

Trakya Yöresinde Yetiştirilen Sığırların Sütlerinde Brucella Türlerinin Varlığının Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemlerle Karşılaştırılmalı Olarak Araştırılması[#]

Ali. A. ABDELKAREEM¹, Serkan İKİZ², Seyyal AK^{2*}

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Temel Bilimler Mikrobiyoloji AbD Cerrahpaşa, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD 34320 Avcılar, İstanbul

* Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Seyyal AK

İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AbD 34320 Avcılar, İstanbul

e-posta: sak@istanbul.edu.tr, Tel: 02124737070/17066

Geliş Tarihi / Received: 12.11.2010

ÖZET

Trakya yöresinde Brucella etkenlerinin varlığının araştırıldığı bu çalışmada, farklı ilçe, köy ve işletmelerde yetiştirilen Brucella aşısı uygulanmamış, sütleri kullanımda olan 75 ineğe ait süt örnekleri tesadüfi olarak toplandı. Örneklerde, Brucella türleri ve Brucella spesifik DNA' sı araştırıldı.

İzolasyon için süt örneklerinden Brucella selektif besiyerlerine ekimler yapıldı. Sütte spesifik DNA'nın saptanması için PCR kullanıldı.

Bakteriyolojik çalışmaların sonucunda, 75 süt örneğinin üç (%4)' ünde *Brucella* spp. izole edildi. İzolatların biri *B. melitensis* diğer ikisi *B. abortus* olarak tanımlandı.

PCR incelemelerinin sonucunda toplam 75 örneğin 17 (%22,66)' sinde Brucella spesifik DNA'sı saptandı. İzole edilen üç örneğin PCR' da da pozitif olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Brucella* spp., süt, PCR, kültür, sığır

ABSTRACT

COMPARATIVE INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF *BRUCELLA* SPP. IN MILK OF CATTLE RAISED IN TRAKYA DISTRICT BY BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

In this study, presence of *Brucella* spp. in Trakya district was investigated. For this purpose, milk samples of 75 unvaccinated cattle raised in various districts, villages and farms, were randomly collected. The collected samples were used for bacterial isolation and detection of Brucella specific DNA.

For isolation, the milk samples were inoculated onto Brucella selective media. PCR technique was applied for determination of the specific DNA in the milk samples.

As a result of bacteriological studies, *Brucella* spp. were isolated from three (4%) of total 75 milk samples. One of the isolates was identified as *B. melitensis*, while the others were *B. abortus*.

Brucella specific DNA was amplified in 17 (22.66 %) of 75 samples by PCR. The culture positive milk samples were also found to be positive by PCR.

Key words: *Brucella* spp., milk, PCR, culture, cattle.

[#] Bu araştırma birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Giriş

Bruselloz, hem insan hem de hayvan sağlığını yakından ilgilendiren ve hayvansal üretim üzerine önemli etkileri olan bulaşıcı, akut, subakut ya da kronik seyirli, zoonoz bir infeksiyöz hastalıktır (Aiello ve ark., 1998; Alton ve ark., 1988; Arda ve ark., 1999; OIE Manual, 2004).

Bruselloz, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslar arası Salgın Hastalıklar Ofisi (OIE) tarafından dünyanın en yaygın zoonozu olarak kabul edilmektedir (WHO, 2006). Ekonomik yönden Bruselloz, yavru atma, perinatal mortalite, infertilite, süt ve et üretiminde azalma, tıbbi harcamalar, sürüye yeni katılan hayvanların masrafları, hayvan hareketi ve ihracatının engellenmesiyle hayvancılık endüstrisinde büyük oranda ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bunun yanında insanlarda Bruselloz' dan kaynaklanan ilaç, hastane masrafları ile iş gücü kayıpları hastalığın ekonomik önemini attırmaktadır (İyisan ve ark., 2000; OIE Manual, 2004; WHO, 2006).

Bruselloz Dünya'da geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir. Prevalansı ülkeden ülkeye değişiklik göstermektedir. Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere, Ortadoğu, Afrika, batı Asya, Latin Amerika ve Güney Amerika da ciddi halk sağlığı problemleri ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Abdussalam ve Fein, 1976; Abela, 1999; Corbel, 1997; OIE Manual, 2004; Taleski ve ark., 2002).

Dünyanın birçok ülkesinde Bruselloz ile mücadele kampanyaları başlatılmıştır. Kuzey Avrupa ülkeleri, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda da yıllar süren yoğun çabalarla Bruselloz büyük ölçüde eradike edilmiştir (Abdussalam ve Fein, 1976; Corbel, 1997; Refai, 2002). Türkiye'de ise 1984 yılından beri sürdürülmekte olan aşılama programına rağmen bazı illerde infeksiyon oranı oldukça yüksek olup, hastalık yeterince kontrol altına alınamamıştır (İyisan ve ark., 2000).

Hayvanlarda başlıca bulaşma yolları infekte sığırların uterus akıntıları, süt, atık fetus ve fetus zarlarındaki mikroorganizmalar ile kontamine olan su ve gıdaların sindirimi ve

infekte hayvanların sütünün buzağılara verilmesidir. Ayrıca infekte uterus akıntıları ve idrarla bulaşık olan kuyruklar diğer hayvanların deri ve konjunktivalarına etkeni bulaştırabilir. Diğer bulaşma yollu ise testisi infekte olan boğaların çiftleşme sırasında sağlam dişilere etkenleri bulaştırmasıdır (Aiello ve Mays, 1998; Arda ve ark.,1999; FAO, 2000; Radostitis ve ark., 1995).

Bakteri, infekte hayvanların süt, idrar, vajina akıntıları, abort sırasında atılan fetus zarları ve fetusun kendisi ile etrafa saçılmaktadır. Ayrıca etkenin saçılmasına aracılık eden diğer canlılar ise kuşlar, yabani hayvanlar, çöl fareleri, sinek ve köpeklerdir. Özellikle çoban köpeklerinin atık yapan hayvanların fetuslarını parçalayarak ve taşıyarak etkenlerin diğer çiftliklere saçılmasında rol oynadığını bildirilmektedir. Ayrıca bazı abort yapan sığırlar da hayat boyu portör kalabil-mektedir. Meme bezleri ve meme üstü lenf yumrularının infeksiyonu, laktasyon döneminde sürekli veya aralıklı olarak organizmanın saçılmasına neden olarak, hastalığın bulaşmasında önemli rol oynarlar (FAO, 2000; OIE Manual, 2004; Radostitis ve ark., 1994).

Dünya Sağlık Teşkilatı (OIE) raporlarına göre her yıl yaklaşık yarım milyon insan Bruselloz'a yakalanmaktadır. *Brucella* cinsindeki etkenler laboratuvar biyogüvenlik kriterlerine göre sınıf-3 risk grubu olarak tanımlanmaktadır (OIE, 2004; WHO, 2006). Risk altında olan bireylerin ise laboratuvar teknisyenleri, Veteriner Hekimler, hayvan bakıcıları, çiftçiler ve kesimhane çalışanları, aşı üretiminde çalışanlar ve sahada hayvanlara aşı uygulayanlar olduğu bildirilmiştir. İnfekte hayvanlardan elde edilen kontamine süt ve süt ürünleri de halk sağlığı yönünden büyük problem oluşturmaktadır (Corbel, 1997; İzmir VHO, 2007).

İnsanlara bulaşma özellikle pastörize edilmemiş süttten, yapılan peynir ve tereyağının sindirim yoluyla alınması, infekte hayvanların dokuları ve vücut sıvılarının deri çatlakları veya konjunktivaya direkt teması ve infeksiyöz aerosollerin inhalasyonu (özellikle laboratuvar çalışanlarında) ile gerçekleşmektedir. Et ile bulaşma için henüz bir kayıt yoktur, ancak çok

az vakada hastalıklı sığır karkaslarından patojen etkenler izole edilmiştir (Arda ve ark.,1999; Noviello ve ark., 2004). İnsanlar arasında hastalığın geçişi kolay olmamasına rağmen kan transfüzyonu, organ ve kemik iliği nakli ile mümkün olduğu bildirilmiştir (OIE Manual 2004; WHO, 2006).

Sığırlarda Bruselloz'un en belirgin semptomlarından biri abortdur ve özellikle gebeliğin 6–8'inci aylarında meydana gelmektedir. Gebelik süresini tamamlayarak doğan yavrular, doğumdan sonra hemen ölebilir. Ayrıca kongenital dönemde enfekte olan buzağılar ya da doğum sonrası kontamine süt ile enfekte olan hayvanlar serolojik taramalarda negatif sonuç verirler. Bu hayvanlar yetişkin olup gebe kaldıklarında, özellikle gebeliğin son aylarında atıklar meydana gelir. Diğer semptomların ise erken doğum, yavru zararlarının atılmaması, metritis, geçici veya kalıcı kısırılık, süt verimi kaybı ve subklinik mastitiler olduğu bildirilmektedir (Aiello, 1998; Quinn ve ark., 1999; Şehin ve Yıldız, 2006).

Brusellozun bulunduğu bölgelerde gebe sığırların %80'i atık yapabilir veya canlı fakat zayıf buzağı doğururlar. Ayrıca hastalığın yeni çıktığı bölgelerde süt veriminde %20'ye varan azalma olabildiği bildirilmektedir (Arda ve ark., 1999).

Gebe olan hayvanlar enfeksiyona gebe olmayanlardan daha duyarlıdır ve gebe olan hayvanlar enfeksiyona yakalandığı zaman genelde abort şekillenir. Ancak koyun ve keçilerde abort oranı sığırlardan daha yüksektir. Buna karşı koyun ve keçilerde infertilite oranının sığırlardan daha düşük olduğu saptanmıştır (İyisan ve ark., 2000).

İnfekte hayvanların çoğu sütleri ile mikroorganizma saçarlar. Memeler, *B. abortus* için üreme yönünden iyi bir ortam teşkil eder. Memeler klinik olarak, normal bir görünümde ise de bakteri memelerde lokalize olarak interstinyal mastitis ve memeüstü lenf yumrularında büyümeye neden olur. Sekunder etkenlerin katılmasıyla süt veriminde azalma, lökosit sayısında artma, klor oranının yükselmesi ve süt şekerinin azaldığı görülür (Arda ve ark., 1999; Corbel, 1997; İyisan ve ark., 2000).

İnfeksiyonun direkt tanısı için etken izolasyonu ve moleküler tanı yöntemleri kullanılmaktadır (Cortez ve ark., 2001). İndirekt tanı için çeşitli serolojik testler uygulanmaktadır. Bu amaç için Süt Ring Testi (MRT), Rose Bengal Plate Testi (RBPT), Serum aglütinasyon Testi (SAT), Komplement Fikzasyon Testi (KFT), RIA ve ELISA en sık kullanılan testlerdir. Ayrıca alerjik testlerden de *Brucella* skin test (*Brucellin*) bazı ülkelerde kullanılmaktadır (Anderson ve ark., 1986; OIE Manual, 2004).

Bakteri izolasyonunun altın standart olmasına rağmen, çok zaman alması, laboratuvar çalışanlarına bulaşma riski, kontamine materyallerden izolasyon şansının az olması ve özel besiyerlerine gereksinim duyması gibi dezavantajları olduğu bildirilmektedir (Bricher, 2002; Cortez ve ark., 2001; Güler ve ark., 2003; WHO, 2006).

PCR testlerinden hızlı ve kesin sonuçların elde edilmesi, kontamine örneklerden etkilenmemesi ve canlı ya da cansız etkenlerden DNA ekstraksiyon edilmesi gibi avantajları vardır. Buna karşı pahalı olması, özel laboratuvarlar ve malzemelere gereksiniminin en önemli dezavantajları olduğu bildirilmiştir (Bricher ve Halling, 1994; Herman ve De Ridder, 1992; Leary ve ark., 2006; XiaoAn ve ark., 2005).

Hızlı, pratik ve kısa zamanda çok sayıda saha örneği ile çalışılabilme olanaklarından dolayı serolojik testler Bruselloz'un tanısında en çok tercih edilen yöntemleri oluşturmaktadır. Yanlış pozitif ve ya negatif sonuçların elde edilmesi, antikorların her zaman belli bir seviyede serumda olmaması, özellikle yeni abort yapmış hayvanlarda yaklaşık 2–3 hafta sonra oluşması gibi dezavantajları vardır. Araştırmacılar serolojik testlerin özellikle *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30 ve *Vibrio cholerae* gibi bazı Gram negatif bakterilerle şekillenen enfeksiyonlarda kros reaksiyon verebildiklerini bildirilmektedir. Ayrıca MRT nin subklinik mastitis olgularında ve laktasyonun son döneminde yanlış pozitif reaksiyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Fekete ve ark., 1992; Holt ve ark., 1994; Leary ve

ark., 2006; İzgür ve ark., 1992; SANCO, 2001; Unver ve ark., 2006).

Hastalığın sürü bazı taramalarında serolojik testler sıklıkla kullanılmakla beraber, gerek hastalığın epidemiyolojik verilerinin izlenmesinde ve gerekse eradikasyon programlarının oluşturması için etkenin direkt tanı yöntemlerinin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Alton ve ark., 1998; Hamdy ve Amin, 2002; Rijpens ve ark., 1996; Taşçı, 2004).

Bu çalışma, Trakya yöresinde yetiştirilen ve sütleri toplanarak tüketime sunulan aşısız, sağmal sığırlardan alınan süt örneklerinde *Brucella* türlerinin varlığını bakteriyolojik ve PCR yöntemleriyle karşılaştırılmalı olarak araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Örnekler

Çalışmada Trakya yöresinde yetiştirilen sütleri tüketime sunulan 75 sütçü ırk sığıra ait süt örnekleri kullanıldı. Her bir hayvana ait süt örnekleri 50' şer ml olarak iki steril tüpe alındı. Süt örneklerinin biri izolasyon da, diğeri PCR' da kullanmak üzere soğuk zincir altında İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına getirildi (Tablo 1).

Besiyerleri

İzolasyon ve identifikasyon için *Brucella* Selektif agar, Triptik Soy Agar, Serum Dekstroz Agar (SDA), Kanlı Agar, 1/25 000 ve 1/50 000' lik Tiyoninli agar, 1/25 000 ve 1/50 000' lik Bazik Fuksinli agar, Gliserinli *Brucella* buyyon ve antibiyotikli besiyerleri (Streptomisin (SIGMA S6501) ilaveli SDA, Penisilin (SIGMA PEN-B) ilaveli SDA) kullanılmıştır (Alton ve ark., 1988; Bilgihan, 2004).

PCR Kiti ve diğer PCR için kullanılan gereçler

Süt örneklerinde *Brucella* türlerine ait spesifik DNA'nın saptanması amacıyla Sacace

Biotechnologies (Bruc-Com. Vet.) kiti kullanıldı.

Agaroz jelin hazırlanması, elektroforez ve DNA bantlarının boyanmasının sırasında sulandırıcı olarak 1X TBE buffer (APPLICHEM A 3945), amplifike edilmiş ürünlerin elektroforezinde % 2 oranında agaroz jel (Sigma E8751), PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi için yükleme solüsyonu (TAKARA-A125), elektroforezde DNA'ların ağırlıklarının saptanması için DNA Marker (Bio Basic INC. 0409), Agaroz jeli boyama amacıyla Ethidium Bromide (Sigma E8751) kullanıldı.

Brucella Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Toplanan süt örnekleri 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı ve krema tüpten alındı, çöküntü izolasyonda kullanıldı. Her bir süt örneğinden *Brucella* selektif besiyerine çift ekimler yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinden biri mikroaerobik diğeri aerobik şartlarda, 37 °C'de 5–7 gün süre ile inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresi sonunda üreyen koloniler Gram boyama yöntemi ile boyandı. Gram negatif kokobasil görünümünde olan koloniler şüpheli koloniler olarak değerlendirildi.

Şüpheli kolonilerin identifikasyonu amacıyla katalaz, oksidaz, üreaz, H₂S üretimi, tiyonin ve bazik fuksinde üreme testleri uygulandı, karbondioksit gereksinimleri belirlendi.

Br. abortus şüpheli izolatların, aşı suşu *Br. abortus* S19'dan ayrımı amacıyla izolatlar 5 IU/ml Penisilin içeren SDA'lı besiyerine, izole edilen *B. melitensis* şüpheli izolatlarının aşı suşu *B. melitensis* Rev 1'den ayrımı amacıyla izolatlar, 2,5 µg/ml streptomisin içeren SDA'lı besiyerlerine çizgi tarzında ekildi. Ekim yapılan besiyerleri 37 °C'de % 7 CO₂'li ortamda 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda izolatların antibiyotikli besiyerinde üreme durumu değerlendirildi.

Tablo 1. Örnek alınan süt sığırlarının bulunduğu ilçeler, yaşları, aşı durumları ve abortus bilgileri

Table 1. Raising place, age, vaccination status, abortion information of sampled cattle

Örnek No	Yer	Yaş Yıl	Aşı	Abortus Bilgileri	Örnek No	Yer	Yaş Yıl	Aşı	Abortus Bilgileri
1	İstanbul Avcılar	5	+	-	39	Kırklareli Vize	6	-	-
2		4	+	-	40	Düzova	6	-	-
3		4	+	-	41	İstanbul Silivri	3	-	-
4		5	+	-	42	Kadıköy	3.5	-	-
5		4	+	-	43		6	-	-
6	İstanbul,	4	-	-	44		3	-	-
7	Arnavutköy	4	-	-	45		4	-	-
8		5	-	-	46	Tekirdağ, Çorlu	8	-	7 Aylık Atık /27.03.2007
9		12	-	-	47	Karamehmet	3	-	Erken Doğum /10.02.2007
10		5	-	-	48	Tekirdağ Saray Göçerler	5	-	2.5 Aylık Atık /29.04.2007
11		4	-	-	49	Tekirdağ Çorlu Vakıflar	7	-	6 Aylık Atık /10.04.2007
12		4	-	-	50	Tekirdağ Çorlu Esenler	4	-	PlasentaRetansiyonu /08.05.2007
13		7	-	8 Aylık Atık /26.01.2007	51	Tekirdağ Çorlu Seymen	5	-	6 Aylık Atık /01.05.2007
14		3	-	-	52	Tekirdağ M.Ereğli Yeniçiflik	5	+	8 Aylık Atık Serolojik (+) 11.03.2007
15		9	-	-	53		4	+	7.5 Aylık Atık /16.04.2007
16	İstanbul Silivri	4	-	-	54	Tekirdağ Çorlu Seymen	5	-	2'nci 6 Aylık Atık /02.05.2007
17	Çanta	6	-	-	55	Edirne Uzunköprü	4	-	-
18		4	-	-	56	Çalıköy	6	-	-
19		4	-	-	57		4	-	-
20		5	-	-	58		3	-	Plasenta Retansiyonu/20.04.2007
21	İstanbul Silivri	4	-	-	59		6	-	-
22	Gazitepe	4	-	-	60	Edirne Uzunköprü Malkaçköy	5	-	-
23		4	-	-	61		5	-	-
24		5	-	-	62		7	-	7 Aylık Atık /03.05.2007
25		5	-	-	63		4.5	-	-
26	Kırklareli Vize	4	-	-	64		7	-	-
27	Çakıllı	5	-	-	65		5	-	-
28		5	-	-	66		5	-	-
29		5	-	-	67		3	-	-
30		6	-	-	68		5	-	-
31		5	-	-	69		6	-	6.5 Aylık Atık /20.03.2007
32	Kırklareli Vize	6	-	-	70		6	-	-
33	Okçular	6	-	7 Aylık Atık /14.04.2007	71	İstanbul Büyükçekmece Hadımköy	4	-	-
34		5	-	-	72		4	-	8 Aylık Atık /07.03.2007
35		5	-	-	73		3	-	-
36		5	-	-	74	Tekirdağ Çerkezköy	4	-	-
37	Kırklareli Vize	7	-	-	75		2.5	-	5 Aylık Atık /14.05.2007
38	Düzova	4	-	-					

(-) : negatif
(+) : pozitif

(-) : negative
(+) : positive

PCR

İncelenecek süt örnekleri 3000 rpm' de 15 dakika soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı, çöküntüye 100 µl DNA ve RNA'sız FTS eklendi. Süspansiyon bir pipetle steril DNA'sız ependorf tüplerine alındı.

Süt örneklerinden DNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu kitte belirtilen yönteme göre gerçekleştirildi.

Elektroforetik Seperasyonu ve DNA' nın saptanması amacıyla DNA'sı amplifiye edilmiş ürünlerden 10 µl alınarak üzerlerine 2'er µl yükleme solüsyonu eklendi. Bu karışımlardan 10'ar µl agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk boşluğa 6 µl DNA marker ve 2 µl yükleme solüsyonu, ikinci boşluğa 10 µl pozitif kontrol, üçüncü boşluğa 10µl negatif kontrol ve diğer boşluklara örnekler için amplifiye DNA konuldu. Elektroforez işlemi 90 Voltta 45 dakika süreyle gerçekleştirildi. İşlemin sonunda jel tanktan alınarak hazırlanan Ethidium Bromide solüsyonunda 45 dakika süreyle boyandı. DNA bantlarının oluşumu U.V. transilatör üzerinde gözlemlendi.

Sonuçların Yorumlanması

Agaroz jel elektroforetik seperasyonun sonucunda pozitif kontrolde spesifik bantın 460 pb moleküler ağırlığında, negatif kontrolde internal kontrolün 770 pb moleküler ağırlığında oluşumu gerekmektedir. İncelenen örneklerde pozitiflik durumu 460 pb ve 770 pb' lik bantlara sahip olunması durumunda kabul edildi. Negatiflik sadece 770 pb moleküler ağırlığında internal kontrol bant oluşumu olarak değerlendirildi.

Bulgular

Ekim yapılan *Brucella* selektif besiyerlerinin aerobik ve mikroaerobik şartlarda 5–7 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin morfolojileri stereo-mikroskopta incelendi. Smooth, şeffaf, şebnem tanesi görünümünde koloni morfolojisine sahip olan kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif kokobasil görünümünde olan koloniler şüpheli olarak kabul edildi. İncelenen 75 örneğin 3'ü (13, 32

ve 53 Nolu) *Brucella* spp. şüpheli koloniler olarak değerlendirildi.

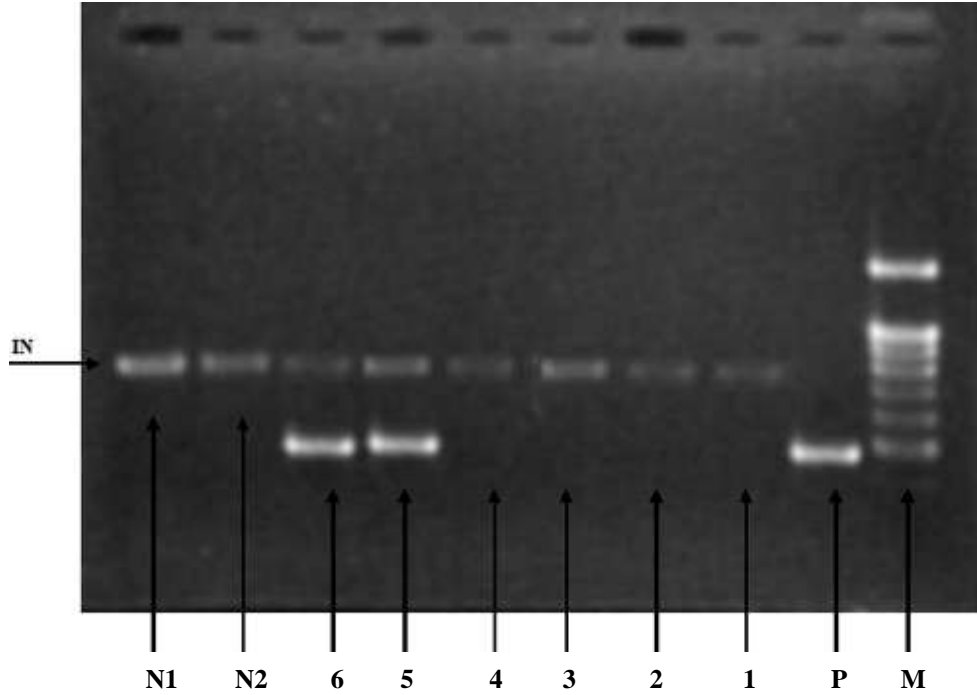
İncelenen üç izolatin oksidaz, katalaz ve üreaz testlerinin pozitif olduğu belirlendi. Şüpheli üç izolatin ikisinin (32 ve 53 nolu) % 7 CO₂'li ortama gereksinim duyduklarının tespit edildi. Diğer izolatin (13 nolu) mikroaerobik ve aerobik ortamın her ikisinde de ürettiği belirlendi. H₂S üretimi, dört günlük inkübasyon süresi içinde bir izolatin (13 nolu) negatif olduğu, iki izolatin (32 ve 53 nolu) 1. günün sonunda pozitif reaksiyon verdiği belirlendi. Tiyonin varlığında üreme yönünden dört günlük inkübasyon süresi sonunda, 32 ve 53 nolu izolatlardan her iki konsantrasyonda Tiyonin içeren *Brucella* besiyerinde ürettiği, 13 nolu izolatin ümediği belirlendi. Bazı Fuksin içeren *Brucella* besiyerlerine ekimleri yapılan üç izolatin her iki konsantrasyonda da ürettiği saptandı.

Sonuç olarak incelenen 75 süt örneğinden izole edilen 3 (%4) suşun birinin *B. melitensis* (13 nolu örneğe ait izolat), diğer ikisinin *B. abortus* (32 ve 53 nolu örneklere ait izolatlardan) olduğu belirlendi.

Antibiyotik içeren besiyerlerinde üreme durumları incelendiğinde; iki adet *B. abortus* izolatının ve bir adet *B. melitensis* izolatının aşı suşu olmadığı saptandı.

Kitle sağlanan spesifik primerleri kullanarak PCR ile incelenen 75 süt örneğinin 17' sinin pozitif olduğu saptandı.

B. abortus (32 ve 53 nolu örnekler) ve *B. melitensis* (13 nolu örnek) izole edilen sütlerin PCR' da da pozitif olduğu belirlendi.



Şekil 1. PCR sonuçları

Figure 1. Results of PCR

M- Marker.
P- Pozitif Kontrol
N 1 ve N 2 Negatif Kontrol
İN- İnternal Kontrol
5 ve 6: Pozitif örnekler.
1, 2, 3 ve 4: Negatif örnekler.

M: Marker
P: Positive Control
N1 and N2: Negative control
IN: Internal Control
5 and 6: Positive control
1,2,3 and 4: Negative control

Tartışma ve Sonuç

Önemli zoonozlardan biri olan Bruselloz' un prevalansı ülkeler, ülke bazında iller ve hatta işletmeler arasında farklılıklar göstermektedir (Aydın ve ark., 1990; Corbel, 1997; Demiröz ve ark., 1996; Erdoğan ve ark., 1993; Güler ve ark., 2003; İlhan ve ark., 1999). Mücadelede hastalık odaklarının saptanması epidemiyolojik çalışmalarda ve eradikasyon programlarında atılacak en önemli adımlardan biri olarak bildirilmektedir (Alton ve ark., 1988; Radostitis ve ark., 1994; SANCO, 2001).

Türkiye' de Bruselloz ile mücadele projesi 1984–2010 yıllarını kapsayan Tarım ve Orman

Bakanlığı tarafından yapılmış, Türkiye beş bölgeye ayrıldığı bir araştırmadır.

Bu projede 1989 yılında Bruselloz prevalansının bölgelere göre değişmekle birlikte, % 0–10 arasında olduğu bildirilmiştir (İyisan ve ark., 2008). Erdoğan ve ark. (1993), 1989–1992 yılları arasında Trakya bölgesinde sığır, koyun ve keçi atık fetuslarından *Brucella* spp. varlığını ve Bruselloz' un seroprevalansını araştırdıkları çalışmada, 97 sığır ve 154 koyun ve keçi fetusundan sığırlarda % 13,4 oranında *B. abortus* koyun ve keçilerde % 20 oranında *B. melitensis* izole edilmiş. Ayrıca sığırlarda % 11, koyun ve keçilerde % 16,13 oranında seropozitiflik saptanmıştır.

İyisan ve ark. (2008), Türkiye genelinde Bruselloz seroprevalansının sığırlarda % 1,43 olduğunu bildirmişlerdir.

Demirözü ve ark. (1996), Trakya yöresinde Bruselloz' un seroprevalansını belirlemek için yaptıkları çalışmada, İstanbul, Tekirdağ, Kırklareli ve Edirne illerinde 6089 sığıra ait kan serumunu RBPT ve KFT ile incelemişler, seroprevalansı % 1,06 olarak saptamışlardır.

Türütoğlu ve ark. (2003), Burdur yöresinde sığır sütlerinde *Brucella* spp. varlığını ve *Brucella* türlerine karşı oluşmuş antikorları belirlemek amacıyla 101 sığıra ait süt örneğini toplamışlar. Süt örneklerinden etken izole etmediklerini ancak MRT ile % 3 ve SAT' la % 2,2 oranında pozitiflik saptadıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada Trakya yöresinde yetiştirilen 75 sığıra ait süt örneklerinde izolasyon oranı % 4 olarak belirlenmiştir.

Sığır Bruselloz' unun primer etkeni *B. abortus*' tur, ayrıca *B. melitensis* ve nadiren de *B. suis*' ten kaynaklanan infeksiyonlar da gözlenmektedir (**Arda ve ark.,1999; OIE Manual, 2004; Qiunn ve ark., 1999; Radostitis ve ark., 1994**). Keçi ve koyun Brusellozunun primer etkeni ise *B. melitensis*' tir. Sığır, keçi ve koyunların bir arada yetiştirilmesi, *B. abortus* ve *B. melitensis*' in kendi primer konakçısı dışında diğer hayvanlara saçılmasına neden olmaktadır (**Corbel , 1997**).

Bu çalışmada bir süt örneğinden *B. melitensis* izole edilmiştir. Çiftlikte koyun ve sığırların bir arada yetiştirilmesi nedeniyle, etkenin koyunlardan sığıra bulaştığı düşünülmüştür.

Brucella türlerinin belirlenmesinde etken izolasyonu ve PCR kullanıldığı, etken izolasyonunun "altın standart" bir yöntem olarak kabul edilmesine karşın, çok zaman alması, laboratuvar çalışanlarına bulaşma riski, kontamine materyallerden izolasyon şansının az olması ve özel besiyerlerine gereksinim duyulması gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (**Bricher, 2002; Fekete ve ark., 1992; Güler ve ark., 2003; Hamdy ve Amin, 2002**).

Brucella etkenlerinin izolasyonunun uzun sürmesi, sütün düşük mikrobiyal kalitesi ve/veya *Brucella* selektif besiyerinin mantar etkenlerinin gelişmesini önlemede yetersiz kalmasından kaynaklanan kültür kontaminasyonlarının, izolasyonda sık karşılaşılan sorunlardan biri olduğu belirtilmiştir (**Kanani, 2007**).

Bu çalışmada sekiz süt örneğinde izolasyonda mantar kontaminasyonundan kaynaklanan sorun yaşanmıştır. Kontamine olması nedeniyle değerlendirilemeyen bu sekiz örneğin üçünde PCR da *Brucella* spesifik DNA' sını belirlenmiştir.

PCR yönteminin hızlı ve kesin sonuç elde edilmesi nedeniyle tercih edilmesinin yanısıra, maliyetinin yüksek olması, özel laboratuvar ve malzemeye gereksinim duyulması gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (**Bricker ve Halling, 1994; Hamdy ve Amin 2002; Herman ve De Ridder, 1992; Leary ve ark., 2006**).

Güler ve ark. (2003), yaptıkları karşılaştırılmalı bir çalışmada, 126 koyuna ait fetus örneğini kültür ve PCR yöntemi ile incelemişler, 39' ar örnekte *B. melitensis* izolasyonu ve PCR' da da spesifik *Brucella* DNA' sini saptamışlardır. Saptanan 39 spesifik *Brucella* DNA' sına ait örneğin 38'inden izolasyon yapıldığı, izolasyon yapılmayan bir süt örneğinin PCR' ının pozitif olduğu, PCR' ı pozitif olan bir örnekten de izolasyon yapılmadığını bildirmişlerdir.

İlhan ve ark. (2008), yaptıkları bir çalışmada kesime götürülen 162 koyunda izolasyon, PCR ve serolojik bulgu sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Sonuçta kandan iki, lenf dokularından 28 *B. melitensis* izolasyonu, PCR' da ise kanda 45, lenf dokusunda 47 pozitiflik saptamışlar, 45 koyunun seropozitif olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Brucella* etkenlerini saptamak için PCR yönteminin daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

Romero ve ark. (1995), seropozitif olarak belirlenen 56 ineğe ait süt örneklerinde izolasyon ile PCR yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, kültürde

pozitiflik oranı % 100, PCR' da ise % 87,5 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar PCR' da pozitiflik oranının daha düşük olmasının nedeninin DNA amplifikasyonunu engelleyen inhibitörlerin neden olabileceği görüşüne varmışlardır. **Güler ve ark. (2003)** da benzer nedenlerden dolayı kültürün PCR tekniğinden daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

Hamdy ve ark. (2002), geçmişte *Brucella* açısından pozitif bilinen bir çiftlikteki 52 sığırın süt örneğini kültür ve PCR yöntemleriyle incelemiş, PCR' da pozitiflik oranı % 55, kültürde ise % 46 olarak saptamışlardır. PCR' daki daha yüksek pozitiflik saptanmanın nedeninin, bu yöntem ile canlı ve cansız bakterilerin saptanabilmesinden ve çok az miktarda bakteriyi de saptayabilme yeteneğinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. **Gallien ve ark. (1998)**, üç infekte sığırın iç organlarından (Uterus, meme, dalak, lenf düğümü, böbrek ve karaciğer) PCR ve bakteriyolojik inceleme yapmışlardır, PCR' da 18 örnekte pozitif saptamışlardır. Pozitif saptanan 18 organ örneğinden 13' ünde etken izolasyonu yapmışlar, sonuçta PCR' ın izolasyondan daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

PCR' ın izolasyondan daha duyarlı olduğunu vurgulayan **Kanani (2007)**, 101 adet boğanın sperma örneklerinin % 7,92' sinde etken izolasyonu, % 18,8' inde PCR ile *Brucella* spesifik DNA' sı belirlemiştir. **Evangelista ve ark. (2005)**, 27 seropozitif sığıra ait kan ve süt örneğinde PCR, kültür ve serolojik testleri karşılaştırdıkları bir çalışmada, pozitif bulunan 27 örneğin 17'sinde PCR ile *Brucella* spesifik bantlar saptarken, 12' sinden *B. abortus* izole etmişlerdir.

Leal-Klavezas ve ark. (2000), yaptığı bir çalışmada süt örneklerinden PCR' da % 64 oranında pozitiflik saptarken aynı örneklerden etken izolasyonu yapamamışlardır.

Bu çalışmada PCR ile 75 süt örneğinden 17 (%22,6) 'sinde *Brucella* spesifik DNA saptanmıştır. İzolasyonun yapıldığı üç süt örneğinde PCR' da pozitif sonuç vermiştir.

Sonuç olarak önemli zoonozlardan biri olan Bruselloz' un Türkiye' de duyarlı hayvanlar

arasında ve insanlarda oldukça yaygın görülmesi nedeniyle kontrol ve eradikasyonu ile ilgili programların aksatılmadan ve dikkatlice yürütülmesi, bölgesel hastalık oranlarının belirlenmesi açısından benzeri çalışmaların belirli zaman aralıkları ile tekrar edilmesi gerekmektedir. Kısa sürede tanı yapabilmek amacıyla uygun laboratuvar koşullarının bulunduğu ortamlarda PCR yönteminin süreyi kısaltması açısından yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abdussalam. M., Fein, D.A., 1976.** Brucellosis as a world problem. Developments in Biological Standardization 31, 9–23.
- Abela, 1999.** B. Epidemiology and control of Brucellosis in ruminant from 1986–1996 in Malta. Revue Scientifique et Technique 18, 648–59.
- Aiello, S.E., Mays, A., 1998.** Brucellosis “ in the Merck Veterinary Manual ” 8th ed. White House Station, N J: Merck and CO. pp. 991–1034.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M., 1988.** Techniques for the Brucellosis laboratory. Institut National De La Recherche Agronomique 147, rue de 1' Universite, 75007; Paris, France.
- Anderson, T.D., Cheville, N.F., Meador, V.P., 1986.** Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. Veterinary Pathology 23, 227–239.
- Arda, M. ve ark., 1999.** Özel Mikrobiyoloji. Ankara: Medisan yayın evi
- Bilgihan, H., 2004.** Klinik mikrobiyolojik tanı. İzmir, Türkiye: Fakülteler kitapevi, Barış yayın
- Aydın, N., Arda, M., Akay, Ö., İzgür, M., Ayhan, H., Esendal, Ö., Aydın, F., 1990.** Atık fetuslardan izole edilen *Brucella* suşlarının Koagülünasyon testi ile identifikasyonu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 37, 348–358.
- Bricher, B.J., 2002.** PCR as a diagnostic tool for Brucellosis. Journal of Veterinary Microbiology 90, 435–446.
- Bricker, B.J., Halling, S.M., 1994.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. Journal of Clinical Microbiology and Infection 32, 2660–2666.

- Corbel, M.J., 1997** Brucellosis in overview. 1.st Internation Conference on Emerging Zoonoz Jarusalem. *Emerging Infectious Diseases* 3, 213–221.
- Cortez, A., Scarcelli, E., Soares, R.M., Heinemann, M.B., Sakamoto, S.M., Genovez, M.E., Ferrira, F., Richtzenhain, İ.J., 2001.** Detection of Brucella DNA from aborted bovine fetuses by PCR. *Australian Veterinary Journal* 79, 500–501.
- Demirözü, K., Çelik, M., İyisan, S., Özdemir, Ü., Erdenliğ, S., 1996.** Trakya bölgesindeki Brucellosis'in sero-epidemiolojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 27, 79–100.
- Erdoğan, İ., Gürel, A., Tekin, C., Uyanık, F., Bitgel A., 1993.** Trakya bölgesinde koyun, keçi ve sığırlarda bakteriyel abortların tesbiti ve dağılımı. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 24, 23–35.
- Evangelista, T.B.R., Santos, H.O., Navarro, A.F.L., Basulto, G.E.M, Nielsen, K., Francisco, M., Gomez, M., Roseles, J.F.M., Manriquez, L.C.P., 2005.** Evaluation of polymerase chain reaction test (PCR) for the diagnosis of bovine Brucellosis. *Tecnica Pecuaria en Mexico* 43, 117–126.
- FAO, 2000.** Bovine Brucellosis. Animal Health Diseas Cards. Erişim <http://www.fao.org/bovine/Brucellosi>.
- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., Sanborn, M.R., 1990.** Preliminary development of diagnostic test for Brucella using PCR. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 216–227.
- Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M., 1992.** Detection of brucella by PCR in bovine fetal and maternal tissue. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 4, 79–83.
- Hamdy, M.E., Amin, A.S., 2002.** Detection of Brucella species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *American Journal of Veterinary Research* 163, 299–303.
- Herman, L., De Ridder, H., 1992.** İdentification of Brucella spp. by using the PCR. *Applied and Environmental Microbioly* 58, 2099–2101.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, T.T., Williams ST., 1994.** Bergey's manuel of determinative bacteriology. 9th. Edi. Baltimore, USA.
- Gallien, P., Dorn, C., Ablan, G., Staak, C. Protz, D., 1998.** Detection of Brucella spp. in organs of naturally infected cattle by PCR. *Veterinary Record* 142, 512–514.
- Güler, L., Gündüz, K., Ok, U., 2003.** Comparison of PCR and bacteriological culture for diagnosis of sheep Brucellosis using aborted fetus samples. *Veterinary Microbiology* 93, 53–61.
- İlhan, Z., Keskin, O., Sareyüpoğlu, B., Kökçü, L., Akan, M., 1999.** Bir sığırcılık işletmesinde Brucella abortus Epidemisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 46, 257–262.
- İlhan, Z., Aksakal, A., Ekin, H., Gülhan, T., Solmaz, H., Erdemli, S., 2008.** Coparison of culture and PCR for detection of Brucella melitensis in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep. *Jornal Compilation. The Socociety for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 46, 301–306.
- İyisan, A.S., Akmaz, Ö., Gökçen Düzgün, S., ark., 2000.** Türkiyede sığır ve koyunlarda Brusellosizin sero epidemiolojisi. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 31, 21–75.
- İzgür, M., Akay, Ö., Arda, M., Erdeğer, J., 1992.** Sığır Brucellosizin teşhisinde EDTA ve 56° C de aglutinasyon testlerinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 39, 191–200.
- Kanani, A.N., 2007.** Serological, Cultural and Molecular Detection of Brucella infection in Breeding Bulls. A thesis submitted to A. A. U. Anand
- Leal-Klevezas, D.S., Martinez, V.I.O., Lopez, M.A., Garcica, C.J., Martinez, S.J.P., 2000.** Use of PCR to detect Br. abortus biovar 1 in infected goats. *Journal of Veterinary Microbiology* 75, 91–97.
- Leal-Klevezas, D.S., Martinez, V.I.O., Lopez, M.A., Martinez, S.J.P., 1995.** Single-step PCR for detection of Brucella spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbioly* 3, 3087–3090.
- Leary, S.O., Sheahan, M., 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.
- Noviello, S., Gallo, R., Kelly, M., Limberger, R.J., Deangils, K., Cain, L., Wallance, B., Dumans, N., 2004.** Laboratuary acquired Brucellosis. *J. Emerg. İnfec. Dis.*; **10**: 1 **OIE 2004** Caprine and ovine Brucellosis. Manual of standerds for diagnostic test and vaccines, OIE Technical Report Series. 5th edition Paris; Chapter 2.4.2.848–1850.

- OIE Manual., 2004.** Bovine brucellosis in : "Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animal". OIE World Organisation For Animal Health part 2 chapter 2.3.1.
- Quinn, P.I., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R., 1999.** Clinical veterinary microbiology. Mosby press, London pp.261–267.
- Radostitis, O.M., Blood, D.C., Gay, C.C., 1994.** Veterinary Medicine 8th edition, Bailliere Tindall Ltd. London pp: 787–813.
- Refai, M., 2002.** Incidence and control of Brucellosis in the near east region. Veterinary Microbioly 90, 81–110.
- Rijpens, N.P., James, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R., Herman, L.M.F., 1996.** Direct detection of *Brucella* spp. In raw milk by PCR and reverse hybridization with 16 S–23 S rRNA spacer probes. Applied and Environmental Microbioly 62, 1683–1688.
- Romero, G., Pardo, M., Grillo, M.J., Diaz, R., Blasco, J.M., Lopez-Gon, I., 1995.** Evaluation of PCR and Indirect ELISA on milk samples for the diagnosis of Brucellosis in dairy cattle. Journal of Clinical Microbioly and Infection 33, 3198–3200.
- SANCO, 2001.** European commiission scientific comitee on animal health and animal welfare, Brucellosis in sheep and goat. C2/AH/R23/2001
- Şehin, T., Yıldız, A., 2006.** Hatay yöresinde koyun ve keçilerde Brusellozisin seroprevalansının araştırılması. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 20, 331–335.
- Taleski, V., Kantardjiev, T., Cretnic Z, 2002.** An overview of the epidemiology and epizootology of Brucellosis in selected countries of Central and South East Europe. Veterinary Microbioly 90, 147–155.
- Taşçı, F., 2004.** Gıda kaynaklı Brucellosis ve önemi. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 23, 137-142.
- Türütoğlu, H., Mutluer, B., Uysal Y., 2003.** Burdur yöresinde toplanan sütlerin *Brucella* enfeksiyonu yönünden araştırılması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 27, 1003–1009.
- Unver, A., Erdoğan, H., Atabay, H., Şahin, M., Güneş, V., Çitil, M., Gökçe, H., 2006.** Sığır atıklarından izole edilen *Brucella* türlerinin RAPD-PCR ile genotiplendirmesi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 12, 121-127.
- VHO, İzmir, 2007,** www.izmir-vho.org7default.asp?sayfa=119.*Brucella* aşısı.(Erişim tarihi 20.08.2007)
- WHO , 2006.** Brucellosis in human and animal World Health Organization, World Organisation for Animal Health and FAO. Geneva
- XiaoAn, C., ChangGing, Q., JiZhang, Z., Chunhua Y, Shuangdi, G., Shumin, C., 2005.** Laboratory evaluation on PCR diagnostic kit for detecting Brucellosis in dairy cow. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology 35, 712–717