

Kars Yöresinde Atık Yapan İneklerin Çeşitli Örneklerinden *Brucella* Etkenlerinin Kültürel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Olguların Epidemiyolojik Analizi ^[1]

Fatih BÜYÜK *  Mitat ŞAHİN *

[1] Doktora tezinden özetlenen bu araştırma Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından 2009-VF-10 nolu proje olarak desteklenmiştir

* Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-4509

Özet

Bu çalışmada, Kars yöresinde atık yapan ineklerden alınan çeşitli örneklerden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle araştırılması ve atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla brusellozise karşı aşılanmamış ve atık yapan 284 inekten alınan 265 süt ve 261 vajinal sıvap örneği ile 97 ineğe ait atık fetal doku örneği incelendi. Bakteriyolojik inceleme sonucunda 265 süt örneğinin 41 (%15.47)'inden ve 261 vajinal sıvap örneğinin 25 (%9.57)'inden ve 97 atık fetus örneğinin 40 (%41.23)'ından olmak üzere toplam 106 (%17.01) örnekten *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. İneklerin 8 (%3.30)'ünün hem süt hem de vajinal sıvap örneğinden *Brucella* spp. izole edildi. İzolatların 105 (%99.05)'i *Brucella abortus* ve 1 (%0.94)'i *Brucella melitensis* olarak tanımlandı. İzolatların tümü saha suşu olarak saptandı. 105 *B. abortus* izolatının 92 (%87.61)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 6, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 9 ve 1 (%0.95)'i *B. abortus* biyotip 1 olarak tiplendirildi. Atık fetus doku örneğinden izole edilen 1 adet *B. melitensis* suşu *B. melitensis* biyotip 3 olarak tiplendirildi. *B. abortus* olarak tanımlanan 8 suş klasik yöntemlerle biyotiplendirilemedi ve atipik *B. abortus* olarak belirlendi. *Brucella* cins spesifik PZR kiti ile tüm izolatlar *Brucella* spp. ve *Brucella* tür spesifik PZR kiti ile 105 izolat *B. abortus* ve 1 izolat *B. melitensis* olarak teyit edildi. Çalışmada, hastalık için risk oluşturabilecek epidemiyolojik faktörler incelendi ve bu faktörlerin brusella pozitifliğine katkı sağladıkları belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Brucella* spp., İnek, İzolasyon ve biyotiplendirme, PZR, Epidemiyoloji

Investigation of *Brucella* Species from Various Samples of Aborted Cattle in Kars Province (Turkey) by Cultural and Molecular Methods and Epidemiological Analysis of Cases

Summary

In this study, investigation of *Brucella* agents from various samples obtained from aborted cattle in Kars province by bacteriological and molecular methods and determination of epidemiological and clinical characteristics of cases were aimed. For this purpose 265 milk and 261 vaginal swab samples were obtained from 284 aborted cattle that were not vaccinated against brucellosis and 97 tissue samples of aborted fetuses were examined. As a result of bacteriological examination, *Brucella* spp. were isolated from total of 106 (17.01%) samples, in 41 (15.47%) out of 265 milk, 25 (9.57%) out of 261 vaginal swab and 40 (41.23%) out of 97 aborted foetus samples. *Brucella* spp. were isolated from both milk and vaginal swab samples of 8 (3.30%) cattle. Among 106 isolates, 105 (99.05%) and 1 (0.94%) were identified as *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*, respectively. All of the isolates were detected as field strains. Among 105 *B. abortus* isolates, 92 (87.61%), 2 (1.90%), 2 (1.90%), 1 (0.95%) were typed as *B. abortus* biotype 3, *B. abortus* biotype 6, *B. abortus* biotype 9 and *B. abortus* biotype 1, respectively. One *B. melitensis* strain isolated from aborted foetus tissue was typed as *B. melitensis* biotype 3. Eight *B. abortus* strains couldn't be biotyped by classical methods and they were determined as atypical *B. abortus*. All of the isolates were confirmed as *Brucella* spp. with *Brucella* genus-specific PCR and 105 isolates were identified as *B. abortus* and one isolate was identified as *B. melitensis* with *Brucella* species-specific PCR. In the study, some epidemiological factors that pose a risk for the disease were also investigated and it was found that these factors contributed to brucella positivity.

Keywords: *Brucella* spp., Cattle, Isolation and biotyping, PCR, Epidemiology



İletişim (Correspondence)



+90 474 2426836/1171



fatihbyk08@hotmail.com

GİRİŞ

Brusellozis, hayvanlarda abort ve infertilite ile karakterize olan ve *Brucella* cinsi bakteriler tarafından oluşturulan, enfeksiyöz, bulaşıcı ve önemli bir zoonotik hastalıktır ^{1,2}. Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Altkomitesi *Brucella* cinsi içerisinde; *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* ve *B. inopinata* sp. nov. adlı 10 farklı tür bildirmiştir ^{3,4}. Sığırlarda enfeksiyondan *B. abortus* sorumlu tutulmuştur ⁵. Fakat *B. melitensis* ve nadiren *B. suis*'in saptandığı sığır enfeksiyonları da mevcuttur ⁶.

Brusellozis, dünyada en yaygın zoonoz olarak kabul edilmektedir. Akdeniz Bölgesi, Orta Doğu, Batı Asya'nın gelişmekte olan ülkelerinde, Afrika ve Latin Amerika'nın bir kısmında insan ve hayvanlarda yaygınlığını sürdürmektedir ^{1,7}. Türkiye'de ve Kars yöresinde brusellozis endemik seyreden bir hastalıktır ve epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir ⁸. Kars ili ve çevresinde yapılan çalışmalarda sığır abortlarından %30-40 oranında *Brucella* spp. izole edilirken ⁹⁻¹¹, %30-70 oranında *Brucella* antikoru tespit edilmiştir ^{9,12}.

Bu çalışmada süt, vajinal sıvap ve atık fötuslardan *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu, identifikasyonu, biyotiplendirilmesi ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Kars yöresinde süt sığırlarında brusellozisin coğrafi dağılımının belirlenmesi, atık olguları ile ilgili epidemiyolojik verilerin ve klinik özelliklerin ortaya konulması ve yorumlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini, Kars ili ve ilçelerine ait işletmelerde Mart 2009 ile Mart 2010 tarihleri arasında atık yapan ve aşısız olduğu bilinen ineklere ait süt ve vajinal sıvap örnekleri ile 2005-2010 yılları (ilk iki ay) arasında teşhis amaçlı Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına getirilen atık fötüs örnekleri

oluşturdu. Örneklemeye yapılan 86 farklı işletmedeki toplam inek sayısı 4.276, boğa sayısı 47 ve koyun odağı 14 olarak saptandı. Çalışmada 284 farklı ineğin 242'sinden hem süt hem de vajinal sıvap olmak üzere toplamda 265 süt ve 261 vajinal sıvap örneği ile 97 farklı ineğin fötal doku örneği *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla incelendi (Tablo 1).

Süt ve vajinal sıvap örneklerinden direk ve Farrell Broth'da ön zenginleştirme sonrası *Brucella* selektif supplement (Oxoid, SR0083A) ilave edilmiş Farrell Agar ve *Brucella* Selektif Agar (Oxoid CM0169) ile Kanlı agara (Oxoid CM0271) ekim yapıldı. Atık fötusa ait organ ve doku örnekleri %5-10 koyun kanı ilave edilmiş kanlı agara ekildi. Tüm örnekler için ikili ekim yapılarak bir tanesi aerob diğeri ise %5-10 CO₂'li ortamda, 37°C'de 5-7 gün süre ile inkübe edildi.

Süt, vajinal sıvap ve atık fötüs örneklerinin ekim ve inkübasyonunu takiben, besiyerleri *Brucella* cinsi bakterilerin oluşturdukları koloni morfolojisi yönünden incelenerek şüpheli kolonilerden preparat hazırlandı, Gram boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopta incelendi. Gram negatif kokobasil olarak görülen etkenlerin katalaz, oksidaz ve üreaz aktiviteleri belirlendikten sonra izolatların identifikasyonu ile biyotiplendirilmesi Alton ve ark.¹³ tarafından bildirilen yöntemlere göre yapıldı. Sonuçlar, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde yapılan çalışmalar ile doğrulandı.

Bu çalışmada moleküler yöntemlerle 41 süt, 25 vajinal sıvap ve 40 fötüs *Brucella* izolatu incelenildi. Bu amaçla *Brucella* cins spesifik PZR kiti (FC BIOTEC, 0303) ve *Brucella* tür spesifik (Multiplex) PZR kiti (FC BIOTEC, 0301) kullanıldı. DNA ekstraksiyonu daha önce bildirilen ¹⁴ kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapıldı. Her bir örnek için 0.2 ml'lik tüpler içerisinde hazır olan 45 µl'lik reaksiyon karışımına 5 µl DNA ekstraktı eklendi ve amplifikasyon işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

Atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerin değerlendirilmesi amacıyla modifiye bir kesitsel çalışma

Tablo 1. Yerleşim yerlerine göre incelenen örnek cinsi ve sayısı

Table 1. Types and the number of samples examined according to locations

Bölge	İşletme Sayısı	Süt	Vajinal Sıvap	Fötüs
Akyaka	5	7	0	6
Arpaçay	8	0	0	13
Digor	5	4	2	8
Kağızman	4	3	2	8
Merkez	42	187	197	38
Sarıkamış	3	2	0	6
Selim	10	54	55	9
Susuz	9	8	5	9
Toplam	86	265	261	97

şeklinde yürütülen bu araştırmada, örnekleme küme örnekleme yöntemi ile yapıldı. Araştırma verilerinin analizi bilgisayar ortamında Minitab paket programı (Minitab Release 12.1 for Windows, State College, PA) kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde yüzdelik oran ve Ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Bakteriyolojik inceleme sonucu 265 süt örneğinin 41 (%15.47)'inden, 261 vajinal sıvı örneğinin 25 (%9.57)'inden ve 97 fötüs örneğinin 40 (%41.23)'ünden *Brucella* spp. izolasyonu yapıldı. Çalışmada 8 (%3.30) hayvana ait hem süt hem de vajinal sıvı örneğinden *Brucella* spp. izole edildi. Süt ve vajinal sıvı örneklerinden ön zenginleştirme öncesi ve sonrası en çok izolasyon Farrell Agarda bunu takiben *Brucella* Agar ve Kanlı Agarda yapıldı. Örneklerin 24 (%36.36)'ü Farrell Broth'da zenginleştirmeyi takiben katı besiyerlerinde kültür sonucu üretildi. Çalışmada en fazla izolasyon fetal atığı takiben 3 ile 30. gün arasında alınan örneklerden, en az izolasyon ise 91. günden sonra alınan örneklerden yapıldı (Tablo 2).

Süt ve vajinal sıvı örneklerinin ekimi sonucunda 4-5. günlerde oluşan kolonilerin *Brucella* A ve M antiserumu ile yapılan aglütinasyon testinde 1 adet süt izolatu hariç (A antiserumu ile negatif ve M antiserumu ile pozitif), tüm izolatlar A antiserumu ile pozitif ve M antiserumu ile negatif aglütinasyon reaksiyonu verdiler. Ayrıca nötral akriflavin solüsyonu ile yapılan aglütinasyonda tüm izolatlar smooth koloni yapısı gösterdiler. Süt ve vajinal sıvılardan izole edilen ve *Brucella* spp. olarak tanımlanan 66 izolatu tümü Tbilisi Fajı'nın rutin test dilüsyonu (RTD) ve 10⁴xRTD ile lizis oluşturmaları nedeniyle *B. abortus* olarak tanımlandı. Ayrıca izolatların 63'ü ilk izolasyonlarında %5-10 CO₂'li

ortamda üredi ve 64'ü H₂S pozitif saptandı. Atık fötuslardan izole edilen 31 suş A antiserumu ile ve 1 suş M antiserumu ile pozitif reaksiyon oluşturdu. İzolatların 25'inin smooth ve 7'sinin kısmı rough koloni yapısında olduğu saptandı. Atık fötüs doku örneklerinden izole edilen ve *Brucella* spp. olarak tanımlanan bir izolat, ilk izolasyonda aerob ortamda üremesi, H₂S testinin negatif olması ve Tbilisi Fajı'nın RTD ve 10⁴xRTD ile lize olmaması nedeniyle *B. melitensis* olarak tanımlandı.

Biyotiplendirme çalışmaları sonucu süt izolatlarının 37 (%90.24)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%4.87)'si *B. abortus* biyotip 6, 1 (%2.43)'i *B. abortus* biyotip 1 ve 1 (%2.43)'i *B. abortus* biyotip 9; vajinal sıvı izolatlarının tümü *B. abortus* biyotip 3; atık fötüs izolatlarının 30 (%96.77)'u *B. abortus* biyotip 3 ve 1 (%3.22)'i *B. abortus* biyotip 9 olarak belirlendi. Atık fötüstan izole edilen 1 adet *B. melitensis* suşu ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Çalışmada fötuslardan izole edilen ve konvansiyonel yöntemlerle *B. abortus* olarak tanımlandı. Çalışmada 105 *B. abortus* izolatının tamamı ve 1 adet *B. melitensis* izolatu saha suşu olarak belirlendi.

Süt, vajinal sıvı ve atık fötüs örneklerinden izole ve tanımlandı. 106 izolatu *Brucella* cins spesifik PZR kiti ile yapılan analizi sonucunda yaklaşık 250 bp'lik bantların görülmesi ile tüm izolatlar *Brucella* spp. olarak belirlendi (Şekil 1a). Süt, vajinal sıvı ve atık fötüs örneklerinden izole ve tanımlandı. 106 izolatu *Brucella* cins spesifik PZR kiti

Tablo 2. Atık sonrası örnek alma zamanı ve izolasyon oranları

Table 2. The sampling time after the abortion and isolation rates

<i>Brucella</i> spp. İzolasyon Durumu	3-30. Gün	31-60. Gün	61-90. Gün	91-120. Gün	121. Gün Sonrası	Toplam
İzole edilen	32	17	5	2	2	58
İzole edilemeyen	46	73	41	28	38	226
Toplam	78	90	46	30	40	284

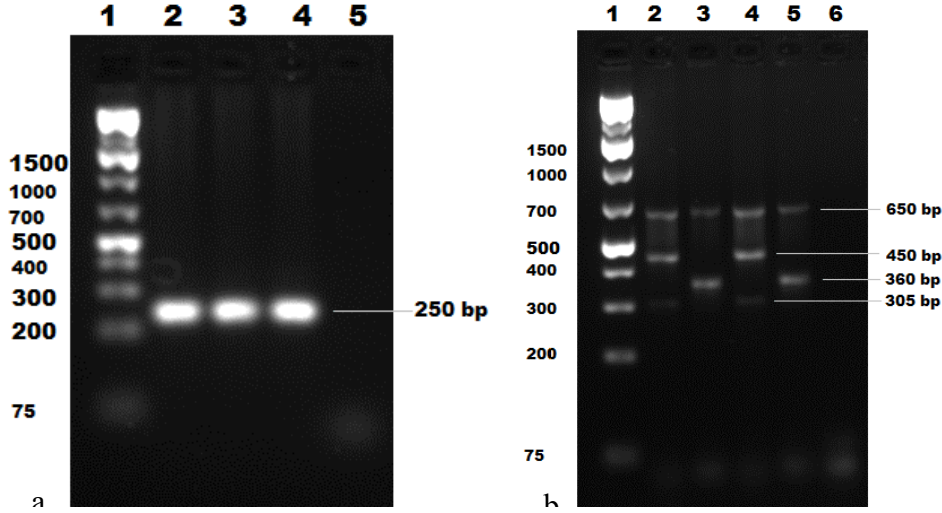
Tablo 3. *Brucella* izolatlarının biyotip dağılımı ve üreme özellikleri

Table 3. Biotype distribution and growth characteristics of *Brucella* isolates

Biyotip	İzolat Sayısı	Örnek Türü	CO ₂	H ₂ S	Tionin	B. Füksin	A Serum Agl.	M Serum Agl.	Tbilisi Fajı
<i>B. abortus</i> biyotip 1	1	Süt	+	+	-	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 3	92	Süt (37) V. sıvı (25) Fötüs (30)	+	+	+	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 6	2	Süt	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. abortus</i> biyotip 9	2	Süt (1) Fötüs (1)	-	+	+	+	-	+	+
<i>B. melitensis</i> biyotip 3	1	Fötüs	-	-	+	+	+	+	-
Atipik <i>B. abortus</i>	8	Fötüs	+	+	-/+	+	-/+	+	-/+

ile *Brucella* spp. olduğu doğrulanan 105 adet *Brucella* spp. suşunun tümü *Brucella* tür spesifik PZR kiti ile 650, 450 ve 305 bp boyutunda bant profilleri göstererek *B. abortus*, klasik yöntemlerle *B. melitensis* olarak tanımlanan 1 adet suş ise 650 ve 360 bp boyutunda iki bant profili vererek *B. melitensis* olarak belirlendi (Şekil 1b).

yol açan enfeksiyöz bir hastalık olarak güncelliğini korumaktadır^{15,16}. Dünyanın birçok ülkesinde ve Türkiye'de ineklerde abortlara neden olan etkenlerin teşhisine yönelik birçok çalışma yapılmıştır^{10,17,18}. Peter¹⁹, abort olgularının ancak %50-65'inin etiyolojisinin belirlenebildiğini ve bunların %50-65'inin bakteriyel, %15-25'inin viral ve %20



Şekil 1. Brucella cins ve tür spesifik PZR sonuçları

a: Brucella cins spesifik PZR sonuçları, 1 nolu kolon; Moleküler ağırlık marker (1 kb DNA ladder, Fermentas, Litvanya), 2 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. abortus* 544), 3 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. melitensis* 16M), 4 nolu kolon; izolat, 5 nolu kolon; negatif kontrol **b:** Brucella tür spesifik PZR sonuçları, 1 nolu kolon; Moleküler ağırlık marker (1 kb DNA ladder, Fermentas, Litvanya), 2 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. abortus* 544), 3 nolu kolon; pozitif kontrol (*B. melitensis* 16M), 4 nolu kolon; *B. abortus* saha izolatu, 5 nolu kolon; *B. melitensis* saha izolatu, 6 nolu kolon; negatif kontrol

Fig 1. The results of Brucella genus and species-specific PCR

a: Results of Brucella genus-specific PCR, lane 1; molecular weight stand (1 kb DNA plus ladder, Fermentas, Lithuania), lane 2; positive control (*B. abortus* 544), lane 3; positive control (*B. melitensis* 16M), lane 4; isolate, lane 5; negative control **b:** Results of Brucella species-specific PCR, lane 1; molecular weight stand (1 kb DNA plus ladder, Fermentas, Lithuania), lane 2; positive control (*B. abortus* 544), lane 3; positive control (*B. melitensis* 16M), lane 4; *B. abortus* field isolate, lane 5; *B. melitensis* field isolate, lane 6; negative control

Atık olgularının epidemiyolojik ve klinik özelliklerine bakıldığında en fazla örnek alınan ve *Brucella* spp. izolasyonu yapılan hayvanlar arasında Montofon melezi, 5 yaş, 1 veya en fazla 3 defa gebelik geçiren, önceki yıllardaki gebelikleri normal sonuçlanan, boğa ile gebe kalan ve 7 ile 9. aylar arasında atık yapan ineklerin çoğunlukta olduğu belirlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde hastalık yönünden sayılan bütün bu risk faktörleri ile brusellozis görülme sıklığı arasındaki ilişki önemli ($P < 0.05$) bulundu. Çalışmada ineklerde abort haricinde klinik belirti olarak metritis (%8.66), retensio sekundarum (%6.29), infertilite (%1.57) ve mastitis (%1.57) saptandı. Çalışmada sadece 97 ineğe ait fötüs örneğinin patolojik incelemesi yapıldı. Olguların çoğunda fötusta şişkinlik, deri altı ödem ve pnömoni tablosuna rastlandı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Brusellozis, gelişmekte olan ülkelerde insan ve hayvan sağlığını olumsuz etkileyen ve büyük ekonomik kayıplara

-25'inin mantar enfeksiyonlarından kaynaklandığını bildirmiştir. Abort olgularında bakteriyel etken olarak sıklıkla *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Chlamydia abortus*, *Salmonella* spp., *Leptospira* spp. gibi mikroorganizmalar izole edilmiştir^{10,16,19-21} ve olguların çoğunda *Brucella* türlerinin ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir^{19,22}. Ülkemizde yapılan araştırmalarda özellikle Kars ve yöresinde brusellozisin endemik olduğu ortaya konulmuştur^{9,15,16,23}. Bu çalışmada ineklerden %25.72 oranında *Brucella* izolasyonu yapıldı. Bu bulgular yörede yapılan ve brusellozisin endemik olduğunu vurgulayan çalışmaların^{9,15,16,23} sonuçlarına benzer niteliktedir.

Hayvanlarda brusellozisin teşhisine yönelik çalışmalar daha çok kan serumu^{9,15} ve süt örneklerinin²⁴⁻²⁶ serolojik ve atık fötüs materyallerinin^{17,21,23} kültürel incelenmesi şeklindedir. İnsanlar için önemli bir bulaşma kaynağı olan süt ve süt ürünleri ile vajinal akıntıdan etken izolasyonuna yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır^{26,27,29}. Kültürel çalışmalarda seropozitif inek sütlerinden^{24,28} %30-88 oranında *Brucella* spp. izole edilirken, sürü taramasının yapıldığı

çalışmalarda ^{26,29} bu oran süt örnekleri için %4-8 ve vajinal sıvay örnekleri için %6-10 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada süt örneklerinin 41 (%15.47)'inden, vajinal sıvay örneklerinin 25 (%9.57)'inden *Brucella* spp. izole edildi. Bu izolasyon oranları seropozitif inek sütlerinde yapılan çalışmaların ^{24,28} oranlarına göre düşüktür. Seropozitif ineklerden daha fazla *Brucella* spp. izolasyonunun beklenen bir durum olması bu çalışmadaki izolasyon oranlarının daha düşük olmasının sebebi olarak gösterilebilir. Bu çalışmadaki izolasyon oranları sürü taramasının yapıldığı çalışmalara ^{26,29} oranla daha fazladır. Bu durum çalışmada incelenen örneklerin tamamının yavru atan ineklerden alınması ve brusellozisin yörede endemik seyretmesi gerçeği ile açıklanabilir. Bu çalışmada 8 ineğe ait süt ve vajinal sıvay örneğinden eş zamanlı olarak *B. abortus* izole edildi. Bu bulgular ineklerin abort sonrası süt, fütal sıvılar, uterus ve vajinal akıntıları gibi çeşitli salgıları ile *Brucella* etkenlerini eş zamanlı olarak çıkarabileceğini göstermektedir.

Brucella etkenleri atığı takiben fütusa ait doku ve organlarda yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Bu tür örneklerin kültürünün yapılması izolasyon şansını artırmaktadır ³⁰. Atık fütus doku örneklerinden *Brucella* etkenlerinin izolasyonuna yönelik birçok çalışma ^{10,11,17,21,23} yapılmıştır. Sağlam ve ark.¹⁰ Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi'nden alınan 96 atık inek fütusunu etiyolojik ve patolojik olarak incelemişler ve örneklerin 40 (%41.6)'ından *Brucella* spp. izole etmişlerdir. Şahin ve ark.¹¹ Kars yöresinde 87 atık inek fütusunu bakteriyolojik olarak incelemişler ve 35 (%40.22)'inden *B. abortus* izole ve identifiye etmişlerdir. Bu çalışmada 97 atık fütus örneği *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla incelendi ve örneklerin 40 (%41.23)'ünden *Brucella* spp. izole edildi. Bu bulgular brusellozisin endemik seyrettiği Kars yöresinde daha önce yapılan çalışmaların ^{10,11} sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Brucella etkenlerinin izolasyonunda örneklerin uygun bir katı besiyerine direk inokulasyonu en yaygın yöntemlerden birisidir. *Brucella* türlerinin çoğu kanlı agar, çikolata agar, triptik soya agar gibi standart katı besiyerinde ürerler. Fakat kontamine doku veya sekresyonlardan etken izolasyonunda Martin-Lewis, Farrell Besiyeri gibi selektif besiyerleri ve %5 at serumu ile zenginleştirilmiş genel besiyerleri kullanılabilir ^{31,32}. *Brucella* mikroorganizmasının düşük seviyede bulunduğu süt, kolostrum ve bazı doku örneklerinde etken izolasyonunda zenginleştirme önerilmektedir. Zenginleştirme, serum dekstroz broth, triptoz broth, soya broth veya *Brucella* broth gibi besiyerlerine birkaç antibiyotik ilavesi ile elde edilebilir ³². *Brucella* etkenlerinin üretilmesinde çeşitli besiyerlerinin etkinliklerinin değerlendirildiği birçok araştırma ^{24,25,28} mevcuttur. Bu çalışmada *Brucella* etkenlerinin izolasyonu amacıyla Farrell Agar, *Brucella* Agar ve Kanlı Agar kullanılmış ve en yüksek izolasyon Farrell Agarda elde edilmiştir. Bu sonuçlar, *Brucella* etkenlerinin üretilmesinde çeşitli besiyerlerinin etkinliklerinin değerlendirildiği araştırmaların ^{25,28} sonuçları ile benzer niteliktedir. Ayrıca çalışmada elde edilen izolat-

ların 24 (%36.36)'ünün Farrell Brothta zenginleştirmeyi takiben izole edilmiş olması *Brucella* etkenlerinin izolasyonunda ön zenginleştirmenin önemini vurgulayan araştırmalarla ^{24,28} uyum içerisinde.

Bruselloziste atığı takiben genellikle ilk haftalarda süt ve vajinal akıntı gibi sekretlerle *Brucella* türleri yoğun bir şekilde atılmakta ve ilk 6 haftalık sürede en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bazı çalışmalarda etkenin sütle yıllarca (7-9 yıl) atıldığı bildirilmiştir ^{33,34}. Bu çalışmada süt ve vajinal sıvay örneklerinin büyük bir kısmı (%59.15) atık sonrası 3 ile 60. günler arasında alındı. Atığı takiben *Brucella* etkenlerinin çeşitli sekretlerle ilk 6 haftalık dönemde yüksek oranda atıldığı gerçeğine uygun bir şekilde, bu dönemler içerisinde alınan örneklerde daha fazla *Brucella* spp. izole edildi. Atığı takiben örnek alma zamanı ile etken izolasyon oranı arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli ($P < 0.05$) bulundu. Çalışmada atığı takiben 90 gün sonra ve hatta birkaç olguda 1 yıl sonra bile etkenin izole edilebilmesi, etkenin uzun yıllar süt ile atılabileceğini göstermektedir.

Hayvanlardan izole edilen *Brucella* türleri ve biyovarları ülkeden ülkeye farklılık gösterebileceği gibi bir ülkenin değişik bölgeleri arasında da farklılık gösterebilir. Hastalığa neden olan baskın *Brucella* tür ve biyovarlarının belirlenmesi enfeksiyonun epidemiyolojisi ve kontrol çalışmaları açısından oldukça önemlidir. Türkiye'de sığır ve koyun brusellozis etkenlerinin biyotiplendirilmesine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur ^{16,17,20,21,35}. Çalışmaların sonucunda Türkiye'de ^{17,20} ve Kars yöresinde ^{16,21} sığırlarda atıklara sebep olan baskın suşların *B. abortus* biyotip 1 ve 3 olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada izole edilen 105 *B. abortus* suşunun 92 (%87.61)'si *B. abortus* biyotip 3, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 6, 2 (%1.90)'si *B. abortus* biyotip 9 ve 1 (%0.95)'i *B. abortus* biyotip 1 olarak tiplendirildi. Fütus doku örneğinden izole edilen bir adet *B. melitensis* suşu ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak belirlendi. Bu sonuçlar Türkiye'de yapılan identifikasyon ve biyotiplendirme çalışmalarının ^{17,20,26,35} sonuçlarıyla farklılık göstermektedir. Bunun nedeni olarak çalışılan bölgelerin ve materyallerin farklı olması gösterilebilir. Kars yöresinde sığırlarda görülen brusellozis olgularında diğer çalışmalara ^{16,21,29} benzer şekilde bu çalışmada da *B. abortus* biyotip 3'ün baskın olduğu fakat *B. abortus* biyotip 1'in oranının giderek azaldığı belirlendi. Çalışmada ayrıca Türkiye'de varlığı daha önce bildirilen ^{35,36} *B. abortus* biyotip 6 ve *B. abortus* biyotip 9, Kars yöresinde ilk kez saptandı. Araştırmaların yapıldığı zaman periyotlarının farklı olması ve yörede yoğun hayvan hareketleri nedeniyle değişik zamanlarda hastalığa neden olan tür ve biyotiplerin değişebilme potansiyeli bu farklılıkların nedenleri olarak düşünülmektedir.

Brucella türlerinin geniş konak çeşitliliği vardır. Fakat enfeksiyonların patojenitesinde çok sıkı bir konak spesifitesi görülür ve türler arasında kros enfeksiyon oldukça nadirdir. Enfekte koyun ve keçilerle temas halinde olan,

aynı ortamlarda barındırılan ve aynı meralarda otlatılan ineklerin *B. melitensis* ile enfekte olabilecekleri bildirilmiştir³⁷. Bu çalışmada sığır kökenli süt, vajinal sıvı ve fötüs doku örneklerinden izole edilen toplam 106 *Brucella* suşunun identifikasyon çalışmaları sonucu 105'i *B. abortus* ve bir izolat *B. melitensis* olarak belirlendi. *B. melitensis*'in izole edildiği fötüsün alındığı işletmedeki ineklerin 4-5 adet keçi ile birlikte barındırıldığı bildirildi. Kars yöresinde yapılan diğer çalışmaların^{16,21,29} sonuçlarına benzer bir şekilde bu çalışmada da sığır brusellozisininden çoğunlukla *B. abortus* saptandı. Ayrıca yörede varlığından daha önce bahsedilmiş²² olmasına rağmen sığır abort olgularından gerçek anlamda ilk *B. melitensis* izolasyonu yapıldı. Daha önce bildirilenlere^{20,37} benzer şekilde bu çalışmada da *B. melitensis*'in sorumlu olduğu sığır abort vakası saptanmıştır. Bu durumun işletmede farklı hayvan türlerinin bir arada beslenmesi ve yakın temasından kaynaklanabileceği ihtimalini akla getirmiştir. Odaktaki ineklerin keçiler ile beraber barındırılması, *B. melitensis*'in keçilerden bulaşabileceği ihtimalini kuvvetlendirmiştir. Fakat keçilerde brusellozis yönünden herhangi bir mikrobiyolojik yoklama yapılmadığı için bu ihtimal kesinlik kazanmamıştır.

Brucella türleri arasındaki genetik homojenite yüksek olmasına rağmen bazı metabolik ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak tür ve biyotip tayini yapılabilmektedir. Fakat konvansiyonel şemaya uymayan yeni ve atipik *Brucella* varyantlarının ortaya çıkması nedeniyle Uluslararası Sistemik Bakterioloji Komitesi *Brucella* Taksonomisi Altkomitesi halen *Brucella* için iyi bir klasifikasyon şeması oluşturamamıştır³⁸. Çeşitli araştırmalarda penisilin duyarlı ve bakteriyofaj dirençli smooth *B. abortus* kültürlerinin^{39,40} yanı sıra boya duyarlı, M antijene sahip *B. abortus* izolatları da bildirilmiştir⁴¹. Bu çalışmada yapılan biyotiplendirme sonucunda 105 *B. abortus* suşunun 8 (%7.61)'i standart biyotiplendirme profiline uygun olarak tiplendirilemedi ve atipik *B. abortus* suşları olarak belirlendi. Bu bulgular yapılan diğer çalışmaların^{39,40,42} sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere bir ülke ya da bölgede standart biyotiplendirme şemasına uymayan atipik izolatların görülmesi her zaman olasıdır. Bu tür izolatların tekrarlayan izolasyonlarının yapılması, ileride bu izolatlarla yeni bir biyotip statüsü verilmesinin ilk aşamasıdır ve bunlar epidemiyolojik araştırmalarda değerli veriler oluştururlar.

Brucella etkenlerinin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanmasında karşılaşılan bazı güçlükler nedeniyle son yıllarda insan ve hayvanlardan brusellozisin tanısı ve cins, tür ve biyotip düzeyinde identifikasyonuna yönelik moleküler teknikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır^{43,44}. Bu tekniklerden *in vitro* DNA amplifikasyonunun yapıldığı PZR yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu teknik, örneklerin kültürünü takiben izolatlar üzerine⁴⁵ uygulanabileceği gibi izolasyona gerek duyulmadan kan, süt, vajinal akıntı, atık fötüs doku örneklerinden etkenin aranmasına yönelik direk PZR¹⁸ şeklinde de yapılabilmektedir. Bu çalışmalar ile

brusellozisin teşhisinde PZR'nin daha hızlı, güvenli, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada izole edilen 106 *Brucella* suşunun cins spesifik PZR kiti ile yapılan analizi sonucu tümü *Brucella* spp., multipleks PZR kiti ile yapılan analiz sonrası 105'i *B. abortus* ve 1'i *B. melitensis* olarak belirlendi. Kültürel sonuçlarla *Brucella* cins ve tür spesifik PZR kitleri karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar aynı bulundu. Brusellozisin teşhisinde altın standart olarak kabul edilen bakteri izolasyonu ile moleküler teşhis amaçlı kullanılan bu PZR kitlerinin benzer sonuçlar vermesi, bu kitlerin spesifitelerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Klasik identifikasyon yöntemlerine göre daha kolay ve kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle tercih edilebilir niteliktedir.

Bruselloziste olası enfeksiyon kaynaklarının ve risk faktörlerinin belirlenmesi sonraki epidemilerin önlenmesi açısından oldukça önemlidir ve buna yönelik birçok çalışma yapılmıştır^{7,46,47}. Bu çalışmalarda^{7,46,47} daha çok sürü büyüklüğü, şekli, idaresi, hijyen ve biyogüvenlik açısından risk değerlendirmesi yapılmış ve sayılan tüm bu faktörler brusella seropozitifliği için birer risk olarak düşünülmüştür. Yaş, ırk, cinsiyet ve abort varlığı gibi faktörlerin ise bireysel seropozitiflik açısından farklı etkilerinin olabileceği ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada hastalık yönünden risk oluşturabilecek yaş, gebelik sayısı, geçen yıllara ait atık varlığı, tohumlama şekli ve atığın gerçekleştiği gebelik dönemi gibi faktörler değerlendirildi. İneklerin yaş dağılımına bakıldığında en fazla atık yapan ve izolasyon yapılan yaş 5 yaş olarak belirlendi ve yaş ile brusellozis görülme sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) bir ilişki saptandı. Bunun nedeni olarak yaşlı hayvanların verim düşüklüğü ve tekrar atık yapma olasılıkları nedeniyle işletmelerde tutulmaması ve dolayısıyla örnekleme esnasında yaşlı hayvan bulma olasılığının az olması şeklinde açıklanabilir. Çalışmada 1 veya en fazla 3 defa gebelik geçirenlerde brusellozis daha fazla saptandı ve brusellozis ile gebelik sayısı arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) bulundu. Bu durum hayvanların yaşları, döl verimi özellikleri ve dolayısıyla hayvanların üretime devam etmek için elde tutulabilirlikleri ile ilişkilendirilmiştir.

Bruselloziste ilk atığı takiben genellikle sonraki gebelikler normal doğum ile sonuçlanır. Fakat bazen ilk atığı takiben 2 veya 3 yıl üst üste veya aralıklı olarak atıklar şekillenebilir³². Bu çalışmada önceki yıllarda gebelikleri normal sonlanan 290 hayvan olmasına rağmen, atık yapan 23 ve çeşitli infertilite problemleri olan 7 hayvan belirlendi. Geçmiş yıllarda atık yapan ve infertilite problemleri olan hayvanlar hariç büyük bir çoğunluğunun ilk kez atık yaptığı tespit edildi. Çalışmada aynı zamanda 27 ineğin ilk gebeliklerinde atık yaptığı belirlendi. Bu bulgular ile yukarıda açıklanan hipotez doğrulanır niteliktedir.

Çalışmada atık yapan ineklerin tohumlama şekilleri ile atık ve izolasyon oranları karşılaştırıldı ve aralarında

istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bir ilişki saptandı. Doğal aşım ile gebe kalan 357 inek ve sun-i tohumlama yapılan 24 inek saptandı. Çalışmadaki tüm işletmelerde toplam 47 adet boğa ve bu boğaların çoğunun ortak kullanıldığı bildirildi. Bu bulgular brusellozis gibi veneral yolla bulaşabilecek hastalıklarda doğal aşım ile etkenlerin daha fazla bulaşabileceği gerçeğiyle uyum içerisindedir.

Brusellozis genellikle ineklerde gebeliğin son üç aylık döneminde atıklara sebep olmaktadır. Bunun yanı sıra gebeliğin ilk dönemlerinde erken embriyonik ölümlere ve atıklara sebep olabileceği gibi gebeliğin sonlanmasına yakın ölü doğum veya cansız, yaşama gücü zayıf canlı buzağı doğumları da görülebilmektedir^{6,32}. Bu çalışmada atık ve izolasyon oranları ile ineklerin gebelik dönemleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) bulundu. En fazla izolasyon 7 ile 9. aylar arası, bunu takiben sırasıyla 4 ile 6. aylar arası ve 1 ile 3. aylar arasındaki gebelik dönemlerinde yapıldı. Çalışmada ayrıca ölü doğum (21 inek) ve zayıf buzağı doğumu (13 inek) yapan ineklerden de örnekleme yapıldı ve *Brucella* izole edildi. Bu bulgular brusellozisin ineklerde özellikle gebeliklerinin son üç aylık döneminde daha fazla görüldüğü ve önemli derecede abortlara yol açtığı gerçeği ile uyum içerisindedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Kars yöresindeki ineklerden %25.72 oranında *Brucella* izolasyonu yapılmış ve hastalığın yörede endemik olduğu bir kez daha ortaya konulmuştur. Sığır brusellozisinin bu yüksek prevalansı ve insan brusellozis vakalarının yıllar içerisinde giderek artması, yörede ve ülke genelinde brusellozise yönelik eradikasyon programları ve uygulamalarının yetersiz kaldığını düşündürmekte ve brusellozisin ülkemizde hem insan sağlığına hem de hayvancılık sektörüne olumsuz etkileri nedeniyle önemli bir sorun olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu sorunun bilincinde olarak, brusellozisin eradikasyonu konusunda çok sayıda disiplinin bir arada programlı bir şekilde çalışması gerekmektedir. Zoonotik hastalıkların insanlara bulaşmasının önlenmesinde temel görev veteriner hekimlerin olmasına rağmen insanlarda ve hayvanlarda brusellozisin kontrolü tıp ve veteriner doktorlarının öncelikli konularından birisi olmalı ve ortaklaşa çalışmalar yürütülmelidir. Bu tür kesit çalışmalarda zaman sıkıntısı olduğundan brusellozis ile ilgili risk faktörlerinin belirlenmesinde büyük öneme sahip kohort çalışmalarının sayılarının artırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Corbel MJ:** Brucellosis: An overview. *Emerging Infect Dis*, 3 (2): 213-221, 1997.
- Ray WC:** Brucellosis (due to *Brucella abortus* and *B. suis*). In, Steele JH (Ed): Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases. pp. 99-127. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1979.
- De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM:** Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol*, 46, 43-49, 2008.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK:** *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 801-808, 2010.
- Corbel MJ, Banai M:** Genus I. *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL. In, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed., Vol. 2 (Part C). pp. 370-386, Springer, New York, 2005.
- WHO:** Brucellosis in human and animals. 2006. <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>. Accessed: 22.08.2010.
- Tun TN:** Prevalence survey of bovine Brucellosis (*Brucella abortus*) in dairy cattle in Yangon, Myanmar. Master of Veterinary Public Health, Chiang Mai University and Freie Universität, Berlin, 2007.
- Erdenliç S:** Türkiye'de *Brucella* kökenleri. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 30 Mart - 03 Nisan İstanbul, 2003.
- Genç O, Otlu S, Şahin M, Aydın F, Gökçe Hİ:** Seroprevalence of Brucellosis and Leptospirosis in aborted dairy cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 359-366, 2005.
- Sağlam YS, Türkütanıt S, Taştan R, Bozoğlu H, Otlu S:** Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden incelenmesi. *Vet Bil Derg*, 14 (2): 133-145, 1998.
- Şahin M, Atabay Hİ, Otlu S, Ünver A, Çelebi Ö:** Kars ve çevresinde bulunan insan, sığır ve koyunlarda Brusellozisin prevalansının serolojik ve kültürel metotlarla araştırılması. VI. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 14-16 Eylül Elazığ, 2004.
- Güllüce M:** Kars ve Çevresinde Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. *Doktora Tezi*. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kars, 1993.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM:** Techniques for the brucellosis laboratory. pp.17-62. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 1988.
- Unver A, Atabay Hİ, Güneş V, Çitil M, Erdoğan HM:** Kars Yöresinde sığır tüberkülozünün yaygınlığının PCR ile belirlenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 13 (1): 27-31, 2007.
- Otlu S, Şahin M, Atabay Hİ, Ünver A:** Serological investigation of brucellosis in cattle, farmers and veterinarians in the Kars district of Turkey. *Acta Vet Brno*, 77, 117-121, 2008.
- Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlu S:** Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 40 (4): 281-286, 2008.
- Erdoğan I, Gurel A, Tekin C, Uyanık F, Bitgel A:** Detection and distribution of bacterial abortion in sheep, goats and cattle in the Thrace region. *J Pendik Vet Microbiol*, 24, 23-35, 1993.
- Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP:** Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol*, 33 (12): 3087-3090, 1995.
- Peter AT:** Abortions in dairy cows: New insights and economic impact. *Adv Dairy Technol*, 12, 233-244, 2000.
- Buyukcangaz E, Sen A:** The first isolation of *Brucella melitensis* from bovine aborted fetus in Turkey. *J Biol Environ Sci*, 1 (3): 139-142, 2007.
- Genc O, Kamber U:** Biotyping of *Brucella* strains isolated from abortions of cows in Kars province. *Ind Vet J*, 81, 1164-1165, 2004.
- Unver A, Erdoğan HM, Atabay Hİ, Şahin M, Güneş V, Çitil M, Gökçe Hİ:** Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12 (2): 121-127, 2006.
- Aydın F, Leloğlu N, Şahin M, Otlu S:** Kars yöresinde sığır ve koyunlarda görülen abortların bakteriyolojik yönden araştırılması. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 27-29 Eylül, Ankara, Türkiye, s. 47. 1994.
- Brodie J, Sinton GP:** Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *J Hyg Comb*, 74 (3): 359-367, 1975.
- Farrell ID, Robertson L:** A comparison of various selective media,

including a new selective medium for the isolation of *Brucellae* from milk. *J Appl Bact*, 35, 625-630, 1972.

26. İlhan Z, Keskin O, Sareyyüpoğlu B, Kökçü L, Akan M: Bir sığırcılık işletmesinde *Brucella abortus* epidemisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 257-262, 1999.

27. Karasoy MH: Brucellosis'li koyunlardan elde edilen sütlerden yapılan peynirlerde *Brucella melitensis*'in dayanma süresi üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 8 (1): 105-112, 1961.

28. Langoni H, Ichihara SM, Silva AV, Pardo RB, Tonin FB, Mendonça LJP, Machado JAD: Isolation of *Brucella* spp. from milk of brucellosis positive cows in São Paulo and Minas Gerais states. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 37 (6): 444-448, 2000.

29. Çelebi Ö, Ötlu S: Kars yöresinde atık yapmış inek sürülerinden alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Brucella* etkenlerinin bakteriyolojik ve moleküler tanımlanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (1): 53-58, 2011.

30. Aydın N: *Brucella* İnfeksiyonları. In, Aydın N, Paracıkoğlu N (Eds): Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). s. 145-163, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.

31. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D: Laboratory based diagnosis of Brucellosis-A review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab*, 49, 487-505, 2003.

32. OIE: Bovine Brucellosis. OIE Terrestrial Manual. www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03BOVINE_BRUCCELL.pdf, Accessed: 15.08.2010.

33. Anonim: Brucellosis. www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/brucella.htm. Erişim tarihi: 16.09.2010

34. Anonim: <http://erzurum.vet.gov.tr/ErzurumVetKont/BakteriyelHast.html#Brucellozis>. Erişim tarihi: 22.09.2010.

35. Sarısayın F, Eroğlu M, Nadas UG: Yurdumuzda izole edilen *Brucella* suşlarının tür ve biyotiplerini tayini ile dağılışı durumu üzerine bir çalışma. *Pendik Vet Kont Araşt Derg*, 1, 24-35, 1969.

36. Refai M: Incidence and control of brucellosis in the Near East region.

Vet Microbiol, 90, 81-110, 2002.

37. Koneman E, Winn W, Alen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G: Koneman's Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 8th ed., Lippincott Williams&Wilkins. 482-490, 2006.

38. Corbel MJ: Atypical *Brucella melitensis* strains. International Comitee on Sytematic Bacteriology Subcomitee on the Taxonomy of *Brucella*. 1994. Prague. Czech Republic. *Int J Syst Evol*, 56, 1169-1170, 2006.

39. Corbel MJ, Morris JA: Studies on a smooth phage-resistant variant of *Brucella abortus*. I. Immunological properties. *Br J Exp Pathol*, 55, 78-87, 1974.

40. Harrington RJ, Bond DR, Brown GM: Smooth phage-resistant *Brucella abortus* from bovine tissue. *J Clin Microbiol*, 5, 663-664, 1977.

41. Morgan WJB: The examination of brucella cultures for lysis by phage. *J Gen Microbiol*, 30, 437-443, 1963.

42. Garcia MM, Brooks BW, Ruckerbauer GM, Rigby CE, Forbes LB: Characterization of an atypical biotype of *Brucella abortus*. *Can J Vet Res*, 52, 338-342, 1998.

43. Bricker BJ: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 435-446, 2002.

44. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR: Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69 (2): 216-227, 1990.

45. Evangelista TBR, Santos HO De Ios, Navarro AFL, Basulto GEM, Nielsen K, Francisco M, Gomez M, Roseles JFM, Manriquez LCP: Evaluation of polymerase chain reaction test (PCR) for the diagnosis of bovine brucellosis. *Tec Pecu Mex*, 43, 117-126, 2005.

46. Al-Majali AM, Talafha AO, Ababneh MM, Ababneh MM: Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in Jordan. *J Vet Sci*, 10 (1): 61-65, 2009.

47. Kassahun J: Seroepidemiological study of brucellosis in humans and dairy cattle in Addis Ababa. *Master Thesis*, Addis Ababa University, Addis Ababa, 2003.