizmalar kullanırlar. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) üretimi, TNF- α ’nın hücre içi öldürmede görev yapması nedeni ile diğer bir virulans mekanizması olabilir. Bazı etken türleri ısı ve proteaza duyarlı bir faktör salgılar. Bu faktör etkenin insan makrofajı içinde canlı kalmasına ve hastalığın kronik bir durum almasına yardımcı olur (Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

Brucella türlerinin büyük bir bölümü, sahip oldukları yüksek virulansları sayesinde hem esas konaklarında hemde diğer konaklarda akut enfeksiyonlara sebep olurlar. Bakteri “gizli patojen” olarak ünlenmiştir. Çünkü şiddetli yangısal reaksiyonlara

yol açmadan da infeksiyon oluşturabilirler. Konağa ait retiküloendotelial sistem hücrelerinden makrofajlar ve plasentada bulunan trofoblast hücrelerinde canlı kalma ve çoğalabilme yetenekleri, etken virulansının kilit noktasını oluşturmuştur. Geçtiğimiz 20 yıldan günümüze yapılan araştırmalar neticesinde, *Brucella* virulansının genetiği ve hücre biyolojisinin anlaşılması noktasında büyük ilerlemeler olmuştur. Bakteriler, savunma mekanizmalarından kaçmalarını sağlayan yağ taşıyıcıları ile hücreye girerler. *Brucella* spp.'lerin canlı kalmaları ve çoğalmaları için ilk basamak olarak hücre içinde bir replikasyon bölgesinin kurulması şarttır. Bunun için de bakterilere ait lipopolisakkarit ve bir periplazmik siklik beta-glukan gereklidir. Fagosomun asidik bir hal alması, VirB tip 4 sekresyon sistemini de içeren bir kaç virulens faktörünü harekete geçirir. VirB sisteminin, dengeleyici proteinleri hücre içine doğru çektiği ve bu şekilde *Brucella* türlerine hücre içinde replikasyon mevkisi kazandırmak üzere konak hücre biyolojisini uygun hale getirdiği düşünülmektedir. Böylece *Brucella* türleri, tıpkı diğer hücre içi patojenler gibi endoplazmik retikulumun çıkış tarafındaki zar veziküllerini yakalayarak kendi replikasyon vakuollerini oluşturur (Yumuk ve O' Callaghan 2012).

Brucella infeksiyonlarına karşı oluşan antikorların koruyucu etkileri yanında, zarar verici etkilerinin de olduğunu gösteren bir çok kanıt mevcuttur. İnfeksiyonun ilk zamanlarında oluşan IgM'ler ve hemen ardından oluşan düşük düzeydeki IgG'ler, bakterilerin komplement aracılığı ile lizisine sebep olur. IgG düzeyinin zamanla artması, bakterilerin lizisi için kompleks oluşturan antikorların bloklanmasına neden olur. Bu durum oldukça spesifik antikor oluşumuna rağmen, bakteri lizisine karşı oluşan direnci ve antikorların koruma etkileri ile yüksek düzeyde antikor titreleri arasında bir ilişkinin olmayışını açıklayabilir. Opsonize edici bu bloke edici antikorlar, *Brucella* spp.'lerin içinde yaşamak ve çoğalabilmek için mekanizmalarını geliştirdikleri fagositler tarafından da kolaylıkla alınır. Fagositik hücreler, *Brucella* spp.'leri elimine edemediği gibi, vücudun diğer noktalarına yayılımına ve kalıcı infeksiyon oluşturmada rol oynarlar (Walker 1999 pp. 196-204).

Duyarlı hayvanlar genellikle ağız mukozasını istila eden *Brucella* spp.'leri yutarlar. Sindirim sistemi yoluyla ya da olası muhtemel farklı yollar ile mukozaya ulaşan bakteriler serbest bir şekilde ya da fagositler içinde ilk olarak bölgesel lenf nodüllerine girer ve yerleşirler. 2 hafta ile 7 ay arasında değişen inkubasyon süresi içinde buralarda çoğalırlar. Daha sonra kana karışarak bir bakteriyemi dönemi

gerçekleştirir ve nihayetinde etkenler retiküloendotelyal sistem hücreleri (dalak, karaciğer, supramammar lenf düğümleri, kemik iliği), meme bezleri ve üreme organlarında lokalize olurlar (Songer ve Post 2012 pp. 200-207). Seyrek olarakta eklem, bursa ve tendo kılıflarına yerleşebilen etkenler erkeklerde testislere yerleşir (Aydın 1997 pp. 110-125).

Ruminantların fötal sıvılarında ve kotiledonlarında bulunan eritritol maddesinin üremeyi arttırıcı etkisi ile plasentaya ait kotiledonların içinde ve çevresinde çoğalan etkenler, fötal anoksi ve endotoksemiye sebep olarak nekrotik plasentit ve abort şekillendirir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207). Gebe uterusu ulaşan organizmalar fetüse ait koriyonik villi epitellerinde ürer ve buradan koriyon ile uterus mukozası arasına yerleşir. Villilerin yağ dejenerasyonu ve otolizinden sonra oluşan fibrino-purulent eksudat, fötal ve maternal zarlar arasındaki bağlantının gevşemesine, fötal membranların ayrılmasına ve yavru atımına sebep olur. Bazen ölen yavru atılmaz ve içeride kalarak mumifiye olur. Korion ile allantois zarları arasındaki bağ dokuyu ve göbek kordonunu istila eden mikroorganizmalar, buralarda seroz infiltrasyonlara sebep olur. Böylece etkenler ana karnındayken yutulmak sureti ile ve kan yolu ile fötusa geçer. Mide, incebağırsaklar ve parankimatöz dokularda yangısal reaksiyonlara sebep olur. Yavru doğsa dahi septisemi ve konstitusyonel bozukluklar sonucu ölür. Placenta çoğu zaman dışarıya atılamayarak içeride kalabilir. Bu durum infeksiyonun yavaş geliştiği ve plasentanın infekte olduğu bölgelere bağ dokunun üreyerek fötus ile uterus arasında kuvvetli bir bağlantının kurulduğu zamanlarda görülür (Aydın 1997 pp. 110-125).

Çok eski zamanlardan günümüze kadar geçen sürede, patojen ile konak arasındaki ilişkinin evrimi, hastalıkla mücadelede çözüm yolları arayan bilim adamlarının eski zamanlardan beri yoğun olarak ilgilendikleri bir konu olmuştur. İnfeksiyon neticesinde ortaya çıkabilecek patolojik lezyonlar için moleküler temeller artık daha net olarak anlaşılmış ve ruminant konağın genetik yapısı ile ilişkilendirilmiştir. Etkenin konak ile her düzeyde içinde olduğu etkileşim, azaltıcı tekniklerin arttırılması ile araştırılabilir ki bunlar yeni geliştirilen güçlü biyoinformatik algoritmalar ile analiz edilmiştir. Şu sıralarda artan patojen ve konak sayısı ile organizmaların tüm genom dizilimlerine ulaşılabilir. Gen ekspresyonunun invivo manyetik rezonans görüntüleri, invivo ve invitro genomik ekspresyon analizleri,

proteomiks, transgenik hayvanlar, invivo “Knock-out” ve biyoinformatik, kapsamlı bütünsel yaklaşımlarla brusellozun moleküler patogenezinin çözülmesinde gittikçe artan oranda kullanılmaktadır. Brusellozlu hayvanlar ile yapılan deneysel çalışmalar ile ortaya çıkarılacak veriler, yakın gelecekte bruselloza karşı caydırıcı bir silah olarak daha makul olabilecek üst düzey aşılarda dizaynı, gerçek zamanlı teşhisler için patojen spesifik “gen ekspresyonu işaretleri” nin geliştirilmesi, işaretleyiciler ile seçilerek ıslah edilmiş hastalık dirençli sığırların üretimi ve gen hedefli “knock out” ve transgenik sığırların üretimini sağlayacaktır. Bu deneysel çalışmalardan elde edilecek sonuçlar ile brusellozun kontrolü için direkt yöntemler geliştirilecek, toplum sağlığında ilerlemeler olacak ve sağlıklı gıda üretimi yapılabilecektir (Adams 2002).

2.6. KLİNİK BULGULAR

Hasta hayvanların klinik tanısı mümkün değildir (Aydın 1997 pp. 110-125). Dişi hayvanlarda brusellozun en önemli semptomu infeksiyöz abortlardır ve bakterilerin plasenta ve fetüsü istila etmesi sonucunda oluşur. Aborte plasenta ve fetüs, doku veya sıvıda 10^9 /gr bakteri yoğunluğuna kadar etken içerebilir. İnfekte hayvanlar sadece bir kez abort yapmalarına rağmen, etkeni hayatlarının geri kalanında etkili bir şekilde taşımayı sürdürürler. Bu süre boyunca çok miktarda etkeni normal gözükken doğumlarda bile sütleri ile saçarlar (Yumuk ve O’ Callaghan 2012). Yavru atmalar, hayvanların ömürleri boyunca sadece bir kez olabileceği gibi, takip eden gebeliklerde de görülebilir. Abortlar gebeliğin her döneminde olabileceği gibi genellikle gebeliğin son aylarında görülür. Dişi hayvanlarda ayrıca infertilite ve mastit olgularına da sık rastlanılır. Doğum veya abort sonrası yavru zarlarının atılamaması hastalık semptomları arasındadır. Erkeklerde üreme organında lezyonlar görülebilir. En çok epididimit, orşit tablosu ve infertilite görülür. Sıklıkla olmasa da etkenler infekte hayvanda eklemlere, tendo zarlarına, bursa mukuzalarına yerleşip kronik yangıya neden olabilirler. Daha çok diz ekleminde ve tek eklemden artrit görülebilir (Aydın 1997 pp. 110-125; Garrido-Abellan ve ark. 2001; Songer ve Post 2012 pp. 200-207; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Brucella ovis infeksiyonlarında, koçlarda görülen infeksiyöz epididimit, orşit ve infertilite, yaygın hastalık belirtileri içindedir. Hastalığın en ciddi komplikasyonu persistan nefrittir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207). Ayrıca erkeklerde genital lezyonlar ve fertilitede azalma görülebilir. Koyunlarda ise plesentitis, abortlar ve kuzuların perinatal ölümlerinde artışlar olabilir (OIE Böl. 2.7.9. 2015).

İnsanlarda akut ateşli bir hastalık olarak görülen bruselloz bu özelliği ile, Malta humması, Akdeniz ateşi, Dalgalı ateş gibi isimler alır. Türkiye’de ise bunlara ilave olarak Peynir hastalığı, Mal hastalığı yada Koyun hastalığı gibi çeşitli isimler ile ifade edilir. İnsanlarda en çok dalgalı ateş ile kendini gösteren hastalık, çoğu hastada dalak ve/veya karaciğer büyümesi yapar. Kronikleşen hastalıkla birlikte hemen hemen bütün organlar etkilenir. Spondilit, endokardit, meningoensefalit ve nörolojik komplikasyonlar görülür. Hastalığın tedavisi için en az 6 hafta süren rifampin ile birlikte tetrasiklin, gentamisin yada streptomisin kombinasyonları tavsiye edilir. *Brucella* için antibiyotik direnci bir problem olarak görülmemektedir (Yumuk ve O’ Callaghan 2012).

2.7. TANI

2.7.1. Direkt Tanı

2.7.1.1. Bakteriyoskopi

Fetüsün mide içeriği, fetal membranlar, plasenta, kotiladonlar, uterus akıntıları, vajinal sıvıblar, fetal organlar ve semen gibi etkenin yoğun olarak bulunabileceği materyallerden frotiler hazırlanıp modifiye Ziehl-Neelsen ve Modifiye Köster boyama yöntemleri ile boyanarak incelenebilir. *Brucella* türleri aside dayanıklı olmasalar da hafif asitler ile dekolorizasyona dirençlidir. Bu özellik, tanıda modifiye Köster boyama gibi ayırıcı boyama yöntemlerinin kullanımını mümkün kılar. Boyamada *Brucella* türleri mavi zemin üzerinde kırmızı renk tonlarında görünürler. Yine Gram ve Stamp boyama yöntemleri de tanı amacı ile kullanılabilir (Alton ve ark. 1988; Aydın 1997 pp. 110-125; Garrido-Abellan ve ark. 2001; Songer ve Post 2012 pp. 200-207; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Dokulardan, florosan antikor preparatlar veya peroksidaz ile işaretlenmiş antikor-konjugat temelli teknikler ile direkt inceleme yapılması, yoğun kontamine örneklerde kullanışlı olabilir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

2.7.1.2. Kültür

Kültür için en iyi örnekler; atık fetüse ait dokular ve mide sıvısı, plasenta, lenf nodülü, uterus ve vagina akıntısı ve erkeklerde semendir (Songer ve Post 2012 pp. 200-207). *Brucella* etkenlerinin kültürü için genellikle katı besiyerleri kullanılır. Çünkü katı besiyerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi dissosiasyonu da sınırlar (Alton ve ark. 1988; Aydın 1997 pp. 110-125). Bazal *Brucella* besiyerleri, laboratuvar

manüplasyonları ve marazi maddelerin kültüre edilmesi maksadı ile kullanılabilir. *Brucella* besiyeri olarak ticari üretimi yapılan ve dehidre toz olarak kullanıma hazır olarak sunulan Triptikaz soy, Bakto-Tripton, Triptik soy, Tripton soya ve Tripkaz soy besiyerlerinden biri, agarlı veya agarsız olarak ve genellikle %2-5 serum ilavesi ile hazırlanabilir. Ayrıca Nutriyent agar, Blood agar base, Columbia agar, Serum dekstrozo agar, Gliserol dekstrozo agar, bazal *Brucella* besiyeri olarak kullanılabilir. Non-selektif bi-fazik karakterli Casteneda's besiyeri kan, süt veya diğer vücut sıvılarından *Brucella* türlerinin dissosiyasyonunu engelleyerek izolasyonunu sağladığı için tercih edilmiştir (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Selektif besiyerleri, ilk izolasyonlarda kontaminantların üremesini *Brucella* türlerine oranla çok daha fazla inhibe ettiği için ve izolasyonda büyük kolaylık sağladıklarından, başarı ile ve oldukça sık olarak kullanılmışlardır. Selektif besiyerleri, yukarıda ismi geçen basal *Brucella* besiyerlerinden herhangi birine antibiyotik ilavesi ve diğer gerekli ilaveler yapılarak oluşturulur. Selektif besiyeri olarak Farrell's besiyeri (Farrell 1974; Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015; OIE Böl. 2.1.4. 2016) ve Cita besiyeri (De Miguel ve ark. 2011; OIE Böl. 2.1.4. 2016) ayrı ayrı yada izolasyon sensitivitesini arttırmak için aynı anda paralel olarak kullanılmışlardır. Ayrıca yine bu amaçla Modifiye Thayer Martin besiyeri (OIE Böl. 2.4.3. 2015; OIE Böl. 2.1.4. 2016), Kuzdas ve Morse besiyeri ve selektif bi-fazik Casteneda's besiyerleri kullanılabilir (Alton ve ark. 1988).

Petriler, 37 °C de %10'a kadar CO₂'li ortamda inkube edilir. *Brucella* spp.'ler, aerofilik üreme karakteri gösterse de, bazı suşlar gelişebilmek için mikroaerob ortama ihtiyaç duyar. Bu nedenle diğer aerofilik bakterilere göre daha yavaş ve zor ürerler. Üreme için tiamin, nikotinamid ve biyotine ihtiyaç duysalar da X ve V faktöre gereksinim göstermezler. Besiyerine yapılacak %5-10 miktarında serum ilavesi, üremelerini sitümüle ederken sofra tuzu, tellurit yada selenit ilavesi üremeyi inhibe eder (Alton ve ark. 1988; Garrity 2005).

Sıvı ortamda iyi bir havalandırma sağlanmadığı takdirde üremeleri zayıf olur. Smooth suşlar 37 °C de 7 günlük inkübasyon sonunda orta derecede bir örnek bulanıklık ve hafif tozumsu kalıntı oluştururlar. Non- smooth suşlar ise granüler kalıntı ile beraber değişik bulanıklık dereceleri ve zar formasyonu oluşturabilirler (Alton ve ark. 1988).

Yarı katı besiyerinde *B. abortus* ve *B. ovis*'in CO₂ bağımlı kültürleri, yüzeyin birkaç mm altında üreme diski oluştururlar. Oysa ki CO₂ bağımsız *Brucella* suşları, yüzeyin altında derinlere doğru bir örnek bulanık form gösterirler. Yarı katı agara yapılan batırma inokulasyonlarda, hareket ve anaerobik üreme izlenmez (Alton ve ark. 1988).

Brucella kolonileri katı nutrient agarda genellikle inkubasyondan 3 gün sonra görünür hale gelir. Şüpheli *Brucella* kolonilerinin kontaminant ile kaplanma ihtimali göz önünde bulundurularak bu zamana kadar kültürlerin kontrolü tavsiye edilmektedir. Selektif besiyerlerinde kolonilerin üremesi bir kaç gün daha gecikebilir. Kültürler, selektif ve non-selektif besiyerlerinde 4. ve 5. günlerde kontrol edilebilir. Ancak 8 ve 10. günlere hatta 14. güne kadar kontrol edildikten sonra, negatif olarak değerlendirilmelidir (Alton ve ark. 1988; Songer ve Post 2012 pp. 200-207).

3-4 günlük *Brucella* kolonilerinin olduğu transparan besiyeri petrileri, bir ışık kaynağına tutuldukları zaman, koloniler yuvarlak, 1-2 mm çaplı, pürüzsüz kenarlı, yarı-saydam ve açık bal renkli olarak görülür. Zaman ilerledikçe, koloniler daha büyük olur ve daha koyu renk alır. İlk aşamada konveks şekilli ve inci gibi beyaz görülebilirler. İlk izolasyonlarda doku yağ parçacıkları veya globülleri sebebi ile atipik şekilli koloniler görülebilir. İzolasyonlarda petriler, sadece bir *Brucella* kolonisine rastlanılabileceği durumların olasılığı göz önünde bulundurularak, ayrıntılı olarak incelenmelidir (Alton ve ark. 1988).

Şüpheli *Brucella* kolonilerinin kontaminant bakteri kolonileri ile örtülmüş olduğu durumlarda, selektif besiyerlerine tek koloni pasajı yapılmalıdır. Eğer şüpheli *Brucella* kolonileri saf olarak seçilebiliyorsa, inokulasyon özesi birkaç tipik koloniye dokundurularak katı besiyerine koloniler birbirine yakın ve birbirinden ayırık olacak şekilde pasajı yapılır. 4-5 günlük inkubasyondan sonra petri, üreyen kolonilerin morfolojisi açısından yukarıda anlatılan hususlar dikkate alınarak, düşük güç mikroskobunda ve oblik ışık altında muayene edilir. Koloniler homojen ise kültür identifikasyonuna başlanabilir. Eğer koloniler saf değil ise bir kez daha koloniler seçilerek işlemler tekrar edilir (Alton ve ark. 1988).

İzolasyon sıvı besiyerinde yapılıyorsa, 3 günlük sürede ve sık aralıklar ile katı agara alt kültürler yapılmalıdır. Bu uygulama, *Brucella* kolonilerini bulmayı ve tanımayı kolaylaştıracak gibi dissosiasyonu da sınırlandırır (Alton ve ark. 1988).

Şüpheli *Brucella* kültürlerinin aynı anda bir kaç çeşit besiyerine pasajı ile saf kültürün görülmesi ve kültürün genel karakteristiklerinin belirlenmesi sağlanabilir. Örneğin *Brucella* kültürlerinde, kanlı agarda hemoliz, MacConkey agarda ise laktoz fermentasyonunun görülmemesi gerekir (Alton ve ark. 1988).

Brucella suşlarının koloni morfolojilerinin gözlenmesi oldukça önemlidir. Smooth *Brucella* suşları büyüme sırasında kolonial değişime yatkındırlar. Kolonial değişim, suşların infektivite ve antijenitelerini de değiştirir. Smooth koloniler genellikle patojenik, rough varyantları ise daha az infektiftirler ve antijenik karakterlerinde eksiklikler taşırlar. Stabil rough *Brucella* türleri, smooth formlara geri dönüşümsüzdür ve kendilerine özgü infektivite seviyelerine sahiptirler. Smooth ve rough koloni formasyonlarının ayırımında kullanılan metodlar arasında, direkt kolonilerin mikroskop altında oblik ışıkla farklı kolonilerin farklı renklerle gözlenmesi, 1/1000'lik taze olarak hazırlanan nötral akriflavin çözeltisinin test edilecek koloniler ile süspansiyonunun hazırlanması ve smooth kolonilerin süspanse kalmaya devam ederken rough kolonilerin anında aglutinasyona uğraması ve son olarak test edilecek kolonilerin önceden stok solüsyonu hazırlanan ve kullanımdan hemen önce tekrar stoktan 1/40 dilüsyonu hazırlanan kristal viole boya solüsyonunun petride mevcut kolonilerin üzerine dökülerek smooth kolonilerin boya almaması ve rough kolonilerin boya almasının gözlenmesi yer alır (Alton ve ark. 1988).

Smooth yüzey antijenine sahip tüm *Brucella* türleri, kendilerine karşı hazırlanmış anti serumlar ile aglutinasyon reaksiyonu verirler. Bu durum rough yüzey antijenine sahip rough *Brucella* türleri ve varyantları için geçerli değildir. Rough *Brucella* türleri, kendilerine karşı hazırlanmış anti-rough serumlar ile aglutinasyon reaksiyonu verirler. *Brucella* türleri ile karışabilecek *Bordetella bronchiseptica*, *Campylobacter fetus*, *Moraxella* ve *Acinetobacter* gibi Gram negatif organizmalar, *Brucella* suşlarına karşı hazırlanmış anti-smooth ve anti-rough serumlar ile aglutinasyon reaksiyonu vermezler. Tanımlanmamış şüpheli kültürlerde slide aglutinasyon testi, ileri identifikasyon testlerinden önce uygun güvenlik önlemleri altında uygulanarak bruselloz olgularında ön tanımlama yapılabilir. Bu uygulamalarda aglutinasyon hızı ve kuvveti, paralelinde çalışılacak bilinen smooth ve rough *Brucella* kültürleri ile aynı zamanda kıyaslama testi yapılarak belirlenmelidir (Alton ve ark. 1988).

Brucella kültürleri fermentatif metabolizmadan ziyade oksidatif metabolizmaya sahiptir. Katalaz pozitifler. *B. ovis*, *B. neotomae* ve bazı *B. abortus* suşları hariç oksidaz pozitifler. *B. ovis* ve yine bazı *B. abortus* suşları hariç üreaz pozitifler. *B. ovis* hariç tüm türler nitratı nitrite indirger. *Brucella* kültürleri sitratı kullanmaz. İndol veya asetilmetilkarbinol (Voges-Proskauer test) üretmez. Litmuslu süt veya sıvı jelatine reaksiyon göstermez. *Brucella* suşlarının diğer bakterilerden ayrımında dikkat edilecek hususlar Tablo 2.3'te gösterilmiştir (Alton ve ark. 1988).

Tablo 2-3: *Brucella* türlerinin bazı Gram negatif bakterilerden ayırt edilmesinde önemli testler (Alton ve ark. 1988)

Test	<i>Brucella</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> 09
Morfoloji	Küçük kokobasil	Küçük kokobasil	Virgül şekil	Diplokok	Diplokok	Basil
37C° de hareket	-	+	+	-	-	-
20C° de hareket	-	-	-	-	-	+
MacConkey agarda laktoz fermentasyonu	-	-	-	D	D	-
Glukoz içeren agarda asit üretimi	- ^a	-	-	-	D	+
Kanlı agarda hemoliz	-	+	-	D	D	-
Katalaz	+	+	+	D	+	+
Oksidaz	+ ^b	+	+	D	+	+
Üreaz	+ ^c	+	-	D	D	+
Nitrat redüksiyonu	+ ^d	+	+	D	-	+
Sitrat kullanımı	-	+	-	-	D	-

^a *B. neotomae* fermentasyon gösterebilir.

^b *B. ovis*, *B. neotomae* ve bazı *B. abortus* suşları negatiftir.

^c *B. ovis* ve bazı *B. abortus* suşları negatiftir.

^d *B. ovis* negatiftir.

D Değişken

Brucella etkenlerini , cins seviyesinde tanımladıktan sonra tür ve biyotip seviyesinde tanımlamak önem kazanır. Tür seviyesinde tanımlama, bakteriyofaj lizisi ve seçilmiş aminoasit ve karbonhidratlar ile oksidatif metabolik profilin tespitine

dayanır. *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* için biyotip seviyesinde identifikasyon ise karbondioksit gereksinimi, hidrojen sülfür üretimi, tiyonin ve bazik fuksin boya hassasiyeti ile monospesifik A ve M antiserumları ile aglütinasyon testleri ile yapılır (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.1.4. 2016). *Brucella* cinsine ait türlerin ayırt edici karakteristik özellikleri Tablo 2.4'te, türlere ait biyotiplerin ayırt edici özellikleri ise Tablo 2.5'te gösterilmiştir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Şimdiye kadar 40'ın üzerinde *Brucella* fajı literatürlerde tanımlanmış olsa da, bu fajların morfolojileri, antijenik spesifiteleri, fiziksel ve kimyasal ajanlara karşı dirençlerinin benzer olması, tüm *Brucella* fajlarının muhtemelen tek bir virüs türünden ve virüsün konakçı yelpazesi içindeki varyantlarının çeşitli grupları ile beraber oluştuğunu düşündürmektedir. Tbilisi (Tb) fajı eski Rusya'da izole edilmiştir. Rutin test dilüsyonunda (RTD) sadece smooth *B. abortus* kültürlerini lize etse de, daha yüksek konsantrasyonlarda ($10^4 \times$ RTD) *B. suis* ve *B. neotomae* türlerini de lize eder. Weybridge (Wb), Izatnagar (Iz), R/C gibi fajlar daha sonraları tanımlanarak smooth ve rough suşlar dahil bakterilerin pratik identifikasyonunda kullanılmıştır (Tablo 2.4) (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Tablo 2-4: *Brucella* türlerinin ayırt edici özellikleri (OIE Böl. 2.1.4. 2016)

Tür	Koloni Morfolojisi ^b	Serum İhtiyacı	Faj Lizisi ^a					Oksidaz	Üreaz	Konak Tercihi
			Tb		Wb	İZ ₁	R/C			
			RTD ^c	10 ⁴ RTD	RTD	RTD	RTD			
<i>B.abortus</i>	S	- ^d	+	+	+	+	-	(+) ^e	(+) ^f	Sığır ve diğer Bovidae ailesi
<i>B.melitensis</i>	S		-	-	(-) ^g	+	-	+	+ ^h	Koyun ve Keçi
<i>B.suis</i>	S	-	-	+	(+) ⁱ	(+) ⁱ		+	+ ^j	biyotip1:Domuz biyotip2:Domuz ve yabani tavşan biyotip3:Domuz biyotip4:Rengeyiği biyotip5: Vahşi kemiriciler
<i>B.neotomae</i>	S	-	- ^k	+	+	+	-	-	+ ^j	Çöl ağaç sıçanı ^l
<i>B.ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Koç
<i>B.canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ ^j	Köpek
<i>B.ceti</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+	Deniz memelisi
<i>B.pinnipedialis</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+ ^h	Yüzgeçayaklılar
<i>B.microti</i>	S	-	-	+	+	+	ND	+	+ ^h	Tarlafaresi
<i>B.inopinata</i>	S	ND	-	PL ^m	ND	ND	ND	ND	+ ^j	Bilinmiyor
<i>B.papionis</i>	S		PL ^m	PL ^m	+	ND	-	-	+ ^j	Bilinmiyor

- (+)/(-) Çoğu izolat pozitif / negatif ^m Parsiyel lizis
- ^a Fajlar: Tbilisi(Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1(Iz₁) ve R/C ND Belirlenmemiş
- ^b Normalde görülen fazi: S:Smooth, R:Rough
- ^c RTD: Rutin test dilüsyonu
- ^d *B.abortus* biyotip2 genellikle ilk izolasyonda büyüme için seruma ihtiyaç duyar
- ^e *B.abortus* biyotip3 ün bazı Afrika izolatları negatiftir
- ^f İntermediye olanlar (*B.abortus* 544 hariç) ve bazı saha suşları negatiftir
- ^g Bazı izolatlar Wb fajı tarafından lize edilir
- ^h Hızlı reaksiyon gösteren suşlar hariç yavaş reaksiyon
- ⁱ *B.suis* biyotip2 nin bazı izolatları Wb veya İz₁ fajı ile negatif veya sadece parsiyel lizis verir
- ^j Hızlı reaksiyon
- ^k Çok küçük, sık plaklar
- ^l *Neotoma lepida*

Tablo 2-5: *Brucella* türlerine ait biyotiplerin ayırıcı karakteristik özellikleri (OIE Böl. 2.1.4. 2016)

Tür	Biyotip	CO ₂ gereksinimi	H ₂ S üretimi	Boyalarda Üreme ^a		Monospesifik serumla aglütinasyon			Referans suşlar ²		
				Tiyonin	Bazik Fuksin	A	M	R	Suş	ATCC	NCTC
<i>B. abortus</i>	1	(+) ^b	+	-	+	+	-	-	544	23448	10093
	2	(+) ^b	+	-	-	+	-	-	86/8/59	23449	10501
	3 ^c	(+) ^b	+	+	+	+	-	-	Tulya	23450	10502
	4	(+) ^b	+	-	(+)	-	+	-	292	23451	10503
	5	-	-	+	+	-	+	-	B3196	23452	10504
	6 ^c	-	(-)	+	+	+	-	-	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	-	+	-	C68	23455	10507
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-	16M	23456	10094
	2	-	-	+	+	+	-	-	63/9	23457	10508
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether	23458	10509
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1330	23444	10316
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen	23445	10510
	3	-	-	+	+	+	-	-	686	23446	10511
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40	23447	11364
	5	-	-	+	-	-	+	-	513	/	11996
<i>B. neotomae</i>		-	+	- ^d	-	+	-	-	5K33	23459	10084
<i>B. ovis</i>		+	-	+	(-)	-	-	+	63/290	25840	10512
<i>B. canis</i>		-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66	23365	10854
<i>B. ceti</i>		(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	B1/94 BCCN 94-74	/	12891
<i>B. pinnipedialis</i>		(+)	-	+	(+)	(+)	(-)	-	B2/94 BCCN 94-73	/	12890
<i>B. microti</i>		-	-	+	+	-	+	-	CCM4915 BCCN 07-01 CAPM 6434	/	/
<i>B. inopinata</i>		-	+	+	+	-	+ ^e		BO1 BCCN 09-01 CAPM 6436	/	/
<i>B. papionis</i>		-	-	-	-	+	-	-	F8/08-60 CIRMBP 0958	/	13660

(+)/(-) Çoğu izolat pozitif/negatif

^a Serum dekstroz agardaki boya konsantrasyonu:20 µg/ml

^b İlk izolasyonda genellikle pozitif

^c *B. abortus* biyotip3 ve 6 ayırımı için ilave olarak 40 µg/ml tiyonin kullanılabilir. Biyotip3= +, Biyotip6= -

^d Tiyoninin 10 µg/ml konsantrasyonunda ürer

^e Zayıf aglütinasyon

² <http://www.the-icsp.org/taxa/Brucellalist.htm>

Bazı *Brucella* suşları identifikasyon özellikleri açısından belirtilen şemaya tam olarak uymayabilir. Atipik özellik gösteren *Brucella* izolatlarının varlığı, bir çok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Ewalt ve Forbes 1987; Garcia ve ark. 1988; Banai ve ark. 1990; Corbel 1991; Erdenliğ ve Şen 2000; Büyükcangaz ve Şen 2007; Büyükcangaz ve ark. 2009; Lucero ve ark. 2008; Erdenliğ Gürbilek ve ark. 2014). Banai ve ark. (1990), konvansiyonel şemaya uymayan atipik suşların yeni bir taksonomik grup oluşturmadıklarını ve bir çok araştırmacıya *Brucella* cinsinin henüz evriminin son aşamasında olmayışının bir göstergesi olduğunu düşündürdüklerini ve atipik suşların tekrarlayan izolasyonlarının yapılmasının, bunlara daha sonra yeni bir tür ve biyotip statüsü verebilecek öncül çalışmalar olabileceğini bildirmişlerdir.

Aşı suşları olan *B. abortus* S-19 ve *B. melitensis* Rev-1'in saha suşlarından ayırımı için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. *B. abortus* S-19 aşı suşu 1:500,000 oranında (2 µg/ml) tiyonin mavisi boya katkılı SDA (Serum dekstrozu agar) besiyerinde inhibe olurken, *B. abortus* biyotip1 saha suşları inhibe olmaz. 5 IU/ml oranında penisilin katkılı SDA besiyerinde aşı suşları inhibe olurken saha suşları ürer. 2,5 µg/ml oranında streptomisin katkılı SDA besiyerinde *B. melitensis* Rev-1 aşı suşu ürerken saha suşları inhibe olur. 1 mg/ml oranında meso-eritritol katkılı SDA besiyerinde *B. abortus* S-19 aşı suşu inhibe olurken saha suşları ürer. *B. abortus* biyotip1 saha suşları ilk izolasyonda üremek için mikroaerob ortama ihtiyaç duyarlar. Aşı suşları aerob ortamda üreyebilirler. Bazı atipik saha suşlarının aşı suşlarından ayırımı için suş virulens testi, deney hayvanı kullanarak yapılabilir. *B. abortus* S-19 aşı suşunun tipik *B. abortus* biyotip1 özellikleri gösteren saha suşlarından ayırımı Tablo 2.6'da, *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunun tipik *B. melitensis* biyotip1 özellikleri gösteren saha suşlarından ayırımı Tablo 2.7'de gösterilmiştir (Alton ve ark. 1988).

Tablo 2-6: *B. abortus* S-19 aşı suşunun tipik *B. abortus* biyotip1 saha suşlarından ayırımı (Alton ve ark. 1988)

Suş	Karbondiyoksit gereksinimi	Katkılı besiyerlerinde üreme		
		Tiyonin mavisi 2µg/ml	i-eritritol 1mg/ml	Penisilin 5 iü/ml
Tipik biyotip 1	+ ^a	+ ^a	+	+ ^a
S-19 suşu	-	-	- ^b	-

a Genellikle ilk izolasyonlarda pozitif

b Eritritole tolerans için mutasyon oranı oldukça yüksek olması gereken bazı şüpheli S-19 lar diğer testlerde suş karakterlerini göstermelerine rağmen eritritol besiyerinde üreme gösterebilir.

Tablo 2-7: *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunun tipik *B. melitensis* biyotip1 saha suşlarından ayrımı (Alton ve ark. 1988)

Suş	Koloni büyüklüğü	Katkılı besiyerlerinde üreme			
		Tiyonin 20 µg/ml	Basık fuksin 20 µg/ml	Penisilin 5 üü/ml	Streptomisin 2,5 µg/ml
Tipik biyotip 1	Büyük	+	+	+	-
Rev-1 suşu	Küçük	-	-	-	+

2.7.1.3. Moleküler Yöntemler

Günümüzde, bruselloz tanısı için kabul edilen altın standart yöntem, konvansiyonel etken izolasyonu ve identifikasyonudur. Ancak bu yöntem, bazı dezavantajlar içermektedir. Testin bu olumsuz yönleri, tanıda oldukça spesifik, hassas ve hızlı sonuç veren farklı bir test ihtiyacını arttırmaktadır. Bu dezavantajlar irdelendiğinde; yöntemin uzun süre alması, teknik altyapı, deneyimli personel ve yoğun emek gerektirmesi (Bricker 2002; Yu ve Nielsen 2010), çok sayıda test içermesi ve tüm sonuçların beraber yorumlanması gereksinimi (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.1.4. 2016), karmaşık aşamalar içermesi, test süresi boyunca laboratuvar personelinin zoonoz etkenin potansiyel riski altında olması, biyolojik savaş ve tarım terörizmi açısından girdiğimiz yeni dönemle ilgili ihtiyaçları karşılayamaması (hızlı tanı ve yüksek hacimli çalışma olanağı) gibi olumsuzluklar karşımıza çıkar. Bu dezavantajları gidermek üzere *Brucella* etkenlerinin moleküler tanısını sağlayan yöntemler, 1987 yılında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) (Polimerase Chain Reaction) testinin uygulanması ile birlikte günümüze kadar oldukça geliştirilmiştir (Bricker 2002; Yu ve Nielsen 2010). PCR testi, kültür yönteminin dezavantajlarını ortadan kaldırarak, düşük maliyet, yüksek hacimli çalışma olanağı, konvansiyonel sistemlere göre nispeten uygulama kolaylığı, az el işçiliği (Bricker 2002), çok az miktarlarda dahi etkenin teşhis edilebilme imkanını, spesifik eradikasyon programlarının yürütülmesi ve epidemiyolojik izlenebilirliği (Bricker 2002; Yu ve Nielsen 2010), reaktörlerin daha hızlı belirlenmesi, etkenin yayılımının engellenmesi, çevre kontaminasyonu ve insana bulaşma olgularında erken tedbir alınması gibi etkin ve hızlı bir testin sağlayacağı genel avantajları kazandırır.

Direkt klinik örnekler ile saf bakteri kültürlerinden uygulanabilen PCR testleri, uygulandıkları örnek materyallerine göre farklı sonuçlanabilir. Bricker (2002), brusellozun PCR ile tanısında direkt klinik materyallerden (aborte fetüs, semen, kan, süt... v.b) test örneği hazırlanması için çalışılırken, testin doğasından kaynaklanan veya

önceden tahmin edilemeyen bir çok olumsuzlukların karşımıza çıkabileceğini ve bunlardan en yaygın olanlarının PCR inhibitörlerinin de hedef DNA ile beraber saflaştırılması ve aşırı miktarda yabancı DNA'nın teste karışması olabileceği ve bu problemlerin dikkatli yapılacak denemelerle bertaraf edilebileceğini bildirmiştir. Yu ve Nielsen (2010), *Brucella* spp. identifikasyonu ve tiplendirilmesi ile ilgili çoğu PCR'nin bakteri kültürlerinden hazırlanan veya ekstrakte edilen DNA'lar için geliştirildiğini, özellikle multipleks PCR performansları için bakteri DNA'sının kalite ve saflığının çok önemli olduğunu, DNA örneği içindeki herhangi bir inhibitörün PCR metodunun kullanımını sınırlayabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, elde edilebilecek yanlış negatif sonuçların, inceleme örneğinin içerdiği EDTA, Rnase / Dnase, heme, heparin, fenol, poliaminler, bitki polisakkaritleri, idrar, kalsiyum alginat ve bulunması muhtemel diğer bileşikler sebebi ile oluşabileceğini, yanlış pozitifliğin ise örneğin kontaminasyonu yada amplikon yükleme hataları sebebi ile oluşabileceğini belirterek, hali hazırda bu dezavantajları bertaraf edecek PCR yöntemlerinin geliştirilmesine devam edildiğini ve bu yöntemlerin geniş çaplı klinik örnekler ile valide edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Brucella spp.'lerin kültürlerden, insan ve hayvan dokularından ve hayvansal ürünlerden cins düzeyinde identifikasyonu için PCR tabanlı testler; 31 kDa BCSP (*Brucella* cell surface salt extractable protein), omp2, 16SrRNA ve IS711 bölümleri başta olmak üzere *Brucella* türlerine ait diğer özel gen bölümlerinin deşifre edilmesi ile geliştirilmiştir (Baily ve ark. 1992; Romero ve ark. 1995a; Matar ve ark. 1996; Mukherjee ve ark. 2007). BCSP31 proteinini kodlayan gen bölgesinden B4 ve B5, 16SrRNA gen bölgesinden F4 ve R2, 16s-23S ve 16S-23S genler arası kopyalanmış ara parçalardan (Intergenic Transcribed Spacers) (ITS), Bru ITS-S ve Bru ITS-A, 16S-23S rDNA ara boşluğundan (Interspace) ITS66 ve ITS279, IS711 böldesinden IS313 ve IS639, per'i kodlayan gen bölgesinden bruc1 ve bruc5, omp2'yi kodlayan gen bölgesinden JPF ve JPR primerleri ile dış membran protein bölgelerinden (omp2b, omp2a, omp31) ve *Brucella* ailesinin omp25/omp31 proteinlerini kodlayan gen bölgelerinden rastgele seçilen primerler, *Brucella* etkenlerinin cins düzeyi tanısı için kullanılmaktadır (Yu ve Nielsen 2010). Özellikle B4 ve B5 primerleri ile günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmıştır. İlk olarak Baily ve ark. (1992), *Brucella* cinsine ait ve ait olmayan suşları kullanarak, B4 ve B5 adını vererek tasarladıkları primerleri ile yaptıkları cins seviyesinde PCR'nin 10fg DNA miktarını doğru olarak saptayabilecek

hassasiyette olduğunu bildirmişlerdir. Da Costa ve ark. (1996), Bcsp31 gen bölgesinden, ısı şoku proteinlerini (HtrA, GroEL, DnaK ve DnaJ) kodlayan gen bölgelerinden ve 16s rRNA bölgesinden kısımları çoğaltmak için seçilen primerler ile *Brucella* suşlarından ve diğer bakterilerden PCR yapmışlar, *Brucella* türleri ve biyotiplerinin teşhis başarısı bakımından, kullanılan primerler için bir farklılık tespit etmeseler de, *Ochrobactrum anthropi* ve *Phyllobacterium* spp. türlerinin, Bcsp31, DnaK, DnaJ, GroEL ve 16s RNA primerleri ile bant verdiğini bildirmişlerdir. Matar ve ark. (1996), 20 hasta kanının perifer mononükleer hücrelerinden ekstrakte ettikleri DNA'lara Baily ve ark. (1992)'nin bildirdikleri PCR'yi uygulamışlar ve tümünü pozitif olarak tespit ettiklerini, aynı çalışmada 30 sağlıklı ve 9 tifoid ateşli hasta kanının ise negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Queipo-Ortuno ve ark. (1997), B4 ve B5 primerlerini kullanarak uyguladıkları Bcsp31 PCR'de, önceden bruselloz tanısı yapılmış hastalardan ve kontrol grubu hastalardan elde ettikleri perifer kan örneği ile çalışmışlar ve sonuçta 50 bruselloz hastasının tamamını doğru teşhis ettiklerini, ayrıca kan örneklerinden 2-4 µg miktarında total DNA ekstrakte edebildiklerini bildirmişlerdir. Casanas ve ark. (2001), B4 ve B5 primerlerini kullanarak uyguladıkları Bcsp31 PCR için referans suşlar ile spesifikite çalışması yapmışlar ve her reaksiyon için 100ng DNA kalıp kullanarak *Brucella* cinsindeki bakterileri pozitif, diğer farklı bakterileri ise negatif olarak teşhis ettiklerini, sadece *Ochrobactrum* türleri için hatalı olarak pozitif reaksiyon belirlediklerini bildirmişlerdir. Moussa ve ark. (2011), çalışmalarında bruselloz şüpheli 7 atık örneğinden klinik örneklerle ve seropozitif 23 hayvana ait doku örneklerine, B4 ve B5 primerlerini kullanarak Bcsp31 PCR yapmışlar, 7 örneğin 4'ünü ve 23 hayvanın 21'ini PCR ile pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Arasoğlu ve ark. (2013), Erzurum ilimizde yaptıkları bir çalışmada, 334 inek sütü örneğine B4 ve B5 primerlerini kullanarak PCR uyguladıklarını ve çalışmalarında 273 örnekte pozitiflik tespit ettiklerini ve PCR için DNA'nın minimum tespit limitini 5pg olarak belirlediklerini bildirmişlerdir. Mitka ve ark. (2007), bruselloz hastası 200 insana ait periferik tam kan, kan serumu ve akyuvar hücre örneklerine, B4 ve B5 primerlerini kullanarak PCR uygulamışlar ve tam kanlardan %99, akyuvarlardan %100 ve serum örneklerinden ise %97 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Uyguladıkları PCR için analitik sensitivite olarak 10-100 fg arası DNA miktarını bildirmişlerdir. Lopes ve ark. (2014), Brezilya'da yaptıkları çalışmada, 83 *Brucella* suşunu, Bcsp31 gen bölgesinden bölümleri çoğaltan çeşitli primerler kullanarak uyguladıkları PCR ile cins düzeyinde

doğruladıklarını bildirmişlerdir. Erdenliğ Gürbilek ve ark. (2015), Şanlıurfa ilimizde yaptıkları bir çalışmada, öncelikle 68'er adet klinik örneğin tümünden DNA ekstraksiyonlarını yapmışlar ve ardından bu DNA'lar için B4 ve B5 primerleri kullanılarak yapılan cins spesifik PCR sonucunda; süt örneklerinin 11'inden (%16,2) ve akyuvar örneklerinin 6'sından (% 8,8) 223 bp'lik DNA amplifikasyonu saptandığını, vaginal sıvıların tamamından ise negatif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir.

PCR teknikleri ilk olarak bakteri izolatları için geliştirilmiş olsa da günümüzde, klinik örneklerden DNA tespiti için de kullanılmaktadır. DNA ekstraksiyon metodları PCR sensitivitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Bu metodların çoğu insan klinik örnekleri ile valide edilmiştir. Veteriner klinik örnekler ile ilgili çok az bildirim mevcuttur. Tüm bu uygulanan PCR teknikleri ile ilgili olarak sensitivite ve spesifite hesaplamak oldukça zordur. Çünkü uygulanan test protokolları her bir makalede farklı olarak tanımlanmıştır. Genel bir kural olarak bruselloz için PCR tekniklerinin spesifiteleri %100'e yakın olsa da, tanı sensitiviteyi kültür yöntemine göre daha düşüktür. Şu ana kadar tanı açısından klinik örneklerden alınan en iyi sonuçlar, kültür ve direkt PCR yöntemlerinin kombine edilerek kullanılması ile elde edilmiştir (Godfroid ve ark. 2010). PCR ile brusellozun tanısı çalışmalarında araştırmacılar, farklı klinik örneklerle uyguladıkları farklı PCR'lerin tanı sensitivite ve spesifitelerini, birbirlerinden çok az farklılıkla ve yüksek olarak bildirmişlerdir. Fekete ve ark. (1992), 105 adet atık sığra ait akciğer, karaciğer, dalak, mide içeriği ve anneye ait plasenta ve vaginal akıntı klinik örneklerine, 43kDa'lık dış membran proteinini kodlayan gen bölgesinden 607 Bp'lik kısmı çoğaltan primerler kullanarak direkt olarak uyguladıkları cins spesifik PCR'nin sensitivitesini %98, spesifitesini ise %96 olarak hesapladıklarını bildirmişlerdir. Romero ve ark. (1995b), *B. abortus* türlerine ait 16S rRNA üzerinde 905 Bp'lik bölümü çoğaltan F4 be R2 primerlerini kullanmışlar, infekte sürüden 56 adet ve infekte olmayan sürüden 37 adet inek sütüne bu cins spesifik PCR'yi direkt uygulayarak, PCR'nin sensitivitesini %87,5 ve spesifitesini %100 olarak bildirmişlerdir. Queipo-Ortuno ve ark. (1997), 47 bruselloz hastası insanın periferik kanlarına B4 ve B5 primerleri kullanarak uyguladıkları Bcsp31 PCR neticesinde, altın standart yöntemine göre hesapladıkları PCR'nin sensitivitesini %100 ve spesifitesini ise %98,3 olarak bildirmişlerdir. Güler ve ark. (2003), 126 küçük ruminant atığına ait fetal mide sıvılarına uyguladıkları *Brucella melitensis* spesifik IS711 PCR'nin sensitivitesini %97,4 ve spesifitesini %100 olarak bildirmişlerdir. Müştak ve ark. (2009), 31 adet sığır,

8 adet koyun ve 1 adet keçi atık mide sıvısı örneğinden direkt olarak gerçekleştirdikleri cins spesifik PCR'nin altın standart yöntemine göre hesapladıkları sensitivite ve spesifitesini %100 bulmuşlardır. Büyükcangaz ve ark. (2011), 94 adet ruminant atığına ait organ homojenatlarına, etkene spesifik Who-A'yı kodlayan gen bölgesinden 460 Bp'lik kısmı çoğaltan primerler kullanılarak *Brucella* cins spesifik PCR uygulamış ve metodunun sensitivitesini %83 ve spesifitesini %94 olarak hesapladıklarını bildirmişlerdir. Erdenliğ Gürbilek ve ark. (2015), 15 adet süt örneğine uyguladıkları Bcsp31 PCR'nin kültür yöntemine göre hesapladıkları sensitivitesini ve spesifitesini sırası ile %78,9 ve %100 olarak bildirmişlerdir.

İlk tür spesifik multipleks PCR testi (m-PCR) AMOS-PCR'dır. İsmini bu test ile teşhis edilebilen "abortus, melitensis, ovis ve suis" tür isimlerinden alır. Ancak bu test ile tüm *Brucella* türlerinin ve aşı suşlarının ayrımı yapılamamaktadır (Yu ve Nielsen 2010; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

Yeni geliştirilen multipleks PCR testi (Bruce-Ladder) hızlı ve basit olarak identifikasyon sağlar. Bu testin önceki PCR testlerine en büyük avantajı çoğu *Brucella* türünü ve aşı suşlarını tek basamakta tanımlaması ve ayırt edebilmesidir. Ayrıca yeni keşfedilen *Brucella* türlerinin de tanımlanması ve ayırt edilebilmesi bu multipleks PCR ile mümkün olabilmektedir (Lopez-Goni ve ark. 2008; Godfroid ve ark. 2010; Yu ve Nielsen 2010; OIE Böl. 2.4.3. 2015). Garcia-Yoldi ve ark. (2006), 8 çift oligonükleotid primer dizayn ederek uyguladıkları multipleks PCR ile 72 adet referans *Brucella* suşu ve saha izolatını doğru olarak identifiye ettiklerini, aynı testle genetik ve serolojik olarak *Brucella* cinsine yakın 23 bakteri suşunun negatif sonuç verdiğini, böylece yüksek spesifiteye sahip ve bilinen tüm türleri ve aşı suşlarını bir basamakta ayırabilen bir test geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Lopez-Goni ve ark. (2008), Garcia-Yoldi ve ark. (2006)'nın daha önce standardize ettikleri protokolu kullanarak 7 farklı Avrupa ülkesi laboratuvarında, toplam 625 farklı hayvan ve coğrafik bölgeden temin edilen saha izolatını ve standart *Brucella* referans suşlarını, Bruce-ladder olarak isimlendirdikleri multipleks PCR ile test etmişler ve türlere ait biyotiplerin tür içinde aynı profili vermesi ile biyotip ayrımının yapılamaması dışında, bir basamakta tüm klasik *Brucella* suşları ve aşı suşlarının ayrımını doğru olarak yapabildiklerini bildirmişlerdir. Ancak *B. canis* izolatlarının bir kısmının *B. suis* olarak tespit edilmesinin testin tek olumsuzluğu olduğunu bildirmişlerdir. Mayer-Scholl ve ark. (2010), Garcia-Yoldi ve ark. (2006)'nın

protokolününe, *B. microti* türünü de tespit edebilen primer çiftini ekleyerek uyguladıkları multipleks PCR ile hem *B. microti* türünü ayırt edebildiklerini ve hem de birbirine çok yakın profil veren *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* türlerini, ortak bant profilleri üzerindeki 794 Bp'lik bantta izlenebilen küçük yükseklik farkları ile ayırt edebildiklerini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada referans suşlar ve saha izolatları olmak üzere toplam 81 *Brucella* suşunun doğru olarak identifiye edildiğini ve içlerinde *Brucella* ailesine yakın suşların da olduğu 33 *Brucella* olmayan suştan da negatif sonuç alındığını bildirmişlerdir.

Bakteri izolatlarından Bruce-ladder multipleks PCR ile identifikasyon yöntemi, çeşitli araştırmalarda, izole edilen bakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için standart bir test olarak uygulanmıştır. Morales-Estrada ve ark. (2012), Meksika'da toplam 5 yıllık bir sürede hayvanlardan, insanlardan ve gıda ürünlerinden izole ettikleri 153 *Brucella* suşunu, 8 çift primer kullanarak uyguladıkları Bruce-ladder PCR ile tür düzeyinde identifiye etmişlerdir. PCR'da her ampikon için 15ng miktarında DNA kalıbı kullandıklarını bildirmişlerdir. Lopes ve ark. (2014), Brezilya'da 1976 - 2013 yılları arasında izolasyonu yapılan 62'si saha suşu izolatu ve 21'i referans suş olmak üzere toplam 83 *Brucella* suşunu önce konvansiyonel bakteriyolojik yöntemle, daha sonra da aynı suşları Bruce-ladder multipleks PCR ile tür seviyesinde identifiye ederek, PCR sonuçlarının bakteriyolojik yöntemle uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Erdenliğ Gürbilek ve ark. (2015), izolasyonunu yaptıkları ve bakteriyolojik yöntemle identifiye ettikleri 15 adet *B. abortus* izolatına, Mayer-Scholl ve ark. (2010)'nın tarif ettiği şekilde multipleks PCR uygulamışlar ve sonuçta tüm suşları *B. abortus* olarak identifiye ettiklerini bildirmişlerdir. Morales-Garcia ve ark. (2015), Meksika'da 14 insan, 13 hayvan ve 2 gıda orjinli toplam 29 *Brucella* izolatını konvansiyonel yöntemle ve Bruce-Ladder multipleks PCR ile karşılaştırmalı olarak tür seviyesinde identifiye etmişler ve sonuçları tamamiyle uyumlu bulmuşlardır. Nasruddin ve ark. (Tarihsiz), Malezya'da 9 adet keçiden izole ettikleri *Brucella* izolatlarına, konvansiyonel yöntem ve Bruce-ladder multipleks PCR kullanarak yaptıkları tür seviyesinde identifikasyon sonuçlarının tamamı ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Testin dezavantajı, hatalı bir şekilde bazı *Brucella canis* suşlarını *B.suis* olarak tanımlayabilmesidir. Ayrıca türlere ait biyotip seviyesinde de tanı yapılamamaktadır. Daha sonraları araştırmacılar tarafından Bruce-ladder multipleks PCR'de yapılan

değişiklikler neticesinde, *B. suis* ile *B. canis* türlerine ait tüm suşların ayırt edilebildiği bildirilmiştir (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Bunlardan birisi, Bruce-ladder v2.0 (suis-ladder) olarak Lopez-Goni ve ark. (2011) tarafından, bir diğeri de Kang ve ark. (2011) tarafından, mevcut PCR'ye 766 ve 344 Bp'lik yeni primer setleri ilavesi yapılarak bildirilmiştir.

Yeni PCR temelli test metodu olan random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR), tür ve biyotip düzeyinde ayırım yapabilmektedir. *B. abortus* biyotiplerinden 1, 2 ve 4'ü, 3, 5, 6 ve 9'dan ayırabilir. *B. suis* biyotiplerinin de ayırımı yapılabilir. Dezavantaj olarak yine bir kısım *B. canis* suşları, *B. suis* biyotip 3 ve 4 olarak görüntü vermektedir (Yu ve Nielsen 2010). *Brucella* türlerinin PCR temelli metodlar ile moleküler identifikasyonu ve ayırımı ile ilgili, şimdiye kadar en az 400 makale yayınlanmıştır (Rosenberg 2014).

Brucella türleri içindeki biyotiplerin tam olarak ayırımını sağlayabilecek PCR temelli metodların olmaması, diğer moleküler tiplendirme tekniklerinin geliştirilmesini hızlandırmıştır. Bu tekniklerden biri olan restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), IS711 insertion sekansı sayıları ile temellenir. Ancak bu amaçla kullanılabilirliği ispat edilememiştir. PCR restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), *Brucella* türlerine ait dış membran proteinlerini kodlayan genlerin restriksiyon analizine dayanır. Bu yöntemin uygulanması kolaydır ancak polimorfizm derecesi az ve sağlamlığı zayıftır (Godfroid ve ark. 2010).

Araştırmacılar tarafından bir kaç yeni fingerprint tekniği ile izole edilmiş belli türlerin aynı biyotiplerinin ayırt edilebildiği gösterilmiştir. Single nukleotide polymorphisms (SNPs), tür içinde DNA sekanslarındaki tek nukleotid farklılıklarını bulur. Multilocus sequence analysis (MLSA), bir referans gen çiftindeki DNA sekans çeşitliliklerini bulur ve bu eşsiz allel profilleri ile suşları tanımlar. Multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA), tekrar eden sekansları içeren bölgeleri analiz eder (Godfroid ve ark. 2010). HOOOF-Prints (hypervariable octameric oligonucleotide fingerprints) olarak adlandırılan ilk MLVA testi, Bricker ve ark. (2003) tarafından geliştirilmiştir. Hali hazırda en yaygın olarak MLVA15_{Orsay} ve MLVA16_{Orsay} yada onların alt panelleri kullanılmaktadır. Çeşitli *Brucella* türleri arasında genetik olarak yakın ilişki olsa da, matrix assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) yöntemi kullanılarak ayırımı yapmak

mümkündür. Lista ve ark. (2011), bütün klasik *Brucella* türlerini içeren 170 *Brucella* suşunu bu yöntemle tür düzeyinde tanımlamıştır (Rosenberg 2014).

Real-time PCR yeni geliştirilmiş bir PCR tekniğidir. Bu PCR'nin avantajı çok kısa sürede sonuç vermesi, elektroforetik analiz gerektirmemesi ve kontaminasyona karşı güvenilir olmasıdır. Bu PCR ile bakteri kültürleri, serum, kan ve parafine gömülü dokular analiz edilebilir. İnsan brusellozunda tanı amacı ile kullanılmaktadır (Yu ve Nielsen 2010). AMOS PCR'nin genişletilmiş şekli 3 farklı Real Time PCR ile uygulamaya sokulmuş, *B. abortus* biyotipleri, *B. melitensis* ve *B. suis* türleri floresan rezonans enerji transferi kullanılarak tanımlanmıştır (Redkar ve ark. 2001). Yine Bcsp31 gen bölgesinden B4 ve B5 primerleri ve SYBR Green 1 kullanılarak *Brucella* suşlarının cins düzeyinde tanısı yapılabilmektedir (Queipo-Ortuno ve ark. 2005). Başka bir kantitatif real time PCR ise serum örneklerinden inaktif, seropozitif ve aktif insan brusellozunda hastalık durumlarının ayrımını da içeren tanımlama, Bcsp31 gen bölgesinden Taqman prob ve primerler kullanılarak yapılmıştır. (Queipo-Ortuno ve ark. 2008). Diğer bir real time PCR çalışmasında ise *Brucella* türlerinin cins seviyesinde tanısı için IS711, Bcsp31 ve per gen bölgelerinden primerler ve Taqman problemleri kullanılarak bir kıyaslama yapılmış ve IS711 temelli testin en hassas, spesifik, etkili ve tekrar edilebilir olduğu bulunmuştur (Bounaadja ve ark. 2009).

2.7.1.4. Hayvan Deneyleri

Şüpheli kültürler ve kontaminasyon ihtimali olmayan marazi maddeler, kobaylara periton içi olarak, kontamine olan marazi maddeler ise hazırlanarak derialtı veya kasiçi yol ile enjekte edilirler. Her örnek için en az 2 kobay kullanılır. Süt ve idrar santrifüj edildikten sonra dip tortuları fizyolojik tuzlu su (FTS) ile, 0,5 ml sperma ise 2 kat FTS ile sulandırılarak 0,2 ml miktarlarında inokule edilir. Bu rakam amnion sıvısı, sinovial sıvılar, göğüs ve karın boşluğu sıvıları için 2 kat FTS ile sulandırıldıktan sonra 0,5 ml miktarındadır. Organlardan hazırlanan inokulumlar 0,5 - 0,1 ml, peynir süspansiyonundan hazırlananlar ise 0,5 ml miktarlarında olacak şekilde kobaya enjekte edilirler (Aydın 1997 pp. 110-125).

Kobaylardan serolojik yoklamalar için kalpten kan alındıktan sonra, birisi enjeksiyondan 3, diğeri ise 6 hafta sonra öldürülürler. Nekropside lenf yumrularında büyüme, karaciğerde nekrotik odaklar, dalağın büyümesi, epididitimsi, testislerde apse ve eklemlerin şişmesi gibi lezyonlar tespit edildiğinde; karaciğer, böbrek, dalak, uterus

ve kemik iliği gibi lezyonlu organlardan uygun besiyerlerine ekimler yapılarak etken izolasyonuna gidilebilir. Yine serolojik yoklamalarla da tanıya yardımcı olur (Aydın 1997 pp. 110-125).

Brucella türlerinin izolasyonunda ender olmakla birlikte 4-7 günlük embriyolu tavuk yumurtası, inokulasyonlarda kullanılmaktadır (Aydın 1997 pp. 110-125).

2.7.2. İndirekt Tanı

2.7.2.1. Serolojik Testler

Bruselloz tanısı için her epidemiyolojik durumda ve tüm hayvan türleri için kullanılabilecek tek bir serolojik test bulunmamaktadır. Özellikle ferdi uygulamalarda, bruselloz tanısı için kullanılan testler bazı yetersizlikler içerir. Kullanılan metodlara göre sonuçlar değerlendirilirken, test sonucunu etkileyebilecek tüm faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Hayvanların aşılanmış olması, aşılanma zamanı, kullanılan aşının türü, uygulama yolu ve miktarı, tespit edilen pozitifliğin aşıya bağlı serolojik reaksiyon sonucu oluştuğu ihtimalini düşündürebilir. İlave olarak bazı mikroorganizmalara (özellikle *Yersinia enterocolitica* O:9) karşı oluşan antikorların testlerde çapraz reaksiyon oluşturabilecekleri (yalancı pozitiflik) ihmal edilmemelidir. Bu yalancı pozitif serolojik reaksiyonlar, tüm hayvan türleri için yaşadıkları bölgelere ve zamana göre değişik oranlarda görülebilir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Tamponlanmış *Brucella* antijen testleri (Buffered *Brucella* antigen tests) (BBAT) iki farklı şekilde hazırlanabilir. Birincisi Rose Bengal boyasının kullanıldığı testtir (RBT). İkincisi ise, brillant yeşili ile kristal viyoleto boya karışımının kullanıldığı Tamponlanmış Pleyt Aglutinasyon Testi (Buffered Plate Agglutination Test) (BPAT)'dir. Her iki test de, antijen olarak *B. abortus* S99 yada S1119-3 olarak isimlendirilen suşun üretilmesi ve elde edilen bakteri antijeninin pH'ı 3,65 civarına getirilmiş tampon solüsyonlar ile karıştırılmasıyla hazırlanır. Testlerin sensitiviteleri oldukça yüksektir. Ancak bulunan pozitiflikler, epidemiyolojik çalışmalarda içeren doğrulayıcı yada tamamlayıcı stratejiler uygulanarak araştırılmalıdır. Yanlış negatif reaksiyonlar oldukça nadir olarak görülebilir. Bu durum prozon fenomeni ile gerçekleşebilir. Serumun dilüe edilmesi veya ileride yapılacak tekrar testlerle bu olumsuzluk aşılabilir. RBT, infekte sürülerin tespiti için yapılan taramalarda yada brusellozdan ari sürü yada çiftliklerde infeksiyon yokluğunun izlenmesinde kullanılabilir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Serum Aglütinasyon Testi (Serum Agglutination Test) (SAT), Kuzey Avrupa Ülkelerinde, sığır brusellozunun surveylans ve kontrol programlarında uzun yıllar boyunca kullanılmıştır. Antijen, *B. abortus* S99 yada S1119-3 suşunun, Fenollü Fizyolojik Tuzlu Su (FFTS) içinde süspanse edilmesi ile hazırlanır. Yanlış pozitiflikleri önlemek ve test spesifitesini arttırmak için son konsantrasyonda 5mM miktarında EDTA ilave edilebilir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Komplement Fiksasyon Testi (Complement Fixation Test) (CFT) karmaşık bir test düzenine sahip olmasının yanında, uygulanması için yeterli laboratuvar altyapısı ve doğru titrasyon ile kullanılan solüsyonların sürekli hazır tutulması için eğitimli personele gereksinim gösterir. Tüm bu olumsuzluklara rağmen test, geniş bir kullanım alanı bulmuştur (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

İndirekt ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (Indirect ELISA) (I-ELISA) ticari olarak geliştirilerek valide edilen bir çok test kiti sayesinde, geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Buna rağmen kullanımdan önce test validasyonlarının standartlarda anlatıldığı şekilde (OIE Böl. 1.1.6. 2016) yapılması tavsiye edilmektedir. Testte antijen olarak, tüm hücre, S-LPS yada OPS kullanılabilir. S-LPS yada OPS kullanıldığında test, *Brucella* antikorlarını tespit edebilmede çok yüksek sensitivite gösterir. Ancak aşı suşları ile de pozitif reaksiyon vermektedir. Hatta *Brucella abortus* RB51 aşısından kaynaklanan antikorlar bile bu testle pozitiflik oluşturabilir. Referans serumla standardize edilen testin tanı sensitivitesi RBT/BPAT testleri ve CFT testine göre en az eşit yada daha yüksek olmalıdır. Spesifitesi ise genellikle daha düşük olur. Pozitif reaksiyonlar BBAT ve CFT testleri ile de araştırılmalıdır (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Yarışmalı ELISA (Competitive ELISA) (C-ELISA), S-LPS veya OPS antijenleri ile ticari olarak hazırlanarak kullanıma sunulmuştur. Buna rağmen kullanımdan önce test validasyonlarının standartlarda anlatıldığı şekilde (OIE Böl. 1.1.6. 2016) yapılması tavsiye edilmektedir. Testin bazı yanlış pozitif serolojik reaksiyonları engellediği gösterilse de tamamını berteraf edememektedir. Yine aşılamaaya bağlı pozitiflikler de görülebilir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

FPA (Florosan Polarizasyon Testi) (Fluorescence Polarisation Assay), antijen antikor etkileşimini ölçmek için geliştirilmiş basit bir tekniktir. Çalışma prensibi olarak diğer serolojik testler gibidir ancak çok hızlı sonuç verir. Bruselloz tanısı için *B. abortus* 1119-3 suşunun S-LPS tabakasının OPS bölümünde bulunan ve küçük moleküler

ağırlığı olan (ortalama 22 kD) bir parça, fluoresin isotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate) (FITC) ile işaretlenerek antijen olarak kullanılır. Testin sensitivite ve spesifitesi birçok C-ELISA ile çok yakındır. Diğer serolojik testlerde olduğu gibi bu test için de validasyonların uygun standarda göre yapılması tavsiye edilir. Yine aşılamaya bağlı pozitiflikler bu test ile de tespit edilebilmektedir. Bulunan pozitiflikler doğrulayıcı yada tamamlayıcı stratejiler ile araştırılmalıdır (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Doğal (Native) haptten ve sitosol (cytosol) proteini temelli testler ruminantlar için oldukça kullanışlıdır. Sığırlarda native haptten testleri, *B. abortus* S19 suşu ile aşılama durumlarında yüksek spesifite gösterdiği gibi RBT ile kombine edilerek hastalık taramalarında da başarı ile kullanılabilir. Testin optimal hassasiyeti (CFT'ye yakın ancak RBT ve S-LPS temelli i-ELISA'dan oldukça düşük) serumun dağılabildiği polisakkarit antijen içeren hipertonic jel sisteminde, ters dairesel immunodifüzyon (RID) (Reverse Radial İmmunodiffusion) sistemi ile elde edilebilir. Ayrıca çift jel difüzyon (double gel diffusion) testi de aynı amaçla kullanılabilir. Doğal Haptten testi ile aşı infeksiyonunun olmadığı durumlarda sero-negatiflik, 3-5 aylık genç sığırların derialtı aşılamasından 2 ay sonra, azaltılmış dozlar ile subkutan ergin aşılamasından 4-5 ay sonra tespit edilebilir. Özellikle konjuktival yol ile aşılamanın genç ve ergin sığırlarda, sero-negatiflik aşılamaadan çok daha kısa bir zaman sonrasında tespit edilebilir. Bu testte elde edilen pozitif sonuçların *Brucella* türlerinin saçılımıyla bağlantılı olduğu, deneysel ve gerçek infeksiyon durumlarında gösterilmiştir (Jones ve ark. 1980). Ayrıca diğer testlerde karşılaşılan *Yersinia enterocolitica* O:9 ve sebebi bilinmeyen çok sayıda yalancı pozitif serolojik reaksiyon (FPSR), doğal haptten yada *Brucella* sitosol proteinleri kullanılarak uygulanan jel presipitasyon testlerinde negatif olarak sonuçlanmaktadır (Munoz ve ark. 2005). Bu doğal haptten testleri, yukarıda anlatıldığı gibi koyun ve keçiler için de infeksiyona bağlı veya bağlı olmayan serolojik yanıtların ayırımında oldukça spesifiktir. Koyun ve keçiler için optimal tanı sensitivitesi (%90 civarı) çift jel difüzyonu veya RID testleri ile elde edilebilir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Süt testleri, süt toplama tankından yapılarak etkili bir izleme sağlanabilir. Pozitiflik halinde, tanka süt veren tüm sığırlara kan testleri yapılmalıdır. Sütten indirekt ELISA (Milk i-ELISA), özellikle büyük sürülerin izlenmesinde kullanılan hassas ve spesifik bir testtir (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Süt indirekt ELISA, koyunlarda *Brucella ovis*

infeksiyonlarının tanısında da oldukça başarılı olarak kullanılmaktadır. Hatta bu amaçla üretim açısından avantajları olan *B. canis* suşlarından (M-) hazırlanan antijenler ile en az *B. ovis* suşlarından hazırlananlar kadar tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir (Lopez ve ark. 2006). Süt Halka Testi (MRT) (Milk Ring Test) ise sığır sürülerinde süt i-ELISA'nın yapılamadığı durumlarda alternatif olarak kullanılabilir. Bu test için süt toplama kazanına aktarılan sütler 150'den az hayvandan geliyorsa, süt kazanından 1ml, 150-450 arası hayvandan geliyorsa 2ml ve 451-700 arası hayvandan geliyorsa kazandan 3ml süt örneği alınarak test edilmelidir. MRT, koyun ve keçi sütleri için çok kullanışlı değildir (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

2.7.2.2. Hücresel Bağışıklık Testleri

Brusellin (Brucellin) deri testi, aşılanmamış sürülerde izleme testi olarak kullanılabilir. Oldukça yüksek spesifiteye sahip bu test ile serolojik olarak negatif aşılanmamış hayvanlar içinde reaktörler tespit edilebilir (Pouillot ve ark. 1997). Ayrıca test, koyun ve keçilerde *B. melitensis* infeksiyonları için de yüksek sensitiviteye sahiptir. Aşılanmamış sürülerde en spesifik test olarak değerlendirilmektedir. Ruminantlar için geliştirilen test, domuzlar için de oldukça etkin olarak kullanılmaktadır. Farklı bakterilerden kaynaklanan çoğu FPSR, bu test ile negatif bulunabilir (Pouillot ve ark. 1997; Dieste-Perez ve ark. 2014). *Brucella abortus* S19, *B. melitensis* Rev1 ve *B. abortus* RB51 aşılarının kullanıldığı durumlarda ise bu test ile yıllarca pozitiflik alınabilir (Pouillot ve ark. 1997). Ayrıca bu testin bireysel hastalık araştırmalarında ve aşı uygulanan ülkelerden ticari hayvan alımlarında kontrol testi olarak kullanılması tavsiye edilmemektedir. Test, hastalığın olmadığı alanlarda sürü sürveylansı için tavsiye edilir. Testin spesifitesi ne kadar yüksek olursa olsun, bulunan pozitiflikler tamamlayıcı ilave tanı testleri ile desteklenmelidir. Aynı hayvana iki kere test uygulaması gerektiğinde, ilk testin hücresel immun yanıtta geçici yorgunluğa sebep olabileceği düşünülerek uygulanacak ikinci test, en az 6 hafta sonraya planlanmalıdır (OIE Böl. 2.1.4. 2016).

İnterferon gama salınım testi (interferon gamma release assay), brusellin gibi uygun bir antijenle, tam kanda mevcut lenfositlerin uyarılması temeline dayanır. Gama interferon üretimi, capture ELISA ile tespit edilir. Bu test, gerçek hastalık olguları ile FPSR'lerin ayırımında faydalı olsa da daha spesifik antijenlerin olmayışı ve test protokolünün standardizasyona ve değişik hayvan türlerinde ve epidemiyolojik şartlarda

validasyona ihtiyaç duyması sebepleri ile rutin kullanımı çok sınırlıdır (OIE Böl. 2.1.4. 2016). Weynants ve ark. (1995), çalışmalarında *B. melitensis* B115 suşundan elde ettikleri stoplazmik protein karışımını, spesifik stümülant antijen olarak şüpheli sığırtam kanları ile muamele etmişler ve ortaya çıkan gama interferon içeriğini, sandvic ELISA ile tespit ederek oluşan antijenik uyarımı ölçmüşlerdir. Sonuçları aynı hayvanlara uyguladıkları diğer klasik bruselloz test sonuçları ile uyumlu bulduklarını hatta serolojik yalancı pozitif reaksiyon gösteren hiç bir hayvanda, pozitiflik tespit etmediklerini bildirerek, bu testi serolojik tanımlar için ideal tamamlayıcı alternatif test olarak değerlendirmişlerdir.

2.8. KORUMA VE KONTROL

Hastalığın doğasından kaynaklanan birçok yönü, bruselloz ile mücadelede kontrol ve eradikasyonu engelleyici etkiler yapmaktadır. Bunlardan en önemlileri değişken inkubasyon süreleri ve daha sonra seropozitif olabilecek hayvanların tanımlanamamasıdır. İnfekte sürülerde sığırtamların yaklaşık %15'i seropozitiflikten önce abort yapabilirler. Bir ilave problem de gizliliklerdir. İnfekte annelerden doğan yavruların yaklaşık %5'i enfeksiyonu devam ettirecek ve sadece ilk doğumlarından sonra seropozitif olacaklardır. Koyun ve keçiler arasındaki gizli reaktörlerin oranı ise bilinmemektedir (Nicoletti 2010).

Birçok gelişmiş ülkede, bruselloz eradike edilmiş olsa da, dünyanın bazı bölgelerinde büyük bir halk ve hayvan sağlığı problemi olarak önemini devam ettirmektedir. Türkiye'de hastalığın endemik olarak devam etmesi; hayvan sürülerinin kontrol dışı hareketi, jeopolitik durum, çevre ülkelerde brusellozun endemik durumda olması ve buralarda politik durumun değişken olması, Türkiye'deki sınırlı veteriner hizmetleri ve hayvancılık uygulamaları, geleneksel olarak çiğ süt ve ürünlerinin tüketilmesi ve infekte hayvanlarla yakın temasın sürdürülüyor olması ile açıklanabilir (Yumuk ve O' Callaghan 2012).

Domuzları ve vahşi yaşam hayvanlarını bruselloza karşı korumak için kullanıma uygun bir aşı hünüz bulunmamıştır. Ayrıca insanlar için de hastalıktan korunmak için aşı uygulaması yapılamamaktadır. İnsanlar arasında brusellozun doğal bulaş kaynağı olarak neredeyse her zaman bir hayvan rezervuar tespit edilmektedir. Çok sınırlı sayıda vaka için hastalık kaynağı insandan insana bulaş olarak rapor edilmiştir (Godfroid ve ark. 2011).

Bruselloz ile mücadelede geçmişten günümüze çok değişik aşı suşları değişik yöntemler ile hazırlanıp kullanılmış olsa da, hali hazırda en çok tercih edilen ve kullanılan suşlar canlı, atenué suşlardır. Bunlardan *B. abortus* S19 aşı suşu, tüm dünyada sığır brusellozundan korunmak için kullanılan en yaygın aşı suşudur. İlk olarak 1923 yılında Jersey ırkı bir ineğin sütünden izole edilerek 1930 yılında tanımlanmıştır. Oda ısısında bir yıldan uzunca bir süre bekletilen suş, atenué olmuş halde bulunmuştur. *B. melitensis* Rev1 aşı suşu, *B. melitensis*'in gelişebilmesi için streptomisine bağımlı virulent bir suşundan meydana getirilmiştir. Bu virulent suş, aşı suşuna dönüştürülürken alt pasajları neticesinde çoğu karakteristik özelliğini kaybetse de streptomisine direncini ve bir miktar da virulent yapısını devam ettirmektedir. Suş, koyun ve keçi sürülerini *B. melitensis* infeksiyonlarına karşı korurken, koyun sürülerinde *B. ovis* infeksiyonundan da dişi ve erkek hayvanları korur. Ayrıca bazı yayınlarda sığır sürülerine uygulandığında, hayvanları bruselloza karşı *B. abortus* S19 aşı suşuna göre daha iyi koruduğu da belirtilmiştir (Schurig ve ark. 2002). Blasco (2006), *B. melitensis* Rev1 aşı suşu ile hazırlanmış konjunktival aşılar ile immunizasyonun, hayvanları *B. melitensis* infeksiyonlarından korumada uygulanabilecek en iyi metod olduğunu vurgulamıştır. *B. abortus* RB51 aşı suşu ise son zamanlarda geliştirilmiş, *B. abortus* 2308 suşunun rough karakterde rifampisin dirençli mutant bir türevidir. Aşı suşunun rough karakterde olması, bu suş kullanılarak yapılan aşılama sonrası oluşabilecek seropozitifliğin, rutinde kullanılan smooth antijenler ile tespit edilmesini engellediği bildirilmiştir (Schurig ve ark. 2002). Bu aşı küçükbaş hayvanlarda *B. melitensis* infeksiyonlarına karşı etkin bir koruma sağlayamamaktadır. Koruyuculuğu *B. melitensis* Rev1 aşı suşu ile kıyas edilemeyecek kadar azdır (El Idrissi ve ark. 2001).

Ülkemizde 1984 yılında “Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesi” başlatılmış ve sadece genç hayvanlara aşı uygulanarak projenin 26 yıl sürdürülmesi planlanmıştır. 1989, 1990 ve 1991 yıllarında yapılan seroprevalans çalışmaları doğrultusunda ve 1991-1993 yılları arasında Trakyada uygulanan azaltılmış dozlar ile ergin hayvanların aşılama plot çalışmaları sonucunda, azaltılmış dozlar ile ergin hayvan aşılması tüm ülkede projeye dahil edilmiştir. 1998 yılında yapılan seroprevalans çalışmasına göre bruselloz fert prevalansı sığırlarda %1,43, koyunlarda ise %1,97, sürü prevalansı ise sığırlarda %11,4 ve koyunlarda %15 olarak belirlenmiştir (İyisan ve ark. 2000). Ulusal Brusella Kontrol ve Eradikasyon Projesinin ardından 2011 yılında hastalığın yaygınlığını belirlemek amacı ile yapılan seroprevalans çalışması

sonucunda ise sığırlarda bruselloz sürü prevalansı %7,8 ve fert prevalansı %2,7, koyunlarda sürü prevalansı %22,5 ve fert prevalansı %3,4 olarak tespit edilmiştir (GKGM 2012). Proje sonunda, bulunan yüksek seroprevelans değerlerinin, çeşitli nedenlere bağlı olarak aşılarda hayvanlara yeterince uygulanamaması olarak düşünülmektedir (İyisan ve ark. 2000). Brusellozun eradikasyonunu sağlamış ülkelerin mücadele stratejileri incelendiğinde, sürü prevalanslarının %1 ve daha az olduğu durumlarda test ve kesim metodu ile eradikasyon programlarının uygulandığı, sürü prevalansının daha yüksek olduğu durumlarda ise aşılama ve diğer tedbirler ile prevalansın önce %1'in altına çekildiği ve daha sonra test ve kesim yöntemi ile nihayi hedeflere ulaşıldığı görülmektedir. 2011 yılında elde edilen seroprevalans verilerinin Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı uzmanları tarafından değerlendirilmesi neticesinde, ülkemizde bruselloz ile mücadelede kitle aşılması yapılmasının en etkili yöntem olacağı ve bu aşılamanın da her yaştaki hayvana güvenilir olarak uygulanabilecek konjunktival yol ile yapılması kararlaştırılmıştır. Bu kapsamda sığırlar için 10 yıl, koyun ve keçiler için 6 yıl sürdürülecek “Brusellanın Konjunktival Aşı ile Kontrolü ve Eradikasyonu” projesi 01 Ocak 2012 tarihinden itibaren başlatılmış ve hali hazırda yürütülmektedir (GKGM 2012). Hastalığın durumu ve aşılamanın etkinliğini araştırmak için yapılan ilk incelemelerde, özellikle keçilerde gebeliğin ilk dönemlerinde yapılan aşılamalarda aşının yüksek oranlarda atıklara sebebiyet verdiği görülmüştür. Aşılamanın başladığı tarihten itibaren hayvanlar için yeni mihrak sayıları incelendiğinde ise; büyükbaş hayvanlar için, 2012 yılında 1696 olan yeni mihrak sayısı, 2013'te 1319, 2014'te 596 ve 2015 yılında ise 315 olarak, küçükbaş hayvanlar için; 2012 yılında 222 olan yeni mihrak sayısının, 2013'te 512 (aşı atıkları ile beraber), 2014'te 75 ve 2015 yılında ise 73 olduğu görülmüştür. İnsanlar için yeni mihrak sayıları incelendiğinde ise 2012 yılında 6759 olan vakka sayısı, 2013 yılında 7225, 2014 yılında 4403 ve 2015 yılında ise 4173 olarak kayıtlara geçmiştir. İlk incelemeler dikkate alındığında, aşılama oranlarındaki artışın, hastalık prevalansının düşmesini direkt olarak etkilediği ve mücadeleye ara vermeden kararlılıkla devam edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır (OIE Hastalık Raporu 2015; Saytekin ve ark. 2015).

Ülkemizde yürütülen immunizasyon çalışmalarında, ilgili uluslararası örgütlerin de tavsiye ettiği gibi, sığırlarda bruselloza karşı *B. abortus* S-19 aşı suşu, 1960 yılından günümüze kadar ve koyun ve keçilerde ise *B. melitensis* Rev-1 aşı suşu (Elberg ve

Faunce 1957), 1968 yılından günümüze kadar hastalıkla mücadele için kullanılmaktadır (İyisan ve ark. 2000; GKGM 2012).

01 Ocak 2012 yılından itibaren derialtı aşı formu yerine kitlesel aşılama için uygun olan konjunktival aşı formu ile mücadeleye devam edilmektedir (GKGM 2012). Konjunktival *B. melitensis* Rev-1 aşısı, her dozunda $0,5 - 2 \times 10^9$ CFU (Colony Forming Unit), Konjunktival *B. abortus* S-19 aşısı ise her dozunda $5 - 10 \times 10^9$ CFU miktarında bakteri içerecek şekilde üretilir ve uygulanır. Göz konjunktivasına damlatılarak uygulanan bu aşılar, üretimi yapan firmaların üretim ruhsatlarında beyan ettikleri ambalaj ve uygulama şekilleri ile ürünlerini kullanıma sunmaktadır. Minas ve ark. (2006), brusellozun yaygın olduğu, prevalansın yüksek olduğu ve göçer hayvancılığın yapıldığı ülkelerde, hastalığın eradikasyonu için ilk basamak olarak hastalığın aşılama ile kontrolünü, bunun içinde *B. melitensis* Rev1 aşı suşu ile hazırlanmış aşılamanın konjunktival yol ile kitlesel aşılama yapılarak uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Fensterbank ve ark. (1987), çalışmalarında dozunda 1×10^9 CFU *Brucella melitensis* Rev1 bakterisi içeren ve genç hayvanlara konjunktival yolla uygulanan bruselloz aşısının, subkutan yol ile uygulanan aşı ile hemen hemen aynı korumayı sağlandığını, hatta olumlu olarak aşılama ile ilgili seropozitifliğin aşılama sonrası 4 ay sonra kaybolduğunu ve hastalıkla mücadele stratejilerinde koyun ve keçi brusellozunun kontrol ve eradikasyonu çalışmalarında tek doz olarak konjunktival aşı formunun kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Zundel ve ark. (1992), çalışmalarında koyun ve keçilere konjunktival yol ile uygulanan *B. melitensis* Rev1 aşısının, subkutan tam doz uygulamalarına göre gebelikte daha az riskli ve bazı istisnalar dışında aşılama ile ilgili serolojik yanıtların çok daha kısa sürdüğünü, hatta dozunda 1×10^8 CFU canlı bakteri içeren konjunktival aşı uygulamasının, gebelik ve seropozitiflik açısından (%20 abort ve 3 ay süreli seropozitiflik) diğer uygulamalara oranla en güvenli olduğunu bildirmişlerdir.

Brusellozun eradikasyon programları gereği yapılan aşılama sonucunda hayvanlarda aglütinojen antikorlar oluşmakta ve aşı ile hayvanlar ile enfekte hayvanların serolojik ayrımı noktasında güçlükler yaşanmaktadır. Bu ayrımı yapabileceğimiz bir test bugün için mevcut değildir. Ancak IgG1 izotipi doğal olarak enfekte olan hayvanlarda, aşılananlara oranla daha uzun süre kaldığı için bu izotipi saptayan testlerin daha güvenilir olduğu kabul edilir. Bu izotip kanda en dominant olarak ve en uzun süreli olarak kalır. Ayrıca immun cevabın en erken dönemlerinde saptanabilir. Bu sebeple

IgG1 izotipini saptayabilen Rose Bengal Plate (RBT) ve Komplement Fiksasyon (CFT) testleri gerek bireysel ve gerekse sürü bazında taramalar için tavsiye edilen testlerdir. Tüp Aglütinasyon testinin (TAT) ise, IgG1'leri saptayamaması, non spesifik antikorları saptaması, hastalığın erken ve geç dönemlerinde tanısal seviyeye ulaşamaması nedenleri ile hayvanlar için tanıda pek güvenilir bir test olarak kabul edilmemektedir (İyisan ve ark. 2000).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İnceleme Örnekleri

Brusellozun tanı yöntemlerini karşılaştırmak amacıyla, Eylül 2014 – Haziran 2016 yılları arasında çeşitli il ve merkezlerden Veteriner Kontrol Enstitüleri'ne gönderilen 166 ruminant (114 koyun, 28 keçi, 23 sığır, 1 manda) atığına ait akciğer, karaciğer ve fetüs mide sıvıları inceleme örneği olarak kullanıldı. Gönderilen 166 atığın 114'ünde akciğer ve karaciğer örneği, 23'ünde akciğer, karaciğer, fetüs mide sıvısı ve 29'unda sadece fetüs mide sıvısı bulunmaktaydı. Toplamda 166 atığa ait 326 örnek incelendi. İncelemeler atık ve organ düzeyinde değerlendirildi.

3.1.2. İzolasyon Besiyerleri

3.1.2.1. Serum Dekstroz Agar (SDA)

Serum Dekstroz Agar, *Brucella* spp. izolasyonu ve identifikasyonunda genel besiyeri, ayrıca antibiyotikli ve boyalı besiyerlerinde temel besiyeri olarak kullanıldı. Triptik Soy Agar (TSA) (Biolife, BH1813), verilen bilgiye göre hazırlanıp 121 °C de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra 56 °C'ye soğutuldu. Uygun sıcaklığa getirilen besiyerine filtre (Sartorius stedim minisart 0,2µm, 16534) ile steril edilmiş %20 dekstroz (LabM, MC013) çözeltisi, son karışımda %1 dekstroz olacak şekilde ve inaktive edilmiş buzağı serumu (Biochrome, S0115) son karışımda %5 olacak şekilde eklendi. İzolasyon ve identifikasyonda kullanmak için 90 mm çaplı plastik petri kutularına ve yatık agar oluşturmak için tüplere dökülerek etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.2.2. Farrell's Besiyeri

Farrell's selektif besiyeri, SDA'ya *Brucella* selektif supplement (Oxoid, SR0083A) ilave edilerek hazırlandı. Bu amaçla; 5 ml metanol (Riedel de Haen, 24229) ve 5 ml steril distile su, hazır supplement flakonuna eklendi. Hazırlanan süspansiyon karıştırıldıktan sonra 10-15 dakika 37 °C sıcaklıkta bekletildi. Tekrar karıştırıldıktan sonra 500 ml ve 56 °C'ye soğutulmuş SDA besiyerine ilave edildi. İzolasyon ve identifikasyonda kullanmak için 90 mm çaplı plastik petri kutularına dökülerek

etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı (Farrell 1974; Alton ve ark. 1988; Marin ve ark. 1996; De Miguel ve ark. 2011; OIE Böl. 2.4.3. 2015; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

3.1.2.3. Cita Besiyeri

Cita besiyeri için, distile su ile hazırlanan 500 ml'lik TSA (Biolife, BH1813) kullanıldı. Otoklavlandıktan ve 56 °C'ye soğutulduktan sonra, son karışımda %5 serum olacak şekilde inaktive edilmiş buzağı serumu ilave edildi. Daha sonra; vancomycin 10 mg (Sigma, V2002), colistin 3,75 mg (Sigma, C1511), nystatin 8,85 mg (Sigma, N3503), nitrofurantoin 5 mg (Sigma, N7878) ve amphotericin-B 2 mg (Sigma, A4884) miktarlarında eklendi (Miguel ve ark. 2011). 90 mm çaplı plastik petri kutularına dökülerek, etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı (De Miguel ve ark. 2011; Vicente ve ark. 2014; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

3.1.3. İdentifikasyon Besiyerleri

İzole edilen suşların biyotiplendirilmesi amacıyla kullanıldı.

3.1.3.1. Penisilin Besiyeri

Penisilin besiyeri, aşı suşları ile saha suşlarının ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için, ilk olarak penisilin stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için penisilin G potasyum tuzunun (Fluca, 13750) distile su ile %0,3'lük solüsyonu, filtre (Sartorius stedim minisart 0,2µm, 16534) ile steril edilerek kriyoviyal tüplere dağıtıldı. Stok solüsyonlar, kullanıma kadar -20 °C'de saklandı. Besiyeri için, otoklav sonrası 56 °C'ye soğutulan 500 ml SDA'ya, 0,5 ml penisilin stok solüsyonu (son karışım 5 İ.Ü/ml) ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra, 90 mm çaplı plastik petri kutularına döküldü ve etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. abortus* S-19 (biyotip1) negatif, *B. abortus* 544 (biyotip1) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.3.2. Streptomisin Besiyeri

Streptomisin besiyeri, *B.melitensis* Rev-1 aşı suşu ile *B.melitensis* saha suşlarının ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için ilk olarak streptomisin stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için Streptomisin sülfat'ın (Sigma, S-6501) distile su ile %0,3'lük solüsyonu, filtre (Sartorius stedim minisart 0,2µm, 16534) ile steril edilerek kriyoviyal tüplere dağıtıldı. Stok solüsyonlar, kullanıma kadar -20 °C'de saklandı. Besiyeri için, otoklav sonrası 56 °C'ye soğutulan 500 ml SDA'ya, 0,4 ml streptomisin stok solüsyonu

(son karışım 2,5 µg/ml) ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra 90 mm çaplı plastik petri kutularına döküldü ve etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. melitensis* 16M (biyotip1) negatif, *B. melitensis* Rev-1 (biyotip1) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.3.3. Eritritol Besiyeri

Eritritol besiyeri, *B.abortus* S-19 aşısı suşu ile *B.abortus* saha suşlarının ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için öncelikle eritritol stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için mezo-eritritol'den (Sigma, E7500) distile su ile %10'lük solüsyonu, filtre (Sartorius stedim minisart 0,2µm, 16534) ile steril edilerek kriyoviyal tüplere dağıtıldı. Stok solüsyonlar, kullanımına kadar -20 °C'de saklandı. Besiyeri için, otoklav sonrası 56 °C ye soğutulan 500 ml SDA'ya, 5 ml eritritol stok solüsyonu (son karışım 1mg/ml) ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 90 mm çaplı plastik petri kutularına döküldü ve etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. abortus* S-19 (biyotip1) negatif, *B. abortus* 544 (biyotip1) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.3.4. Tiyonin Besiyeri

Tiyonin besiyeri, aşısı suşlarının saha suşlarından ayrımı ile *B. abortus* biyotiplerinin ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için ilk önce tiyonin (Sigma, T3387) boyasına distile su ilave edilerek %0,1'lik tiyonin stok solüsyonu hazırlandı. Stok boya solüsyonu, 100 °C sıcaklıkta 1 saat tutularak steril edildi. Otoklav ile steril edilmiş 500 ml SDA'ya, hazırlanan tiyonin stok boya solüsyonundan 10 ml ilave edilerek, 1/50,000 oranında (20 µg/ml) tiyonin boya içeren besiyerleri hazırlandı. 90 mm çaplı steril plastik petri kutularına dökülerek etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. abortus* 86/8/59 (biyotip2) negatif, *B. abortus* Tulya (biyotip3) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.3.5. Bazik Fuksin Besiyeri

Bazik fuksin besiyeri, *B. melitensis* Rev1 aşısı suşunun saha suşlarından ayrımı ile *B. abortus* biyotiplerinin ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için ilk önce bazik fuksin boyasına (Merck, 115937) distile su ilave edilerek %0,1'lik bazik fuksin stok solüsyonu

hazırlandı. Stok boya solüsyonu, 100 °C sıcaklıkta 1 saat tutularak steril edildi. Otoklav ile steril edilmiş 500 ml SDA'ya, hazırlanan bazik fuksin stok boya solüsyonundan 10 ml ilave edilerek, 1/50,000 oranında (20 µg/ml) bazik fuksin boya içeren besiyerleri hazırlandı. 90 mm çaplı steril plastik petri kutularına dökülerek etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. abortus* 86/8/59 (biyotip2) negatif, *B. melitensis* 16M (biyotip1) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.3.6. Safranin Besiyeri

Safranin besiyeri *B. suis*'in diğer türlerden ayrımı için kullanıldı. Besiyeri için, öncelikle safranin boyasına (Sigma, S2255) distile su ilave edilerek %0,5'lik safranin stok solüsyonu hazırlandı. Stok boya solüsyonu, 100 °C sıcaklıkta 1 saat tutularak steril edildi. Otoklav ile steril edilmiş 500 ml SDA'ya, hazırlanan safranin stok boya solüsyonundan 10 ml ilave edilerek, 1/10,000 konsantrasyonda (100 µg/ml) safranin boya içeren besiyeri hazırlandı. 90 mm çaplı steril plastik petri kutularına dökülerek etiketlendikten sonra +4 °C'ye kaldırıldı. Referans suşlardan *B. suis* 1330 (biyotip1) negatif, *B. melitensis* 16M (biyotip1) pozitif kontrol olarak kullanıldı ve her parti üretim için kalite kontrolü yapıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.4. Diğer Besiyerleri

3.1.4.1. Christensen Besiyeri

Christensen besiyeri, üreaz aktivitesinin ölçülmesi amacı ile kullanıldı. 0,5 gr pepton (LabM, MC008), 2,5 gr NaCl (Merck, 106400), 1 gr Monopotasyum fosfat (KH_2PO_4) (Merck, 104873), 0,006 gr fenol red (Merck, 107241), 0,5 gr dekstroz (Lab-M, MC013) ve 20 gr agar (BD, 214010), 500 ml distile su ile tamamlanıp karıştırıldıktan sonra, 5 ml miktarında test tüplerine dağıtıldı ve 121 °C'de 20 dakika otoklav ile steril edildi. 45 °C sıcaklığa soğuduktan sonra test tüplerinin herbirine son konsantrasyonu %2 olacak şekilde filtre ile steril edilmiş %20'lik 0,5 ml üre solüsyonu (Merck, 108487) ilave edildi. Meyilli bir yerde soğutulduktan sonra etiketlenerek kullanım zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edildi (Alton ve ark. 1988). Her parti üretim için *B. ovis* 63/290 suşu negatif kontrol ve *B. melitensis* Ether suşu (biyotip 3) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.1.4.2. %15 Gliserinli Triptik Soy Broth

%15 Gliserin (Merck, 104092) ilaveli triptik soy brot (Merck, 105459) izolasyonu ve identifikasyonu yapılan *Brucella* spp.'leri, uzun süreli olarak -20 °C'de saklamak için kullanıldı (Alton ve ark. 1988). Triptik soy broth, distile su ve %15 Gliserin ilavesi ile hazırlandıktan sonra 121 °C'de 20 dakika otoklav ile steril edildi ve steril kriyoviyal tüplere 1 ml dağıtılarak kullanım zamanına kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

3.1.5. Morfolojik, Serolojik, Biyokimyasal ve Faj Test Gereçleri

3.1.5.1. Bakteri Saflığı ve Morfolojisinin Belirlenmesi

Şüpheli bakteri kültüründen Gram boyama için hazır boyama seti kullanıldı (Merck, 111885).

3.1.5.2. Antiserumlar

Brucella Poliklonal A-M Antiserumu (2008-1; PVKE) ile *Brucella* Monospesifik A ve M Antiserumları (2010-1; PVKE), steril distile suyla sulandırılarak kullanıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.5.3. Biyokimyasal Test Gereçleri

Katalaz testi için %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) (Merck, 108597), oksidaz testi için oksidaz identifikasyon stikleri (Merck, 113300) kullanıldı. Hidrojen Sülfür (H₂S) üretiminin tespiti amacı ile SDA yatık agar tüplerinde Kurşun Asetat emdirilmiş hazır kağıtlar (Riedel-de Haen, 37104) kullanıldı. Üremede CO₂ ihtiyacının belirlenmesi için ilave CO₂ gazı içermeyen etüv kullanıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.5.4. Fajlar

Faj testleri için, Tibilisi (FTb-01-07; PVKE), İzatnagar (FIz-05-07; PVKE) ve R/C (FR/C-08-07; PVKE) fajları, steril distile su ile sulandırılarak kullanıldı (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.1.6. Standart Suşlar

B. abortus biyotip1, 2 ve 3 için referans olan sırasıyla; *B. abortus* 544 (ATCC 23448), *B. abortus* 86/8/59 (ATCC 23449) ve *B. abortus* Tulya (ATCC 23450) suşları, *B. melitensis* biyotip1, 2 ve 3 için referans olan sırasıyla; *B. melitensis* 16M (ATCC 23456), *B. melitensis* 63/9 (ATCC 23457) ve *B. melitensis* Ether (ATCC 23458) suşları,

B. suis biyotip1 için referans olan *B. suis* l330 (ATCC 23444) suşu, *B. ovis* için referans suş olan *B. ovis* 63/290 (ATCC 25840) suşu ile *B. abortus* S-19 (ATS-PVKA-13-04) ve *B. melitensis* Rev-1 (ATS-PVKE-08-04) aşı suşu, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Brusella Referans ve Aşı Üretim Laboratuvarının suş koleksiyonundan temin edildi. Referans suşlar, bakteriyel identifikasyon ve biyotiplendirmede test kontrol olarak, besiyerlerinin kontrol edilmesinde pozitif ve negatif kontrol suşları olarak, moleküler tanıda DNA'ları izole edilerek pozitif kontrol olarak ve moleküler minimum tespit limiti belirlemek amacı ile referans suş olarak kullanıldı (Alton ve ark. 1988).

3.1.7. Moleküler Yöntem Gereçleri

3.1.7.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu Gereçleri

DNaz / RNaz'dan arındırılmış ve kapaklı 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Axygen), kriyovial tüpleri (Axygen), vorteks (Ika ve WiseMix), mikrosantrifüj (Hettich) ve spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop1000) kullanıldı.

3.1.7.2. İnceleme Örneği için DNA Ekstraksiyon Kitleri

Direkt inceleme örneklerinden (akciğer, karaciğer ve fetüs mide sıvısından) DNA ekstraksiyonu için DNeasy Blood & Tissue Ekstraksiyon Kiti (69506, Qiagen, Almanya) kullanıldı. Elde edilen DNA kontrolü, Purelink Genomik DNA Mini Ekstraksiyon Kiti (K1820-01, Invitrogen, ABD) ile yapıldı. Kit içerikleri aşağıda listelenmiştir.

DNeasy Blood & Tissue Ekstraksiyon Kiti; Proteinaz K, ATL Solüsyonu (Doku Eritme Tampon Solüsyonu), AL Solüsyonu (Eritme Tampon Solüsyonu), AW1 Solüsyonu (Yıkama Tampon Solüsyonu 1), AW2 Solüsyonu (Yıkama Tampon Solüsyonu 2), AE Solüsyonu (Ayırma Tampon Solüsyonu), Spin Kolon Tüpleri ve Toplama Tüplerini içerir.

Purelink Genomik DNA Mini Ekstraksiyon Kiti; Proteinaz K, Eritme/Yapıştırma Tampon Solüsyonu, Parçalama Tampon Solüsyonu, Yıkama Tampon Solüsyonu 1 ve 2, Ayırma Tampon Solüsyonu, Spin Kolon Tüpleri ve Toplama Tüplerini içerir.

3.1.7.3. Tür Spesifik Multipleks DNA Amplifikasyonu (m-PCR) Gereçleri

Organlardan kit ile ve izolatların kültürlerinden kaynatma ile elde edilen DNA'lara uygulandı.

Amplifikasyonda gerekli optimal ortam için;

1-Enzim, dNTP, MgCl₂, gerekli tampon solüsyonlar ve su içeren hazır multipleks PCR kiti (Qiagen, 206143) kullanıldı (Mayer-Scholl ve ark. 2010). Ayrıca direkt inceleme örneklerinden elde edilen DNA'ların çoğaltılması için DMSO (Dimetilsülfoksit) (Merck, 802912) ve hazır kit içeriğinde mevcut Q solüsyonu ilave edildi.

2-*Brucella* türlerinin (*B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.canis*, *B.ovis*, *B.neotomae*, *B.inopinata*, *B.pinnipedialis* ve *B.ceti*) ve aşı suşlarının (*B.abortus* S-19, *B.melitensis* Rev-1 ve *B.abortus* RB51) ayrımını tek basamakta yapabilen, *Brucella* cinsindeki bakterilerin farklı gen bölgelerinden büyüklüğü 152 ile 2524 bp arasında değişen parçaları amplifiye eden 8 çift tür spesifik primere (Garcia-Yoldi ve ark. 2006; Lopez-Goni ve ark. 2008; OIE Böl. 2.4.3. 2015), *B.microti* primerleri de eklenerek 9 çift primer kullanıldı (Tablo 3.1).

Primer karışımı;

Primerler, liyofilize pelet olarak İngiltere Hayvan ve Bitki Sağlığı Ajansı (APHA) aracılığı ile Sigma-Aldrich firmasına sentezlettiler. 100 µM konsantrasyonda (100 pmol/µl) olacak şekilde steril ve DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR suyu ile sulandırılarak stok konsantrasyonlar hazırlandı. Primer stok konsantrasyonlarından gerekli miktarlar alınarak her bir primer için son konsantrasyonu 2 µM (2 pmol/µl) olacak şekilde son primer karışımı oluşturuldu ve PCR'lerde kullanıldı.

Tablo 3-1: Hedef türlerin saptanmasında tür spesifik multipleks PCR primerleri*

Sıra No	Hedef Türler	Primer Adı	Primer dizilimi (5' - 3')	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
1	1-3, 5-13	BMEI0998f BMEI0997r	ATC-CTA-TTG-CCC-CGA-TAA-GG GCT-TCG-CAT-TTT-CAC-TGT-AGC	1682 ¹	A
2	1-13	BMEI0535f BMEI0536r	GCG-CAT-TCT-TCG-GTT-ATG-AA CGC-AGG-CGA-AAA-CAG-CTA-TAA	450 ²	A
3	2- 10 ve 13	BMEII0843f BMEII0844r	TTT-ACA-CAG-GCA-ATC-CAG-CA GCG-TCC-AGT-TGT-TGT-TGA-TG	1071	A
4	1- 4, 6- 13	BMEI1436f BMEI1435r	ACG-CAG-ACG-ACC-TTC-GGT-AT TTT-ATC-CAT-CGC-CCT-GTC-AC	794	A
5	1-10, 12-13	BMEII0428f BMEII0428r	GCC-GCT-ATT-ATG-TGG-ACT-GG AAT-GAC-TTC-ACG-GTC-GTT-CG	587	A
6	3 ve 5-8	BR0953f BR0953r	GGA-ACA-CTA-CGC-CAC-CTT-GT GAT-GGA-GCA-AAC-GCT-GAA-G	272	A
7	13	BMEI0752f BMEI0752r	CAG-GCA-AAC-CCT-CAG-AAG-C GAT-GTG-GTA-ACG-CAC-ACC-AA	218	A
8	1-5, 7-13	BMEII0987f BMEII0987r	CGC-AGA-CAG-TGA-CCA-TCA-AA GTA-TTC-AGC-CCC-CGT-TAC-CT	152	A
9	8	Bmispec_f Bmispec_r	AGA-TAC-TGG-AAC-ATA-GCC-CG ATA-CTC-AGG-CAG-GAT-ACC-GC	510	B

1- *Brucella abortus* 2- *Brucella melitensis* 3- *Brucella suis* 4- *Brucella ovis* 5- *Brucella canis* 6- *Brucella neotomae* 7- *Brucella inopinata* 8- *Brucella microti* 9- *Brucella pinnipedialis* 10- *Brucella ceti* 11- *Brucella abortus* S-19 12- *Brucella abortus* RB51 13- *Brucella melitensis* Rev-1

¹B. *abortus* RB-51 için amplikon büyüklüğü 2524 bp dir.

²Deniz memelileri izolatu *Brucella* suşları için amplikon büyüklüğü 1320 bp dir.

*Örnek olarak, *B. abortus* saha suşları için 1, 2, 4, 5 ve 8 no'lu primer çiftlerinin oluşturduğu farklı ağırlıklardaki bantlar birlikte izlenmelidir.

A- (Lopez-Goni ve ark. 2008; OIE Böl. 2.4.3. 2015)

B- (Scholz ve ark. 2008a; 2008b; Mayer-Scholl ve ark. 2010)

3.1.7.4. Cins Spesifik Bcsp31 DNA Amplifikasyonu (Bcsp31 PCR) Gereçleri

Amplifikasyonda gerekli optimal ortam için;

1-FastStart Taq DNA Polimeraz enzimi (Roche, 120329370001), 10 x PCR Solüsyonu + MgCl₂ (Roche, 120329370001), 4 adet dNTP (Jena Bioscience, 1001S,1002S,1003S,1004S), DMSO, steril ve DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR suyu (DEPC- Treated Water) (Ambion, AM9906) kullanıldı.

2-Primer olarak; 31 kDa'luk saf olarak elde edilebilen *Brucella* hücre yüzeyi proteinini (BCSP) (*Brucella* cell surface salt extractable protein) kodlayan gen bölgesinden büyüklüğü 223 bp olan parçayı çoğaltan B4 (Forward) ve B5 (Reverse) primerleri (Sigma, 466) kullanıldı (Tablo 3.2).

Primer ve dNTP stok karışımları;

Primerler, liyofilize pelet olarak İngiltere Hayvan ve Bitki Sağlığı Ajansı (APHA) aracılığı ile Sigma-Aldrich firmasına sentezlettiler. 100 µM konsantrasyonda (100 pmol/µl) olacak şekilde steril ve DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR suyu ile sulandırılarak stok konsantrasyonlar hazırlandı. Her bir primer stoktan sulandırılarak 10 µM'lık son konsantrasyonda (10 pmol/µl) primer karışımı hazırlandı.

dNTP karışımı için her biri 100 mM konsantrasyonda olan 4 çeşit dNTP stoğu, steril ve DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR suyu ile sulandırılarak, son konsantrasyon 20 mM olacak şekilde kullanıma hazır karışım haline getirildi.

Tablo 3-2: Cins spesifik Bcsp31 PCR primerleri

Hedef Türler	Primer Adı	Primer Dizilimi (5' - 3')	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
1, 2, 3, 4, 5, 6	B4-BCSP31(F) B5-BCSP31(R)	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	223	C
1- <i>Brucella abortus</i> 2- <i>Brucella melitensis</i> 3- <i>Brucella suis</i>	4- <i>Brucella ovis</i> 5- <i>Brucella canis</i> 6- <i>Brucella neotomae</i>	C- (Baily ve ark. 1992; Casanas ve ark. 2001)		

3.1.8. Elektroforez ve Görüntüleme

10 X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Lonza, BE50844), distile su ile sulandırılarak 1X oranında kullanıldı.

Agaroz jel, %1,5 oranında hazırlandı. Bunun için Agaroz (Sigma, A5093) 1,5 gr tartıldı ve 1X TAE solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlandıktan sonra, homojenizasyon sağlanana kadar eritildi. Biraz soğuduktan sonra 2µl, %1'lik etidyum bromür (Applchem, A1152) eklendi. Taraklar uygun olarak yerleştirildikten sonra jel, kalıp tepsisinin üzerine döküldü. Oda sıcaklığında bekletilerek jelin katılaşması sağlandı ve taraklar çıkarıldı. Jel kalıbı elektroforez tankına yerleştirilerek yürütme işlemi yapıldı.

Yükleme boyası olarak 6X DNA yükleme boyası (NewEngland Biolabs, F70215), DNA marker olarak 2000 bp'lik ladder (Qiagen Gel Pilot Mid Range) kullanıldı.

3.1.9. Diğer Gereçler

Otomatik pipetler (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl; Eppendorf), 0.2 ml'lik ince çeperli, düz kapaklı DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR tüpleri (Axygen), DNaz / RNaz'dan ari steril filtreli pipet uçları (Ratiolab), ısı döngü cihazı (Palm-Cycler), agaroz jel elektroforez sistemi (Bio-Rad), elektroforez cihazı (Bio-Rad PowerPac Basic), jel görüntüleme sistemi (Vilber-Lourmat), kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Etken İzolasyonu

Gelen örnekler, Farrell's, Cita ve Serum dekstroz agara ekildi. Ekim yapılan petrilerin tamamı, %6 CO₂'li ortamda 37 °C'de 6-8 gün inkübasyona bırakıldı. Koloni oluşumu günlük olarak kontrol edildi (Alton ve ark 1988; Aydın 1997 pp. 110-125; OIE Böl. 2.1.4. 2016).

Aynı zamanda, ekimi yapılan organ örneklerinin her birinden steril şartlarda 25 mg, mide sıvısından 150 µl alınarak moleküler analizler için DNA ekstraksiyonu işlemine kadar -20 °C'de saklandı.

3.2.2. Cins Düzeyinde İdentifikasyon

İnkübasyon süresi sonunda üreme saptanan kültürlerden, tipik 1-2 mm çapında, saydam ve bal renkli koloniler seçildi. Gram yöntemi ile boyandı. Mikroskopik bakıda karakteristik Gram negatif kokobasil görünümlü kolonilerden elde edilen saf kültürlerle poliklonal *Brucella* A-M antiserumu ile aglütinasyon, katalaz, oksidaz ve üreaz testleri yapıldı. Ayrıca kültür, DNA izolasyonu için steril ve DNaz / RNaz'dan arındırılmış PCR suyu içeren kriyoviyallerde süspanse edildi (Alton ve ark 1988; OIE Böl. 2.4.3. 2015).

3.2.2.1. *Brucella* Anti A + M Poliserum ile Aglütinasyon

Test edilecek her bir şüpheli kültürden, FTS ile eşit yoğunlukta 1 ml'lik bakteri süspansiyonu hazırlandı. Smooth *Brucella* spp. lere karşı hazırlanmış poliserum ile eşit

miktarda temiz bir lam üzerinde karıştırıldı. Aglütinasyonun varlığı, etkenin *Brucella* cinsine ait bir mikroorganizma olabileceğini gösterdi (Alton ve ark. 1988).

3.2.2.2. Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerinde bir damla Hidrojen Peroksit (H_2O_2) ve üzerine iğne uçlu öze ile alınan taze bakteri kültürü karıştırıldı. Kabarcık oluşumunun gözlenmesi ile reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark. 1988).

3.2.2.3. Oksidaz Testi

Taze bakteri kültüründen steril öze ile alınan bakteri, ticari olarak alınan oksidaz çubuğunun ucundaki işaretli bölgeye sürüldü. Kültürün sürüldüğü yerde 10 saniye içinde koyu mor bir rengin görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi (Alton ve ark. 1988).

3.2.2.4. Üreaz Testi

Taze kültür, içinde Christensen besiyeri olan yatık tüplere ekildi. Tüpler oda ısısında 5 saatlik aralarla 24 saate kadar renk değişimi açısından kontrol edildi. Rengin sarıdan pembeye dönüşümü ile test pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark. 1988).

3.2.3. Etkenin Tür Seviyesinde İdentifikasyonu ve Biyotiplendirilmesi

3.2.3.1. Karbondioksit (CO_2) İhtiyacının Belirlenmesi

Bu amaçla izolatlar 1'er ml FTS içerisinde süspanse edildi. Süspansiyonlar çizgi şeklinde SDA'ya ekildi ve petriler aerob şartlarda 37 °C'de 5 gün inkübe edildi. Üreme varlığı negatif, yokluğu pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark. 1988).

3.2.3.2. Hidrojen Sülfür (H_2S) Gaz Çıkışının Belirlenmesi

İzolatlardan, SDA içeren yatık tüplere ekimler yapıldı. Sonra, hazır kurşun asetat emdirilmiş filtre kağıtları, besiyerlerine değmeyecek şekilde tüplerin ağız kısımlarına yerleştirildi. 37 °C'de %6 CO_2 'li ortamda 5 gün inkübe edildi. Kağıdın renginin siyaha dönüşmesi ile test pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark. 1988).

3.2.3.3. Penisilin, Streptomisin, Eritritol, Tiyonin, Bazık Fuksin ve Safranin Varlığında Üreme

İzolatlardan, 1'er ml steril FTS içerisinde süspansiyonlar eşit yoğunluklarda hazırlandı. Steril pamuk sıvıplar kullanılarak bakteri süspansiyonlarının ekimleri her bir petride 5 örnek olacak şekilde tek çizgi halinde yapıldı. Petriler %6 CO_2 'li ortamda 37

°C’de 5 gün inkubasyona bırakıldı. Üreme varlığı pozitif, yokluğu negatif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

3.2.3.4. Faj Testleri

Test edilecek her bir izolattan, steril FTS ile eşit yoğunlukta 1 ml’lik bakteri süspansiyonu hazırlandı. Her bir bakteri süspansiyonundan steril bir sıvayapı yardımıyla, SDA besiyerine ekim yapıldı. Ekim alanının sol tarafına tibilisi ortasına izatnagar ve sağına R/C fajlarından 20 µl damlatıldı. Petriler kuruduktan sonra, 37 °C’de %6 CO₂’li ortamda 24 saat inkübe edildi. Fajın damlatıldığı alanda, tam lizisin görülmesi pozitif, lizisin görülmemesi negatif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

3.2.3.5. *Brucella* A ve M Monospesifik Antiserumlar ile Aglütinasyon

Test edilecek suşlardan, steril FTS ile eşit yoğunlukta 1 ml’lik bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyonlar, 65 °C lik sıcak su banyosunda 1 saat tutularak inaktive edildi. Temiz bir lama 20 µl kadar bakteri süspansiyonu damlatıldıktan sonra üstüne A ve M monospesifik antiserumlardan eşit hacimde ilave edilip karıştırıldı, 1-2 dakika içinde aglütinasyon vermesi pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

3.2.4. Moleküler Yöntemlerle Etken İdentifikasyonu

3.2.4.1. Kültürden DNA Ekstraksiyonu

Kültürden DNA ekstraksiyonu için kaynatma yöntemi kullanıldı (Lopez-Goni ve ark. 2008; İça ve ark. 2012; OIE Böl. 2.4.3. 2015). *Brucella* spp. kolonilerinden alınan bakteri, içleri 250 µl steril ve DNaz / RNaz’dan arındırılmış PCR suyu ile dolu ağzı kapaklı steril kriyoviyal tüpler içerisinde süspanse edildi. Daha sonra, kriyoviyal tüpler içi su dolu beher içinde 10 dk. kaynatıldı. Kaynayan süspansiyonlar steril pipet ile 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve mikrosantrifüj ile 8000 rpm de 1 dk. santfuj edildi. 200 µl süpernatant dikkatli bir şekilde başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak, amplifikasyon için -20 °C’de saklandı. Multipleks PCR için, izole edilen DNA miktarı ölçülerek (Thermo, NanoDrop1000) her reaksiyon tüpü için 50 – 150 ng miktarında kullanıldı.

3.2.4.2. İnceleme Örneklerinden DNA Ekstraksiyonu

İnceleme örneklerinden DNA ekstraksiyonu için ticari kit kullanıldı. Kit içeriğinde belirtilen yöntem, 166 atığa ait 326 örneğe uygulandı. 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alınmış olan 25 µg doku ve 150 µl mide sıvısı örneği üzerine, 20

µl proteinaz K ve 180 µl ATL solüsyonu ilave edildi. 56 °C’de doku tamamen eriyene kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 15 saniye vorteks ile karıştırıldı. Üzerine 200 µl AL solüsyonu ilave edildi ve karıştırıldı. 200 µl etanol (%96) (Merck, 100971) ilave edildi ve tekrar karıştırıldı. Karışım, 2 ml’lik toplama tüpünün içindeki DNeasy mini spin kolon içine aktarıldı ve bir dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon, tüpün içinden çıkarılarak yeni 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi, 500 µl AW1 solüsyonu ilave edildi, 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon tekrar yeni bir 2 ml’lik toplama tüpüne konuldu ve 500 µl AW2 solüsyonu ilave edildi. DNeasy membranını kurutmak için 14000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi. DNeasy mini spin kolon, 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve AE solüsyonu DNeasy membranın üzerine 200 µl miktarında ilave edildi. Oda ısısında bir dakika süreyle inkübe edildi ve 8000 rpm’de bir dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpe aktarıldı ve son işlem bir daha tekrar edildi. Elde edilen toplam süpernatant, amplifikasyon işleminde kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

3.2.4.3. Kültürden Tür Spesifik DNA Amplifikasyonu (m-PCR)

Bakteri kültürlerinden elde edilen DNA ekstraktlarına uygulandı. Reaksiyon karışımı, 200 µl’lik ısıya dayanıklı nükleazdan arındırılmış özel PCR tüpleri içerisinde, finalde 25 µl miktarda olmak üzere; 12,5 µl 2X multipleks PCR kit master karışımı (Qiagen), 2,5 µl primer karışımı (her bir primer 2 pmol/µl), 9 µl nükleazdan arındırılmış PCR suyu ve 1 µl (50 – 150 ng) DNA örneği içerdi. DNA amplifikasyonu; 95 °C’de 15 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra toplam 25 döngü, 94 °C’de 30 saniye (denatürasyon), 58 °C’de 90 saniye (ilk bağlanma), 72 °C’de 3 dakika (ilk sentez) ve döngülerin sonunda, 72 °C’de 10 dakika (son sentez) tutularak amplifikasyon tamamlandı (Mayer-Scholl ve ark. 2010).

3.2.4.4. İnceleme Örneklerinden Tür Spesifik DNA Amplifikasyonu (m-PCR)

Elde edilen DNA ekstraktlarına uygulanacak PCR, Mayer-Scholl ve ark. (2010)’nın yöntemi temel alınarak ve aşağıda detaylı olarak verilen yöntemler kullanılarak modifiye edildi. Bunun için;

- 1-Farklı ekstraksiyon kitleri kullanılarak, ekstraksiyon kalitesi incelendi.

2-Kalıp DNA miktarı 1 - 5 µl arasında arttırılarak denendi. Arttırılan oranda PCR karışımındaki su miktarı azaltıldı ve değiştirilen döngülerle (25, 30, 35, 40 ve 45) dama tahtası yöntemiyle denendi.

3-Non spesifik bant oluşumlarının engellenmesi için Q solüsyonu ve %4 DMSO ilaveli ve ilavesiz denemeleri, ekstrakte DNA'nın 50 kat sulandırılmalı m-PCR denemeleri yapıldı.

4-Kalıp DNA miktarı ve döngü sayısı belirlenen modifiye m-PCR yönteminde oluşan bant kalitesini arttırmak amacıyla ilk bağlanma ısıları 58-65 °C arasında değiştirilerek denendi.

5-Elektroforez aşamasında, agaroz jele yüklenen ampikon miktarı 2 kat arttırılarak denendi.

Denemeler sonucu belirlenen ve modifiye edilen yöntem (5 µl kalıp DNA, 35 döngü), ilk bağlanma ısılarının PCR kalitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, ilk bağlanma (annealing) ısılarında 58-65 °C arasında 1'er derecelik artışlarla denemeler yapıldı. PCR karışımı; 200 µl'lik ısıya dayanıklı nükleazdan arındırılmış özel PCR tüpleri, finalde 25 µl PCR karışımı olmak üzere; 12,5 µl 2X multipleks PCR kit master karışımı (Qiagen), 2,5 µl primer karışımı (her bir primer 2 pmol/µl), 1 µl DMSO, 4 µl nükleazdan arındırılmış PCR suyu ve 5 µl DNA örneği içerdi. DNA amplifikasyonu; 95 °C'de 15 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra toplam 35 döngü, 94 °C'de 30 saniye (denatürasyon), 58-59-60-61-62-63-64-65 °C değişik sıcaklıklarda 90 saniye (ilk bağlanma), 72 °C'de 3 dakika (ilk sentez) ve döngülerin sonunda 72 °C'de 10 dakika (son sentez) tutularak tamamlandı.

3.2.4.5. İnceleme Örneklerinden Cins Spesifik Modifiye Bcsp31 DNA Amplifikasyonu

İnceleme örneklerinden elde edilen DNA ekstraktlarına uygulandı. Queipo-Ortuno ve ark. (1997)'nin uyguladığı yöntem, reaksiyona giren primer miktarının 0,1 µM'dan 0,2 µM'a, MgCl₂ miktarının 1 mM'dan 1,5 mM'a arttırılmasıyla, reaksiyon hacminin %4'ü oranında DMSO eklenmesi çoğaltma için 35 olan döngü sayısının 30 döngüye indirilmesi ve ürünün yürütülmesi için %2'lik yerine %1,5'luk agaroz jel kullanılmasıyla modifiye edildi. Sonuçta; her bir reaksiyon tüpünde 50 µl son hacim olmak üzere; primer miks stoğundan 1µl (Son konsantrasyon 0,2 µM), dNTP miks stoğundan 0,5 µl (Son konsantrasyon 0.2 mM), enzimden (5 İÜ/µl) 0,25 µl (Son

konsantrasyon 1,25 İÜ), 100 mM Tris-HCl pH:8,4, 500 mM KCl ve 15 mM MgCl₂ karışımını içeren 10 X PCR solüsyonundan 5 µl (Son konsantrasyon 10 Mm Tris-HCl pH:8.4, 50 mM KCl ve 1,5 mM MgCl₂), DMSO'dan 2 µl (Son konsantrasyon % 4), PCR suyundan ise 31,25 µl kullanıldı. Son olarak klinik örneklerden direkt olarak ekstrakte edilen DNA templeyti 10 µl ilave edilerek PCR karışımı tamamlandı. DNA çoğaltmak için, PCR tüpleri thermal döngü cihazına yerleştirilerek çoğaltma işlemi 93 °C'de 5 dakika ön denatürasyonu takiben, toplam 30 döngü, 90 °C'de 1 dakika (denatürasyon), 60 °C'de 30 saniye (bağlanma), 72 °C'de 1 dakika (sentez) ve döngülerin sonunda 72 °C'de 7 dakika (son sentez) ısı ve süreler uygulanarak tamamlandı. Çoğaltılmış ürünler, %1,5 luk agaroz jelde yürütüldü.

3.2.5. Minimum Tespit Limitinin Belirlenmesi

Kullanılan PCR'lerin tanı duyarlılıklarını belirleyebilmek için minimum tespit limiti çalışıldı. Bu amaçla *B. abortus* Tulya (ATCC 23450), *B. abortus* S-19 , *B. melitensis* 16M (ATCC 23456), *B. melitensis* Ether (ATCC 23458) ve *B. melitensis* Rev-1 referans suşları kullanıldı. Tüm suşlar SDA besiyerine şerit çizgi oluşturacak şekilde ekildi. 37 °C'de CO₂'li ortamda 5 gün inkubasyondan sonra toplanan kültürlerden kaynatma yöntemi ile DNA'lar izole edildi. İzole edilen DNA'ların miktarları spektrofotometrik olarak (Thermo, NanoDrop1000) ölçüldü ve konsantrasyonları ng / µl cinsinden elde edildi. Ana stoklar, 10 ng/µl, 5 ng/µl, 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl ve 1 pg/µl, 100 fg/µl, 10 fg/µl, 1 fg/µl miktarında DNA içerecek şekilde sulandırılarak PCR'lerde kullanıldı (Mitka ve ark. 2007).

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Konvansiyonel yöntemle yapılan bakteri izolasyonu ve identifikasyonu, standart test metodu olarak kabul edildi. Direkt klinik materyallere uygulanan multipleks ve cins spesifik PCR'lerin sensitivite, spesifite, pozitif tahmini değer, negatif tahmini değer ve test geçerlilikleri, 2x2 tablosu kullanılarak hesaplandı (Shaikh 2011).

Tablo 3-3: 2x2 tablosu ve veri analizi

	Altın Standart Test		TOPLAM
	Pozitif	Negatif	
Tanı Testi Pozitif	A (GP)	B (YP)	A+B (GP+YP)
Tanı Testi Negatif	C (YN)	D (GN)	C+D (YN+GN)
TOPLAM	A+C (GP+YN)	B+D (YP+GN)	A+B+C+D (GP+YP+YN+GN)

GP: Gerçek Pozitif :Altın standart test ve tanı testi beraber pozitif olanlar.
 YP: Yalancı Pozitif :Altın standart test negatif iken tanı testi pozitif olanlar.
 GN: Gerçek Negatif :Altın standart test ve tanı testi beraber negatif olanlar.
 YN:Yalancı Negatif :Altın standart test pozitif iken tanı testi negatif olanlar.

Duyarlılık(Sensitivite) : Tanı testinin gerçek pozitifleri bulabilme yeteneği, $A / (A + C) \times 100 = \%$ olarak ifade edildi.

Özgüllük(Spesifite) : Tanı testinin gerçek negatifleri bulabilme yeteneği, $D / (B + D) \times 100 = \%$ olarak ifade edildi.

Pozitif Tahmini Değer : Gerçek pozitif olanların, tanı testi ile bulunan toplam pozitif olanlar içindeki yüzdesi, $A / (A + B) \times 100 = \%$ olarak ifade edildi.

Negatif Tahmini Değer : Gerçek negatif olanların, tanı testi ile bulunan toplam negatif olanlar içindeki yüzdesi, $D / (C + D) \times 100 = \%$ olarak ifade edildi.

Test Geçerliliği : Tanı testinin doğru tanı koyabilme yeteneğinin göstergesi, $(A + D) / (A + B + C + D) \times 100 = \%$ olarak ifade edildi.

Testler, duyarlılık ve özgüllüğün toplamı > 170 ise, klinik olarak yararlı bir test, duyarlılık ve özgüllüğün toplamı > 190 ise, tanısal gücü yüksek bir test olarak tanımlandı (Derhem 2015).

4. BULGULAR

4.1. İzolasyon ve Cins Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları

Brucella şüpheli kolonilerden Gram boyama yöntemi ile yapılan boyama ile saptanan, Gram negatif kokobasil görünümlü izolatlarla yapılan poliklonal *Brucella* anti-serumu ile aglütinasyon testleri ile katalaz, oksidaz ve üreaz testlerinin pozitif olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre 166 atık örneğinin 85'inden *Brucella* spp. izole ve identifiye edildi. Hayvan türlerine göre 28 keçi atığı örneğinin 14'ünden, 114 koyun atık örneğinin 56'sından, 23 sığır atık örneğinin 15'inden cins düzeyinde etken identifikasyonu yapıldı (70'i küçükbaş, 15'i sığır). Bir manda atık örneğinden ise izolasyon yapılamadı. Böylece toplam 326 organ örneğinin 171'inden etken izolasyonu ve cins düzeyinde identifikasyonu yapıldı (Tablo 4.1).

4.2. Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları

Cins düzeyinde belirlenen 85 atığa ait 171 izolata uygulanan biyokimyasal testler sonucunda tür ve biyotip düzeyinde identifikasyon yapıldı.

Brucella spp. olarak adlandırılmış 171 izolat içinde, küçükbaş izolatlarının (n=70) 52'si *B. melitensis* biyotip 3 saha suşu, biri Penisiline duyarlı *B. melitensis* biyotip 3 saha suşu, biri Tiyonine duyarlı *B. melitensis* biyotip 3 saha suşu, 13'ü *B. melitensis* biyotip 1 saha suşu, biri Tiyonine duyarlı *B. melitensis* biyotip 1 saha suşu, ikisi *B. melitensis* Rev-1 aşı suşu olarak identifiye edildi (Tablo 4.1).

Cins düzeyinde adlandırılmış sığır izolatlarının (n=15) 14'ü *B. abortus* biyotip 3 saha suşu ve biri *B. abortus* S-19 aşı suşu olarak identifiye edildi (Tablo 4.1).

Tablo 4-1: Kültür yöntemi ile tür ve biyotip düzeyinde identifikasyon sonuçları

Örnek no	Hayvan türü	İnceleme örnekleri ve izolasyon sonuçları			H ₂ S üretimi	CO ₂ ihtiyacı	Boyalı besiyerleri			Anti-biyotik besiyerleri			Faj testleri			Anti serum		Değerlendirme
							Tiyonin	B.Fuksin	Safranin	Streptomisin	Penisilin	Eritritol	İzatanagar	Tibilisi	R/C	Anti-A	Anti-M	
		FMS	Karaciğer	Akciğer														
4	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
5	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
7	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
8	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
11	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
20	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
21	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
22	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
29	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
35	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
36	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
37	Keçi	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
40	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
41	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
42	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
43	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
44	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
45	Sığır	+	+	.	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	B.a.S19
46	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
47	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
48	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
49	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
50	Sığır	+	+	.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3
52	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
61	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
62	Koyun	+	-	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
63	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
64	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
65	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
66	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
67	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
68	Koyun	+	+	.	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	B.m.Rev1
69	Sığır	+	-	.	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	B.a.bt3
70	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
71	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3

Örnek no	Hayvan türü	İnceleme örnekleri ve izolasyon sonuçları																	Değerlendirme
				Boyalı besiyerleri			Anti-biyotik besiyerleri		Faj testleri			Anti serum							
		FMS	Karaciğer	Akciğer	H ₂ S üretimi	CO ₂ ihtiyacı	Tiyonin	B.Fuksin	Safranin	Streptomisin	Penisilin	Eritritol	Tibilisi	İzatanagar	R/C	Anti-A	Anti-M		
72	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
73	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
74	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
75	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
76	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
77	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
78	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
79	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
80	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
81	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
82	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
83	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
84	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
85	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
86	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
87	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
88	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
89	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
90	Sığır	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
107	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
108	Koyun	+	+	.	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	¹ B.m.bt1	
109	Sığır	+	-	.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
110	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
111	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
112	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
113	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
114	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
115	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
116	Sığır	.	.	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
117	Sığır	+	-	.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
118	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1	
119	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1	
120	Keçi	+	-	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1	
121	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3	
122	Sığır	+	+	.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
123	Sığır	+	+	.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3	
124	Keçi	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1	

Örnek no	Hayvan türü	İnceleme örnekleri ve izolasyon sonuçları			H ₂ S üretimi CO ₂ ihtiyacı	Boyalı besiyerleri			Anti-biyotik besiyerleri			Faj testleri			Anti serum		Değerlendirme	
		FMS	Karaciğer	Akciğer		Safranin	B.Fuksin	Tiyonin	Streptomisin	Penisilin	Eritritol	R/C	İzatanagar	Tibilisi	Anti-M	Anti-A		
125	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
126	Keçi	+	+	.	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	B.m.Rev1
127	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
139	Koyun	.	.	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
148	Keçi	.	.	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
149	Keçi	.	.	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
150	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
151	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
152	Keçi	+	+	.	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
153	Koyun	+	+	.	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	² B.m.bt3
154	Koyun	+	+	.	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	¹ B.m.bt3
158	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
160	Koyun	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
Referans Suşlar																		
Brucella abortus 544					+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt1
Brucella abortus Tulya					+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	B.a.bt3
Brucella melitensis 16M					-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	B.m.bt1
Brucella melitensis 63/9					-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	B.m.bt2
Brucella melitensis Ether					-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	B.m.bt3
Brucella abortus S19					-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	B.a.S19
Brucella melitensis Rev1					-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	B.m.Rev1

B.m.bt1 : *Brucella melitensis* biyotip 1

B.m.bt2 : *Brucella melitensis* biyotip 2

B.m.bt3 : *Brucella melitensis* biyotip 3

B.a.bt1 : *Brucella abortus* biyotip 1

B.a.bt3 : *Brucella abortus* biyotip 3

B.a.S19 : *Brucella abortus* S19

B.m.Rev1 : *Brucella melitensis* Rev1

FMS : Fetüs mide sıvısı

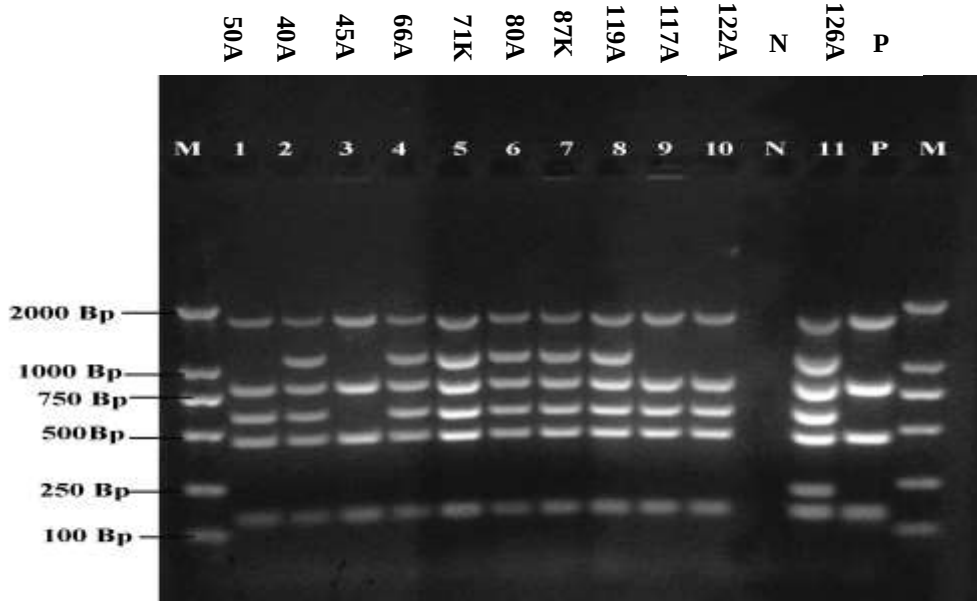
¹ : Tiyonine Duyarlı Atipik

² : Penisiline Duyarlı Atipik

4.3. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon Sonuçları

4.3.1. Kültürden m-PCR Sonuçları

Konvansiyonel yöntemle (Kültür) cins düzeyinde identifikasyonu yapılan izolatlara uygulanan m-PCR ile, izolatların tür düzeyinde identifikasyonları yapıldı. Sonuçların kültür yöntemi ile bire bir uyumlu olduğu görüldü (Tablo 4.2) (Şekil 4.1).



Şekil 4-1: Kültürlerden Ekstrakte Edilen DNA'lar ile m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği

M- Marker 2000Bp, 1- izolat no:50A (*B. abortus*), 2- izolat no:40A (*B. melitensis*), 3- İzolat no:45A (*B. abortus* S-19), 4- İzolat no:66A (*B. melitensis*), 5-İzolat no:71K (*B. melitensis*), 6- İzolat no:80A (*B. melitensis*), 7- İzolat no:87K (*B. melitensis*), 8- İzolat no:119A (*B. melitensis*), 9- İzolat no:117A (*B. abortus*), 10-İzolat no:122A (*B. abortus*), 11- İzolat no: 126A (*B. melitensis* Rev-1), N: Negatif Kontrol, P: Pozitif Kontrol (*B. abortus* S-19 referans aşısı suşu)

4.3.2. İnceleme Örneklerine Uygulanan Direkt m-PCR Sonuçları

4.3.2.1. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Standardizasyonu İçin Uygulanan Deneme Sonuçları

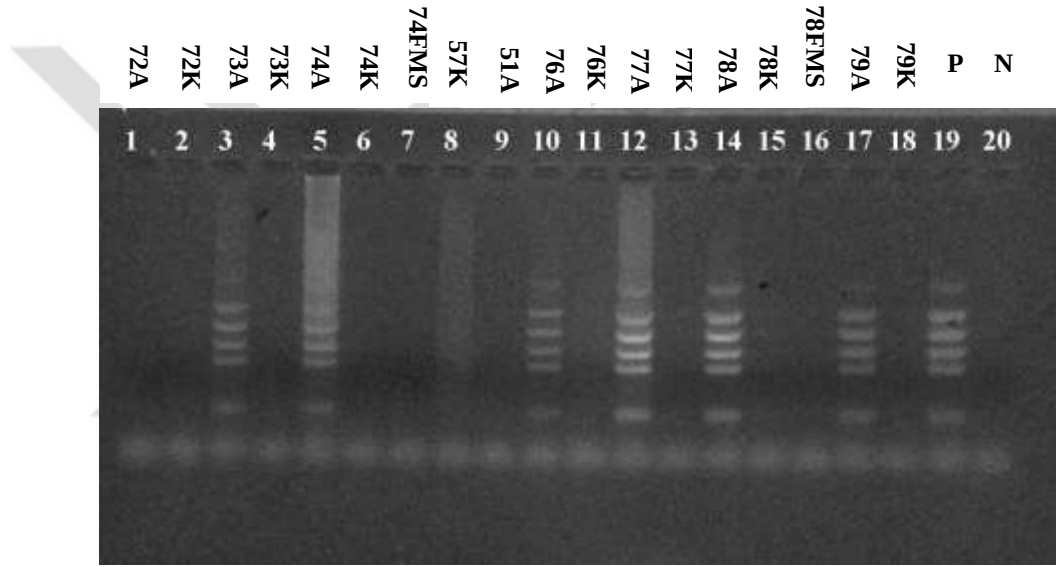
İnceleme örneklerinden elde edilen DNA'lara direkt m-PCR uygulayabilmek amacıyla uygulanan dama tahtası yöntemi sonucunda, 5 µl ekstrakte DNA ve 35 siklus (döngü) uygun bulundu.

Çalışmada, ekstraksiyon aşamasında kullanılan farklı ekstraksiyon kitleri için aynı sonuçlar alındı. DMSO ilavesinin bant kalitesi üzerine olumlu etkileri belirlenirken Q solüsyonu ilavesi olumlu etki göstermedi. Kullanılan DNA kalıplarının sulandırılması

ve jelde yürütme aşamasında yüklenen ampikon miktarındaki artışın oluşan bant kalitesi üzerinde olumlu etkileri izlenemedi.

Yapılan, döngü sayısı ve kalıp DNA miktarı eşleşmelerinde, 5 µl DNA ekstraktı dışında kullanılan DNA miktarlarında, uygun bant oluşumları saptanamadı. Bant oluşumları, 5 µl DNA ekstraktı kullanılan 25, 30 ve 35 döngülerde saptandı.

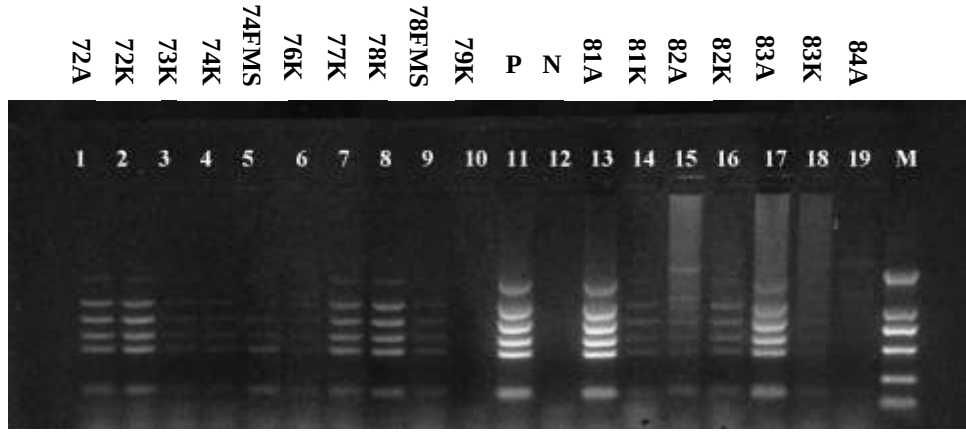
5 µl ekstrakte DNA ve 25 döngülü m-PCR sonucunda bant profillerinden bazıları oldukça silik ve zayıf olarak izlendiğinden bu PCR, tanıda kullanılmaya uygun bulunmadı (Şekil 4.2).



Şekil 4-2: İnceleme Örneklerinden Ekstrakte Edilen 5 µl DNA İle 25 Döngülü Direkt m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği

1- 72A, 2- 72K, 3- 73A, 4- 73K, 5- 74A, 6- 74K, 7- 74FMS, 8- 51A, 9- 57K, 10- 76A, 11- 76K, 12- 77A, 13- 77K, 14-78A, 15- 78K, 16- 78FMS, 17- 79A, 18- 79K, 19- Pozitif Kontrol (*B. melitensis* 16M), 20- Negatif Kontrol

5 µl ekstrakte DNA ve 30 döngülü m-PCR sonucunda, bant profilleri 25 döngüye göre daha belirgin olsa da, PCR profillerinde belirgin olmayan, silik ve zayıf yapılar izlendiği, bazı bantların ise çok belirgin olduğu, homojen bir görüntünün sağlanamadığı belirlendi. Bu nedenle tanıda kullanıma uygun bulunmadı (Şekil 4.3).



Şekil 4-3: İnceleme Örneklerinden Ekstrakte Edilen 5 µl DNA İle 30 Döngülü Direkt m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği

M- Marker 2000Bp, 1- 72A, 2- 72K, 3- 73K, 4- 74K, 5- 74FMS, 6- 76K, 7- 77K, 8- 78K, 9- 78FMS, 10- 79K, 11- Pozitif Kontrol (*B. melitensis* 16M), 12- Negatif Kontrol, 13- 81A, 14- 81K, 15- 82A, 16- 82K, 17- 83A, 18- 83K, 19- 84A

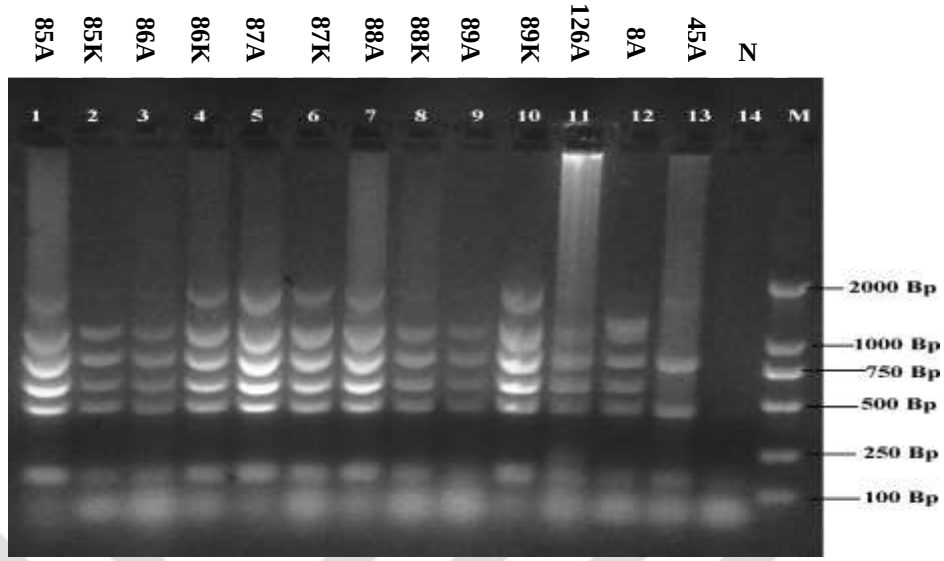
5 µl ekstrakte DNA ve 35 döngülü m-PCR sonucunda bant profillerinin belirgin olduğu belirlendi (Şekil 4.4; Şekil 4.5).

Döngü sayısı (35) ve ekstrakte DNA miktarı (5 µl) belirlenen m-PCR yöntemine uygulanan farklı ilk bağlanma ısılarındaki 58-65 °C arasındaki artışın, bant profillerinin görünümelerini olumlu bir yönde etkilemediği saptandı. Bu nedenle uygulanan PCR'lerde ilk bağlanma ısısı olarak 58 °C tercih edildi.

Denemeler sonucu geliştirilen ve bu çalışma ile Modifiye Mayer-Scholl m-PCR olarak adlandırılan bu yöntem sonucunda, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te de izlendiği gibi, oluşan bant profillerinin düzgün olduğu, yorumlanabilecek düzeyde olduğu belirlendi.

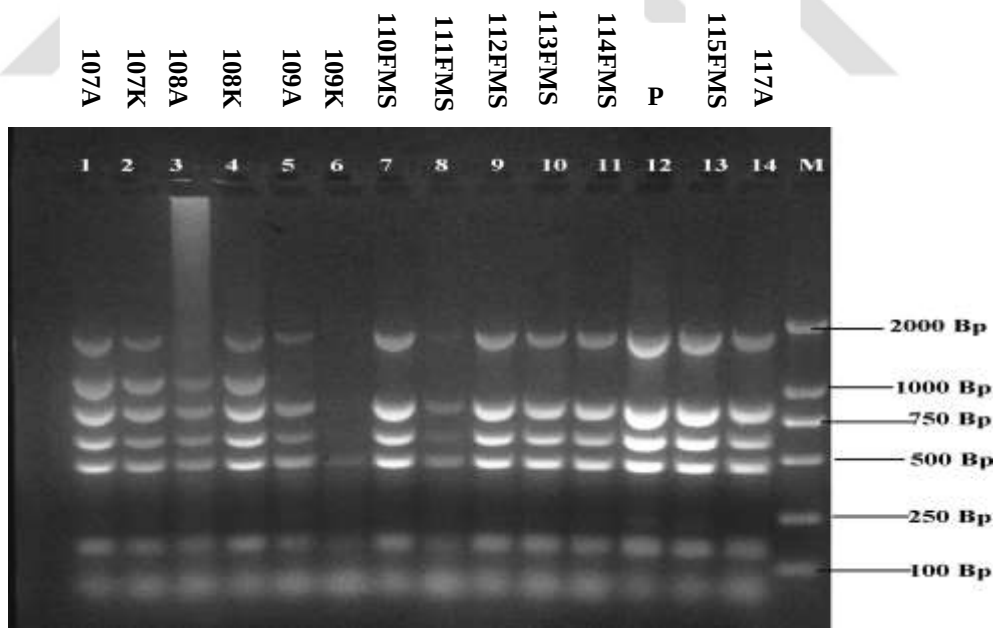
4.3.2.2. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Sonuçları

Yapılan modifikasyonlar sonucu geliştirilen ve direkt olarak inceleme örneklerinden elde edilen DNA'lara uygulanan bu m-PCR yöntemi sonuçları, atık düzeyinde değerlendirildiğinde 166 atıktan 81'i pozitif bulundu. Organ düzeyinde değerlendirildiğinde ise 326 inceleme örneğinin 149'undan tür düzeyinde etken identifikasyonu yapıldı (Tablo 4.2) (Şekil 4.4; Şekil 4.5).



Şekil 4-4: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (A)

M- Marker 2000Bp, 1- 85A (*B. melitensis*), 2- 85K (*B. melitensis*), 3- 86A (*B. melitensis*), 4- 86K (*B. melitensis*), 5- 87A (*B. melitensis*), 6- 87K (*B. melitensis*), 7- 88A (*B. melitensis*), 8- 88K (*B. melitensis*), 9- 89A (*B. melitensis*), 10- 89K (*B. melitensis*), 11- 126A (*B. melitensis* Rev-1), 12- 8A (*B. melitensis*), 13- 45A (*B. abortus* S-19), 14- Negatif Kontrol



Şekil 4-5: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Uygulamasına Ait Görüntü Örneği (B)

M-Marker 2000Bp, 1- 107A (*B. melitensis*), 2- 107K (*B. melitensis*), 3- 108A (*B. melitensis*), 4- 108K (*B. melitensis*), 5- 109A (*B. abortus*), 6- 109K (Negatif), 7- 110FMS (*B. abortus*), 8- 111FMS (*B. abortus*), 9- 112FMS (*B. abortus*), 10- 113FMS (*B. abortus*), 11- 114FMS (*B. abortus*), 12- Pozitif Kontrol (*B. abortus* Tulya), 13- 115FMS (*B. abortus*), 14- 117A (*B. abortus*)

Tablo 4-2: İnceleme örneklerinden kullanılan yöntemle göre elde edilen sonuçlar

Örnek		Kültürden İdentifikasyon		Direkt İnceleme Örneğinden İdentifikasyon	
Numarası (ÖN:) ve Kaynağı	Çeşidi	Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem	m-PCR Yöntemi	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Yöntemi	Modifiye Bcsp31 PCR Yöntemi
4 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
5 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
7 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
8 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
11 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
20 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
21 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
22 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
29 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
35 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
36 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
37 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
39 Koyun	A	Negatif	Negatif	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
40 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
41 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif
42 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
43 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.

Örnek		Kültürden İdentifikasyon		Direkt İnceleme Örneğinden İdentifikasyon	
Numarası (ÖN:) ve Kaynağı	Çeşidi	Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem	m-PCR Yöntemi	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Yöntemi	Modifiye Bcsp31 PCR Yöntemi
44 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
45 Sığır	A	<i>B. abortus</i> S-19	<i>B. abortus</i> S-19	<i>B. abortus</i> S-19	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. abortus</i> S-19	<i>B. abortus</i> S-19	<i>B. abortus</i> S-19	<i>Brucella</i> spp.
46 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
47 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
48 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
49 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
50 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	Negatif
	K	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
52 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
61 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
62 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Negatif	Negatif	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
63 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
64 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
65 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
66 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
67 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
68 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	Negatif	Negatif
69 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	Negatif	Negatif
	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

Örnek		Kültürden İdentifikasyon		Direkt İnceleme Örneğinden İdentifikasyon	
Numarası (ÖN:) ve Kaynağı	Çeşidi	Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem	m-PCR Yöntemi	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Yöntemi	Modifiye Bcsp31 PCR Yöntemi
70 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
71 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
72 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
73 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
74 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
75 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
76 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
77 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
78 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
79 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
80 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif
81 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
82 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
83 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
84 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
85 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
86 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.

Örnek		Kültürden İdentifikasyon		Direkt İnceleme Örneğinden İdentifikasyon	
Numarası (ÖN:) ve Kaynağı	Çeşidi	Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem	m-PCR Yöntemi	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Yöntemi	Modifiye Bcsp31 PCR Yöntemi
87 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
88 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
89 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
90 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
107 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
108 Koyun	A	Tiyonine duyarlı <i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Tiyonine Duyarlı <i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
109 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
110 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
111 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
112 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
113 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
114 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
115 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
116 Sığır	FMS	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
117 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
118 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
119 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
120 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	Negatif	Negatif	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.

Örnek		Kültürden İdentifikasyon		Direkt İnceleme Örneğinden İdentifikasyon	
Numarası (ÖN:) ve Kaynağı	Çeşidi	Konvansiyonel Bakteriyolojik Yöntem	m-PCR Yöntemi	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR Yöntemi	Modifiye Bcsp31 PCR Yöntemi
121 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
122 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
123 Sığır	A	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. abortus</i> biyotip3	<i>B. abortus</i> saha	<i>B. abortus</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
124 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
125 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
126 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>B. melitensis</i> Rev-1	<i>Brucella</i> spp.
127 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
139 Koyun	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
148 Keçi	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
149 Keçi	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
150 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
151 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
152 Keçi	A	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip1	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
153 Koyun	A	<i>Penisiline Duyarlı B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>Penisiline Duyarlı B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
154 Koyun	A	<i>Tiyonine Duyarlı B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
	K	<i>Tiyonine Duyarlı B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
158 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.
160 Koyun	A	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	K	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	Negatif	Negatif
	FMS	<i>B. melitensis</i> biyotip3	<i>B. melitensis</i> saha	<i>B. melitensis</i> saha	<i>Brucella</i> spp.

A: Akciğer K: Karaciğer FMS: Fetüs Mide Sıvısı

4.4. Kullanılan Üç Yöntem İle İncelenen Örneklerden Elde Edilen Pozitiflik Sonuçlarının Karşılaştırılması

Sonuçlar karşılaştırıldığında, örnekler uygulanan konvansiyonel izolasyon, identifikasyon yöntemi ile kültürden m-PCR ile identifikasyon sonuçları, birebir aynı elde edildi. Bu nedenle diğer yöntemlerle karşılaştırma, kültür adı altında tek sonuç kabul edilerek yapıldı.

Örnekler uygulanan kültür yöntemi ile elde edilen sonuçlar Modifiye Mayer-Scholl m-PCR ve Modifiye Bcsp31 PCR sonuçları ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3; Tablo 4.4).

Tablo 4-3: İdentifikasyonda kullanılan yöntemlerle tanı sonuçlarının, sayısal karşılaştırılması

Örnekler	Üç yöntemin incelenen örnekler göre elde edilen pozitiflik sonuçları		
	Kültür	Modifiye Mayer-Scholl m-PCR	Modifiye Bcsp31 PCR
Atık (n=166)	85	81	82
İnceleme örneği (n=326)	171	149	146
Akciğer (n=137)	75	66	66
Karaciğer (n=137)	70	57	54
Fetüs Mide Sıvısı (n=52)	26	26	26

Kültür ile Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yönteminin karşılaştırılması;

1-Örnekler atıklar düzeyinde (n=166) dikkate alındığında, kültür ile incelenen örneklerin (A ve/veya K ve/veya FMS) en az birinde olmak üzere 85 pozitiflik belirlendi. M-PCR ile bu örneklerin 80'i pozitif, 5'i negatif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Ancak kültür negatif bir atık (ÖN:39), direkt m-PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

2-Tüm organlar dikkate alındığında (n=326), kültür ile identifikasyonu yapılan 171 örneğin 146'sı direkt m-PCR ile pozitif bulundu. Kültür ile identifikasyonu yapılan 25 örneğin direkt m-PCR ile identifikasyonu yapılmadı (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Ancak kültür ile identifikasyonu yapılamayan üç örnek (Örnek No: 39A, 62K ve 120K), direkt m-PCR ile identifiye edildi (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

3-Örnek olarak akciğerlerin karşılaştırılması sonucunda, kültür pozitif 75 akciğerin 65'i direkt m-PCR ile pozitif bulundu. Kültür pozitif olan 10 örnek (ÖN: 37A; 40A; 61A; 69A; 82A; 84A; 124A; 125A; 158A; 160A) m-PCR ile negatifti (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür negatif olan örnek (ÖN:39A), direkt m-PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

4-Örnek olarak karaciğerlerin karşılaştırılması sonucunda, kültür pozitif 70 karaciğerin 55'i direkt m-PCR ile pozitif bulunurken 15'i (ÖN: 37K; 40K; 44K; 61K; 68K; 76K; 83K; 84K; 124K; 125K; 127K; 151K; 154K; 158K; 160K) negatif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür negatif iki karaciğer örneği (ÖN: 62K, 120K) direkt m-PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

5-Örnek olarak fetüs mide sıvılarının karşılaştırılması sonucunda, kültür pozitif 26 FMS'nin tamamı, direkt m-PCR ile de pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Kültür ile Modifiye Bcsp31 PCR yönteminin karşılaştırılması;

1- Atıklar için sonuçlar karşılaştırıldığında (n=166), inceleme örneklerinin en az birinden *Brucella* türü identifikasyonu yapılarak kültür pozitif bulunan 85 atıktan 81'i, inceleme örneklerine uygulanan direkt Bcsp31 PCR'lerin en az biri ile pozitif bulundu. Kalan dördü (ÖN: 40; 61; 69; 84), inceleme örneklerine uygulanan direkt Bcsp31 PCR'ler ile negatif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Kültür sonucu identifikasyonu yapılmayan bir atık (ÖN:39) direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

2- Tüm organlar dikkate alındığında (n=326), kültür ile identifikasyonu yapılan 171 örneğin 143'ü, direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu. Kültür ile identifikasyonu yapılan 28 örneğin direkt Bcsp31 PCR ile identifikasyonu yapılmadı (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Buna karşın, kültür sonucunda identifikasyonu yapılmayan üç örnek (ÖN:39A, 62K, 120K), direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

3-Akciğerler için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 75 akciğerin 10'u direkt Bcsp31 PCR ile negatif, 65'i pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Ancak kültür sonucu identifikasyonu yapılmayan bir akciğer (ÖN:39A) direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

4-Karaciğerler için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 70 karaciğerin 52'si direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Buna karşın kültür ile identifikasyonu yapılmayan iki karaciğer (ÖN: 62K; 120K) direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

5-Fetüs mide sıvıları için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 26 FMS'nin tamamı direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Kültür ile Modifiye Mayer-Scholl m-PCR ve Modifiye Bcsp31 PCR yöntemlerinin karşılaştırılması;

1- Atıklar için sonuçlar karşılaştırıldığında (n=166), inceleme örneklerinin en az birinden *Brucella* spp. identifikasyonu yapılarak kültür pozitif bulunan 85 atıktan 80'i, en az bir inceleme örneğinin en az bir direkt PCR'ı ile pozitif bulundu. Kalan dördü (ÖN: 40; 61; 69; 84) her iki direkt PCR ile negatif bulundu. Kültür pozitif bir atık (ÖN:125) direkt m-PCR ile negatif bulunurken, direkt Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür sonucu identifikasyonu yapılamayan bir atık, (ÖN: 39) akciğer örneğine uygulanan her iki direkt PCR ile de pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

2- Tüm organlar dikkate alındığında (n=326), kültür ile identifikasyonu yapılan 171 örneğin 142'si her iki direkt PCR ile pozitif bulundu. Dördü (ÖN: 41K; 50A; 79K; 80K) direkt m-PCR ile pozitif, direkt Bcsp31 PCR ile negatif sonuç verdi. Biri (ÖN: 125A), direkt Bcsp31 PCR ile pozitif, direkt m-PCR ile negatif bulundu. Kalan 24 inceleme örneği her iki PCR ile negatif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür sonucu identifikasyonu yapılmayan üç inceleme örneği (ÖN: 39A; 62K; 120K) her iki direkt PCR ile de pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

3-Akciğerler için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 75 akciğerin 64'ü, her iki direkt PCR ile pozitif, 9'u ise her iki direkt PCR ile negatif bulundu. Ancak kültür pozitif 50A örneği, m-PCR ile pozitif, Bcsp31 PCR ile negatif, kültür pozitif 125A örneği ise m-PCR ile negatif, Bcsp31 PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür sonucu identifikasyonu yapılamayan bir akciğer örneği (ÖN: 39A), uygulanan her iki direkt PCR ile de pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

4-Karaciğerler için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 70 karaciğerin 52'si, her iki direkt PCR ile pozitif, üç örnek (ÖN: 41K; 79K; 80K) direkt m-PCR ile pozitif, direkt Bcsp31 PCR ile negatif bulundu. Kalan 15'i her iki direkt PCR ile negatifti. (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Bu sonucun aksi olarak kültür identifikasyonu yapılamayan iki karaciğer inceleme örneği (ÖN: 62K; 120K) uygulanan her iki direkt PCR ile de pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

5-Fetüs mide sıvıları için sonuçlar karşılaştırıldığında, kültür pozitif 26 FMS'nin tamamı, her iki direkt PCR ile pozitif bulundu (Tablo 4.2; Tablo 4.4).

Tablo 4-4: Kültür ile Modifiye Mayer-Scholl m-PCR ve Modifiye Bcsp31 PCR yöntemlerinin karşılaştırılması

Yöntemler	Atık (n=166)	Organ (n=326)	Akciğer (n=137)	Karaciğer (n=137)	Fetüs Mide Sıvısı (n=52)
K(+) A(+) B(+)	80	142	64	52	26
K(+) A(-) B(-)	4	24	9	15	0
K(+) A(+) B(-)	0	4	1	3	0
K(+) A(-) B(+)	1	1	1	0	0
K(-) A(+) B(+)	1	3	1	2	0
K(-) A(+) B(-)	0	0	0	0	0
K(-) A(-) B(+)	0	0	0	0	0
K(-) A(-) B(-)	80	152	61	65	26
TOPLAM	166	326	137	137	52

K: Kültür İdentifikasyon

A: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR

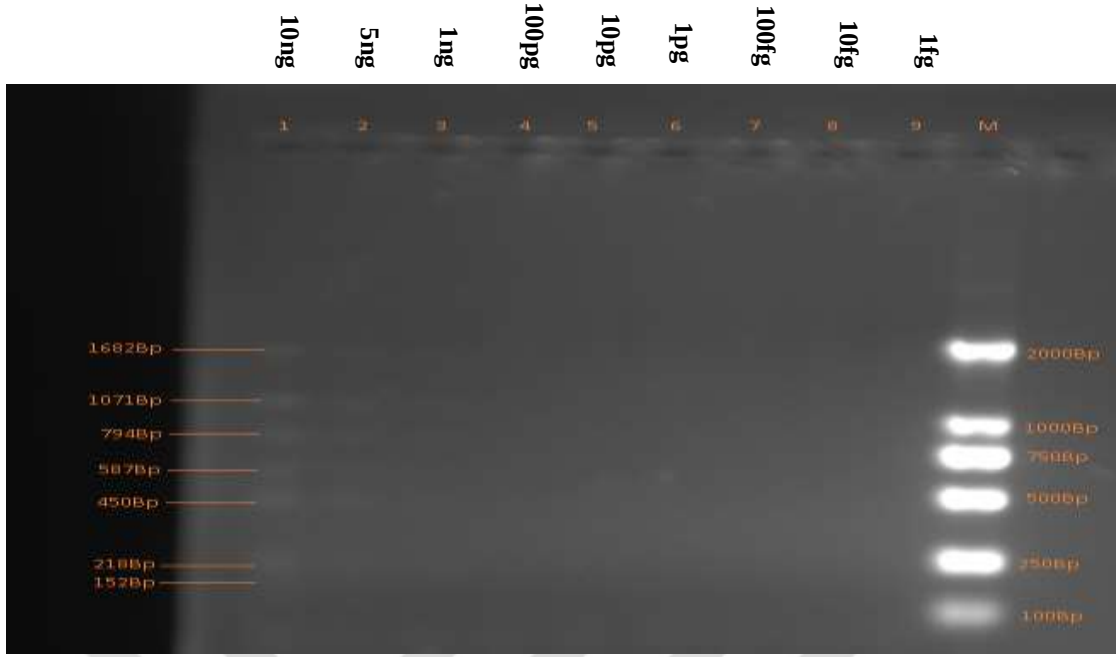
B: Modifiye Bcsp31 PCR

(+): Pozitif

(-): Negatif

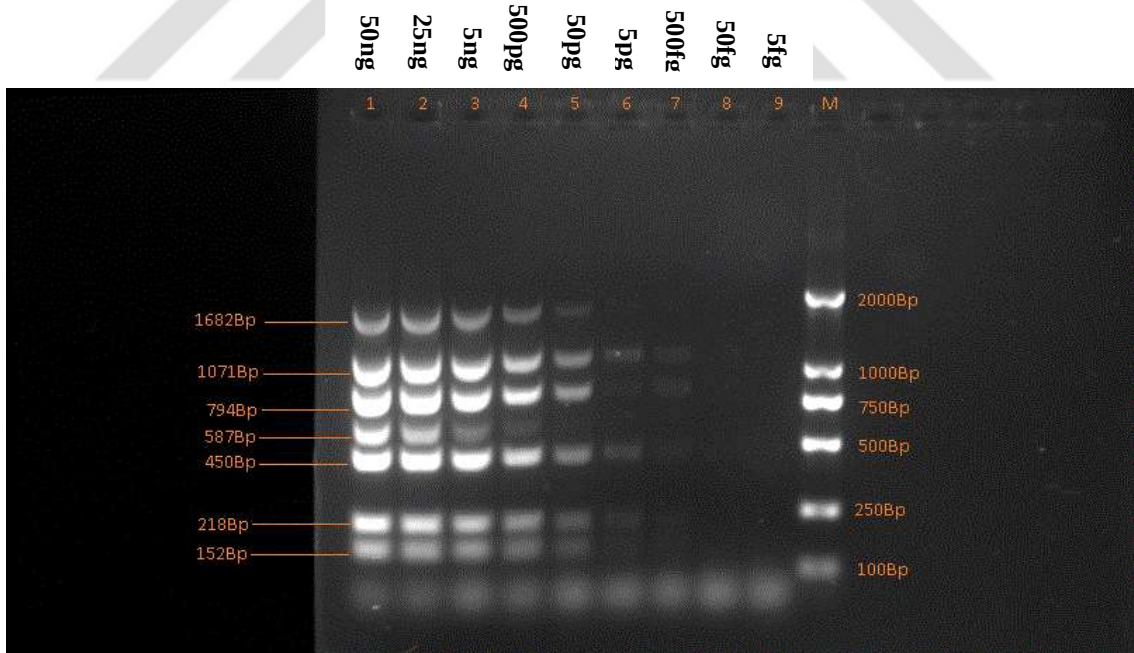
4.5. Minimum Tespit Limiti Çalışmasının Sonuçları

B.abortus Tulya (ATCC 23450), *B.abortus* S-19 , *B.melitensis* 16M (ATCC 23456), *B.melitensis* Ether (ATCC 23458) ve *B.melitensis* Rev-1 referans suşları için yapılan tespit limiti belirleme çalışması sonucunda, tüm kullanılan suşlar için aynı sonuçlar olmak üzere, PCR çeşitlerine göre sırasıyla minimum tespit limitleri; kültürden m-PCR için 5ng (Şekil 4.8), inceleme örneğinden Modifiye Mayer-Scholl m-PCR için 500pg (Şekil 4.9) ve inceleme örneğinden Modifiye Bcsp31 PCR için 1ng (Şekil 4.10) olarak bulundu.



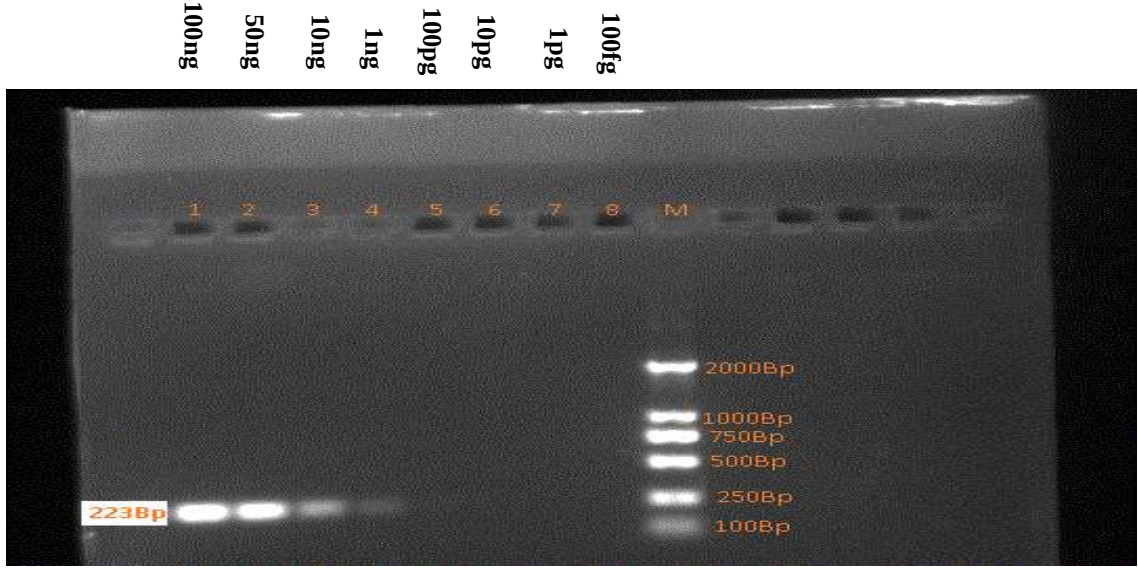
Şekil 4-8: Kültürlerden m-PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü

B. melitensis Rev-1 suşu. 1.sütun:10ng, 2.sütun: 5ng, 3.sütun: 1ng, 4.sütun: 100pg, 5.sütun: 10pg, 6.sütun: 1pg, 7.sütun: 100fg, 8.sütun:10fg, 9.sütun:1fg M:Marker 2000Bp



Şekil 4-9: Modifiye Mayer-Scholl m-PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü

B. melitensis Rev-1 suşu. 1.sütun: 50ng, 2.sütun: 25ng, 3.sütun: 5ng, 4.sütun: 500pg, 5.sütun: 50pg, 6.sütun: 5pg, 7.sütun: 500fg, 8.sütun:50fg, 9.sütun:5fg M:Marker 2000Bp



Şekil 4-10: Modifiye Bcsp31 PCR İçin Minimum Tespit Limiti Görüntüsü

B.melitensis Rev-1 suşu. 1.sütun: 100ng, 2.sütun: 50ng, 3.sütun: 10ng, 4.sütun: 1ng, 5.sütun: 100pg, 6.sütun: 10pg, 7.sütun: 1pg, 8.sütun: 100fg, M:Marker 2000Bp

4.6. İstatistiksel Analiz Sonuçları

4.6.1. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR için Sensitivite ve Spesifite Sonuçları

1-Tüm atıklar için (n=166), sensitivite (S_e) %94,11, spesifite (S_p) %98,76, pozitif tahmini değer %98,76, negatif tahmini değer %94,11 ve test geçerliliği ise %96,38 bulundu (Tablo 4.5).

Tablo 4-5: Atıklar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm atıklardan direkt m-PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test) Pozitif (+)	Negatif (-)	Toplam
Test Pozitif	80(GP)	1(YP)	81
Test Negatif	5(YN)	80(GN)	85
Toplam	85	81	166

$$\text{Sensitivite} = (80/(80+5)) \times 100 = \%94,11$$

$$\text{Spesifite} = (80/(80+1)) \times 100 = \%98,76$$

$S_e (94,11) + S_p (98,76) = 192,87 > 190$, tanısal gücü yüksek bir test.

$$\text{Pozitif tahmini değer} = (80/(80+1)) \times 100 = \%98,76$$

$$\text{Negatif tahmini değer} = (80/(80+5)) \times 100 = \%94,11$$

$$\text{Test geçerliliği} = (80+80)/(80+80+5+1) \times 100 = \%96,38$$

2-Tüm organlar için (n=326), sensitivite %85,38, spesifite %98,06, pozitif tahmini değer %97,98, negatif tahmini değer %85,87 ve testin geçerliliği ise %91,41 bulundu (Tablo 4.6).

Tablo 4-6: Organlar için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm inceleme örneklerinden direkt m-PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	146(GP)	3(YP)	149
Test Negatif	25(YN)	152(GN)	177
Toplam	171	155	326
Sensitivite	$= (146 / (146+25)) \times 100$		= %85,38
Spesifite	$= (152 / (152+3)) \times 100$		= %98,06
$S_e (85,38) + S_p (98,06) = 183,44 > 170$, klinik olarak yararlı bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (146 / (146+3)) \times 100$		= %97,98
Negatif tahmini değer	$= (152 / (152+25)) \times 100$		= %85,87
Test geçerliliği	$= (146+152) / (146+152+3+25) \times 100$		= %91,41

3-Tüm akciğerler için (n=137), sensitivite %86,66, spesifite %98,38, pozitif tahmini değer %98,48, negatif tahmini değer %85,91 ve test geçerliliği ise %91,97 bulundu (Tablo 4.7).

Tablo 4-7: Akciğerler için modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm akciğerlerden direkt m-PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	65(GP)	1(YP)	66
Test Negatif	10(YN)	61(GN)	71
Toplam	75	62	137
Sensitivite	$= (65/(65+10)) \times 100$		= %86,66
Spesifite	$= (61/(61+1)) \times 100$		= %98,38
Se (86,66) + Sp (98,38) = 185,04 > 170, klinik olarak yararlı bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (65/(65+1)) \times 100$		= %98,48

$$\begin{aligned} \text{Negatif tahmini değer} &= (61/(61+10)) \times 100 = \%85,91 \\ \text{Test geęerlilięi} &= (65+61)/(65+61+10+1) \times 100 = \%91,97 \end{aligned}$$

4-Tüm karaciğerler için (n=137), sensitivite %78,57, spesifite %97,01, pozitif tahmini değer %96,49, negatif tahmini değer %81,25 ve test geęerlilięi ise %87,59 bulundu (Tablo 4.8).

Tablo 4-8: Karaciğerler için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm karaciğerlerden direkt m-PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	55(GP)	2(YP)	57
Test Negatif	15(YN)	65(GN)	80
Toplam	70	67	137
Sensitivite	$= (55/(55+15)) \times 100$		$= \%78,57$
Spesifite	$= (65/(65+2)) \times 100$		$= \%97,01$
$S_e (78,57) + S_p (97,01) = 175,58 > 170$, klinik olarak yararlı bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (55/(55+2)) \times 100$		$= \%96,49$
Negatif tahmini değer	$= (65/(15+65)) \times 100$		$= \%81,25$
Test geçerliliği	$= (55+65)/(55+65+2+15) \times 100$		$= \%87,59$

5-Tüm fetüs mide sıvıları için (n=52), sensitivite, spesifite, pozitif tahmini değer, negatif tahmini değer ve test geğerliliği %100 bulundu (Tablo 4.9).

Tablo 4-9: Fetüs mide sıvıları için Modifiye Mayer-Scholl m-PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm fetüs mide sıvılarından direkt m-PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	26(GP)	0(YP)	26
Test Negatif	0(YN)	26(GN)	26
Toplam	26	26	52
Sensitivite	$= (26/(26+0)) \times 100 = \%100$		
Spesifite	$= (26/(26+0)) \times 100 = \%100$		

$S_e (100) + S_p (100) = 200 > 190$, tanısal gücü yüksek bir test.

Pozitif tahmini değer	$= (26/(26+0)) \times 100$	$= \%100$
Negatif tahmini değer	$= (26/(26+0)) \times 100$	$= \%100$
Test geçerliliği	$= (26+26)/(26+26+0+0) \times 100$	$= \%100$

4.6.2. Modifiye Bcsp31 PCR için Sensitivite ve Spesifite Sonuçları

1-Tüm atıklar için (n=166), sensitivite %95,29, spesifite %98,76, pozitif tahmini değer %98,78, negatif tahmini değer %95,23 ve test geçerliliği ise %96,98 bulundu (Tablo 4.10).

Tablo 4-10: Atıklar için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm atıklardan direkt Bcsp31 PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	81(GP)	1(YP)	82
Test Negatif	4(YN)	80(GN)	84
Toplam	85	81	166
Sensitivite	$= (81/(81+4)) \times 100$	$= \%95,29$	
Spesifite	$= (80/(80+1)) \times 100$	$= \%98,76$	
$S_e (95,29) + S_p (98,76) = 194,05 > 190$, tanısal gücü yüksek bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (81/(81+1)) \times 100$	$= \%98,78$	
Negatif tahmini değer	$= (80/(80+4)) \times 100$	$= \%95,23$	
Test geçerliliği	$= (81+80)/(81+80+4+1) \times 100$	$= \%96,98$	

2-Tüm organlar için (n=326), sensitivite %83,62, spesifite %98,06, pozitif tahmini değer %97,94, negatif tahmini değer %84,44 ve testin geçerliliği ise %90,49 bulundu (Tablo 4.11).

Tablo 4-11: Organlar için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm organlardan direkt Bcsp31 PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	143(GP)	3(YP)	146
Test Negatif	28(YN)	152(GN)	180
Toplam	171	155	326

Sensitivite	$= (143 / (143+28)) \times 100$	$= \%83,62$
Spesifite	$= (152 / (152+3)) \times 100$	$= \%98,06$
$S_e (83,62) + S_p (98,06) = 181,68 > 170$, klinik olarak yararlı bir test.		
Pozitif tahmini değer	$= (143 / (143+3)) \times 100$	$= \%97,94$
Negatif tahmini değer	$= (152 / (152+28)) \times 100$	$= \%84,44$
Test geçerliliği	$= (143+152) / (143+152+3+28) \times 100$	$= \%90,49$

3-Tüm akciğerler için (n=137), sensitivite %86,66, spesifite %98,38, pozitif tahmini değer %98,48, negatif tahmini değer %85,91 ve test geçerliliği ise %91,97 bulundu (Tablo 4.12).

Tablo 4-12: Akciğerler için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm akciğerden direkt Bcsp31 PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	65(GP)	1(YP)	66
Test Negatif	10(YN)	61(GN)	71
Toplam	75	62	137

Sensitivite	$= (65/(65+10)) \times 100$	$= \%86,66$
Spesifite	$= (61/(61+1)) \times 100$	$= \%98,38$
$S_e (86,66) + S_p (98,38) = 185,04 > 170$, klinik olarak yararlı bir test.		
Pozitif tahmini değer	$= (65/(65+1)) \times 100$	$= \%98,48$
Negatif tahmini değer	$= (61/(61+10)) \times 100$	$= \%85,91$
Test geçerliliği	$= (65+61)/(65+61+10+1) \times 100$	$= \%91,97$

4-Tüm karaciğerler için (n=137), sensitivite %74,28, spesifite %97,01, pozitif tahmini değer %96,29, negatif tahmini değer %78,31 ve test geçerliliği ise %85,40 bulundu (Tablo 4.13).

Tablo 4-13: Karaciğerler için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm karaciğerlerden direkt Bcsp31 PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	52(GP)	2(YP)	54
Test Negatif	18(YN)	65(GN)	83
Toplam	70	67	137
Sensitivite	$= (52/(52+18)) \times 100$		$= \%74,28$
Spesifite	$= (65/(65+2)) \times 100$		$= \%97,01$
$S_e (74,28) + S_p (97,01) = 171,29 > 170$, klinik olarak yararlı bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (52/(52+2)) \times 100$		$= \%96,29$
Negatif tahmini değer	$= (65/(65+18)) \times 100$		$= \%78,31$
Test geçerliliği	$= (52+65)/(52+65+2+18) \times 100$		$= \%85,40$

5-Tüm fetüs mide sıvıları için (n=52), sensitivite, spesifite, pozitif tahmini değer, negatif tahmini değer ve test geçerliliği %100 bulundu (Tablo 4.14).

Tablo 4-14: Fetüs mide sıvıları için Modifiye Bcsp31 PCR 2x2 tablosu ve hesaplamalar

Tüm fetüs mide sıvılarından direkt Bcsp31 PCR testi	Bakteriyel identifikasyon testi (Referans Test)		Toplam
	Pozitif (+)	Negatif (-)	
Test Pozitif	26(GP)	0(YP)	26
Test Negatif	0(YN)	26(GN)	26
Toplam	26	26	52
Sensitivite	$= (26/(26+0)) \times 100$		$= \%100$
Spesifite	$= (26/(26+0)) \times 100$		$= \%100$
Se (100) + Sp (100) = 200 > 190, tanısal gücü yüksek bir test.			
Pozitif tahmini değer	$= (26/(26+0)) \times 100$		$= \%100$
Negatif tahmini değer	$= (26/(26+0)) \times 100$		$= \%100$
Test geçerliliği	$= (26+26)/(26+26+0+0) \times 100$		$= \%100$

5. TARTIŞMA

Etken izolasyonu, araştırmacılar tarafından brusellozun klinik örneklerden tanısı için altın standart olarak kabul edilmiştir (Alton ve ark. 1988; Yu ve Nielsen 2010; OIE Böl. 2.1.4. 2016). İzolasyonlarda kullanılan katı besiyerleri, *Brucella* kolonilerinin sağlıklı gelişimini (Non-smooth varyantları önlemesi) ve tanımlanmasını sorunsuz olarak sağladığı için geçmişten günümüze oldukça yaygın olarak kullanılmıştır. Sıvı besiyerleri, etkenin göreceli olarak daha az sayıda olduğu inceleme örneklerinde, ön zenginleştirme amacı ile tercih edilmiştir. Bruselloz tanısında kullanılan selektif besiyerlerinin hazırlanmasında, bazal besiyeri olarak; kanlı agar, triptik soy agar, kolombiya agar, serum dekstroza agar veya gliserol dekstroza agardan her hangi birinin tercih edilebileceği bildirilmiştir (Alton ve ark. 1988; OIE Böl. 2.1.4. 2016). Araştırmacılar, selektif besiyeri olarak önerilen Farrell's ve Cita besiyerlerinin beraber kullanımının, izolasyon sensitivitesini en üst düzeyde arttırdığını ve etkenin tanısını kolaylaştırdığını bildirmişlerdir (Vicente ve ark. 2014; OIE Böl. 2.1.4. 2016). Bu çalışmada, tanı için olumlu katkıları göz önünde bulundurularak, Farrell's ve Cita besiyerleri beraber kullanılmıştır. Her iki selektif besiyeri için de bazal besiyeri olarak serum dekstroza agar seçilmiştir. Ayrıca tüm ekimlerde serum dekstroza agar, *Brucella* türlerinin üremesini inhibe edebilecek antibiyotik içermediğinden ayrı bir besiyeri olarak ekimlerde paralel kontrol amacıyla kullanılmıştır. Böylece iki farklı selektif besiyeri ve bir genel besiyeri olmak üzere toplam üç besiyeri, paralel kullanılarak izolasyon sensitivitesi en üst düzeye çıkartılmıştır.

Araştırmacılar, yaptıkları çok sayıda çalışmada, bruselloz etkeni olarak ülkemiz küçükbaş hayvanlarından en sık olarak *B. melitensis* biyotip3, daha az olarak *B. melitensis* biyotip1, büyükbaş hayvanlarından ise en sık olarak *B. abortus* biyotip3 ve daha az olarak da *B. abortus* biyotip1 saha suşlarının izole edildiğini bildirmişlerdir (Erdenliğ ve Şen 2000; Büyükcangaz ve ark. 2009; Büyük ve Şahin 2011; Çerekçi ve ark. 2011, Sayan ve Erdenliğ Gürbilek 2014; Erdenliğ Gürbilek ve ark. 2014; Erdenliğ Gürbilek ve ark. 2015; Karagül ve ark. 2015). Bu çalışmada diğer araştırmacıların bulgularına benzer olarak kültür ile koyun ve keçi atıklarından izole edilen *Brucella* izolatlarının, 117 (%68,42)'si *B. melitensis* biyotip3, 29 (%16,96)'u *B. melitensis* biyotip1, 4 (%2,34)'ü *B. melitensis* Rev-1, sığır atıklarından izole edilen izolatların ise

19 (%90,48)'u *B. abortus* biyotip3 ve 2 (%9,52)'si *B. abortus* S-19 olarak identifiye edilmiştir. Biyotiplerin dağılımı incelendiğinde, sonuçların önceki çalışmalarda saptanan tür ve biyotip sonuçları ile benzer olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler, ülkemizde biyotip dağılımının değişmediğini, komşu ülkelerdeki biyotip dağılım profillerine benzer olduğunu ve yeni *Brucella* biyotiplerinin aktif olarak hayvanlar arasında bulaşmadığını düşündürmüştür.

Çok sayıda araştırmacı, brusellozun kontrol ve eradikasyonu çalışmalarının devam ettiği dönemlerde, aşı suşlarının da hayvanlardan zaman zaman izole ve identifiye edildiklerini bildirmişlerdir (Banai ve ark. 1990; Bardenstein ve ark. 2002; Aras ve Ateş 2011; Karagül ve ark. 2015). Bu çalışmada da, iki atıktan *B. melitensis* Rev-1 ve bir atıktan *B. abortus* S-19 aşı suşu izole edilmiştir. Ülkemizde 2012 yılından bu zamana, yürütülen “Brusellozun Kontrol ve Eradikasyonu Projesi” kapsamında, abort vakalarından zaman zaman aşı suşlarının tespiti, olası bir durum olarak değerlendirilmiştir.

Bir çok araştırmacı tarafından, *B. melitensis* ve *B. abortus* suşlarının spesifik konaklarından farklı olarak, zaman zaman çapraz konaklardan da izole edilebildikleri bildirilmiştir (Aldomy ve ark. 1992; Ocholi ve ark. 2005; Büyükcangaz ve Şen, 2007; Abdelkareem ve ark. 2011; Büyükcangaz ve ark. 2011; Morales-Estrada ve ark. 2012; Erdenliğ Gürbilek ve ark. 2014). Bu çalışmada ise önceki çalışmaların aksine, büyükbaş hayvanlardan sadece *B. abortus*, küçükbaş hayvanlardan ise sadece *B. melitensis* suşları izole ve identifiye edilmiştir. Bu sonucun çalışmaya özgün bir rastlantı olabileceği veya ülkemizde artan tek tür işletmeciliğe (sığır yada küçükbaş), eğitim ve bilinç düzeyinin artması ile işletme şartlarının iyileştirilmesine, biyogüvenlik önlemlerindeki artışa, ortak mera kullanımındaki azalmaya veya uygulanan koruma ve kontrol stratejileri ile bulaşma riskinin azaltılması ile gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür.

PCR, bakteri kültürlerinden *Brucella* cinsinin identifikasyonu için bir çok araştırmacı tarafından kullanılmıştır (Fekete ve ark. 1990; Baily ve ark. 1992; Herman ve De Ridder 1992; Romero ve ark. 1995a; Da Costa ve ark. 1996; Casanas ve ark. 2001; Büyük ve Şahin 2011; Singh ve ark. 2013). Kültürden tür spesifik PCR testi de identifikasyonda kullanılmış ve kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle önerilmiştir (Bricker ve Halling 1994; 1995; Sifuentes-Rincon ve ark. 1997; Garcia-Yoldi ve ark. 2006; Lopez-Goni ve ark. 2008; Huber ve ark. 2009; Mayer-Scholl ve ark. 2010; Büyük

ve Şahin 2011; Kang ve ark. 2011; Lopez-Goni ve ark. 2011; İça ve ark. 2012). Bu çalışmada *Brucella* izolatlarından elde edilen DNA'lara tür spesifik multipleks PCR uygulanmış ve elde edilen sonuçlar, konvansiyonel biyokimyasal testlere dayanan identifikasyon sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Tanı yöntemi sonuçlarının, birbirleri ile %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Kısa sürede sonuç alınmış olması ve sonuçların konvansiyonel yöntem sonuçlarından farklı olmaması, testin avantajları olarak değerlendirilmiş ancak identifikasyonun biyotip düzeyinde yapılamaması, yöntemin epidemiyolojik çalışmalarda eksikliğe neden olabileceğini düşündürmüştür.

Konvansiyonel olarak uygulanan kültür yöntemi ile identifikasyon altın standart yöntem olmasına rağmen, bir çok araştırmacı çeşitli PCR yöntemleri kullanarak direkt klinik materyalden kısa sürede identifikasyonun yapılabilirliğini araştırmışlardır (Fekete ve ark. 1992; Leal-Klevezas ve ark. 1995; Romero ve ark. 1995b; Matar ve ark. 1996; Queipo-Ortuno ve ark. 1997; Çetinkaya ve ark. 1999; Güler ve ark. 2003; O'Leary ve ark. 2006; İlhan ve ark. 2007; Mitka ve ark. 2007; Mukherjee ve ark. 2007; Müştak ve ark. 2009; Büyükcangaz ve ark. 2011; Moussa ve ark. 2011; Arasoğlu ve ark. 2013; Gopaul ve ark. 2014; Qasem ve ark. 2014; Erdenliğ Gürbilek ve ark. 2015; Kaynak-Onurdağ ve ark. 2016).

Büyükcangaz ve ark. (2011), ruminant atıklarına ait organ homojenatlarına etkene spesifik primerler kullanarak *Brucella* cins spesifik PCR uygulamışlar, uyguladıkları PCR için kültür yöntemine göre hesapladıkları PCR sensitivitesini %83, spesifitesini ise %94 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kültür yöntemi ile daha yüksek oranda bruselloz tanısı koyabildiklerini belirtmişler, sebep olarak atık organ homojenatlarının içerebileceği kontaminantların DNA'sı ve konağa ait ökaryotik hücrelere ait genomik DNA'nın PCR için inhibitör etki oluşturabileceği yorumunu yapmışlardır. İnceleme örneklerinden verimli bir DNA ekstraksiyonunun önemini vurgulamışlardır.

Erdenliğ Gürbilek ve ark. (2015), çeşitli klinik örneklerle direkt cins spesifik Bcsp31 PCR uygulamışlar ve süt örneklerinin %16,2'sini ve akyuvar örneklerinin %8,8'ini pozitif bulmuşlardır. Kültür yöntemine göre hesapladıkları PCR sensitivitesini % 78,9 ve spesifitesini % 100 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar, etkenin hücre içi bir bakteri olması sebebiyle ve sütün yağ tabakasına yüksek ilgi göstermesi sonucu oluşan ekstraksiyon güçlüğü, ayrıca süt örneğindeki etken varlığının az sayıda olma

olasılığını, uyguladıkları PCR yönteminin kültür yöntemine göre olası eksiklik sebepleri olarak yorumlamışlardır.

Direkt klinik materyallerden cins düzeyinde yapılan çalışmalar dışında, tür spesifik primerler kullanılarak az sayıda olsa da çalışmalar yapılmıştır. Güler ve ark. (2003), 126 küçük ruminant atığına ait fetüs mide sıvılarına 731bp'lik *Brucella melitensis* spesifik IS711 bölgesinden primerler kullanarak uyguladıkları direkt PCR'nin sensitivitesini %97,4 ve spesifitesini %100 olarak bildirmişlerdir. Kültürü pozitif olduğu halde PCR'ı negatif bulunan bir sonuç için, örneğin içerebileceği inhibitör faktörlerin varlığını, olası örnekleme hatasını veya laboratuvar hatalarını sebep olarak bildirmişlerdir. İlhan ve ark. (2007), Van ilinde bir mezbahaya getirilen 162 koyuna ait kan ve lenfoid doku örneklerine 731bp'lik *Brucella melitensis* spesifik IS711 bölgesinden seçtikleri primerler ile direkt PCR uygulamışlar ve serolojik yöntemle göre hesapladıkları PCR sensitivitesini kandan ve lenfoid dokudan olmak üzere sırasıyla %91,1 ve %100, spesifitesini ise sırasıyla %96,5 ve %98,2 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Kaynak- Onurdağ ve ark. (2016), Edirne ilinde yetiştirilen sığırlara ait 99 süt örneğine, geliştirdikleri real-time kantitatif PCR (qPCR) yöntemini uygulamışlar, 14'ü aşı suşu (*B. abortus* S19), ikisi saha suşu (*B. abortus* saha) olmak üzere 16 süt örneğinde *B. abortus* tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar çalışmalarında, ikisi hariç sütlerden bakteriyel izolasyon yapılamadığını, izolasyon yapılan iki sütün de qPCR ile saha suşu tespit edilen süt örnekleri olduğunu bildirmişlerdir. Bruselloz tanısında kullanılan PCR yöntemlerinin aşı suşu ve saha suşlarının ayırımını yapabilmesi gerekliliğini vurgulamışlardır.

Sanches-Jimenez ve ark. (2014), kültürden tür düzeyinde identifikasyon amacıyla önerilen ve geliştirilen Bruce-Ladder multipleks PCR (m-PCR)'yi dört primer çifti kullanarak modifiye etmişler ve köpeklerde tam kandan ekstrakte edilen DNA'lara *B. canis*'in tür düzeyinde direkt tanısını için uygulamışlardır. Kan kültürüne göre hesap ettikleri PCR sensitivitesini %92,6 ve spesifitesini ise %90 olarak bildirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları tanı yöntemleri ile yaptıkları karşılaştırmalar sonunda, uyguladıkları PCR yönteminin tam kandan *B. canis* identifikasyonu için kullanılabilir olduğu ve serolojik testle beraber kullanımının tanı hassasiyetini arttırmak için daha faydalı olabileceği kanaatine varmışlardır. Bu araştırmanın dışında, m-PCR ile direkt klinik örneklerden tür düzeyinde yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Bu çalışmada, *Brucella* türleri m-PCR kullanılarak direkt klinik materyallerden saptanmıştır. Kullanılan yöntem, Mayer-Scholl ve ark. (2010)'nın kültürden identifikasyonda kullanmak üzere geliştirdikleri m-PCR'nin modifiye edilmesi ile geliştirilmiştir. Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yönteminde modifikasyon için, PCR'de kullanılan kalıp DNA miktarları arttırılmış, artan oranda su miktarı azaltılmış, %4 oranında DMSO ilave edilmiş ve döngü sayıları arttırılmıştır. Atıklara ait farklı inceleme örneklerine Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar konvansiyonel bakteriyolojik yöntemle identifikasyonda atık düzeyinde (n=166) değerlendirildiğinde, kültürle identifikasyon standart kabul edilerek uygulanan Modifiye m-PCR'nin sensitivite ve spesifite sonuçları, sırasıyla %94,11 ve %98,76, inceleme örnekleri organlar düzeyinde ise (n=326) sırasıyla %85,38 ve %98,06 olarak hesaplanmıştır. Derham (2015), hesaplanan test sensitivite ve spesifiteleri beraber değerlendirildiğinde sensitivite ve spesifite toplamı 170 üstü değerde olan bir testin klinik olarak yararlı bir test, toplamı 190 üstü olan bir testin ise tanısal gücü yüksek bir test olarak değerlendirilebileceğini bildirmiştir. Bu sebeple klinik materyallerden direkt PCR çalışılması durumunda elde edilen verilerle, Modifiye m-PCR yönteminin sensitivite ve spesifitesinin yüksek oranda ve birbirine yakın değerlerde olduğu ve direkt inceleme örneklerine uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlara göre, atık düzeyinde değerlendirildiğinde Modifiye m-PCR'nin tanısal gücü yüksek, bir hayvana ait organ örneklerinin herbirine göre de, klinik olarak yararlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir. İnceleme örnekleri ayrı ayrı organ olarak ele alındığında, sensitivite ve spesifitenin daha düşük olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum organlar arasında etkenin saptanmasının değişiklik göstermesine bağlanmıştır. Ancak inceleme örneği bütün olarak atık olduğunda, araştırıcı bir kaç organı materyal olarak kullanmakta ve etkeni yakalama şansını arttırmaktadır. Bu çalışmada da örnekler arasındaki spesifite ve sensitivite farkları bu durumu açıklamaktadır. Kaynak- Onurdağ ve ark. (2016)'nın yaptığı çalışmada geliştirilen PCR yöntemi için bulunan sonuçların, bruselloz tanısında altın standart yöntem olan kültür yöntemi ile doğrulamasının yapılamamış olması, önerilen yöntemin güvenilirliği açısından önemli bir eksiklik olduğunu düşündürmüştür.

Romero ve ark. (1995b), sığırlara ait süt örneklerine bruselloz tanısı için direkt PCR uygulamışlar ve sonuçları değerlendirirken yanlış negatif bakteriyolojik sonuçların, inceleme örneğinin aşırı kontaminasyonu, bazı *B. melitensis* suşlarının selektif besiyerlerinde inhibisyona uğraması veya kültür öncesi canlılığını kaybetmesine

bağlı olarak oluşabileceğini ve tüm bu şartlarda bile, bakteri DNA'sının hala PCR ile saptanabileceğini bildirmişlerdir. Büyükcangaz ve ark. (2011), kültür sonucu negatif iken PCR sonucu pozitif olan benzer durumları, örnekler arası veya canlı olmayan *Brucella* etkenleri arası çapraz kontaminasyon, kültüre olamayacak durumdaki canlı etken varlığı veya örnekte mevcut ölü bakteri varlığıyla açıklamışlardır.

Romero ve ark. (1995b), sığırlara ait süt örneklerine bruselloz tanısı için uyguladıkları direkt PCR sonuçlarını değerlendirirken, yanlış negatif PCR sonuçlarının sebebi olarak; olası PCR inhibitörlerinin varlığını, tespit limiti altındaki organizma sayısını, örnekteki hedef DNA'nın bozulmasını (degradation) ve yetersiz DNA ekstraksiyonunu göstermişlerdir. Bricker (2002), klinik örneklerden direkt yapılan PCR'ler için en yaygın sorunun PCR inhibitörlerinin ve konakçıya ait hücre DNA'larının hedef DNA ile beraber saflaştırılması olduğunu bildirmiştir. Yu ve Nielsen (2010), bruselloz tanısında kullanılan multipleks PCR metodlarının başarısı için ekstrakte edilen DNA'nın kalite ve saflığının çok önemli olduğunu, yanlış negatifliklerin inceleme örneğinde bulunan EDTA, RNaz / DNaz, heme, heparin, fenol, poliamin, polisakkarit, üre, kalsiyum alginat ve benzer ajanlar gibi PCR inhibitörleri ile oluşabileceğini, yanlış pozitif reaksiyonların ise örnek kontaminasyonu ve PCR yükleme hataları ile oluşabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada da klinik örneklerle uygulanan bu modifiye multipleks PCR sonucunda, atık bazında bir (ÖN:39), organ düzeyinde değerlendirildiğinde üç örneğin (ÖN:39A, 62K ve 120K) kültür ile negatif, direkt m- PCR ile pozitif olarak (yanlış pozitiflik) saptandığı belirlenmiştir. Bu durum diğer araştırmacıların ileri sürdüğü gibi inceleme örneklerinde mevcut *Brucella* spp.'lerin canlılığını kaybetmiş olması, *Brucella* spp.'lerin kültüre olamayacak kadar az miktarda olması ve/veya aşırı miktarda olan ve selektif agarda da üremesi engellenemeyen kontaminantların, *Brucella* spp.'lerin üremesini baskılamasıyla gerçekleştiği düşünülmüştür. Konvansiyonel bakteriyolojik yöntemle pozitif bulunduğu halde klinik örnekten direkt m-PCR sonuçları negatif bulunan organ düzeyinde 25 adet inceleme örneği için bu durum (yanlış negatiflik), ekstraksiyon aşamasında hedeflenen DNA ile beraber yüksek miktarda ökaryotik hücre ve kontaminant mikroorganizma DNA'sının ekstrakte edilmesi veya dokuda mevcut veya sonradan oluşabilen kimyasalların da ekstrakte edilerek inhibitör etki oluşturmamasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmüştür.

Araştırmacılar, *Brucella* türlerine spesifik 31kDa Bcsp'yi ve bu proteini kodlayan genetik bölgeyi hem immunolojik çalışmalar için (Mayfield ve ark. 1988) ve hemde PCR ile *Brucella* türlerinin cins seviyesinde tanısı amacıyla çalışmalarında tercih etmişlerdir. Yapılan literatür taramaları sonucunda, kültür için (Baily ve ark. 1992; Da Costa ve ark. 1996; Casanas ve ark. 2001; O'Leary ve ark. 2006; Lopes ve ark. 2014, Mukherje ve ark. 2007) insan ve hayvan kanlarından direkt identifikasyon için (Matar ve ark 1996; Queipo-Ortuno ve ark. 1997; O'Leary ve ark. 2006; Mitka ve ark. 2007; Mukherje ve ark. 2007; Erdenliş Gürbilek ve ark. 2015), süttten direkt identifikasyonda (O'Leary ve ark. 2006; Arasoğlu ve ark. 2013; Erdenliş Gürbilek ve ark. 2015) ve lenf nodüllerinden direkt identifikasyon için (O'Leary ve ark. 2006) *Brucella* spp. DNA'sının saptanmasına yönelik B4 ve B5 primerleri ile çok sayıda çalışmanın yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmada da klinik inceleme örneklerinden ekstraksiyonu yapılan DNA'lara B4 ve B5 primerlerini kullanarak, Queipo-Ortuno ve ark. (1997)'nin uyguladığı cins spesifik Bcsp31 PCR, modifiye edilerek uygulanmıştır. Ancak bu yöntemle atık fôtuslardan direkt tanıda, Moussa ve ark. (2011)'nin çalışması dışında bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Moussa ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada yedisi bruselloz şüpheli olgulardan ve 23'ü seropozitif hayvanlardan (23 doku örneğı) toplam 30 inceleme örneğini araştırmışlar, öncelikle sadece B4 ve B5 primerlerini kullanarak uyguladıkları direkt PCR ile yedi örneğın dördünü, *Brucella* spp. pozitif olarak değerlendirmişler ve sonra bu primerlerinde içinde olduğı üç çift primerli multipleks PCR uygulayarak bruselloz şüpheli yedi örnekten dördünü ve seropozitif 23 hayvana ait doku örneklerinin 21'ini PCR ile *B. melitensis* pozitif olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, B4 ve B5 primerleri ile uygulanan Bcsp31 PCR yöntemi modifiye edilerek uygulanmış, sonuçları kültür yöntemi ile karşılaştırılmış, atıklar dikkate alındığında, uygulanan Modifiye Bcsp31 PCR'nin sensitivite ve spesifite sonuçları sırasıyla %95,29 ve %98,76, organ düzeyinde inceleme örnekleri için sensitivite ve spesifite sonuçları ise sırasıyla %83,62 ve %98,06 olarak hesaplanmıştır. Moussa ve ark. (2011)'nin yaptığı çalışmada ise standart yöntem olan kültür yönteminin kullanılmaması, sonuçların karşılaştırılmaması ve PCR yönteminde ekstraksiyon aşamasından bilgi verilmemesinin çalışmanın eksikliği olduğunu düşündürmüştür.

Bu çalışmada, atık bazında ve organ düzeyinde direkt tanı amacıyla modifiye edilerek kullanılan ve ismi Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemi olarak adlandırılan PCR yönteminin sonuçları, kültür sonuçları standart kabul edilerek incelendiğinde, testlerin atık bazında hesaplanan sensitivite ve spesifite sonuçlarının birbirlerine çok yakın olduğu saptanmıştır. Bu durum 9 primer çifti kullanılan ve tür düzeyinde identifikasyonu sağlayan Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yönteminin kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Yapılan çalışmalarda tanı amacıyla kullanılan yöntemlerde (Kültür ve PCR) organların üstünlükleri incelenmiş, fetüs mide sıvısından yüksek oranda başarı sağlandığı ve bunu organların takip ettiği bildirilmiştir (Çetinkaya ve ark. 1999; Güler ve ark. 2003; Müştak ve ark. 2009; Qasem ve ark. 2014). Bu çalışmada inceleme örneklerinin birbirlerine üstünlükleri için kültür ve direkt PCR sonuçlarında saptanan pozitifliklerin sensitivite ve spesifitesi incelendiğinde, ilk sırada fetüs mide sıvısı sonra akciğer ve en son olarak da karaciğerin direkt PCR'ler için inceleme örneği olarak kullanılmasının uygun olduğu saptanmıştır. Fetüs mide sıvısından yapılan PCR'lerin başarısı, bu sıvının dokulara oranla çok sayıda *Brucella* etkeni içermesi, daha az yabancı DNA ve daha az PCR inhibitörü bileşik içerdiğine bağlanmıştır. Etkenin akciğerden, karaciğere göre daha yüksek oranda saptanabilmesi, etkenin aborte fetüs akciğerine affinite göstermesi ve sonuçta plöra-pnömoninin en yaygın rastlanılan bozukluk olmasına bağlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda kullanılan PCR'ler için minimum tespit limiti değerleri 10 fg ile 10 ng arasında olmak üzere düşük (Baily ve ark. 1992; Çetinkaya ve ark. 1992; Fekete ve ark. 1992; Mitka ve ark. 2007) ve yüksek (Sifuentes-Ringon ve ark. 1997; Arasoğlu ve ark. 2013; Qasem ve ark. 2014) değerlerde hesaplanarak bildirilmiştir. Arasoğlu ve ark. (2013), değişik PCR programlarının uygulanıyor olmasının, örnek tipi ve hazırlanmasındaki farklılıkların, muhafaza şartları ve DNA ekstraksiyon prosedürlerinin değişken olmasının bu şekilde farklı minimum tespit limiti sonuçlarına sebep olabileceğini bildirmişlerdir. Kahya ve ark. (2013), PCR'ler için belirlenen siklus sayısının, kalıp DNA konsantrasyonuna, primer uzaması ve amplifikasyonunun etkinliği (kullanılan enzimin kalitesine) ile ilgili olduğunu, az miktarda DNA ile başlandığında en fazla 40 siklus, daha fazla DNA ile başlandığında ise ideal siklus sayısının 30 olması gerektiğini, siklus sayısının fazla olmasının hatalara yol açarak spesifik olmayan ikincil

ürünlerin oluşumuna neden olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, uygulanan 3 PCR yöntemi için minimum tespit limiti değerleri birbirlerinden ve benzeri çalışmalardan farklı olarak; kültürden m-PCR için 5ng, Modifiye Mayer-Scholl m-PCR için 500pg ve Modifiye Bcsp31 PCR için 1ng olmak üzere yüksek olarak bulunmuştur. Özellikle Modifiye Bcsp31 PCR için bulunan değerin, benzer çalışmalara göre (Baily ve ark. 1992; Mitka ve ark. 2007; Arasoğlu ve ark. 2013) oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bcsp31 PCR için benzer çalışmalara göre bulunan yüksek minimum tespit limiti değerinin, PCR spesifitesini arttırmak için yapılan modifikasyonlardan birisi olan “döngü sayısının azaltılması” işlemi ile gerçekleştiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmada yapılan değişikliklerle Modifiye Mayer-Scholl m-PCR olarak adlandırılan direkt m-PCR yöntemi ile klinik örneklerden direkt *Brucella* türlerine ait DNA’ların belirlenerek tür düzeyinde identifikasyonlarının (tanısal gücü yüksek düzeyde) yapılabilmesi ortaya konmuştur. Ayrıca brusellozun çok önemli bir hastalık olması nedeniyle ve özellikle etkenin biyotip düzeyinde belirlenmesi gereken çalışmalarda, Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemine paralel, klasik yöntemleri kullanarak ekim yapılması, konvansiyonel yöntemle identifikasyona gidilmesi, belirlenmiş sonucu desteklemek, güçlendirmek amacıyla önerilebilir. Böylece Modifiye Mayer-Scholl m-PCR yöntemi sayesinde çok kısa zamanda ve tür düzeyinde sonuca ulaşılarak gerekli tedbirlerin hızla alınması sağlanabilecek, konvansiyonel identifikasyonla da, PCR ile tanının konamadığı durumlarda sonuç garanti altına alınmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdelkareem, A.A., İkiz, S. ve Ak, S. (2011). Trakya yöresinde yetiştirilen sığırların sütlerinde *Brucella* türlerinin varlığının bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırılması olarak araştırılması. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **37(1)**, 23-33.
- Adams, L.G. (2002). The pathology of brucellosis reflects the outcome of the battle between the host genome and the *Brucella* genome. *Veterinary Microbiology*, **90**, 553-561.
- Aldomy, F.M.M., Johans, K.L. ve Altarazi, Y.H. (1992). Isolation of *Brucella melitensis* from aborting ruminants in Jordan. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **107**, 239-242.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. ve Verger, J.M. (1988). *Techniques For The Brucellosis Laboratory*. Paris: INRA
- Aras, Z. ve Ateş, M. (2011). The first report of isolation and molecular characterization of *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine strain from an aborted sheep fetus in Turkey. *Small Ruminant Research*, **95**, 150-159.
- Arasoğlu, T., Güllüce, M., Özkan, H., Adıgüzel, A. ve Şahin, F. (2013). PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **43**, 501-508.
- Avila-Calderon, E.D., Lopez-Merino, A., Sriranganathan, N., Boyle, S.M. ve Contreras-Rodriguez, A. (2013). A history of the development of *Brucella* vaccines. *BioMed Research International*, **Volume 2013**, Article ID 743509, 8 pages.
- Aydın, N. (1997). Gram negatif küçük çomaklar – *Brucella* infeksiyonları. İçinde Arda, M. (Ed.), *Özel Mikrobiyoloji*. Ankara: Medisan Yayınevi; 110–125
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S. ve Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **95**, 271-275.

- Banai, M., Mayer, I. ve Cohen, A. (1990). Isolation, identification and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *Journal of Clinical Microbiology*, **28(5)**, 1057-1059.
- Bardenstein, S., Mandelboim, M., Ficht, T.A., Baum, M. ve Banai, M. (2002). Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *Pst*I site polymorphism of its *omp2* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **40(4)**, 1475-1480.
- Blasco, J.M. (2006). Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, **62**, 33-37.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chenais, B., Henault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S. ve ark. (2009). Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, bcs31 and per target genes. *Veterinary Microbiology*, **137**, 156-164.
- Bricker, B.J. ve Halling, S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **32(11)**, 2660-2666.
- Bricker, B.J. ve Halling, S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, **33(6)**, 1640-1642.
- Bricker, B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **90**, 435-446.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R. ve Halling, S.M. (2003). *Brucella* "HOOF-Prints": strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiology*, **3**, 15-27.
- Büyük, F. ve Şahin, M. (2011). Kars yöresinde atık yapan ineklerin çeşitli örneklerinden *Brucella* etkenlerinin kültürel ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve olguların epidemiyolojik analizi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **17(5)**, 809-816.

Büyükçangaz, E. ve Şen, A. (2007). The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, **1(3)**, 139-142.

Büyükçangaz, E., Şen, A. ve Kahya, S. (2009). Isolation and biotyping of *Brucella melitensis* from aborted sheep and goat fetuses. *Turkish Journal of Veterinart and animal sciences*, **33(4)**, 311-316.

Büyükçangaz, E., Şen, A., Çarli, K.T. ve Kahya, S. (2011). Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey. *Veterinary Record*, **168**, 430.

Casanas, M.C., Queipo-Orturo, M.I., Rodriguez-Torres, A., Orduna, A., Colmenero, J.D. ve Morata, P. (2001). Specificity of a polymerase chain reaction assay of a target sequence on the 31 KDa *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **20**, 127- 131.

Corbel, M.J. (1991). Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **29(5)**, 1066-1068.

Çerekçi, A., Kılıç, S., Bayraktar, M., Uyanık, M.H., Yaşar, E. ve Esen, B. (2011). *İnsan kaynaklı Brucella izolatlarının tanımlama ve tiplendirilmesinde konvansiyonel yöntemler ile gerçek zamanlı multipleks polimeraz zincir reaksiyonunun karşılaştırılması*. Erişim: 28. 09. 2016. Mikrobiyoloji Bülteni: http://www.mikrobiyolbul.org/managete/fu_folder/2011-03/html/2011-45-03-392-400.htm

Çetinkaya, B., Öngör, H., Muz, A., Ertaş, H.B., Kalender, H. ve Erdoğan, H.M. (1999). Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Veterinary Record*, **144**, 239–240.

Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiebaud, M. ve Dubray, G. (1996). Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *Journal of Applied Bacteriology*, **81**, 267-275.

De Miguel, M.J., Marin, C.M., Munoz, P.M., Dieste, L., Grillo, M.J. ve Blasco, J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**(4), 1458-1463.

Dieste-Perez, L., Blasco, J.M., De Miguel, M.J., Marin, C.M., Barberan, M., Conde-Alvares, R. ve ark. (2014). Performance of skin tests with allergens from *B. melitensis* B115 and rough *B. abortus* mutants for diagnosing swine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **168**, 161–168.

Derhem, B. (2015). *Tanı testlerinin kullanımı ve değerlendirilmesi*. Erişim: 10.10.2016. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi: [http://www.ailehekimimedicine.ankara.edu.tr/files/2015/02/Tani-Testlerinin-Kullanımı-ve-Değerlendirilmesi.pdf](http://www.ailehekimimedicine.ankara.edu.tr/files/2015/02/Tani-Testlerinin-Kullanimi-ve-Değerlendirilmesi.pdf)

Elberg, S.S. ve Faunce, K. (1957) Immunization against *Brucella* infection. VI. immunity conferred on goats by a non-dependant mutant from a streptomycin dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, **73**(2), 211-217.

El Idrissi, A.H., Benkirane, A., El Maadoudi, M., Bouslikhane, M., Berrada, J. ve Zerouali, A. (2001). Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, **20**(3), 741-747.

Erdenliğ, S. ve Şen, A. (2000). Koyun atıklarından *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **31**(2), 31-42.

Erdenliğ Gürbilek, S., Baklan, E.A. ve Aksoy, H.Y. (2014). Türkiye’ de 2007 ve 2008 yılları arasında izole edilen Brusella suşlarının identifikasyonu ve faj duyarlılıklarının saptanması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **3**(2), 67-72.

Erdenliğ Gürbilek, S., Tel, O.Y. ve Keskin, O. (2015). Brusellosis Şüpheli sürülerdeki ineklerden alınan klinik örneklerden *Brucella* spp. tanısı için PCR ve bakteriyolojik kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **4(2)**, 48-52.

Ewalt, D.R. ve Forbes, L.B. (1987). Atypical isolates of *Brucella abortus* from Canada and the United States characterized as dye sensitive with M antigen dominant. *Journal of Clinical Microbiology*, **25(4)**, 698-701.

Farrell, I.D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*, **16**, 280–286.

Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M. ve Sanborn, M.R. (1990). Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, **69**, 216-227.

Fekete, A., Bantle, J.A. ve Halling, S.M. (1992). Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **4**, 79–83.

Fensterbank, R., Verger, J.M. ve Maggy, G. (1987). Conjunktival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev-1. *Annals of Veterinary Research*, **18**, 397-403.

Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I. ve Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2688-2693.

Garcia, M.M., Brooks, B.W., Ruckerbauer, G.M., Rigby, C.E. ve Forbes, L.B. (1988). Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **52**, 338-342.

Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., De Miguel, M.J., Munoz, P.M., Vizmanos, J.L. ve 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* Rev-1. *Clinical Chemistry*, **52(4)**, 779-781.

Garrido-Abellan, F., Blasco Martinez, J.M., Duran-Ferrer, M., Garin-Bastuji, B., Macmillan, A., Minas, A. ve ark. (2001). Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*). *Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, European Commission, SANCO.C.2/AH/R23/2001*, 1-89.

Garrity, G.M. (Ed.). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (2nd ed.). Volume 2 Part C. New York: Springer Press.

Gezgen, C. ve Şeker, E. (2014). Brusellosis: Güncel Yaklaşımlar. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, **12**, 28 - 66. Erişim 24. 04. 2016, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E1OF8892433CFFA79D6F5E6C1B43FFD85653DB9EC146B4>

GKGM (2012, 13 Ocak). *Brusellanın Konjunktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi Genelge No: 2012/3*. Ankara: GTHB, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. Erişim 15. 05. 2016, <http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Genelgeler/BRUCELLA.pdf>.

Godfroid, J., Nielsen, K. ve Saegerman, C. (2010). Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*, **51**, 296-305.

Godfroid, J., Scholz, H.C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D. ve ark. (2011). Brucellosis at the animal / ecosystem / human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, **102**, 118-131.

Gopaul, K.K., Dainty, A.C., Muchowski, J.K., Dawson, C.E., Stack, J.A. ve Whatmore, A.M. (2014). Direct molecular typing of *Brucella* strains in field material. *Veterinary Record*, **doi:10.1136/vr.102674**, 1-3.

Güler, L., Gündüz, K. ve Ok, Ü. (2003). Comparition of polimerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Veterinary Microbiology*, **93**, 53-61.

Herman, L. ve De Ridder, H. (1992). Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58(6)**, 2099-2101.

Huber, B., Scholz, H.C., Lucero, N. ve Busse, H.J. (2009). Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *International Journal of Medical Microbiology*, **299**, 563-573.

İça, T., Aydın, F., Gümüşsoy, K.S., Perçin, D., Sümerkan, A.B., Ocak, F. ve ark. (2012). Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **59**, 259-264.

İlhan, Z., Aksakal, A., Ekin, I.H., Gülhan, T., Solmaz, H. ve Erdenliğ, 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. *Letters in Applied Microbiology*, **46**, 301-306.

İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Gökçe Düzgün, S., Ersoy, Y., Eskiizmirli, S., Güler, L. ve ark. (2000). Türkiye’ de sığır ve koyunlarda brucellosisin seroepidemiolojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **31(1)**, 21-75.

Jones, L.M., Berman, D.T., Moreno E., Deyoe, B.L., Gilsdorf, M.J., Huber, J.D. ve ark. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, **12(6)**, 753–760.

Kahya, S., Büyükcangaz, E. ve Çarlı, K.T. (2013). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve optimizasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **32(1)**, 31-38.

Kang, S.I., Her, M., Kim, J.W., Kim, J.Y., Ko, K.Y., Ha, Y.M. ve ark. (2011). Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **77(18)**, 6726-6728.

Karagül, M.S., Baklan, E.A., Saytekin, A.M., Yıldız Öz, G. ve Erdenliğ Gürbilek, S. (2015). Biovar distribution of *Brucella* isolates from livestock in Turkey between 2010-2014. Poster Tebliği No: 128, 32. *Dünya Veteriner Hekimler Kongresi*, 13-17 Eylül 2015, İstanbul.

Kaynak-Onurdağ, F., Ökten, S. ve Şen, B. (2016). Screening *Brucella* spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. *Journal of Dairy Science*, **99**(5), 1-7.

Leal-Klevezas, D.S., Martinez-Vazquez, I.O., Lopez-Merino, A. ve Martinez-Soriano, J.P. (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, **33**(12), 3087-3090.

Lista, F., Reubsaet, F.A.G., De Santis, R., Parchen, R.R., Jong, A.L., Kieboom, J. ve ark. (2011). Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology*, **11**, 267-278.

Lopes, E.S., Machado, V.S.L., Simoes, C.T., Garin-Bastuji, B. ve Da Costa, M. (2014). Identification of *Brucella* sp. isolated in Brasil from 1976 to 2013 by Bruce-ladder PCR. *Acta Scientiae Veterinariae*, **42**, 1242.

Lopez, G., Escobar, G.I., Ayala, S.M. ve Lucero, N.E. (2006). Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. *Veterinary Microbiology*, **116**, 232–238.

Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., De Miguel, M.J., Munoz, P.M., Jacques, I. ve ark. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species and of the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 3484–3487.

Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., De Miguel, M.J., Barquero-Caluo, E., Guzman-Verri, C. ve ark. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*, **154**, 152-155.

Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I. ve Jacob, N.R. (2008). *Brucella* isolates in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiology and Infection*, **136**, 496-503.

Marin, C.M., Alabart, J.L. ve Blasco, J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **34(2)**, 426-428.

Matar, G.M., Khneisser, I.A. ve Abdelnoor, A.M. (1996). Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-Kilodalton *Brucella* Antigen DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, **34(2)**, 477-478.

Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Golner, C., Scholz, H.C. ve Nockler, K. (2010). Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *Journal of Microbiological Methods*, **80**, 112-114.

Mayfield, J.E., Bricker, B.J., Godfrey, H., Crosby, R.M., Knight, D.J., Halling, S.M. ve ark. (1988). The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Elsevier Science Publishers B.V.*, **63**, 1-9.

Minas, A. (2006). Control and eradication of Brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, **62**, 101-107.

Mitka, S., Anetakis, C., Souliou, E., Diza, E. ve Kansouzidou, A. (2007). Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **45(4)**, 1211-1218.

Morales-Estrada, A.I., Castillo-Salto, J., Lopez-Merino, A., Morales-Garcia, M.R., Valle-Valdez, J.G. ve Contreras-Rodriguez, A. (2012). Characterization of *Brucella* species in Mexico by Bruce-ladder polymerase chain reaction (PCR). *African Journal of Microbiology Research*, **6(11)**, 2793-2796.

Morales-Garcia, M.R., Lopez-Mendez, J., Pless, R., Garcia-Morales, E., Kosanke, H., Hernandez-Castro, R. ve ark. (2015). Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico- a comprehensive investigation. *Veterinaria Italiana*, **51(3)**, 185-190.

- Moussa, I.M., Omnia, M.E., Amin, A.S., Ashgan, M.H. ve Selim, S.A. (2011). Evaluation of the currently used polymerase chain reaction assays for molecular detection of *Brucella* species. *African Journal of Microbiology Research*, **5(12)**, 1511-1520.
- Mukherjee, F., Jain, J., Patel, V. ve Nair, M. (2007). Multiple genus-specific markers in PCR assays improve the specificity and sensitivity of diagnosis of brucellosis in field animals. *Journal of Medical Microbiology*, **56**, 1309-1316.
- Munoz, P.M., Marin, C.M., Monreal, D., Gonzales, D., Garin-Bastuji, B., Diaz, R. ve ark. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12(1)**, 141–151.
- Müştak, H.K., Günaydın, E., Küçükayan, U. ve Dakman, A. (2009). Atık fetüs mide içeriklerinden konvansiyonel kültürel yöntem ve polimeraz zincir reaksiyonu ile *Brucella* spp.’nin teşhisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **20**, 35-38.
- Nasruddin, N.S., Zamri-Saad, M. ve Mazlan, M. (Tarihsiz). *Identification of Brucella melitensis using a multiplex PCR Bruce-ladder system*. Erişim: 08.10.2016. Faculty of Veterinary Medicine, University Putra Malaysia: http://www.vet.upm.edu.my/dokumen/FKUVE1_Example_for_extended_abstract.pdf
- Nicoletti, P. (2002). A short history of brucellosis. *Veterinary Microbiology*, **90**, 5-9.
- Nicoletti, P. (2010). Brucellosis: Past, present and future. *Section of Biological and Medical Sciences and Arts*, **31(1)**, 21-32.
- Ocholi, R.A., Kwaga, J.K.P., Ajogi, I. ve Bale, J.O.O. (2005). Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. *Revue Scientifique et Technique – International Office of Epizootics*, **24(3)**, 973-979.

O.I.E. *Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Chapter (Bölüm) 2.4.3. Bovine Brucellosis.* (2015). (Version adopted in May 2009). Erişim tarihi: 01. 05. 2016. World Organisation For Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINEBRUCELL.pdf

O.I.E. *Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Chapter (Bölüm) 2.7.2. Caprine and Ovine Brucellosis.* (2015). (Version adopted in May 2009). Erişim tarihi: 01. 05. 2016. World Organisation For Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.02_CAPRINE_OVINE_BRUC.pdf

O.I.E. *Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Chapter (Bölüm) 2.7.9. Ovine Epididymitis (Brucella ovis).* (2015). (Version adopted in May 2015). Erişim tarihi: 01. 05. 2016. World Organisation For Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf

O.I.E. *Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Chapter (Bölüm) 1.1.6. Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays For Infectious Diseases.* (2016). (Version adopted in May 2013). Erişim tarihi: 20. 06. 2016. World Organisation For Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf

O.I.E. *Manuel of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Chapter (Bölüm) 2.1.4. Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis) (Infection with B. abortus, B. melitensis and B. suis).* (2016). (Version adopted in May 2016). Erişim tarihi: 20. 06. 2016. World Organisation For Animal Health: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf

O.I.E. (2016, Ocak). *Hastalık Raporu / Annual Animal Health Report Notification of Turkey in 2015.* O.I.E. Annual Health Information. Erişim 17.10.2016, http://www.oie.int/Wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail

O'Leary, S., Sheahan, M. ve Sweeney, T. (2006). *Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows. *Research in Veterinary Science*, **81**, 170-176.

Pouillot, R., Garin-Bastuji, B., Gerbier, G., Coche, Y., Cau, C., Dufour, B. ve ark. (1997). The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Veterinary Research*, **28(4)**, 365–374.

Qasem, J.A., AlMomin, S., Al-Mouqati, S.A. ve Kumar, V. (2014). Characterization and evaluation of an arbitrary primed polymerase chain reaction (PCR) product for the spesific detection of *Brucella* species. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **doi:10.1016**, 1-7.

Queipo-Ortuno, M.I., Morata, P., Ocon, P., Manchado, P. ve Colmenero, J.D. (1997). Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral blood PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **35(11)**, 2927–2930.

Queipo-Ortuno, M.I., Colmenero, J.D., Reguera, J.M., Garcia-Ordenez, M.A., Pachon, M.E., Gonzalez, M. ve ark. (2005). Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **11**, 713-718.

Queipo-Ortuno M.I., Colmenero, J.D., Bravo, M.J., Garcia-Ordenez, M.A. ve Morata, P. (2008). Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **14**, 1128-1134.

Redkar, R., Rose, S., Bricker, B. ve DelVecchio, V. (2001). Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*, **15**, 43-52.

Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. ve Lopez-Goni, I. (1995a). Spesific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **33(3)**, 615-617.

Romero, C., Pardo, M., Grillo, M.J., Diaz, R., Blasco, J.M. ve Lopez-Goni, I. (1995b). Evaluation of PCR and indirect enzymelinked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, **33(12)**, 3198-3200.

Rosenberg, E. (Ed.). (2014). *The Prokaryotes*. (4th ed.). Berlin: Springer Reference

Sanchez-Jimenez, M.M., Ortiz-Roman, L.F., Castrillan-Salazar, L.L., Giraldo-Echeverri, C.A. ve Olivera-Angel, M. (2014). Application of a polymerase chain reaction test for the detection of *Brucella canis* from clinical samples of canines and humans. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, **27**, 3-11.

Sayan, M. ve Erdenliğ Gürbilek, S. (2014). Single nucleotide polymorphism analysis of the rpoB gene region for genotyping of *Brucella melitensis* strains isolated from field in Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **20(3)**, 411-415.

Saytekin, A.M., Karagül, M.S., Baklan, E.A. ve Erdenliğ Gürbilek, S. (2015). Current situation of brucellosis outbreaks in Turkey after mass vaccination started in 2012. Poster Tebliği No: 127, 32. *Dünya Veteriner Hekimler Kongresi*, 13-17 Eylül 2015, İstanbul.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaut, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S. ve ark. (2008a). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, 375-382.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Fleche, P. ve ark. (2008b). Isolation of *Brucella microti* from Soil. *Emerging Infectious Diseases*, **14(8)**, 1316-1317.

Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S. ve ark. (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **9(2)**, 153-156.

Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vernaut, G., Tomaso, H. ve ark. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, 801-808.

Schurig, G.G., Sriranganathan, N. ve Corbel, N.J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, **90**, 479-496.

Shaikh, S.A. (2011). Measures derived from a 2x2 table for an accuracy of a diagnostic test. *Journal of Biometrics and biostatistics*, **2:128**.doi:10.4172/2055-6180.1000128.

Sifuentes-Rincon, A.M., Revol, A. ve Barrera-Saldana, H.A. (1997). Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Molecular Medicine*, **3(11)**, 734-739.

Singh, A., Gupta, V.K., Kumas, A., Singh, V.K. ve Nayakwadi, S. (2013). 16S rRNA and Omp31 gene based molecular characterization of field strains of *B. melitensis* from aborted foetus of goats in India. *The Scientific World Journal*, **Volume 2013**, Article ID 160376, 7 pages.

Songer, J.G. ve Post, K.W. (2012). *Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Yayınevi.

Vicente, A.F., Antunes, J.M.A.P., Lara, G.H.B., Mioni, M.S.R., Allendorf, S.D., Peres, M.G. ve ark. (2014). Evaluation of tree formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed Research International*, **Volume 2014**, ID: 702072, 3 Pages.

Walker, R.L. (1999). *Brucella*. İçinde D.C. Hirsh ve Y.C. Zee (Ed.), *Veterinary Microbiology*. Massachusetts: Blackwell Science; 196-204

Weynants, V., Godfroid, J., Limbourg, B., Saegerman, C. ve Letesson, J.J. (1995). Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *Journal of Clinical Microbiology*, **33 (3)**, 706-712.

Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M.S., Brew, S.D. ve ark. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 4120-4128.

Yu, W.L. ve Nielsen, K. (2010). Review of detection of *Brucella* spp. by polimerase chain reaction. *Croatian Medical Journal*, **51**, 306-313.

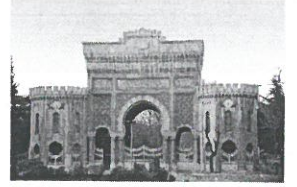
Yumuk, Z. ve O'Callaghan, D. (2012). Brucellosis in Turkey an overview. *International Journal of Infectious Diseases*, **16**, 228-235.

Zundel, E., Verger, J.M., Grayon, M. ve Michel, R. (1992). Conjunktival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine: safety and serological responses. *Annals of Veterinary Research*, **23**, 177-188.





T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2014/ 41

29/05/2014

Prof. Dr. Seyyal AK
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Veteriner Hekim Ahmet Murat SAYTEKİN'ne ait **"Ruminant Atıklarında Brusella Türlerinin Multipleks PCR ve Konvansiyonel Yöntemler İle Tanısı, Yöntemlerin Birbirleri İle Karşılaştırılması"** başlıklı projeniz; Kurulumuz üyelerince incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği"nin 8.Maddesi (k-2) bendi hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ. HADYEK Başkanı