

Sığır Atıklarından İzole Edilen *Brucella* Türlerinin RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi¹

Ahmet UNVER* Hidayet M. ERDOĞAN** Halil İ. ATABAY * Mitat ŞAHİN*
Vehbi GÜNEŞ** Mehmet ÇİTİL** Halil İ. GÖKÇE**

¹ KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (VF 2003-5).

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

**Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars-TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2006/21-A

Özet

Brusellozis, Türkiye’de yaygın olan ve ekonomik olarak büyük önem arz eden zoonotik bir enfeksiyondur. Sığır brusellozisine neden olan ajanların genetik karakterizasyonu tam olarak ortaya konulmamıştır. Bu çalışma, *Brucella* türlerinin atık sığırlardan izolasyonu ve genotiplendirmesini amaçlamıştır. Altmışiki atık sığır fetusunun 37’sinden (59.7%) *Brucella* spp. izole ve tanımlanmıştır. Yirmiyedi suş rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği ile analiz edildi ve elde edilen amplifiye DNA polimorfizmi bunların aşı ve tip suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 polimorfizmi ile karşılaştırıldı. Oniki (44.4%) ve 15 (55.6%) suşun RAPD profilleri sırası ile bunların *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 profilleri ile aynı bulundu. Bu sonuçlara dayanarak, sığır brusellozisinin teşhis, kontrol, eradikasyon ve salgın idaresinde her iki *Brucella* türü de (*B. abortus* ve *B. melitensis*) dikkate alınmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Brucella*, sığır, abort, RAPD

Genotyping of *Brucella* spp. Isolated from Aborted Cattle Fetuses by RAPD-PCR

Summary

Brucellosis is an endemic and economically important zoonotic infection in Turkey. Genetic characterization of the agents responsible for brucellosis in cattle has not been documented. The purpose of this study is to isolate and genotype *Brucella* spp. from aborted cattle fetuses. *Brucella* spp. was isolated and identified from 37 out of 62 (59.7%) aborted cattle fetuses. Twenty seven isolates were analyzed by randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and the amplified DNA polymorphisms were compared with those of vaccine and prototype strains of *B. abortus* (S19) and *B. melitensis* (Rev1). The RAPD profiles of 12 (44.4%) and 15 (55.6%) isolates were found to be identical to those of *B. abortus* S19 and *B. melitensis* Rev1, respectively. These results suggest that both *Brucella* spp., *B. abortus* and *B. melitensis*, should be considered for implementing diagnosis, control, eradication and outbreak management of bovine brucellosis in this region.

Keywords: *Brucella*, cattle, abortion, RAPD

İletişim (Correspondence)

Phone: +90 474 2486800/1173

e-mail: ahmetunver@hotmail.com

GİRİŞ

Brusellozis evcil hayvanlarda görülen zoonotik karakterde bakteriyel bir hastalıktır. *Brucella* mikroorganizmaları hayvanların genital organlarına yerleşerek gebe hayvanlarda abortus, infertilite ve mastitis, erkek hayvanlarda ise orşitis, epididimitis ve steriliteye neden olmaktadır. Nadir olarak nekrotik karakterde yanlılara ve pnemonilere sebebiyet vermektedirler. Hastalık dünyada yaygın olup önemli sağlık ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır¹⁻³.

Hastalık hücre içi mikroorganizmalar olan *Brucella* ailesine ait *Brucella abortus* (sığır), *Brucella melitensis* (koyun-keçi), *Brucella ovis* (koyun), *Brucella canis* (köpek), *Brucella suis* (domuz), *Brucella neotoma* (rat) ve *Brucella maris* (deniz memelileri) etkenlerince oluşturulmaktadır¹⁻³. Ancak *Brucella* mikroorganizmaları anılan konakçı dışında da enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Özellikle *B. melitensis* ve *B. suis* son yıllarda sığırlarda enfeksiyonlara sıklıkla yol açtığı rapor edilmektedir^{2,4}, *B. abortus* ise koyun ve köpeklerden izole edilmektedir^{2,3,5}. Ülkemizde evcil hayvanlarda görülen brusellozis vakalarında *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. canis* etkenleri izole edilmiştir^{6,7}.

Ülkemiz de dahil dünyanın bir çok ülkesinde brusellozis'in evcil hayvanlar arasındaki yaygınlığı kesin rakamlarla bilinmemektedir. Ülkemizde çeşitli bölgelerde abortlar üzerine yapılan izolasyon çalışmalarında ruminantlarda brusellozis'e bağlı abortların %15-40 dolaylarında olduğu bildirilmesine⁸⁻¹² rağmen hasta kayıt ve bildirim sisteminin olmaması, her abort vakasının teşhis laboratuvarlarına gönderilmemesi veya gönderilememesi bu rakamın daha yüksek olmasını muhtemel kılmaktadır. Yine ülkemizde çeşitli serolojik yöntemler kullanılarak yapılan bölgesel çalışmalarda hastalığın seroprevalansı %1-70 arasında değişmektedir^{7,12-14}. Kars ili ve çevresinde yapılan izolasyon çalışmalarında sığır abortlarından *Brucella* izolasyon oranları %30-40 arasında değişmektedir^{9,11,12}. Kars bölgesinde yapılan seroprevalans çalışmalarında kullanılan testin çeşidine göre önemli farklılıklar olmasına rağmen hayvanların %30 ila %70'inde *Brucella* antikörleri tespit edilmiştir^{7,11,13}.

Brusellozis'in hem hayvan ve hem de insanlarda atipik klinik belirtileri olmasından ötürü kesin teşhisi klinik olarak oldukça zor olmasından dolayı teşhiste direk veya indirek laboratuvar metotlarıyla mümkün

olmaktadır. Etkenin direk izolasyonu ve identifikasyonu en etkili metot olmasına karşın bu işlemin günler ve hatta haftalar sürmesi ve biyolojik tehlike arz etmesi birer dezavantajdır^{3,15}. Bunun yanında hastalığın teşhisinde indirek serolojik teknikler de rutin olarak hastalığın epidemiyolojik taramalarında kullanılmasına^{6,7,11,13,16} rağmen bu testlerin bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar; test antijeni olarak kullanmak amacıyla zoonoz bir etkenin laboratuvarında sürekli tutulması ve kültürünün oluşturduğu biyolojik tehlike boyutunun yüksekliği, hastalığın aktif durumunun tam olarak ortaya koyulamaması, enfeksiyon veya aşılama sonucu oluşan seropozitiliğin bir çok durumda birbirinden ayıralamaması, yapılan saha çalışmalarında farklı seroprevalansların elde edilmesi, hastalığın varlığı hakkında kesin karar vermek için iki ayrı testin kullanılması ve en az iki defa tekrarlanması, testlerde *Brucella* genusu türlerinin bazı mikroorganizmalarla çapraz reaksiyon vermesi, oluşan immunoglobulinlerin çeşitliliğinin (enfeksiyonun ilk döneminde IgM ve sonraki safhalarda veya ikinci enfeksiyonlarda IgG) testlerin tekrarlanmasını zorunlu kılması, yanlış pozitif sonuçlar ve gizli enfeksiyonun serolojik olarak tanınamaması sayılabilecek en önemlileridir^{1-4,15}. Bu dezavantajlar nedeniyle ciddi ekonomik kayba sebep olan ve ülkemizde ve dünyada en önemli zoonozlardan biri olan brusellozis'in epidemiyolojisi ve hastalığa yol açan etken yada etkenlerin karakterizasyonu günümüzde detaylı olarak ortaya konulamamıştır³. Son yıllarda başta Polymerase Chain Reaction (PCR) olmak üzere moleküler yöntemler ile yapılan teşhis ve genotiplendirme yöntemleri oldukça önem kazanmış ve bu tekniklerin başarı ile uygulanabilirlikleri birçok bakteriyel etken yönünden incelenmiştir¹⁵. Brusellozis'in teşhisinde farklı moleküler yöntemler başarı ile kullanılmıştır^{10,17-19}. Ülkemizde ise yapılan çalışmalarda atık fötusun abomasum içeriğinde *Brucella* türlerinin varlığı PCR ile ortaya konulmuştur^{10,19}. Hastalığın epidemiyolojisinin detaylı anlaşılabilmesi için izole edilen etkenlerin tiplendirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çeşitli konvansiyonel ve moleküler teknikler kullanılmaktadır. Konvansiyonel metotlar (serotiplendirme, biyotiplendirme, faj tiplendirme vs) sonucu *B. abortus* (9 biovar) *B. melitensis* (3 biovar), *B. suis* (4 biovar) alt tiplere ayrılmıştır^{2,3}. Fakat konvansiyonel metotlar ile *Brucella* türlerinin alt türlere ayrıştırılması güç olduğu bildirilmiştir^{15,20}. Bu nedenle moleküler tekniklerin kullanıldığı daha gelişmiş tiplendirme metotları *Brucella* türleri arasındaki yüksek DNA homolojisine rağmen yaygınlaşmıştır¹⁵. Bu amaçla restriction fragment length polymorphism (RFLP)²¹, pulse field gel

electrophoresis (PFGE)²², amplified fragment length polymorphism (AFLP)²³, repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (REP-PCR)²⁴, enterobacterial repetitive intragenic consensus-polymerase chain reaction ERIC-PCR²⁵, HOOF Print²⁶, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)²⁰, teknikleri başarıyla kullanılmıştır. Fakat ülkemizde ve Kars bölgesinde brusellozis'e neden olan etkenler genetik olarak karakterize edilmemiş ve geniş kapsamlı bir saha çalışması da yapılmamıştır.

Bu çalışmada, ekonomik olarak oldukça önemli olan hayvan yetiştiriciliği sektöründe büyük ekonomik kayıplara neden olan ve ciddi bir halk sağlığı problemi olan sığır brusellozis'in PCR tekniği kullanılarak kesin ve hızlı bir şekilde teşhis edilmesi ve bu hastalığın moleküler epidemiolojisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca yapılacak olan genotiplendirme sonucu virulent *Brucella* türlerinin tespiti ve aşılamlarda kullanılan suş ile uygunluğunun belirlenmesi de hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Atık buzağı örnekleri: Çalışmanın materyalini 2002 ile 2004 yılları arasında Kars merkez ve köylerinden toplanan ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına getirilen toplam 62 adet atık sığır fetusu ile Kars bölgesinde sahadan ve kesimhanelerden toplanan 31 adet atık yapmamış sığırın fetal membranları oluşturdu. Fötlürlere ait iç organlar, fetal membranlar veya abomasum içeriği usulüne uygun olarak alınarak bakteriyolojik ve moleküler biyolojik yoklamalara tabi tutuldu.

Brucella izolasyonu: Atık materyalden *Brucella* cinsine bağlı mikroorganizmaların izolasyonu ve identifikasyonu için selektif ve zenginleştirilmiş (at veya sığır serumu ile) besi yerlerinden yararlanıldı. Bu amaçla bacitracin/polymixin ilave edilen *Brucella* agara ekimler yapıldı. Ekim yapılan ortamlar aerobik ve mikroaerobik olarak 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremeler *Brucella* mikroorganizmaları yönünden değerlendirildi. Bu amaçla koloniler makroskopik görünimleri, gram boyama ve biyokimyasal testlere tabi tutuldu³.

Brucella izolatlarından DNA izolasyonu: Bu amaçla bakteriyolojik ekim sonucu elde edilen izolatlardan 2-3 koloni 200 µl steril fizyolojik tuzlu su içerisinde bir mikro tüpte süspanse edildi. Bakteri süspan-siyonuna 50 ug Proteinase K (MBI Fermantes) ve 400

µl NETS lizis tampon solusyonu (NETS buffer; 0.01M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M Tris-HCl pH7.6 ve %0.05 Sodyum Dodesil Sülfat) eklendi. Karışım 65°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra eşit miktarda (600 µl) kloroform ve izoamilalkol (24:1 oranında) karışımı ilave edilerek karıştırıldı. Karışımından sonra tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Oluşan süpernatant (akıcı bölüm) başka bir steril mikro tübe aktarılarak üzerine 0.1 volüm 3M sodyum asetat ve 2.5 volüm mutlak alkol ilave edilerek -20°C'de 2 saat inkübe edildi. Presipite olan DNA mikro tüpün 13.000 rpm 5 dakika santrifüjünden sonra çöktürüldü. Pelet absolut alkol ve %70'lik etanol ile iki defa yıkandıktan sonra 15-20 dakika kuruması için beklendi. DNA peleti 100 µl steril distile deiyonize su ile sulandırılıp PCR de template (şablon) olarak kullanıldı.

Polymerase Chain Reaction (PCR) ile *Brucella* DNA amplifikasyonu:

Her bir örnek için 0.2 ml'lik steril mikrotüp içinde 50µl lik reaksiyon karışım (5 µl 10 x PCR buffer, 250 µmol her bir dNTP, 2 ünite Taq polimeraz, her bir *Brucella* cins spesifik primerinden 50 pg ve 5 ml ekstrakte edilmiş DNA) hazırlandı. Kullanılan primerler ve baz dizilimi; Ba 148-167F: 5' TGCTAATACCGTATGTGCTT 3' ve Ba 928-948R: 5' TAACCGCGACCGGGATGTCAA 3' şeklindeydi¹⁸. Termal şartlar ise; 95°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 35 siklustan oluşan 95°C'de 1 dk denatürasyon, 58°C'de 2 dk birleşme (annealing) ve 72°C'de 2 dakika sentez ve çoğalma (extention) ve 72°C'de 7 dk son ekstensiyon şeklinde uygulandı. PCR ürünleri %1 agaroz jel elektroforez ile ayrıldıktan sonra etidyum bromür boyama ile UV illuminatörde gözlemlendi. DNA fragman büyüklükleri eşzamanlı koşutulan DNA marker'ı (Gene Ruler "100 bp" MNI Fermantes) ile kıyaslanarak tespit edildi. PCR'de pozitif kontrol olarak *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 aşı suşlarının yukarıda aktarılan DNA izolasyon yöntemi ile saflaştırılmış DNA'ları kullanıldı. Bu teknikte negatif kontrol olarak bütün PCR içeriğine sahip template (şablon) DNA yerine steril damıtık su içeren ve aynı termal ortamda tutulan karışım kullanıldı.

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-PCR Tekniği ile Genotiplendirme: Kültür sonucu elde edilen izolatların genotiplendirmesi ve bu izolatların aşı suşuyla karşılaştırılması Erdoğan²⁰ ve Tcherneva ve ark²⁷ tarafından bildirilen RAPD tekniği kullanılarak yapıldı. PCR tekniği ile temelde aynı olan RAPD-PCR metodunda etkene özgü olmayan rastgele seçilen primerler kullanıldı. RAPD-PCR amplifikasyo-

nunda her bir örnek için 0.2 ml'lik steril mikrotüp içinde 50 µl'lik reaksiyon karışımı (5 µl 10 x PCR buffer, 250 µmol her bir dNTP, 2 ünite Taq polymeraz, 25 mM primer ve 5 µl ekstrakte edilmiş DNA) kullanıldı. RAPD-PCR'da kullanılan primerler ve dizimleri; PRİMER 6: 5' AACAGCACTCTGTTTCAGGC 3' ve UNİVERSAL: 5' TTATGTAAAACGACGGCCACT 3' şeklindeydi²⁰. Termal şartlar ise; 94°C'de 3 dk başlangıç denaturasyonu, 4 siklustan oluşan 94°C'de 45 saniye denaturasyon, 26°C'de 2 dk birleşme ve 72°C'de 2 dakika ekstensiyon, 30 siklustan oluşan 94°C'de 45 saniye denaturasyon, 36°C'de 2 dk birleşme ve 72°C'de 2 dakika sentez ve çoğalma ve 72°C'de 2 dakika ekstensiyon ve 72°C'de 7 dk son ekstensiyon şeklinde uygulandı. RCR ürünlerinin görüntülenmesi, DNA standardı ve kontroller PCR bölümünde anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

BULGULAR

Toplam 62 adet atık sığır fetuslarına ait dokulardan *Brucella* spp. izolasyonu amacıyla yapılan ekimler sonunda 37 (%59.7) adet örnekten üreyen mikroorganizmalar kolonilerin makroskopik görünüşleri, gram boyama ve biyokimyasal testler ile *Brucella* spp. olarak tanımlandı. Bu 37 örnek içerisinde saklanabilen 32 adet izolat PCR ile test edildi. Toplam atık sığır fetustan izolasyonun yıllara göre oranları; 2002 yılında %66.7 (10/15), 2003 yılında %48.5 (14/19) ve 2004 yılında %72.2 (13/18) olarak belirlendi. Yılların toplam ortalaması ise %59.7 (37/62) olarak tespit edildi (Tablo 1). Muhafaza edilebilen 32 izolatın tamamı *Brucella* spp. olarak teyid edildi (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. Atık sığır fetuslarının *Brucella* yönünden kültür ve PCR sonuçları.

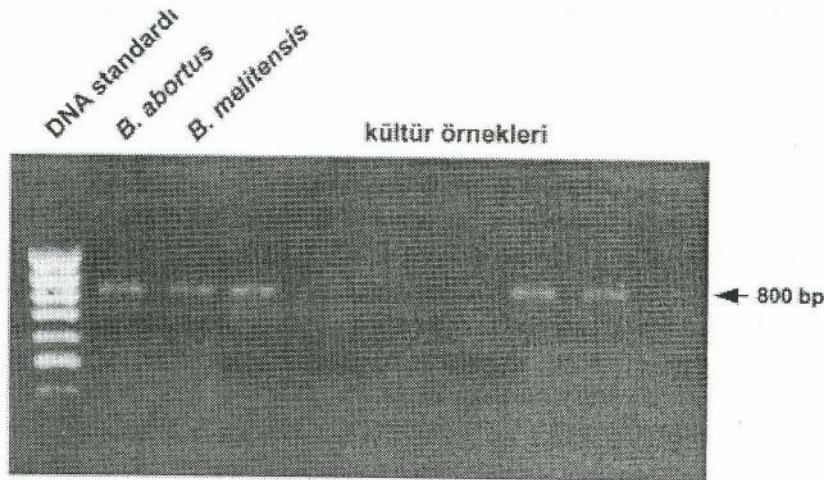
Table 1. *Brucella* culture and PCR results of aborted cattle fetuses.

Örneklerin toplandığı yıllar	İncelenen atık fötüs sayıları	<i>Brucella</i> pozitif olan örneklerin sayıları ve yüzde oranları	
		Kültürel yöntemlerle	PCR ile*
2002	15	10 (%66.7)	10 (%66.7)
2003	29	14 (%48.3)	12 (%41.3)
2004	18	13 (%72.2)	10 (%55.5)
Toplam	62	37 (%59.7)	32 (%51.6)

* PCR ile işlenen izolat sayısı.

Kontrol amacıyla toplanan 31 adet atık yapmamış sığır örneklerinden ise *Brucella* yönünden kültür ve PCR sonuçları negatif bulunmuştur.

İzole edilen ve PCR ile pozitif bulunan 27 adet *Brucella* suşun RAPD-PCR ile analizini takiben elde edilen DNA profilleri *Brucella* standart suşları olan *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev1 ile karşılaştırıldı. İncelenen izolatların %44.4 (12/27) *B. abortus* S19 ve %55.6 (15/27) ise *B. melitensis* Rev1 suşlarının DNA profilini gösterdi (Tablo 2). *B. abortus* S19 suşunun DNA profilini gösteren izolatların yıllara göre dağılım oranları 2002'de %20 (2/10), 2003'te %71.4 (5/7) ve 2004'te ise %50 (5/10) olarak belirlendi (Tablo 2). *B. melitensis* Rev1 suşunun DNA profilini gösteren izolatların yıllara göre dağılım oranları ise 2002'de %80 (8/10), 2003'te %28.6 (2/7) ve 2004'te %50 (5/10) olarak belirlendi (Tablo 2).



Şekil 1. Atık fötüslerde izole edilen etkenler ile yapılan PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroferizini takiben elde edilen temsili bir resim.

Figure 1. Representative agarose gel picture of PCR products from *Brucella* isolates.

RAPD analizleri "Primer 6" (Şekil 2) ve "Univerrsal" (Resim gösterilmedi) olmak üzere iki farklı primer ile gerçekleştirilmiş ve bu iki primere göre yapılan tiplendirme sonuçları birbirlerine paralel bulunmuştur.

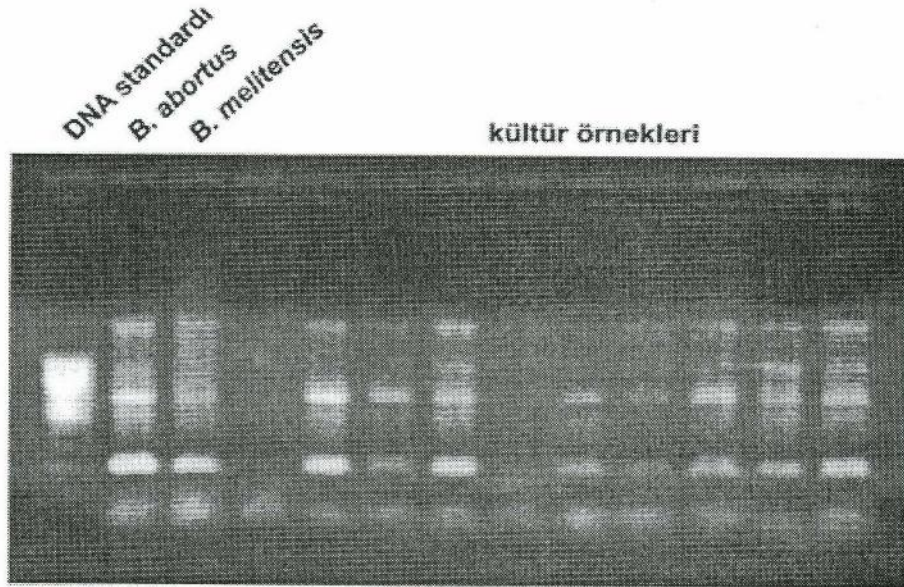
Tablo 2. Atık sığır fetusularından izole edilen *Brucella* suşları ile yapılan RAPD sonuçları.

Table 2. RAPD results of *Brucella* strains isolated from aborted cattle fetuses.

Yıllar	İncelenen izolat sayıları	<i>B. abortus</i> S19 benzeri profil üretkenlerin sayısı	<i>B. melitensis</i> Rev 1 benzeri profil üretkenlerin sayısı
2002	10	2 (20)	8 (80)
2003	7	5 (71.4)	2 (28.6)
2004	10	5 (50)	5 (50)
Toplam	27	12 (44.4)	15 (55.6)

talar sürmesi ve etkenin biyolojik tehlike arzemesi dezavantaj oluşturur. Bu sebeple serolojik testler yaygınlıkla kullanılmakla beraber bu tekniklerin de giriş kısmında açıklanan dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda kullanılan moleküler teknikler (polymerase chain reaction-PCR) başarıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada da PCR *Brucella* etkenlerini ortaya koymada başarıyla kullanıldı. Nitekim izolatların hepsi PCR ile de *Brucella* oldukları teyid edildi. Bu da kültür ile PCR arasında daha önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi bir paralellik olduğunu göstermektedir^{17,19}.

Kars ve çevresinde daha önce yapılan çalışmalarda abortların çiftlik prevelansının %46-53 arasında yıllık insidansının ise etkilenen sürülerde %12.5-20 arasında bulunmuştur (Erdoğan ve ark. 2004) ve abortlardan



Şekil 2. *Brucella* izolatları ile "Primer 6" primeri kullanılarak gerçekleştirilen RAPD-PCR sonucu oluşan ürünlerin agaroz jel elektroferizini takiben elde edilen temsili bir resim.

Figure 2. Representative agarose gel picture of RAPD-PCR products using "Primer 6" primers from *Brucella* isolates.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Ülkemizde ve Kars bölgesinde büyük ekonomik kayba yol açan ve dünyada en önemli zoonozlardan bir olan Brucellozis'in epidemiyolojisi tam olarak bilinmemektedir³. Hem hayvanlarda ve hem de insanlarda atipik klinik belirtiler ile seyretmesinden dolayı hastalığın laboratuvar teşhisi oldukça önemlidir. Etkenin direk izolasyonu ve identifikasyonu en güvenilir metot olmasına karşın bu işlemin günler ve hatta haf-

yapılan izolasyon çalışmalarında %30-40 arasında *Brucella abortus* izole edilmiştir⁹. Bu çalışmada yıllara göre farklılık olmasına rağmen ortalama izolasyon oranı %59.7 (%48.3-%72.2) olarak bulunması sığır atıklarında *Brucella* spp. dominant etiyolojik etken olmaya başladığını göstermektedir. Bunun en önemli nedenleri düşük aşılama oranı (yaklaşık %28)²⁸ veya aşının başarısız olması olabilir (saha ve aşı suşlarının farklı olması). Nitekim çalışmamızda izole edilen suşların çoğunluğu *B. melitensis* Rev 1 DNA profili gös-

termiştir.

Brucella spp. genotiplendirilmesinde çeşitli metotlar başarıyla kullanılmıştır. Bunlardan RAPD çalışmamızda da uygulandı. Teknik olarak kolay, çabuk ve ucuz bir metot olan RAPD herhangi bir DNA sekans bilgisi gerektirmemesi tekniğe pratiklik ve uygulamada kolaylık kazandırmaktadır. Herhangi bir dizileme sahip tek primer kullanıldığında aynı tür veya türler arasında başarıyla genetik ayırım yapabilmektedir²⁰. Çalışmamızda geleneksel olarak kullanılan 10 bazlık primerler yerine daha önce *Listeria monocytogenes* tiplendirilmesinde kullanılan 20 bazlık primerler kullanıldı²⁷. Bu modifikasyon, tekniğin özgünlüğünü ve tekrarlanabilirliğini arttırmaktadır. Tekniğin tekrarlanabilirliği aynı çalışma prosedürünün sıkı takibiyle daha iyi sağlanabilmektedir²⁰. Bu çalışmada genotiplendirilen *Brucella* suşları iki farklı DNA profili ortaya çıkardı. Bunlar, %44.4 oranıyla *B. abortus* S19 ve %55.6 ile *B. melitensis* Rev1 olarak belirlendi. Bu bulgu daha önce ülke ve bölgemizde rapor edilmemiştir. Saha çalışmaları diğer ülkelerde *B. melitensis*'in sığırlarda abortlara yol açtığını göstermiştir^{2,4}. Elde edilen sonuç *B. melitensis*'in yaygın bir şekilde abortlara yol açtığını göstermektedir. İlginç olan bir diğer bulgu ise elde edilen genotiplerin yıllara göre değişen oranlarda yaygın olmasıdır. Bunun biyolojik açıklaması zor olmakla beraber bölgeden bölgeye veya sürüden sürüye değişen bir durumdan kaynaklanabilir. Ancak bu farklılığı açıklayabilmek için daha detaylı bir saha çalışmasının yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada atık fütüslerin %59.7'inde *Brucella* spp. izole edilmesi enfeksiyonun bölgede oldukça yaygın bir atık nedeni olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu etkenlerin PCR ile de bulunması ve sonuçların kültürel yöntemler ile paralellliği bu tekniğin hastalığın teşhisinde ve epidemiyolojik araştırmalarda başarı ile kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. Yine son yıllarda kullanımı yaygınlaşan moleküler yöntemlerle genotiplendirme, infeksiyöz hastalıkların epidemiyolojisinde ve hastalık etkenlerinin sınıflandırılmasında oldukça önem kazanmıştır. Bu yöntemler, etkenin üretilmesine ihtiyaç duyulmaması, tekrar uygulanabilirliğinin yüksek olması, çabuk sonuçlandırılabilirliği gibi bir çok avantajlara sahiptir. Bu çalışmada uygulanan RAPD-PCR yöntemi, elde edilen suşların genetik olarak standart suşlara yakınlığını ortaya koymada başarıyla uygulanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, RAPD-PCR ile analiz edilen suşlardan 15'inin konvansiyonel olarak yaygın sığır brusellozis etkeni olarak bilinen *B. abortus*'dan ziyade *B. melitensis*'e genetik yakınlık

göstermesi, *B. melitensis*'in sığır brusellozis'in etiolojisinde oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. *B. abortus*'a göre daha fazla virulent olan ve dolaşısıyla daha fazla zoonotik potansiyele sahip olan *B. melitensis* beşeri hekimlikte de göz önünde tutulmalıdır. Gerek beşeri gerekse veteriner hekimlikte hastalıkla ilgili teşhis, kontrol ve eradikasyon programlarında ve salgın idaresinde her iki *Brucella* türü de (*B. abortus* ve *B. melitensis*) dikkate alınmalıdır. İleriki çalışmalarda, bölgede brusellozis'e neden olan etkenler antijenik olarak da karakterize edilmeli, günümüzde kullanılan aşı suşları ile saha suşlarının karşılaştırılması gerçekleştirilmeli ve yöreye özgün test ya da aşı antijenleri geliştirilmelisinine yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 1 **Radostits OM, Blood DC, Gay CC:** Veterinary Medicine. (8th ed.) pp.787-813. London, 1994.
- 2 **Corbel MJ:** Brucellosis: An overview. *Emerg Inf Diseases*, 3 (2): 213- 221, 1997.
- 3 **Arda M, Minbay A, Aydın N, Leloğlu N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker K S:** Özel Mikrobiyoloji. Medisan, 1997.
- 4 **Banai M:** Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol*, 90, 497-519, 2002.
- 5 **Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim C, Oluoch A, Kakoma I:** *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. *Can J Vet Res*, 67, 312-313, 2003.
- 6 **Yardımcı H:** Koyunlarda *Brucella melitensis* infeksiyonlarının Aglutinasyon, Rose Bengal ve ELISA testleriyle ortaya konması ve bu testlerin teşhisteki değeri üzerinde bir araştırma (Doktora Tezi) Ankara, 1989.
- 7 **Güllüce M:** Kars ve çevresindeki sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması (Doktora Tezi) Kars, 1993.
- 8 **Eroğlu M:** Türkiye'de brusellozisin insidensi. Uluslararası Brusellosis Sempozyumu. 18-20 Ekim 1988, İstanbul, Türkiye, sf 33-35,1988.
- 9 **Sağlam YS, Türkütanıt SS, Taştan R, Bozoğlu H, Otlı S:** Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden incelenmesi. *Vet Bil Derg*, 14, 133-145, 1998.
- 10 **Çetinkaya B, Öngör H, Muz A, Ertat HB, Kalender H, Erdoğan HM:** Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Vet Rec*, 144 (9): 239-240, 1999.
- 11 **Genç O, Otlı S, Şahin M, Aydın F, Gökçe HI:** Seroprevalence of Brucellosis and Leptospirosis in Aborted Dairy Cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 359-366, 2005.
- 12 **Şahin M, Atabay Hİ, Otlı S, Ünver A, Çelebi Ö:** Kars ve çevresinde bulunan insan, sığır ve koyunlarda Brusellozisin prevalansının serolojik ve kültürel metotlarla araştırılması. Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 14-16 Eylül, Elazığ, 2004.
- 13 **Şeyda T, Aydın F, Genç O, Güler MA, Baz E:** Sığır serumunda Mikroaglutinasyon Testi (MAT) ile *Brucella* antikorlarının araştırılması. *KAÜ Vet Fak Derg*, 3 (1): 7-11, 1997.

- 14 İyisan AS, Akmaz Ö, Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmirliler S, Güler L, Gündüz K, Işık N, İçyerioğlu K, Kalender H, Karaman Z, Küçükayan U, Özcan C, Seyitoğlu Ş, Tuna İ, Tunca T, Üstünakın K, Yurtalan S: Türkiye' de sığır ve koyunlarda brucellosis' in seroepidemiyojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 31(1): 21-75, 2000.
- 15 Bricker BJ: PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90(1-4): 435-446, 2002.
- 16 Baum M, Zamir O, Bergman-Rios R, Katz E, Beider Z, Cohen A, Banai M: Comparative evaluation of Microagglutination Test and serum Agglutination Test as supplementary diagnostic methods for Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 33 (8):2166-2170, 1995.
- 17 Fekete A, Bantle JA, Halling SH: Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J Vet Diagn Invest*, 4 (1): 79-83, 1992.
- 18 Herman L, deRidder H: Identification of *Brucella* spp. by using the Polymersae Chain Reaction. *Appl Environ Microb*, 58 (6): 2099-2101, 1992.
- 19 Leyla G, Kadri G, Umran O: Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. *Vet Microbiol*, 93: 53-61, 2003.
- 20 Tcherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LM: Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol*, 88(1): 69-80, 2000.
- 21 Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O: Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, 141, 2111-2121, 1995.
- 22 Allardet-Servent A, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Michaux S, Ramuz M: Physical map of the *Brucella melitensis* 16 M chromosome. *J Bacteriol*, 173(7): 2219-2224, 1991.
- 23 Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, Macmillan AP: Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol*, 43(2):761-769, 2005.
- 24 Mercier E, Jumas-Bilak E, Allardet-Servent A, O'Callaghan D, Ramuz M: Polymorphism in *Brucella* strains detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *J Clin Microbiol*, 34(5): 1299-1302, 1996.
- 25 Tcherneva E, Rijpens N, Naydensky C, Herman L: Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol*, 51(1-2): 169-178, 1996.
- 26 Bricker BJ, Ewalt DR: Evaluation of the HOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria. *BMC Microbiol*, 5, 37, 2005.
- 27 Erdoğan HM: An Epidemiological Study of Listeriosis in Dairy Cattle in England. PhD Thesis University of Bristol, UK, 1998.
- 28 Erdoğan HM, Çitil M, Güneş V, Unver A: Dairy Cattle Farming in Kars District, Turkey: II. Health Status. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 745-752, 2004.