T C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BRUCELLA MELITENSIS SUŞLARININ GENETİK PROFİLLERİNİN MLVA (MULTİLOKUS DEĞİŞKEN SAYIDA ARDIŞIK TEKRAR ANALİZİ) VE MLST (MULTİLOKUS DİZİ TİPLENDİRME) YÖNTEMLERİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Kadir AKAR
Veteriner Hekim

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

KONYA 2021

T C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BRUCELLA MELITENSIS SUŞLARININ GENETİK PROFİLLERİNİN MLVA (MULTİLOKUS DEĞİŞKEN SAYIDA ARDIŞIK TEKRAR ANALİZİ) VE MLST (MULTİLOKUS DİZİ TİPLENDİRME) YÖNTEMLERİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Kadir AKAR

Veteriner Hekim

DOKTORA TEZİ

Danışman

Prof. Dr. Osman ERGANİŞ

Bu Araştırma Tarım ve Orman Bakanlığının Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) tarafından TAGEM/HSGYAD/A/20/A5/P1/1842 Proje numarası ile desteklenilmiştir.

KONYA 2021

ÖNSÖZ

Bruselloz, Türkiye'nin de dahil olduğu Akdeniz'e komşu Avrupa ülkeleri ile Kuzey Afrika ülkelerinde, Meksika ile Orta ve Güney Amerika'da, Hindistan ve Arap Yarımadası'nda hiperendemik ve halk sağlığına önemli etkileri olan oldukça bulaşıcı bakteriyel bir zoonozudur. Hastalık neredeyse tüm hayvan türlerinde ve insanlarda görülür. Bruselloz insanlık tarihinin bilinen en eski hastalıklarındandır. Enfeksiyon hayvanlarda önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Dünyanın birçok ülkesinde endemik görülen enfeksiyonun yılda 500,000 insanı etkilediği ve bundan 26 kat kadar fazla enfekte bireyin olduğu tahmin edilmektedir. Brusellozun Türkiye'de sığır ve koyunlarda yaygınlığını tespit etmek için 2011 yılında yapılan çalışmada, hastalığın sürü prevalansı sığırlarda %7,8 ve koyunlarda %22,5 olarak bildirilmiştir (Yumuk ve O'Callaghan 2012). Daha sonra 2017 yılında Koyun ve Keçi Brusellozu yönünden serosurvey çalışmasında fert prevalansı %2,10 ve sürü prevalansı %12,34 olarak hesaplanmıştır (GTHB 2018). Brusellozun eradike edildiği ülkelerde MLST ve MLVA gibi metodlar hastalıkların orijinlerinin tespiti ve mihrak araştırma konularına ışık tutması açısından oldukça önemli moleküler metodlardır. Bu çalışmada, tüm Türkiye'yi temsil edecek şekilde suşlar seçildi. Doğrulama çalışmalarının ardından genotiplendirme için MLST ve MLVA metodları kullanıldı. İki farklı metodun sonuçları yorumlaranarak değerlendirmeye alındı.

Doktora tez çalışmam sırasında ilgi ve yardımlarını gördüğüm danışman hocam Sayın Prof. Dr. Osman ERGANİŞ'e, S.Ü Veteriner Fakültesi Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. U. Sait UÇAN, Prof. Dr. H. Hüseyin HADİMLİ, Doç. Dr. Zafer SAYIN, Doç. Dr. Aslı SAKMANOĞLU'na, Dr. Öğretim üyesi Ali USLU'ya, Aksaray Üniversitesi Öğretim Üyesi Dr. Gökçenur SANİOĞLU'na,

Proje öneri formunun hazırlanma aşamasından, tez haline kadar ki geçen her aşamasında desteğini esirgemeyen kıymetli arkadaşım Sayın Dr. Öğretim görevlisi M. Sencer KARAGÜL'e,

Enstitü müdiremiz Sayın Dr. Fahriye SARAÇ'a, beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım mesai arkadaslarım Sayın Emin Ayhan BAKLAN, Sayın Dr. Ahmet Murat SAYTEKİN, Sayın Dr. Esra SATIR'a, Sayın Dr. Buket EROĞLU'na, Sayın Dr. Gülseren YILDIZ ÖZ'e, Sayın Ayşe PARMAKSIZ'a ve değerli teknik koordinatörümüz Sayın Dr. Ayşe ATEŞOĞLU'na,

Bu çalışmaya verdikleri her türlü katkı için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü ile Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğüne tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Verdikleri bütçe olanaklarından dolayı tezi yapma fırsatı sunan Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)'e teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmamı, bana huzurlu, mutlu ve sevgi dolu hissetmemi sağlayan her aşamasında hep yanımda olan anne, baba, kardeşim ve eşine teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **ii**

İÇİNDEKİLER ..... **iv**

ŞEKİLLER ..... **vii**

ÇİZELGELER ..... **ix**

SEMBOLLER / KISALTMALAR ..... **x**

ÖZET ..... **xiv**

SUMMARY ..... **xvi**

1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**

1.1.Hastalığın Tanımı 3

1.2. Hastalığın Tarihçesi 5

1.3. Etken Özellikleri 8

1.4. Epidemiyoloji 12

1.4.1. Hayvanlarda Epidemiyoloji 12

1.4.2. İnsanlarda Epidemiyoloji 18

1.4.3. Ülkemizde Bruselloz 19

1.5. Patogenez 19

1.6. Klinik Bulgular 27

1.6.1. Hayvanlarda Klinik Bulgular 27

1.6.2. İnsanlarda Bruselloz 29

1.7. Tanı Yöntemleri 31

1.7.1. Direkt Tanı Yöntemleri 31

1.7.2. İndirekt Tanı Yöntemleri 42

1.7.3. Hücresel Bağışıklık Testleri 46

1.8. Tedavi 47

1.9. Koruma ve Kontrol 49

1.9.1. İdeal *Brucella* Aşısı 52
1.9.2. Ülkemizde Koruma ve Kontrol Programı 55
2.GEREÇ VE YÖNTEM 58
2.1. Gereç 58
2.1.1. İzolatlar 58
2.1.2. İzolasyon Besiyeri 59
2.1.3. Biyotiplendirme Besiyerleri 59
2.1.4. Diğer Besiyerleri 62
2.1.5. Morfolojik, Serolojik, Biyokimyasal ve Faj Test Gereçleri 62
2.1.6. Moleküler Yöntemlerde Kullanılan Gereçler 64
2.1.7. Görüntüleme ve Elektroforez Cihazları 66
2.1.8. Kullanılan Diğer Gereçler 67
2.2. Yöntem 67
2.2.1. Etkenin İdentifikasyonu ve Biyotiplendirilmesi 67
2.2.2. Moleküler Yöntemler 68
3.BULGULAR 76
3.1. Biyotiplendirme Sonuçları 76
3.2. MLVA Metodunda Kullanılan PZR Ürünlerinin Doğrulanması Sonuçları 80
3.3. MLVA Metodu için Hazırlanan PZR Ürününün Fragment Analiz Sonuçları 80
3.4. MLVA Sonuçlarının Değerlendirilmesi 92
3.5. MLST Metodundaki PZR Ürünlerinin Doğrulanması Sonuçları 97
3.6. MLST Metodu için Sekans Veri Sonuçlarının Değerlendirilmesi 98
3.7. MLST Metodundaki Değerlendirme Sonuçları 111
4.TARTIŞMA 112
4.1. MLVA ile Sonuçların Değerlendirilmesi 113
4.1.1. Akdeniz ve Avrupa Ülkelerindeki Durum 113

4.1.2. Orta Asya ve Uzak Doğu Ülkelerindeki Durum..... 118
4.1.3. Ülkemizdeki Durum 121
4.2. MLST Sonuçlarının Değerlendirilmesi 122
5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... 127
6.KAYNAKÇA 128
7.EKLER..... 142
EK-A: Etik Kurul Kararı 142
EK-B..... 143
8.ÖZGEÇMİŞ..... 149

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Brucella türlerinin filogenetik dağılımı (Pappas 2010) 10

Şekil 1.2. Dünya haritasında ki Brucella melitensis kaynaklı hastalık dagılımı (OIE 2020). 14

Şekil 1.3. Dünya haritasındaki Brucella abortus kaynaklı hastalık dağılımı (OIE 2020). 16

Şekil 1.4. Makrofaj hücrelerinde Brucella'nın hücre içi trafiği şematizesi (de Figureido ve ark 2015). 23

Şekil 1.5. Brucella farklı türlerinin biyovar dağılımları (Le Fleche ve ark. 2006) 39

Şekil 1.6. Multilokus Sequene Typing ile türlerin dağılımı (Whatmore ve ark. 2007) 41

Şekil 1.7. Brucella melitensis biyovarların Multilokus Sequence Typing analizindeki Sequence Typing değerleri ve coğrafik ilişkisi (Whatmore ve ark 2016)..... 42

Şekil 2.1. Çalışma izolatlarının coğrafi dağılımı 58

Şekil 2.3. aroA gen bölgesi GeneStudio programında değerlendirilmesi..... 75

Şekil 3.1. Multi Lokus Variable Number Tandem Repeat Analizinin PZR agaroz jel görüntüsü Referans16M ve Referans 63/9'a ait jel görüntüsü. Referans63/9M1:145-250 ile 320-465 bp arası..... 80

Şekil 3.2. Referans 16M multipleks1 ve multipleks 2 lokuslarının pikleri GeneMapper ekran görüntüsü 82

Şekil 3.3. Referans 16M multipleks3 lokusların pikleri GeneMapper ekran görüntüsü..... 83

Şekil 3.4. Referans 16M multipleks4 lokusların piklerinin GeneMapper ekran görüntüsü... 84

Şekil 3.5. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks1 ve multipleks2 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü..... 86

Şekil 3.6. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks3 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü 87

Şekil 3.7. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks4 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü 88

Şekil 3.8. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez multipleks1 ve multipleks2 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü 89

Şekil 3.9. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez multipleks3 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü..... 90

Şekil 3.10. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez multipleks4 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü..... 91

Şekil 3.11. MultiLokus Variable Tandem Repeat Analiz ile çalışılan 50 adet saha izolatına ait dendogram analiz sonuçları olup 93

Şekil 3.12. Multi Lokus Variable Number Tandem Repeat Analizi'ne göre genotiplerin yakınlık ilişkileri Genotiplerin konakçı ilişkilerini göstermek adına kullanılan program ile farklı renklendirmeler yapılmıştır 1: sığır 2: keçi 3: koyun 4: keçi-koyun 5: keçi-sığır 95

Şekil 3.13. Çalışma izolatlarının Akdeniz izolatları arasındaki genotiplerin ilişkilerinin belirlenmesi. İzolatların kökenlerini belirtmek adına kullanılan program ile farklı renklendirmeler yapılmıştır. Koyu yeşil: Türkiye, Mavi: Yunanistan, Açık yeşil: İtalya, Pembe: Tunus, Sarı renk: Portekize 97

Şekil 3.14. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: Marker, trpE: 486 bp, gry: 469 bp, aroA: 565 bp, dnaK: 470 bp, cobQ: 422 bp, intF: 430 bp, glk: 475, omp25: 490, gap: 589 bp 98

Şekil 3.15. aroA gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü..... 102

Şekil 3.16. omp25 gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü 103

Şekil 3.17. cobQ gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü 104

Şekil 3.18. glk gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü 105

Şekil 3.19. trpE gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü..... 106

Şekil 3.20. dnaK gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü 107

Şekil 3.21. gap gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü..... 108

Şekil 3.22. gyrB gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü..... 109

Şekil 3.23. int-hyp gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü 110

ÇİZELGELER

Çizelge 1. Brucella türlerine ait konakçılar ve insanlardaki patojenitesi (Hull ve Schumaker 2018) 11

Çizelge 2. Brucella türlerinin biyovarlarının ayrıcı özellikleri (Alton ve ark. 1988; Joint FAO / WHO Expert Committee on Brucellosis 1986, Whatmore 2009; and Whatmore ve ark. 2014, OIE 2016)..... 33

Çizelge 3. Yıllara göre insan Brusellozu vaka ve ölüm sayıları (WAHİS 2019). 56

Çizelge 4. Multilokus Variable Number Tandem Repeat Analiz primer dizinleri ve uzunlukları (Garofolo ve ark 2013) 65

Çizelge 5. Multilokus Sequence Typing yönteminde kullanılacak genlere özgü primer dizileri ve uzunlukları (Whatmore ve ark 2007) 66

Çizelge 6. Multiplekslerin primer dizilimleri ve uzunlukları, florasan işaret renklerine göre dizaynı (Gorofolo ve ark 2013, LeFleche ve ark 2006) 70

Çizelge 7. Çalışma Örnekleri Biyotip Özelliklerine göre Değerlendirilmesi 77

Çizelge 8. Referans numunelerin tekrar (allel) sayıları 85

Çizelge 9. MLVA-16 sonucunda toplam 50 adet Brucella melitensis izolatının allel (tekrar) durumları ve HGDI değerleri..... 96

Çizelge 10. Multilokus Sequence Typing tüm genlerin allel numaraları ve Sequence Typing değerleri 99

Çizelge 11. Veritabanında Türkiye'ye ait izolatların Multilokus Sequence Typing değerleri (pubmlst.org)..... 111

SEMBOLLER / KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
AGID	Agar Jel immunodifuzyon Testi
B. abortus	*Brucella abortus*
B. canis	*Brucella canis*
B. ceti	*Brucella ceti*
B. inopinata	*Brucella inopinata*
B. melitensis	*Brucella melitensis*
B. microti	*Brucella microti*
B. neotamae	*Brucella neotamae*
B. ovis	*Brucella ovis*
B. papionis	*Brucella papionis*
B. pinnipedialis	*Brucella pinnipedialis*
B. suis	*Brucella suis*
B. vulpis	*Brucella vulpis*
BCSP31	Brucella cell surface salt extractable protein
BCV	Brusella içeren vakuol (Brucella-Containing Vacuole)
BTWC	Biyolojik ve Toksin Silahları Konvansiyonu
Bv	Biyovar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFT	Komplement Fikzasyon Testi
Cº	Celsius
CO2	Karbondioksit
DC	Dendrik Hücreler (Dendrik Cell)
DR	Doksisiklin+ Rifampisin
DS	Doksisiklin+Streptomisin
DSÖ	Dünya Saglık Örgütü
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EEA1	Erken Endozomal Antijen 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

ER	Endoplazmik Retikulum
ERİFA	Enzimatik Hızılı İmmunofiltrasyon Testi
FAP	Floresan Polarizasyon Testi
GM1	Gangliosidler
GPI	Glikosilfosfatidilinositol
HOOF-Prints	Hypervariable Octameric Oligonucleotide Fingerprints
I-ELISA	İndirek-ELISA
IFA	İndirekt fluoresan antikor
IgA	Immunoglobulin A
IgG	İmmunoglobulin G
IgM	İmmunoglobulin M
IL	İnterlökin
INF-γ	İnterferon Gamma
IS.	Insersion Sequence (Ekleme dizileri)
IU	İnternasyonel Ünite
Iz	Izatnagar
LAMP1	Lizozom ile ilişkili membran glikoprotein1
LPS	Lipopolisakkarit
M Hücreler	Membranöz Hücreler
M1	Multipleks1
M2	Multipleks2
M3	Multipleks3
M4	Multipleks4
M1fw	Mix1Forward
M2fw	Mix2Forward
M3fw	Mix3Forward
M4fw	Mix4Forward
M1rw	Mix1Reverse
M2rw	Mix2Reverse
M3rw	Mix3Reverse

M4rw	Mix4Reverse
ME	Merkaptoetonel Testi
MLST	Multi Locus Sequence Typing
MLVA	Multi Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis
MRT	Milk Ring Test-Süt Ring Testi
MRT	Süt Halka Testi (Milk Ring Test)
MyD88	Miyeloid Differentiation 88
NATO	Kuzey Atlantik Antlasma Paktı
NC	Nitroselüloz
NF-κβ	Nükleer Faktör kappaβ
NK	Natural Killer (Doğal Katil) hücreleri
O_2	Oksijen
OD	Optik Dansite
OIE	Dünya Hayvan Saglığı Örgütü
Omp	Outer membran protein
O-PS	O-Polisakkarit
pH	Hidrojen Gücü
pmol	Pikomol
PZR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
PAMP	Patojen ilişkili moleküler modeller (pathogen-associated molecular pattern
R	Rough
R/C	Rough/Canis
RBPT	Rose Bengal Pleyt Testi
RER	Rough endoplazmik retikulum
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorhism
RGSF-A	Ginseng saponin fraksiyonu A
RIA	Radioimmune assay
RTD	Rutin Test Dilusyonu
S	Smooth

SDA	Serum Dekstroz Agar
S-LPS	Smooth-Lipopolisakkarit
ST	Sequence Typing
Tb	Tibilisi
TLR	Toll benzeri reseptör (Toll like Receptor)
TNF-α	Tümör Nekrozis Faktör-α
TOB	Tarım ve Orman Bakanlığı
TR	Tandem Repeat
TRL	Toll benzeri reseptörleri
TSA	Tryptone Soy Agar
VNTR	Variable Number Tandem Repeat
WAHIS	Dünya Hayvan Saglıgı Bilgisi Veritabanı
Wb	Weybridge
WGS	Whole Genome Sequance
A	Alfa
M	Mikron

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Brucella melitensis Suşlarının Genetik Profillerinin MLVA (Multilokus Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Analizi), MLST (Multilokus Dizi Tiplendirme) Yöntemleriyle Değerlendirilmesi

Kadir AKAR

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi/KONYA-2021

Brucella melitensis (*B. melitensis*) kaynaklı Bruselloz enfeksiyonu ülkemizdeki küçükbaş hayvanlarında yüksek prevalans ile seyretmektedir. Bu çalışmada, 2009 ve 2017 yılları arasında Türkiye'nin yedi coğrafik bölgesinde bulunan farklı çiftliklerden gönderilen atık yapan koyun, keçi ve sığır konakçılarına ait numunelerden izole edilen ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Brusella Aşıları Üretim ve Referans Laboratuvarında tiplendirilen 50 adet *B. melitensis* suşunun Multilokus Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Analizi (MLVA) ve Multilokus Dizi Tiplendirme (MLST) yöntemleri ile genotiplendirilmesi amaçlandı.

Çalışmada kullanılan izolatlar, Serum Dekstroz Agar Besiyerine pasajlandıktan sonra *B. melitensis* olduklarına teyit etmek amacıyla klasik biyotiplendirme metodu yapıldı ve biyovarlarına göre tiplendirildi. Referans suşları ile 50 adet çalışma izolatının DNA ekstraksyonu ticari kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildikten sonra suşlar MLST ve MLVA ile genotiplendirildi. Sonuçlar Hunter Gaston Diversity Indexe (HGDI) göre değerlendirildi.

Genotiplendirme metotları için 17 adet *B. melitensis* bt1, 2 adet *B. melitensis* bt2, 23 adet *B. melitensis* bt3 ve 8 adet atipik *B. melitensis* izolatı kullanıldı. MLST metodunda 2 profil tespit edildiği ve ayrım gücünün yeterli olmadığından dolayı HGDI değeri hesaplanmamıştır. MLVA metodu için HGDI değerlerinin 0,55 ile 0,88 arasında değiştiği, ama en ayırt edici lokusun Bruce16 (HGDI=0,88) olduğu, onu Bruce04 (HGDI=0,86) ve Bruce30'un (HGDI=0,86) takip ettiği belirlendi. MLVA-16'ya göre çalışılan 50 adet izolatta 46 farklı genotip tespit edildi. Toplam 50 adet izolat profilinin 30 adedinin veritabanı ile birebir eşleştiği, kalan 20 adedinin veritabanında yer almadığı belirlendi. Bu 30 adet izolatın %93,3'ünün insan izolatları ile birebir aynı olduğu belirlendi. MLVA-8'e göre ise tüm izolatlarda genotip 43'ün yaygın olduğu tespit edildi. MLST ile 39 suşta özellikle Doğu Akdeniz Bölgesindeki ülkelere ait izolatlarda baskın olarak belirlenen Sequence Typing (ST8) varlığı tespit

edilirken, 11 suşta daha önceden tanımlanmayan bir profil saptandı. ST8'in ve yeni ST'nin dizilimi karşılaştırıldığında, glucokinase geninde varyasyon olduğu tespit edildi. *B. melitensis* Rev-1 aşı suşu ST7 genotipinde olduğu ve saha izolatları ile tamamen farklı olduğu belirlendi. MLST ve MLVA metodları ile *B. melitensis* biyovarları arasında ayrım yapılamadı. Bunun yanısıra konakçı, bölge ve yıla göre suşlar arasında önemli farklılıklar bulunamadı.

Sonuç olarak, MLVA metodunun ayrım gücünün MLST'e göre daha yüksek olduğu, MLST metodunun önceki yapılan çalışmalara göre belirlenen coğrafik kökenlere göre suşların ayrımında yararlı olduğu belirlendi. Kullanılan her iki yöntemin, yeni çıkacak hastalık vakalarından elde edilen izolatların takip edilmesine ve ayrıca hastalığın kontrol çalışmaları için bölgeye hâkim genotipe göre yapılacak olası aşı çalışmalarına yön verebileceği düşünülmektedir. MLVA metodu ile belirlenen profillerin insandakilerle aynı olmasının konakçılar arası geçiş açısından Tek Sağlık konusunu gündeme getirmektedir. Hayvan sağlığını korumanın insan sağlığı açısından çok önemli olduğu görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyovar; *Brucella melitensis;* Genotiplendirme; MLST; MLVA.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Evaluation of Genetic Profiles of *Brucella melitensis* Strain by using MLVA (Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis) and MLST (Multilocus Sequence Typing) techniques

Kadir AKAR

Microbiology Department

PhD THESİS/KONYA-2021

Brucellosis infection caused by Brucella melitensis (B. melitensis) progresses with a high prevalence in ovine animals in our country. In this study, 50 B. melitensis strains isolated from samples belonging to abortion made by cows, sheep and goat hosts sent from different farms in seven geographical regions of Turkey between 2009 and 2017 and typed in Brucella Vaccines Production and Reference Laboratory of Pendik Veterinary Control Institute, was aimed to be genotyped by using Multilokus Variable Numbe Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Multilocus Sequence Typing (MLST) methods.

After the isolates used in the study were passaged into Serum Dextrose Agar Medium, classical biotyping method was used to confirm that they were B. melitensis and typed according to their biovars. After DNA extraction of reference strains and 50 study isolates was performed in accordance with the commercial kit protocol, the strains were genotyped with MLST and MLVA. The results were evaluated according to the Hunter Gaston Diversity Index (HGDI).

For genotyping methods, 17 B. melitensis bt1, 2 B. melitensis bt2, 23 B. melitensis bt3 and 8 atypical B. melitensis isolates were used. Since 2 profiles were detected in the MLST method and the discrimination power was not sufficient, the HGDI value was not calculated. It was determined that HGDI values for MLVA method varied between 0.55 and 0.88, but the most distinctive locus was Bruce16 (HGDI=0,88), followed by Bruce04 (HGDI=0,86) and Bruce30 (HGDI=0,86). 46 different genotypes were detected in 50 isolates studied according to MLVA-16. It was determined that 30 of a total of 50 isolate profiles matched exactly with the database, and the remaining 20 were not included in the database. It was determined that 93.3% of these 30 isolates were identical to human isolates. According to MLVA-8, genotype 43 was found to be common in all isolates. According to MLST analysis, the presence of Sequence Typing (ST8), which was determined to be dominant in the isolates belonging to the countries in the Eastern Mediterranean Region, was detected in 39 strains, while a previously undefined profile was detected in 11 strains. When the sequences of ST8 and the new ST were compared, a variation was found in the glucokinase gene. The B. melitensis Rev-1 vaccine strain was determined to be in the ST7 genotype and completely different from the field isolates. No

distinction could be made between MLST and MLVA methods and B. melitensis biovars. In addition, no significant differences were found between strains by host, region and year.

As a result, it was determined that the discrimination power of MLVA method is higher than MLST and MLST method is useful in differentiation of strains according to geographic origins determined according to previous studies. It is thought that both methods used can guide the follow-up of isolates obtained from new disease cases and also possible vaccination studies to be carried out according to the dominant genotype for disease control studies. The fact that the profiles determined by the MLVA method are the same as those in humans brings up the issue of One Health in terms of transition between hosts. It is seen that protecting animal health is very important for human health.

Key Words: Biovar; *Brucella melitensis;* Genotyping; MLST; MLVA.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Brucella melitensis, koyun ve keçilerde hastalık oluşturduğu gibi sığırlarda da yavru atmaya neden olmaktadır. Bu nedenle çiftlik hayvanlarında oldukça patojendir. Brusellozun Türkiye'de sığır ve koyunlarda yaygınlığını tespit etmek için 2011 yılında yapılan çalışmada, hastalığın sürü prevalansı sığırlarda %7,8 ve koyunlarda %22,5 olarak bildirilmiştir (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı-Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2012). Bazı ülkelerde geniş çaplı eradikasyon programları ile hastalık eradike edilmiş veya büyük oranda azaltılmıştır (Whatmore 2007). Hastalıkla ilgili Türkiye'de 2012 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından kitlesel aşılama ile ''Kontrol ve Eradikasyon Projesi'' başlatılmıştır. 2015 yılına ait çalışmalarda hayvan ve insan vakalarında hastalık çıkışı sayıları incelenmiş ve hastalığın insidensinin düştüğü görülmüştür. Ayrıca hastalığı etkin bir şekilde kontrol etmek ve eradikasyon aşamasına getirmek için, kitlesel aşılamanın sürdürülmesi gerektiği vurgulanmıştır. İnsidensin azalması, sadece hastalık vaka sayısı değil, hastalık kaynağı olan bölgenin belirlenmesi açısından da önemlidir (Saytekin ve ark 2015).

Brucella spp.'lerın konakçı dağılımı ve ekolojik yaşam aralığı oldukça geniş bir yalpazede seyretmektedir. Hastalık etkenlerinin biyoterör ajanı olma potansiyeli de hastalığın risk seviyesini yükseltmekte ve mücadelenin önemini arttırmaktadır. *Brucella* etkenleri için bahsedilen riskler göz önüne alındığında enfeksiyona neden olan *Brucella* türü ve suşunun identifiye edilmesi çok önemlidir. *B. melitensis* kaynaklı brusellozun hem ülkemiz küçük ruminant sürülerinde yüksek prevalans değeri olması, hem de söz konusu suşun insan ve hayvan sağlığı için oluşturduğu riskler bulunmaktadır. *B. melitensis* konvansiyonel biyotipledirme metotları ile biyovar 1, 2 ve 3 olarak ayrılmaktadır. Koyun ve keçilerde yaygın olarak *B. melitensis* biyovar 3 enfeksiyona yol açmaktadır. Enfeksiyonun enzootik olarak görüldüğü bölgelerde koyun ve keçilerle yakın ilişki içinde bakılan duyarlı evcil ve yabani hayvanlarda *B. melitensis*'e bağlı Brusellozun yaygın olduğu belirtilmiştir (OIE 2009). Bruselloza neden olan *Brucella* türleri, günümüzde çoğunlukla bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle (Real-Time ve Multipleks PZR) identifiye edilmektedir. Bu moleküler yöntemlerle biyovar düzeyinde sınıflandırma yapılamamaktadır. Ayrıca bu metodlar epidemiyolojik araştırmalar için belirli bir

seviyede ayrım yeteneğine sahip olduğu ve *Brucella* cinsi içindeki yüksek genetik benzerlik olması, alt tiplendirmeyi zorlaştırmaktadır. Yapılan araştırmalar yaşanan tüm bu zorlukların gelişmiş moleküler metotlar ile aşılabileceği görüşünü kuvvetlendirmiştir. MLST ve MLVA analizleri ile her suşun genetik profilleri tespit edilerek hangi türün veya biyovarın hangi profile sahip olacağı belirtilip, farklı coğrafi yerlerden gelen suşlar ile yakınlıkları ortaya konulmaktadır (Vergnaud ve ark 2018).

Son zamanlarda, mikrobiyol popülasyonların karakterizasyonunu ortaya koymak için yapılan çalışmalarda bakterilerde Multilokus Dizi Tiplendirme (MLST) metodu, tercih edilmektedir. Bu metot hem yerel ve hem de global seviyede mikrobiyal tiplendirme ve epidemiyolojik çalışmalar için geniş çaplı uygulanmaktadır. Bu şekilde oluşturulan veriler, filogenetik ilişki ve popülasyon yapısı araştırmaları için de uygundur. Variable Number Tandem Repeat (VNTR) temelli tiplendirme metotları, çabuk değişen işaretleyici bölgelerde varyasyon indekslemesi açısından özellikle epidemiyolojik araştırmalar için bilgilendirici niteliktedir. Multilokus Değişken Sayıda Ardışık Tekrar Analizi (MLVA) metodunda, farklı lokuslarda tekrar ederek yer alan TR (Tandem Repeat) sayıları ve baz uzunluklarına göre karşılaştırılabilir somut veriler elde edilmektedir. MLST metodunda ise özellikle korunmuş gen bölgelerinin sekansları karşılaştırılarak, suşlar arasındaki farklı genetik profiller ve baz dizilimleri sekans verisi ortaya konulmaktadır (Whatmore 2009).

Bu proje ile sığır, koyun ve keçi atık vakalarından izole edilen *B. melitensis* suşlarının birbirini destekleyen ve elde edilecek verileri zenginleştiren MLST ve MLVA metotları ile genetik profillerinin ortaya konulması, suşların orjinlerinin tespit edilmesi ve *B. melitensis* Rev-1 aşı suşu ile benzerlik/farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler ışığında sahada sirküle olan *B. melitensis* suşlarının moleküler profilleri belirlenerek hastalığın moleküler epidemiyolojisi hakkında bilgi sağlanacaktır. Bununla beraber bölgeye özgü suş profilleri varlığı ve baskın genotip tespit edilecektir. Bruselloz epidemiyolojisinde elde edilecek gelişmeler, dolaylı olarak hastalığın gelecekteki kontrolünde etkili olacaktır. Bu çalışma ile genetik profiller belirlenip filogenetik ağaç oluşturularak, suşların çıkış yerleri ile ilgili daha somut veriler elde edilebilecektir. Elde edilen profiller veri tabanında karşılaştırılarak, ülkeler arası

etken saçılımı ile ilgili daha fazla bilgi edinilecektir. Ayrıca farklı yıllarda gelen izolatlar incelenerek profil değişimi olup olmadığı belirlenecektir. Elde edilecek tüm veriler Türkiye'deki *B. melitensis* genetik profil yükünü araştırmaya yönelik yapılacak diğer çalışmalar için temel teşkil edecektir. Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü Brusella Aşıları Üretim ve Referans Teşhis Laboratuvarında MLST ve MLVA yöntemlerinin validasyonu bu çalışmada gerçekleştirilmesi ile rutin analizlerde kullanılabilmesi amaçlanmaktadır.

1.1.Hastalığın Tanımı

Bruselloz, Dünyada en sık görülen antropozoonosis olmaya devam etmekte olup, sıklıkla kronik, çoğu zaman yetersiz olan ve düşük mortaliteye sahip bir hastalığa neden olmaktadır (Pappas ve ark 2006a). Sığır, koyun, domuz ve keçi gibi çiftlik hayvanlarda atık ve kısırlık gibi üreme sorunlarına neden olan, son derece önemli sosyo-ekonomik sonuçları olan zoonoz bir hastalık olarakta tanımlanabilmektedir (Godfroid ve ark 2010). En belirgin semptomları aralıklı ateş, titreme, terleme, zayıflık, miyalji, abort, osteoartiküler komplikasyonlar, endokardit, depresyon ve anoreksidir. Hastalık düşük mortalite ile yüksek morbidite ile seyreder. Ölüm oranının az ve hastalığın uzun süreli olması, çok az miktarda mikroorganizmanın aerosol yolla alınarak enfeksiyona neden olması sebebiyle, etkenin potansiyel bir biyo-terör ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Kuzey Atlantik Antlaşması Örgütü (NATO) ve Biyolojik ve Toksin Silahları Konvansiyonu (BTWC) gibi diğer kuruluşların potansiyel biyolojik silahlarının tabakalandırılmamış listelerine de dahil edilmiştir (Pappas ve ark 2006b). Gelişmekte olan ülkelerde yılda yarım milyondan fazla yeni Bruselloz vakası görülmektedir (Pappas ve ark 2006a).

Hastalık etkeni çiftlik hayvanlarını etkilediği gibi vahşi yaşamdaki hayvan türlerinden de izole edilmiştir. Ayrıca farklı konakçılarda farklı *Brucella* türleri bildirilmiştir (Pappas ve ark 2006b). Günümüzde Bruselloza neden olan 12 farklı tür tanımlanmaktadır (Scholz ve ark 2018).

Klasik olarak, *Brucella* türleri konakçı tercihine göre ve fenotipik karakterizasyonun kombinasyonu aracılığı ile tanımlanır. Bu şekilde, *B. abortus* tipik olarak sığırlarda *B. melitensis* koyun ve keçilerle birlikte, *B. suis* domuzlarda ve *B. canis* köpeklerde Bruselloz ile ilişkilidir (Whatmore 2009). Koyunlardada, *B. ovis*

koçlarda epididimitis olarak kendini gösterir (Godfroid ve ark 2010). Bununla birlikte, sığırlarda *B. melitensis*'in enfeksiyonu bilidirimi gibi *Brucella* türlerinin öncelikle tercih ettikleri konakçıları dışında da izolasyonları olmuştur (Karagül ve ark 2015).

Bruselloz, ekonomik değeri yüksek hayvanlar için önemli bir hastalıktır (Corbel 1997). *B. melitensis,* küçük ruminantlardaki Brusellozunun etiyolojik ajanıdır. Hayvancılık sektöründe ekonomik kayıplara neden olduğu gibi halk sağlığını da ciddi şekilde etkiler (Tosser-Klopp ve ark 2014).

Küçük ruminantların Brusellozu sanayileşmiş çoğu ülkede kontrol altına alınmıştır; ancak, bu hastalık, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Orta Asya, Sahra altı Afrika ve Latin Amerika'nın bazı kısımları gibi temel ekonomik geçim kaynağı küçük ruminant olan bölgelerde endemik seviyede devam etmektedir. *B. melitensis* için küçükbaş hayvanlar birincil konakçılardır, fakat aynı zamanda çok çeşitli ikincil konakçılar, sığırlar, devegiller ve yabani geviş getiren hayvanlarda da enfeksiyona neden olmaktadır (FAO 2010).

Sığırlarda görülen Bruselloza Bang Hastalığı ismi verilmiştir, bulaşıcı abort ve epizootik abort terimleri de kullanılmaktadır (Matthew ve Leland 2004). Zoonotik karakter gösteren ve etkeni *B. canis* olarak kabul edilen köpeklerdeki Bruselloz hastalığı, üreme bozukluklarının önemli nedeni olarak görülmektedir (The Center for Food Security & Public Health 2012).

İnsanlarda, Bruselloz kronik hallerde genel halsizlik, ateş ve artrit gibi pek çok farklı hastalık komplikasyonu olarak kendini gösterebilir. Hayvandan insana geçiş, atık dokuları ile temas veya enfekte olmuş hayvanların pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinini tüketilmesi yoluyla gerçekleşebilir (Seleem ve ark 2010).

İnsanlarda hastalığa neden olan farklı *Brucella* türleri arasında (*B. abortus, B. melitensis, B. canis, B. inopinata* ve *B. suis*), *B. melitensis* virülensi en yüksek olan türdür (Corbel 2006). İnsan Brusellozu, ana klinik semptom (ateş) ve coğrafi bölgeye bağlı olarak zaman içinde Malta ateşi, Akdeniz ateşi, Undulant ateşi, Cebelitarık ateşi, Kaya ateşi ve Neapolitan ateşi gibi isimlerle adlandırılmıştır (Rossetti ve ark 2017).

Brusellozun kaynağı, hayvan rezervuarlarında hemen hemen her zaman bulunmakla birlikte insandan insana bulaşma ile ilgili az sayıda rapor bildirilmiştir (Godfroid ve ark 2005). *Brucella*' nın farklı konak hücrelerinde başarılı bir şekilde hayatta kalma ve çoğalma kabiliyeti patojenitelerini açıklar. *Brucella* bakterilerinin plasental trofoblastlarda yaygın olarak replikasyonu, hayvan konaklarında abortla ilişkilidir ve makrofajlarda kalıcılığı hem doğal hayvan konakçılarında hem de insanlarda Brusellozun ayırt edici özelliği olan kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Roop ve ark 2009).

1.2. Hastalığın Tarihçesi

Bruselloz hastalığı ile tam olarak hangi tarihte karşılaşıldığı bilinmemesine rağmen, hastalığın tarihçesinin insanlarla hayvanların ilk temas ettiği zamana kadar uzandığı düşünülmektedir. Arkeolojik ve antropolojik çalışmalarla, Brusellozun 60 milyon yıl önce hayvanlarda ve yaklaşık 3 milyon yıl önce insanlarda meydana geldiğine dair kanıtlar ortaya konulmuştur (Akpınar 2016). Güney Afrika'da, 2.4-2.8 milyon yıl önce yaşamış bir insanın iskeleti üzerinde yapılan çalışmalar, bel omurunda (L4-L5) saptanan kemik lezyonlarının radyolojik, makroskopik ve mikroskopik olarak Brusellozla örtüştüğünü göstermektedir (D'anastasio ve ark 2009). Bruselloza özgü kemik lezyonları, MS 79' da volkanik bir patlama ile tahrip olmuş Roma kenti kalıntılarında bulunan yetişkin iskeletlerinde yapılan antropolojik çalışmalarda da bulunmuştur. Ayrıca elektron mikroskobu ile yapılan bir çalışmada, gömülü karbonize peynir analizinde, morfolojik olarak *Brucella*'ya benzer kok formları tespit edilmiştir (Capasso 2002).

Brusellozun tarihsel isimleri arasında Dalgalı ateş, Bang hastalığı, Cebelitarık hastalığı, Akdeniz ateşi, Malta ateşi, Konstantinopolis ateşi ve Girit ateşi bulunmaktadır. Hastalık Malta adasında ilk tespit edildiğinde, hastalığa "Malta humması" veya "Akdeniz ateşi" adı verilmiştir. Hastalığın klinik seyrindeki tipik ateş nedeniyle, hastalık "inatçı ateş" olarak adlandırılmıştır. Türkiye'de, koyunlardan insanlara bulaşmasından dolayı "koyun hastalığı", hayvanlardan insanlara hastalık bulaşmasından dolayı "mal hastalığı" veya çiğ sütten yapılan peynirden bulaşmasından dolayı "peynir hastalığı" isimleri verilmiştir. Ancak, en sık olarak Bruselloz ismi kullanılmaktadır (Yumuk ve O'Callaghan 2012, Akpınar 2016).

Bruselloz hastalığı resmi olarak ilk kez 1860 yılında Jeffery Allen Marston tarafından tanımlanmıştır. İngiltere'de Kraliyet Tıp Akademisi'nde cerrahi asistanı olan Marston, hastalık bulgularını ayrıntılı bir şekilde yazmış ve hastalığı dalgalı ateşi, diğer ateşlerden ayırmıştır (Nicoletti 2002, Wyatt 2013, Akpınar 2016). Marston hastalık etkeninin tam formunu tanımlayamasa da diğer Akdeniz ateşlerinden ayırt edici bir tanım yapmıştır (Akpınar 2016). İskoç Doktor Sir David Bruce 1887 yılında hastalık etkenini morfolojik olarak tanımlamayı başarmıştır. Malta'da ateşlenip ölen İngiliz askerinin dalaklarından, *Micrococcus* olarak adlandırılan Gram negatif kokobasili izole etmiştir. İlk kez görülen hastalığa neden olan organizmaların adı Latince *Micrococcus melitensis* olarak adlandırılarak ‘’melita” kelimesinden türetilmiştir. Danimarkalı Veteriner Bernard Lauritz Frederik Bang 1895 yılında, *Bacillus abortus* adı verdiği veya tanımladığı mikroorganizmaları, sığır plasentası, fetus ve uterus duvarı salgıları gibi sığırlara ait materyallerden izole etmiştir (Akpınar 2016, Rossetti 2017).

Wright ve Smith 1897 yılında, insan ve hayvan serum aglütinasyon testlerinde *B. melitensis*'in spesifik antikorlarını tespit ettikten sonra Brusellozun zoonoz bir hastalık olduğunu bildirmiştir. Günümüzde de kullanılmakta olan serum aglütinasyon testi kullanılarak hastalığın tanısı ilk kez gerçekleştirilmiştir (Akpınar 2016).

Themistocles Zammit 1905 yılında, *B. melitensis*'i keçi sütünden ve idrarından izole etmiştir. Ayrıca keçilerin *B. melitensis* konakçısı olduğunu ve insanların çiğ süt ve süt ürünlerinden etkeni aldığını açıklamıştır (Wyatt 2005).

Jacob Traum 1914 yılında, *B. suis*'i Amerika Birleşik Devletleri Indiana eyaletinde erken doğan domuz yavrularının karaciğer, mide ve böbreklerinden izole etmiştir (Wyatt 2005, Mantur ve Amarnath 2008).

Amerikalı bakteriyolog Alice Evans 1918 yılında, Malta ateşi ve Bang hastalığının birbirleriyle oldukça benzer özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Keçilerde, domuzlarda ve sığırlarda gözlemlenen etkenin sadece antijenik farklılıkları olduğunu, ancak morfolojik, kültürel veya biyokimyasal olarak aynı cinsten olduklarını bildirmiştir. Evans, Sir David Bruce'un anısına etkeni *Brucella* olarak isimlendiren ilk kişi olmuştur (Akpınar 2016).

Orpen 1924 yılında, İngiltere'deki insanlarda *B. abortus* enfeksiyonları rapor etmiştir. Porto Riko'da benzer çalışmalar Morales-Otero tarafından yürütülmüştür. Koyunlardaki *B. ovis* enfeksiyonu 1953 yılında Van Drimmelen tarafından tanımlanmıştır. *B. neotoma,* Amerika Utah eyaletindeki kenelerden 1957 yılında, Stoenn ve Blackman tarafından izole edilmiştir (Pappas ve ark 2005).

Beamic (1968); köpeklerde yapılan bir çalışmada, *B. canis* izole edilmiştir. *B. canis* normal olarak av köpeklerinde yaygın olmasına rağmen, 1977 yılında bir kadın hastadan da izole edilmiştir (Pappas ve ark 2005).

İngiliz ve Amerikalı araştırmacılar, 1994 yılında, birbirlerinden bağımsız olarak yaptıkları çalışmalarda, daha önce bilinmeyen *Brucella* organizmalarını memelilerin karkaslarından ve İskoçya yunuslarından izole etmişler ve *B. maris* adını vermişlerdir (Foster ve ark 2007). Ewalt, Ross ve arkadaşları, balinalar, yunuslar ve foklardan *B. pinnipedialis* ve *B. ceteace* adlı iki yeni *Brucella* türü izole ettiklerini bildirmişlerdir (Ewalt ve ark 1994, Akpınar 2016). Yeni Zelanda'da spinal osteomiyelitli bir hastada da *B. pinnipedialis* izole edilmiştir (Sohn ve ark 2003, McDonald ve ark 2006).

Scholz ve ark (2008), Orta Avrupa'daki tarla farelerinden ve vahşi kırmızı tilkinin mandibular lenf düğümlerinden *B. microti* izole edilmiştir. Bu türün insanlarda hastalığa neden olduğuna dair bir kanıt bulunamamış, ancak özellikle avcılar için potansiyel bir risk oluşturabileceği bildirilmiştir (Scholz ve ark 2009).

B. inopinata, klinik Bruselloz belirtileri olan yaşlı bir kadındaki meme implantı enfeksiyonundan 2010 yılında izole edilmiştir (Scholz ve ark 2010).

B. papionis, 2014 yılında ABD'de bir araştırma enstitüsünde ölü doğan iki babun plesentasıdan izole edilmiş, doğrulayıcı bağımsız biyokimyasal testler, MLST ve MLVA 16 yapılarak identifiye edilmiştir (Whatmore ve ark 2014).

Ülkemizde *Brucella* etkeninin varlığını bildiren ilk çalışmalar, 1905'te Doktor Hüsamettin Kural ve Mahmut Sami Akalın tarafından Kuleli Askeri Hastanesinde tedavi edilen bir askerde *B. melitensis*'in izolasyonu ile başlamıştır. Sığırlarda ilk izolasyon 1931 ile 1932 yıllarında Zühtü Berke tarafından gerçekleştirilmiştir. Koyunlarda *B. melitensis* ilk olarak 1944 yılında Aktan ve Köylüoğlu tarafından Bandırma Merinos çiftliğinde tespit edilmiştir. Ülkemizde insan ve hayvanlarda

serolojik testlerle hastalığın ilk tespiti, 1943 yılında Golem tarafından yapılmıştır. Köpeklerde *B. canis* 'in serolojik olarak varlığı, İstanbulluoğlu ve ark (1983) yaptığı çalışmada bildirilmiştir. Türkiye'de insan Brusellozun epidemiyolojisi ile ilgili kapsamlı çalışmalardan birisi de Çetin ve ark. (1990) tarafından 1984-1987 yılları arasında Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK)' ın yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 70,009 serum örneği incelenmiş riskli gruplarda %6.0 normal popülasyonda %1.8 oranında seropozitiflik saptanmıştır. Ayrıca bakteriye maruz kalan birey sayısının 1,750,000 olarak tahmin edildiği raporlanmıştır (Çetin ve ark. 1990, Akpınar 2016).

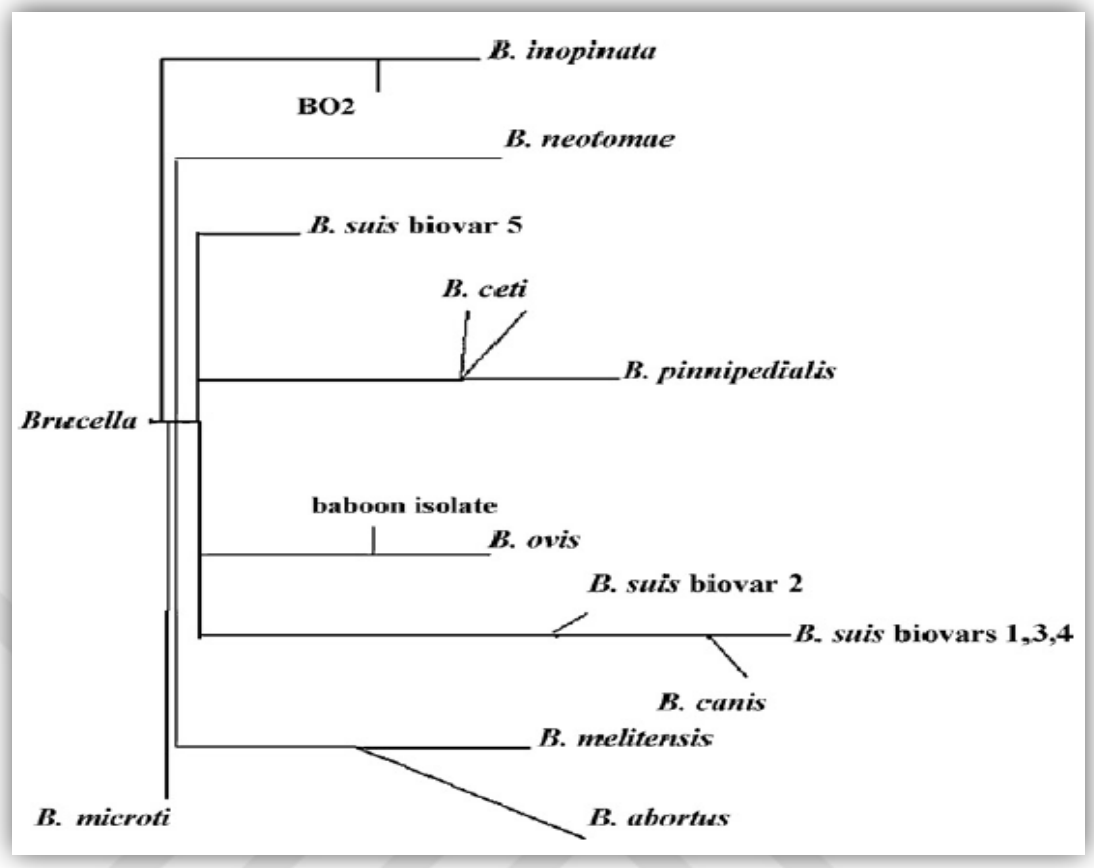
1.3. Etken Özellikleri

Bruselloz hastalığına neden olan *Brucella* türleri, insanları ve çeşitli memeli hayvanları enfekte edebilen Gram-negatif, aerobik, hareketsiz, kapsülsüz, sporsuz, fakültatif hücre içi bakterilerdir. Kokobasil (0.5-0.7 μm x 0.6-1.5 μm boyutlarında), morfolojiye sahip tek tek veya nadiren kısa zincir kümeler halinde bulunurlar. Serum-dekstroz agar veya diğer berrak renkteki besiyerlerinde kolonileri şeffaf, kabarık, dışbükeydir, ışık altında soluk bal renginde görünen pürüzsüz, parlak bir yüzeyi vardır. (Ryan ve Ray 2004, Eisenberg ve ark 2012, Hull ve Schumaker 2018, Scholz ve ark 2018). *Brucella* cinsi bakteriler, *Proteobacteriaceae*'nin α-2 alt grubunun bir parçasıdır. *Agrobacterium* ve *Rhizobium* cinsinin bazı bitki patojenlerine ek olarak hayvan patojenleri (*Bartonella*) ve fırsatçı bakterileri (*Ochrobactrum*) ile yakın bir genetik ilişki göstermektedirler (OIE 2009, Lalsiamthara ve Lee 2017). Bakteri, katalaz ve üreaz pozitiftir. Oksidaz ise *B. neotoma* ve *B. ovis* türleri haricinde diğerlerinde pozitiftir (Scholz ve ark 2018). Karbonhidratı fermente edemezler ve nitriti nitratla oksitleyebilirler. *Brucella* bakterileri, diğer Gram-negatif bakterilerinden çok daha az pirojenik bir lipopolisakkarit hücre duvarına sahiptir ve bu da Bruselloz hastalığındaki dalgalı ateş tablosunun sebebi olarak bildirilmektedir. Flagella veya pilusları yoktur ve bipolar boyama göstermezler. *Brucella* türlerinin koloni morfolojileri çoğu açıdan benzerdir. Rough lipopolisakkarit (RLPS) ve protein antijenleri sahip olan *B. ovis* ve *B. canis* hariç olmak üzere diğer türlerinin dış hücre duvarlarında smoth lipopolisakkarite (SLPS) yapısı vardır (Kaltungo ve ark 2014).

Pek çok *Brucella* türünün izolasyonunda serum veya kana ihtiyaç bulunmaktadır. Büyüme için optimum sıcaklık 37◦C ve optimum pH 6.6–7.4'dir

(Scholz ve ark 2018). *Brucella* cinsi bakteriler sıvı ortamda yavaş gelişirler. *Brucella* türleri aerobik olmasına rağmen, bazı suşlarının büyümesi için %5-10'luk $C0_2$ gereksinimi vardır (Matthew ve Leland 2004). Karbondioksit gereksinimleri; glutamik asit, ornitin, lisin ve riboz kullanma yeteneği; hidrojen sülfit üretimi, tiyonin veya bazik fuksin boyaları varlığında büyüme; belirli lipopolisakarit epitoplarına karşı antiserumlarla aglütinasyon ve bakteriyofaj ile lizis duyarlılığı ile türler ve biyovarlar ayrılmaktadırlar. *Brucella* kanlı agar besiyeri plaklarında büyüyebilir ve büyümesi için X veya V faktörleri gerekli değildir (Purcell ve ark 2007).

Brucella cinsine ait; *B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. canis, B. neotomae, B. ovis, B. pinnipedialis, B. ceti, B. microti, B. inopinata, B. papionis* ve *B. vulpis* olmak üzere 12 adet tür vardır (Scholz ve ark. 2018, Whatmore 2009, Whatmore ve ark 2014). ABD'de bir araştırma enstitüsünde ölü doğan iki babun plesentasından izole edilen ve diğer *Brucella* suşları ile karşılaştırıldığında metabolik aktivite, bazı doğrulayıcı bağımsız biyokimyasal testler ve ayrıca MLST ve MLVA16 analizleri yapılarak diğer suş profillerinden farklılığı ortaya konularak *B. papionis* olarak adlandırılmıştır (Whatmore ve ark 2014). Kemirgenlerden ve insanlardan yakın zamanda izole edilmiş ancak henüz taksonomik olarak tarif edilmeyen diğer gruplar da bulunmaktadır (Hull ve Schumaker 2018). İki adet *B. vulpis* izolatı 2008 yılında Avusturya'daki kırmızı tilkilerin mandibular lenf düğümlerinden izole edilmiştir. MLST analizi ile diğer *Brucella* türlerinden farklı olduğu kanıtlanıp doğrulanmıştır (Scholz ve ark 2016) (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Brucella türlerinin filogenetik dağılımı (Pappas 2010)

İnsanlarda hastalık oluşturan *Brucella* türleri azalan patojenitelerine göre; *B. melitensis, B. suis, B. abortus* ve *B. canis* olmak sıralanmıştır. *B. melitensis* ve *B. suis*, genellikle deve, domuz, koyun veya keçilerde hastalık yapıcı etkileri vardır. Ayrıca *B. melitensis'*lerin sığırlarda da oldukça patojen oldukları saptanmıştır. *B. abortus*, sığırlarda en yaygın görülen tür olup, *B. canis* köpeklerle ilgilidir (Matthew ve Leland 2004). Bu türlere ek olarak *B. ceti, B. pinnipedialis* ve *B. vulpis* düşük oranda patojen oldukları belirtilmektedir (Hull ve Schumaker 2018).

Genom tipik olarak iki dairesel kromozom içerir. DNA G + C içeriği (% mol): 57.1–59'dur (Scholz ve ark 2018). *Brucella* cinsi üyeleri arasında %90'dan fazla genetik benzerliğe rağmen, etken ajanların farklı konakçılar için eğilimleri bildirilmektedir (Verger ve ark 1985, Cloeckaert ve ark 2002, Banai ve Corbel 2010, Kaltungo ve ark 2014).

B. melitensis'e ait 3 adet biyovar, koyun ve keçileri enfeksiyona neden olmaktadır. Çoğu keçi ırkı hassastır, ancak koyun ırklarındaki duyarlılık değişkendir.

B. melitensis, sığır, deve ve köpeklerde, ancak nadiren atlarda ve domuzlarda rapor edilmiştir. Enfekte koyun ve keçilerdeki etken yabani geviş getiren hayvanlara bulaşabilmektedir. Koyunlar *B. abortus* enfeksiyonlarına karşı nispeten dirençlidir (Kaltungo ve ark 2014). Keçilerde *B. abortus* kaynaklı enfeksiyonun prevalansı oldukça düşüktür (Kaltungo ve ark 2014). *B. abortus* konakçı olarak sığırları tercih etmektedir. Bununla birlikte, bu tür ile mandalar, develer, geyikler, köpekler, atlar, keçiler, koyunlar ve insanlar enfekte olabildikleri bildirilmektedir (Kudi ve ark 1997, Megid ve ark 2010). Atların *B. abortus'*a ve daha az sıklıkla *B. suis*'e karşı duyarlı oldukları bildirilmektedir (Megid ve ark 2010). Bu patojen sığır, at, tavşan, tavşan, ren geyiği, köpek ve insan gibi diğer hayvan türlerini de etkileyebilir (Çizelge1.1) (Kaltungo ve ark 2014).

Çizelge 1.1. *Brucella* türlerine ait konakçılar ve insanlardaki patojenitesi (Hull ve Schumaker 2018)

Brusella Türleri	**Doğal Konakçılar**	**Enfeksiyon gücü**
B. melitensis	Koyun, keçi ve develer	Yüksek
B. abortus	Sığır, geyik ve bizonlar	Yüksek
B. suis	Domuzlar, yaban tavşanı, ren geyiği	Yüksek
B.canis	Köpek türleri	Orta dereceli
B.ovis	Koyun	Raporlanmamış
B.neotamae	Çöl fareleri	Raporlanmamış
B.ceti	Deniz memelileri	Düşük
B.pinnipedialis	Yüzgeçayaklılar	Düşük
B.microti	Kızıl tilki ve Tarla faresi	Raporlanmamış
B. inopinata	İnsan	Yüksek
B.papionis	Babunlar	Raporlanmamış
B. vulpis	Kızıl tilki	Raporlanmamış

B. suis biyovar 1 ve 3'ün insanlar için patojenik potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir (Kaltungo ve ark 2014). İlave olarak, biyovar 4 ve 5, sırasıyla ren geyiği ve kemirgenlerle spesifik olarak ilişkili oldukları bildirilmektedir (Corbel 2006).

Köpekler, *B. ovis* ve *B. neotomae* enfeksiyonuna dirençlidir, sadece *B. canis*, *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* ile enfekte olabilmektedirler (Hollet 2006). *B.*

canis genellikle evcil köpekleri, vahşi etoburları ve nadiren diğer evcil hayvanları ve insanları enfekte eder (Carmichael 1990). *B. canis* ile nadir insan enfeksiyonu vakaları bildirilirken, *B. ovis* ve *B. neotoma* enfeksiyonu insan vakaları bildirilmemiştir (Yagupsky 2004).

OIE raporlarına göre, develerin herhangi bir *Brucella* türü için birincil konakçı olarak görülmediğini bildirmiştir (Kaltungo ve ark 2014). Bununla birlikte, hem *B. abortus* hem de *B. melitensis*'e karşı hassastırlar (Fugier ve ark 2007, Kaltungo ve ark 2014). Yeni *Brucella* türlerinin enfeksiyona neden olma kapasitesi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bir deniz memelisi izolatı ile olası bir laboratuvar kaynaklı enfeksiyon bildirilmiş ve belirli bir dizi tipi (ST27) Peru ve Yeni Zelanda'daki üç insan enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Whatmore ve ark 2008).

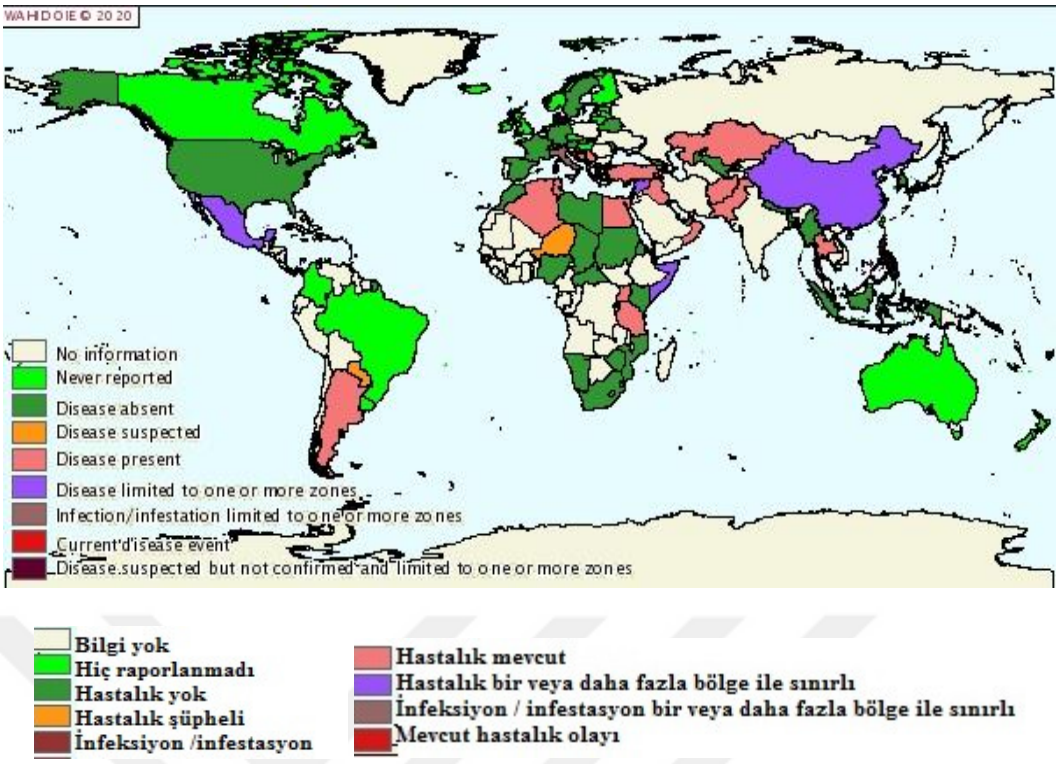
1.4. Epidemiyoloji

1.4.1. Hayvanlarda Epidemiyoloji

Akut Bruselloz sadece gebe ruminantlarda görülür ve üreme organlarına ait dokularda, etken fazla miktrada çoğaldıktan sonra plasental kolonizasyon ve abort ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca deneysel sonuçlar, *Brucella* enfeksiyonu nedeniyle atık yapan hayvanların yaklaşık olarak %12'sinin, ilk gebeliklerinde organizmanın tespiti olmadan ikinci ve bazen üçüncü kez atık yapabileceğini ve bu sebeple atık yapan hayvanın sürüden derhal çıkarılmasını öngörmektedir (Aparicio 2013).

B. melitensis türü için konakçı yelpazesini önemli oranda keçi ve koyunlar oluşturmaktadır. Patolojik ve epidemiyolojik açıdan, küçük ruminantlarda *B. melitensis* enfeksiyonunun seyri, sığırlardaki *B. abortus* enfeksiyonuna benzemektedir. Ruminantlarda Brusellozun ana klinik bulguları, enfeksiyonun ardından gebeliğin son üçte birinde oluşan ölü doğumlar şeklinde görülebilmektedir (Elzer ve ark 2002, Blasco ve Molina-Flores 2011). Sağlıklı hayvanlar *Brucella* enfeksiyonuna birçok yolla maruz kalabilir, çünkü enfekte olmuş dişilerin doğum sıvıları veya fetüs, plasenta ve atık salgıları ile çok sayıda bakteri saçılır. *Brucella* cinsi bakteriler soğuk ve nemli koşullarda, açık havada birkaç ay hayatta kalma kabiliyetine sahiptirler. *Brucella* ayrıca meme bölgesine kolonize olarak süt ile saçılabilmektedir. İlk atık sonrasında gebe kalan dişiler herhangi bir semptom göstermemesine rağmen bakteri saçılımına devam edebileceği bildirilmiştir (Banai 2007, Blasco 2010).

B. melitensis, Brucella cinsinin virülensi en yüksek türüdür ve üç biyovarı bulunmaktadır; biyovar 1 ve 3, Akdeniz, Orta Doğu ve Latin Amerika'da küçük ruminantlarda en sık izole edilenlerdir (Lucero ve ark 2008, Blasco ve Molina-Flores 2011). Bruselloz, ciddi zoonoz hastalık olmasının yanı sıra hayvanlarda abortlara sebep olmasından dolayı önemli kayıplara yol açmaktadır. Bu kapsamda hastalık, hayvan ve hayvansal ürün ticareti için bir engel oluşturmaktadır (Benkirane 2006, Banai 2007, Seleem ve ark 2010). Hastalık çoğu gelişmiş ülkede kontrol altında olmasına rağmen, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Orta ve Güneydoğu Asya, Sahra altı Afrika ve Latin Amerika'nın bazı bölgelerinde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Rossetti ve ark 2017). Muhtemelen düşük gelirli ülkelerin diğer hastalıklara öncelik vermesi ya da teşhis ve araştırmayı destekleyecek tesisler, insan yetenekleri veya spesifik testlerden yoksun olması nedeniyle hastalık geçmiş tarihlerde yeterince bildirilmemiştir. Son 15 yılda, özellikle Doğu Avrupa, Balkanlar ve Avrasya'da enfeksiyon yeniden ortaya çıktığı görülmektedir (FAO 2010). Asya'da Bruselloz enfeksiyonunun geniş alanda seyrettiği bildirilmektedir. Hastalığın hiç rapor edilmediği Japonya ve Kore Cumhuriyeti (Güney Kore) dışında, Türkiye, İsrail, Ürdün, Irak, İran, Ermenistan, Gürcistan, Afganistan, Rusya ve Moğolistan gibi ülkelerde caprine Bruselloz mevcut olması ile beraber bilgi paylaşımının kısıtlandığı Suriye, Lübnan, Hindistan, Çin, Endonezya, Myanmar gibi ülkelerde ise endemik oarak seyrettiği bilinmektedir (Benkirana 2006, Gwida ve ark 2010, Bamaiyi ve ark 2014, Miller ve ark 2016). Dünyadaki güncel *B. melitensis* kaynaklı Bruselloz hastalığının dağılımı Şekil 1.2'de gösterilmektedir. Dünya Hayvan Sağlığı Bilgisi Veritabanı (WAHIS) aracılığı ile bu haritaya erişim sağlanabilmektedir (OIE 2020).



Şekil 1.2. Dünya haritasında ki *Brucella melitensis* kaynaklı hastalık dagılımı (OIE 2020).

B. melitensis, yalnızca sığırları değil, aynı zamanda enfekte süt alan buzağılarda da enfeksiyona neden olmaktadır (Kahler 2000, Alvarez ve ark 2011). Köpeklerden de *B. melitensis* izole edilmiş olup enfekte plasentaları ya da fetüs parçalarını enfekte olmayan bölgelere taşıyabilme riskinden dolayı hastalığın saçılımı yönünden köpeklerin önem arz ettiği bildirilmektedir (Hınıc ve ark 2012).

B. melitensis, keçi sürülerini enfekte ederek Caprine Bruselloza neden olabilmektedir. Keçiler, belirli epidemiyolojik durumlar altında *B. abortus* enfeksiyonuna duyarlı olabilir (Leal-Klevezas ve ark 2000, Ali ve ark 2015, Wareth ve ark 2015); ancak sürüdeki enfeksiyonu bireysel olarak sürdürmezler. Benzer şekilde, keçilerden *B. suis* izolasyonları nadiren bildirilmiştir, ancak son zamanlarda bu şekilde bir enfeksiyon varlığı bildirilmemiştir (Rossetti ve ark 2017).

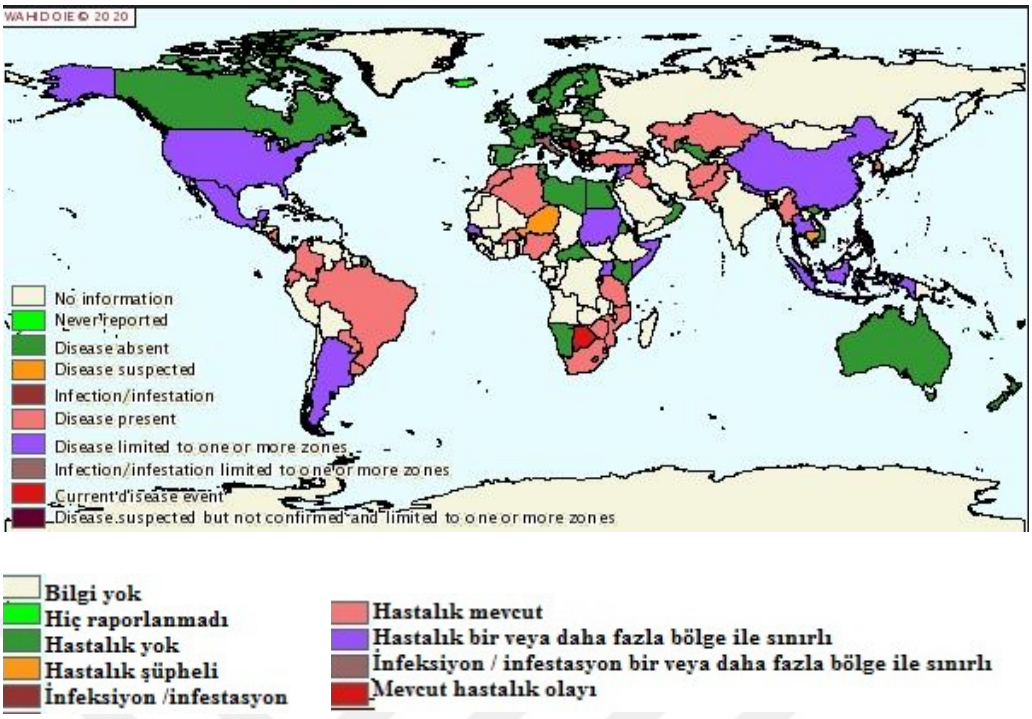
B. abortus enfeksiyonunda olduğu gibi, *B. melitensis* de konjenital yolla yavruya geçebilir. Ancak bu yolla bulaşma nadir olarak görülür. Hastalık annelerde latent olarak seyrettiği için yavruya bulaşma daha çok kolostrum veya çiğ süt tüketerek olmaktadır (Aparicio 2013). Düşük yayılım hızına rağmen, bu tür gizli enfeksiyonların varlığı, hastalığın yok edilmesini daha da zorlaştırır, çünkü bakteriler, saptanabilir immun cevap oluşturmadan varlıklarını sürdürmekte, enfekte

hayvanlar da hastalık semptomu oluşturmadan etkeni taşımaya devam etmektedir. Bu nedenle, enfekte sürülerde, dişiler ile beraber yavrularınında, eradikasyon programının bir parçası olarak sürülerinden çıkarılması önerilmektedir (Banai 2007). Gizli seyreden *Brucella* enfeksiyonunun gelişmesini sağlayan mekanizma tam olarak bilinmemektedir (Blasco ve ark 2011).

Bruselloz seropozitif tespit edilen bazı dişi tokluların doğum sonrası sütleri ile *B. melitensis*'i saçtığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada yedi ay boyunca seropozitif olan kuzuların postmortem testlerinin seronegatif olduğu bildirilmiştir. Bu durum aynı ahırdaki seronegatif annelerden doğan yavru kuzulardada gözlemlenmiştir (Aparicio 2013). Yapılan diğer bir çalışmada *B. melitensis* abort yapmış seronegatif bir keçinin vajinal akıntısından izole edilmiştir. Seronegatif hayvanların yayılma için potansiyel bir risk olduğu bildirilmiştir (Herrera ve ark 2011).

Sığır Brusellozu genellikle *B. abortus* kaynaklı görülmektedir, insanlar dâhil olmak üzere sığır dışındaki hayvanlar da hastalığa yakalanabilir aynı zamanda kalıcı enfeksiyonlar ve saçılımda önemli rol oynayabilirler. Türkiye'de sığırlarda en yaygın görülen biyovar *B. abortus* biyotip 3'tür (Karagül ve ark 2015).

Bazı enfeksiyonların kaynağının tespitinde biyovarların dağılımının önemli olabildiği bildirilmiştir (Garin- Bastuji ve ark 2006, Aparicio 2013). Sığır Brusellozu, sığırların yetiştirildiği hemen hemen tüm ülkelerde görülmekle birlikte, bazı kuzey ve orta Avrupa ülkeleri, Avustralya, Kanada, Japonya ve Yeni Zelanda'nın hastalıktan ari olduğu bildirilmektedir. 2008 yılında, 12 Avrupa Birliği ülkesinin, küçükbaş brusellozu ile birlikte sığır brusellozundan da ari olduğu resmi olarak kabuş edilmiştir. Güney Avrupa'da sığır brusellozu durumu daha az elverişlidir, ancak orada bile görülme sıklığı %1'den azdır (EFSA 2010). Şekil 1.3'de Dünyadaki güncel *B. abortus* kaynaklı Bruselloz hastalığının dağılımı gösterilmiştir. Erişim Dünya Hayvan Sağlığı Bilgisi Veritabanı (WAHIS) aracılığı ile gerçekleşebilmektedir (OIE 2020).



Şekil 1.3. Dünya haritasındaki *Brucella abortus* kaynaklı hastalık dağılımı (OIE 2020).

Sığırlarda Brusellozun saçılımında, suni tohumlamada kullanılan enfekte semen önemli rol oynamaktadır. Süt işletmelerinde, sağım için kullanılan meme başlıkları bakterilerin inekten ineğe bulaşma riskini yükselttiği için sağım da dikkate alınması gereken bir konudur (Samartino 2003, OIE 2010).

Enfekte annelerden doğan fetüslerin %60 ila %70'inin enfeksiyonu taşıdığı kanıtlanmıştır. Dişi buzağılar, doğum kanalından geçerken doğum sırasında veya enfekte ineklerden kolostrum veya süt emerek de enfekte olabilir. Çoğu enfekte buzağı çeşitli antibakteriyel ajanlar ile tedavi edilmeye çalışılmasına rağmen, yetişkinlik dönemine kadar bu buzağılar enfekte olmaya devam eder, serolojik testlerde yanlış negatiflik alınsa dahi ilk hamileliklerinde abortlar görülebilmektedir. Bu tür hayvanlar Bruselloz kontrolü ve eradikasyon için ciddi bir tehdit oluşturur (Aparicio 2013).

Serolojik testlerde negatif olan işletmeden alınan süt örneklerinden *B. abortus* izolasyonun yapıldığı ve örneklerin biyotip 2, 3, 9 olduğu raporlanmıştır (Aparicio 2013). Meksika'da, smooth fenotipli *B. abortus* saha suşunun, seronegatif olan ve normal olarak doğan buzağıdan, düşük dozlu RB51 aşısı ile aşılanan iki ineğin vajinal sıvısından izole edildiği bildirilmiştirr (Arellano-Reynoso ve ark 2013).

Bruselloz prevalansı yüksek olan ahırlarda, yayılma için önemli bir risk faktörü, enfekte ineklerin sürünün meralarını kirletmesi ve *Brucella*'nın yeterli nem seviyeleri ile uzun süre yaşayabildiği durumdur. Mikroorganizma organik materyalin varlığında daha da dirençli hale gelir (Abernety ve ark. 2011). Sığırların hastalığa karşı bağışıklık tepkilerinde önemli farklılıklar gösterdiği belirtilmiş olsa da bu farkın çoğu genetik ile ilgili olabilir. Sığır ırkları genetik olarak Bruselloza karşı duyarlı veya dirençli değillerdir. Süt ineklerinde Bruselloz insidansının yüksek olması, yetiştiricilik düzeninden kaynaklanan yakın birlikte yaşamanın sonucudur (Westhusin ve ark 2007, Aparicio 2013).

B. suis enfeksiyonları esas olarak domuzları enfekte ederken, daha az sıklıkla sığırlarda veya koyun ve keçilerde enfeksiyon oluşturabilmektedirler. Dünyada domuz Brusellozundan 1, 2 ve 3 başta olmak üzere 5 adet *B. suis* biyovarı bulunmaktadır (EFSA 2009). Her iki cinsiyeti de etkileyerek, kısırlık, abort, orşit, kemik ve eklem lezyonlarına neden olabilmektedir. Biyovar 1 Amerika ve Asya'da bulunurken biyovar 3 Çin, ABD ve Avrupa'da rapor edilmiştir (OIE 2010). Prevalansı Güney Amerika ve Güneydoğu Asya'nın bazı bölgeleri hariç düşük olduğu bildirilmektedir. Avrupa Birliği içinde, domuz Brusellozunun epidemiyolojik durumu değişmektedir. Bazı ülkeler hastalıktan eradike iken, bazılarında sporadik bazılarında ise ciddi enfeksiyonlara neden olduğu bildirmektedir. Mevcut epidemiyolojik veriler, Avrupa'da *B. suis* biyovar 2'nin domuzlarda en yaygın enfeksiyon kaynağı olduğunu, ancak biyovarlar 1 ve 3'ün de mevcut olduğunu göstermektedir (EFSA 2009; Godfroid ve ark. 2011).

B. suis giriş bölgeleri, esas olarak oral, nazofaringeal, konjunktival ve vajinal mukoza olmak üzere diğer *Brucella* enfeksiyonu tipleri için tanımlananlara benzer yol izlemektedir. Genellikle klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce nispeten uzun bir inkübasyon süresi vardır. Bunlar genellikle genç hayvanlarda görülmez ve enfeksiyon oluşturma durumları hayvanların yaşına, cinsiyetine ve fizyolojik durumuna bağlı olarak değişmektedir (Aparicio 2013).

B. canis, tüm köpekleri enfekte ettiği gibi az da olsa insanlara da bulaştığı bilinmektedir (Moreno 2014, Kauffman ve Petersen 2019). Canine Brucellozis olarak da isimlendirilen etken oral ve veneral olarak bulaşmaya ek olarak dişi köpeklerin plasenta atıkları ve vajinal sekresyonları ve erkeklerin spermalarında yüksek oranda

bulunmaktadır. İdrar ile bulaşmaya ilişkin bir kayıt bulunmamasına karşın, salya, nazal, oküler sekresyon ve dışkıdan izolasyonun yapılabildiği bildirilmektedir. Alet, ekipman ve insan faktörlerinin hastalığın bulaşmasında rol aldığı raporlarda bildirilmektedir (Wanke 2004, Seleem ve ark 2010, Kauffman ve Petersen 2019).

1.4.2. İnsanlarda Epidemiyoloji

İnsan Brusellozunun yaygınlığı, göçebe çobanlar, hayvancılık uygulamaları, beslenme alışkanlıkları, süt işleme yöntemleri ve süt ürünleri ve ayrıca çevresel sanitasyon gibi faktörlere bağlıdır (Zinsstag ve ark 2006, Gwida ve ark 2010). Bruselloz, enfekte çiftlik hayvanlarından insana pastörize edilmemiş süt veya süt ürünlerini tüketme, soluma, konjunktiva veya cilt sıyrıkları yollarıyla bulaşabilmektedir (Corbel 2006, Avila-Calderon ve ark 2013, Welburn ve ark 2014). Bulaşma ayrıca enfekte hayvanlar, plasenta ile abort dokuları veya ürünleri ile doğrudan temas yoluyla da gerçekleşebilir (Kose ve ark 2014). Bruselloz genellikle mezbahalarda, Veteriner hekimlerde, laboratuar teknisyenlerinde, avcılarda, çiftçilerde ve hayvancılık üreticilerinde görüldüğü için genellikle bir meslek hastalığı olarak kabul edilir. Brusellozun bulaşması genellikle kan transfüzyonu, organ nakli, kemik iliği nakli, emzirme yoluyla, cinsel temas veya doğuştan yol ile olmaktadır (Mantur ve ark 1996, Corbel 2006, Gwida ve ark 2010, Doedato ve ark 2011, Aznar ve ark 2012, Tuon ve ark 2017, Frank ve ark 2018). *B. ovis* koyunlarda yaygın olmasına rağmen insanlarda hastalığa neden olmadığı belirtilmiştir (Corbel 1997). Brusellozis, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz'e kıyısı olan Avrupa ülkeleri, Meksika, Hindistan, Kuzey Afrika, Arap Yarımadası, Orta ve Güney Amerika'da hiperendemik olarak seyretmektedir. Buna karşın Kanada, İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kuzey Avrupa ülkelerinde oldukça nadir olarak görülmektedir. Son yıllarda Kırgızistan, Tacikistan ve Kazakistan gibi Asya kıtasındaki ülkelerden yeni odaklar bildirilmiştir (Pappas ve ark 2006b, Kandemir 2015). Düşük ve orta gelirli ülkelerde, *Brucella*'nın gerçek insidansının saptanamaması genellikle eksik raporlama, yetersiz izleme verileri, mali kaynak ve kapasite eksikliği ve veteriner hekimler ile sağlık görevlileri arasındaki sorunlardan kaynaklanmış olduğu ve tüm bu faktörlerin hastalığın prevalansının artmasına etken olduğu paylaşılmaktadır (Fournier ve ark 2015). Bruselloz için başlıca risk faktörlerinin belirlenmesi, hastalığın doğası ve insan Brusellozunun ortadan kaldırılması için bulaşma yolları hakkında kapsamlı bir anlayışa ulaşmak için çok önemlidir (Sofian ve ark 2008,

Golshani ve Bouzari 2017). Endemik bölgelerde kontrol programlarının bulunması, akut Bruselloz vakalarının aile fertlerinin taranmasının önemi son zamanlarda vurgulanmıştır (Almuneef ve ark 2004, Mantur ve ark 2006, Verma 2013, Esmaeili 2014).

1.4.3. Ülkemizde Bruselloz

Türkiye'de endemik olarak görülen Bruselloz, özellikle, Doğu, Güneydoğu ve İç Anadolu'da yer alan illerde yoğun olarak seyretmektedir. Yapılan hastalık bildirimlerinde vaka sayısında düşme görülmesine rağmen, hayvan ve insan Brusellozu henüz kontrol altında değildir (Sağlık Bakanlığı 2011). Türkiye'de 1980'lere kadar insanlarda Bruselloz vakası nadiren kaydedilmiştir. Örneğin, 1930 ve 1980 arasında, 2000'den az vaka kaydedilmiştir. Resmi olarak 1980–2005 döneminde, toplam 189.226 insanda Bruselloz vakası rapor edilmiştir; bunların yaklaşık 90.000'i, yılda yaklaşık 15.000 vaka olmak üzere 2000 ve 2005 yılları arasında bildirilmiştir. Ancak kayda geçilmeyen vakalar da göz önüne alındığında tahmini oranın 1:30 civarında olduğu ve gerçek rakamlara ulaşılamadığı düşünülmektedir (Durusoy ve Karababa 2010, Yumuk ve O'Callaghan 2012). Türkiye'de ilk laboratuvar onaylı Bruselloz vakası 1915'te bildirilmiştir. Ülkemizdeki raporlar incelendiğinde, 1915'ten 1963'e kadar 48 yılda 11. 621 kişinin Brusella aglütinasyon testi ile test edildiği ve bunların yaklaşık %9'unun pozitif olduğu tespit edilmiştir. Çelik (1937), 1157 kişiden aldığı örnekleri çalışmış ve %2.6 oranında Bruselloz tespit etmiştir. Golem (1943), 1154 kişiden aldığı örnekleri çalışmış ve %5,9'unda pozitiflik belirlemiştir. Akyay ve Gürsel (1957), Eskişehir ilinde 2424 kişi ve 203 mezbaha işçilerinden aldığı örnekleri çalışmış ve sırasıyla %4,3 ve %23,1 oranında Bruselloz tespit etmiştir (Yumuk ve O'Callaghan 2012). Türkiye'de TC. Sağlık Bakanlığının OIE ile paylaştığı rapor doğrultusunda 2019 yılı Bruselloz vaka sayısı 10244 olup, 2015 yılında vaka sayısının (4173) en düşük seviyelere indiği görülmektedir. Aynı verilere göre son ölüm vakası 2018 yılında rapor edilmiştir (WAHİS 2019).

1.5. Patogenez

Bruselloz, genel itibarı ile gebeliğin son üç ayında abortlar, prematüre doğumlar ile hayvanlarda infertiliteye neden olmaktadır. (Poester ve ark 2005). Zoonotik potansiyeli nedeniyle bruselloz, hayvanlarda aborta neden olan diğer bazı hastalıklardan ayırt edilmelidir. Hayvanlarda enfeksiyonun akıbeti; hayvanın yaşına,

üreme ve immünolojik durumuna, doğal direncine, etkeni alış yoluna ve enfektif suşun virülansına ve sayısına bağlı olarak değişmektedir (Neta ve ark 2010).

Brucella'nın neden olduğu ilk aborttan sonra, ilerleyen dönemlerde tekrar abort görülse de inekler sıklıkla normal doğum yaparlar. Gerek enfekte annelerden doğan vertikal yolla etkeni almış buzağılar, gerekse kontamine sütlerle beslenerek enfekte olan buzağılar hastalık belirtisi göstermeksizin serolojik olarak negatif kalabilirler. Ancak bu tür düveler ilk gebeliğinde asemptomatik enfeksiyon sonucunda abort yapabilir ya da enfekte yavrular doğururlar. Enfekte sığırlar etkenin bulaşmasında ana kaynaktır. Enfeksiyonun diğer klinik belirtileri ise ineklerde süt veriminin azalması sütteki somatik hücrelerin sayısındaki artışı ve bozulmuş üreme sağlığı ve verimliliğidir (Neta ve ark 2010).

Enfeksiyon genellikle belli başlı ayırt edici klinik semptomplar ile seyretmesede enfekte boğalar, ateş, iştahsızlık ve depresyon gibi sistemik enfeksiyon belirtileri geliştirebilir (Campero ve ark 1990). Boğalarda *B. abortus*'un neden olduğu en önemli lezyon, genellikle seminal vezikülit ve epididimit ile ilişkili olan orşittir (Neta ve ark 2010). Testis parankiminin kronik orşit ve fibrozunun bir sonucu olarak, etkilenen boğalarda kalıcı kısırlık gelişebilir (Campero ve ark 1990).

Atık fetüslerin yanı sıra elimine edilen fetal membranlar ve uterus sekresyonları abort veya doğumdan sonra en önemli enfeksiyon kaynaklarıdır. Hastalık, buzağılara vertikal olarak ve kontamine süt yoluyla da bulaşabilir, ancak bu enfeksiyon yolları çok daha az önemlidir. Veneral bulaşma, doğal koşullar altında önemli bir enfeksiyon yolu olmamakla birlikte, kontamine sperma ile suni tohumlama potansiyel bir enfeksiyon kaynağı teşkil etmektedir (Neta ve ark 2010).

Etkenin inhalasyonu sonucu solunum mukozası, bütünlüğü bozulmuş deri veya konjunktiva yoluyla enfeksiyon meydana gelebilmesine rağmen, en yaygın enfeksiyon yolu gastrointestinal sistemdir ki buradan lokal lenf düğümlerine yayılır ve burada *Brucella* etkenleri fagositlerde hücre içinde çoğalarak lenfatik damarların invazyonunu takiben gelişen bakteriyemi sonucunda sistemik enfeksiyon meydana gelmektedir (Ko ve Splitter 2003). Sistemik enfeksiyon, gebe uterusta, erkek genital organlarında ve meme bezlerinde etkenin kolonizasyonunu destekler (Ko ve Splitter 2003, Neta ve ark 2010).

B. abortus'un, gebelikte son trimesterde yüksek konsantrasyonlara ulaşan eritritol ve steroid hormonların etkisi altındaki uterusa karşı güçlü bir yönelimi vardır. Eritritol, *B. abortus* tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak metabolize edilebildiğinden hayatta kalmasına yardımcı olur (Samartino ve Enright 1996). Geviş getirenlerin koryonik villuslarının tabanında bulunan eritrofagositik trofoblastik hücreler, *B. abortus*'un interkotiledoner trofoblastlara yayıldığı yerden fetal plasental dokuların birincil invazyon bölgesi olarak kabul edilir (Santos ve ark 1996). *Brucella* çoğalması, inflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu, trofoblastik nekrozu, vasküliti ve allantokoryon ülserasyonunu indükler. Sonuç olarak, fetal-maternal metabolik alışverişler bozulur ve abort ile sonuçlanmaktadır (Nata ve ark 2010).

Histolojik olarak plasentadaki birincil hedef hücreler olan trofoblastik hücreler şişkin ve etken ile doldurulur. Nekroz, ödem, fibrin birikimi ve bazı durumlarda vaskülit ile birlikte genellikle nötrofilik ve histiyositik bir enflamatuar infiltrat vardır. Endometriyumda ciddi bir nötrofil, lenfosit, plazma hücresi ve eozinofil birikimi vardır. Yangısal reaksiyon, multifokal erozyon veya yüzeysel ülserasyonla beraberdir (Neta ve ark 2010).

Brucella enfeksiyonlarının en önemli özelliği; etkenin hem retiküloendotelial sistemin fagositik hücrelerinde hem de trofoblastlar gibi fagositik olmayan hücrelerin içinde çoğalabilmesidir (He 2012). Makrofajlar, dentritik hücreler (DC) ve trofoblastlar *Brucella'lar* için önemli hedef hücrelerdir (Xavier ve ark 2010). Etkenin hedef hücrelere ulaşması için solunum sistemindeki mukozal bariyeri, ürogenital sistemi ya da sindirim sistemini geçmesi gerekir. *Brucella,* intestinal mukozaya invazyonunu membranöz hücreler (M hücreleri) aracılığıyla yapar. İntra-epitelyal fagositler de transepitelyal göç ve *Brucella'*nın lamina propria ve submukozaya taşınmasını destekler. Fagositoza duyarlı hale gelmis bakteri komplement ya da Fc reseptörleri aracılıgı ile fagosite edilirken, fagositoza duyarlı hale gelmeyen etkenler lektin ve fibronektin reseptörlerinin etkilesimi ile hücreleri ele geçirir. Opsonize bakteri genellikle aktive olmuş makrofajlar tarafından hücre içinde çoğalmaya başlamadan fagolisosom içinde öldürülür. Opsonize olmayan mikroorganizmalar ise genellikle hayatta kalıp, kendisini alan makrofajın içinde çoğalarak hedef hücrelere ulasır (Nata ve ark 2010, Xavier ve ark 2010). Attenue suşlar da konakçı hücrelere

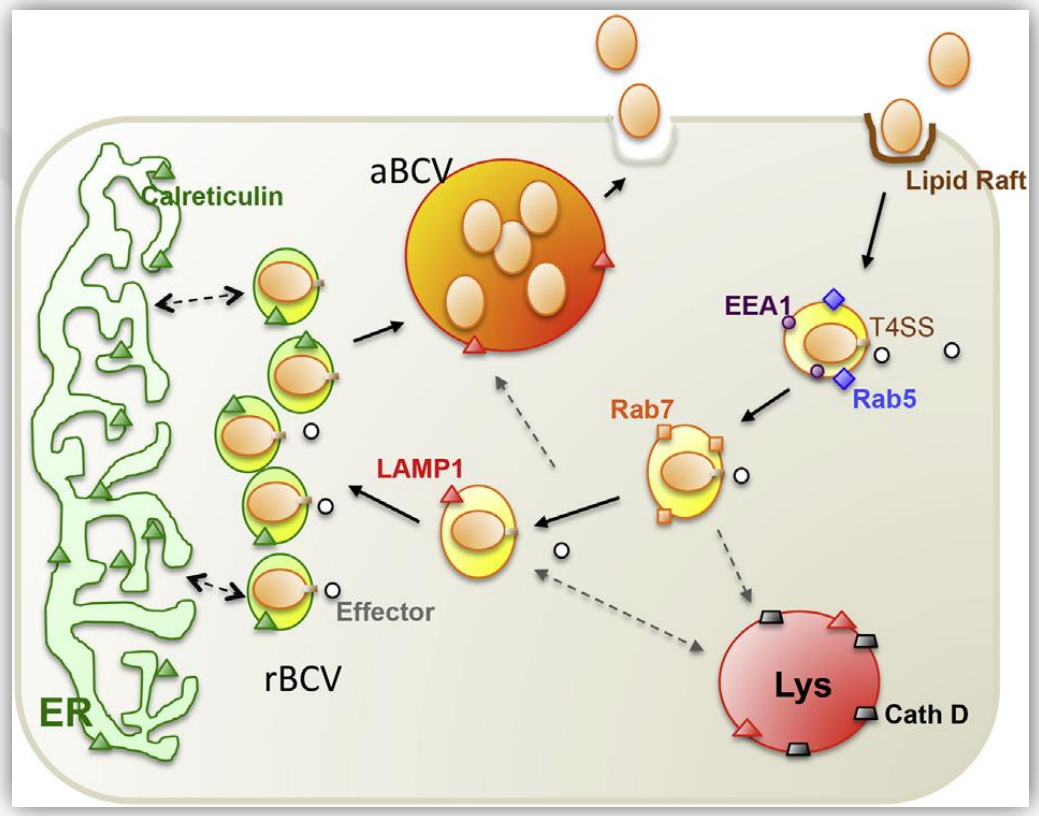
yapışır ve invaze eder, ancak hücre içinde hayatta kalamazlar (Gorvel ve Moreno 2002, Nata ve ark 2010).

Brucella için fagositik olmayan hücrelerde spesifik bir reseptör tanımlanmamakla birlikte, adezyona katılan spesifik bakteriyel moleküllerin kanıtı bulunmaktadır (Gorvel ve Moreno 2002). *Brucella*'nın 41 Kd' luk (SP41) yüzey proteini, konakçı hücrelere yapışma ve invazyonu ile ilişkilidir (Castenada-Roldan 2006). In vitro çalışmalar, epitelyal hücrelerin etken tarafından invazyonu, aktin filamanlarının, bakterinin konakçı hücre zarı ile etkileşim alanına alınmasıyla ilişkili olduğunu göstermiştir (Guzman-Verri ve ark 2001). Epitel hücresine penetrasyon, aktin polimerizasyonu gerektirir (Kim 2015).

Etkenin fagositik olmayan hücrelere yapışması ve internalizasyonu, Rho, Rac ve Cdc42 gibi hücre iskeleti düzenleyicileri olarak bilinen Rho alt ailesine ait GTPaz'ların dolaylı ya da doğrudan aktivasyonu ile gerçekleşir (Guzman-Verri ve ark 2001). Bu proteinler hücre metabolizmasının düzenlemesinde rol oynarlar. Cdc42, fagositik olmayan bir hücre ile temas sırasında *Brucella* tarafından doğrudan aktive edilen tek GTPazdır. Rac ve Rho'nun aktivasyonu ise dolaylıdır çünkü inhibisyonları konakçı hücrelere invazyonu engellemektedir (Nata ve ark 2010). Bunlara ek olarak, siklik GMP, PIP3-kinaz, tirosin kinaz ve MAP kinazları içeren diğer proteinler *Brucella'*nın konakçı hücre yüzeyine yapışmasında rol oynar (Guzmán-Verri ve ark 2001, Gorvel ve Moreno 2002).

GTPaz aktivasyonu ve F-aktin polimerizasyonu aynı zamanda makrofaj yüzeyine yapışma ile de ilişkilidir (Guzmán-Verri ve ark 2001). Annexin I'de yapışmanın erken safhalarında membran füzyonunda rol oynayan bir proteindir (Glowacka ve ark 2018). Bakteriyel internalizasyon, makrofaj hücre zarında oluşan mikro bölgeler olan, lipid parçacıkları tarafından da meydana gelir. Bu yapı, *Brucella*'nın hücre içi trafiğine katkıda bulunur (Şekil 1.4) (de Figureido ve ark 2015). Opsonize olmayan *Brucella* suşları, insan monositlerine ve murin makrofajlarına lipidize olarak internalize olurlar. Bu işlem, TLR4 ve PI3-kinazın aktivasyonunu gerektirir. Bununla birlikte, insan dendritik hücrelerindeki bu süreç, yalnızca kısmen lipidizasyona bağlıdır (von Bargen ve ark 2012). LPS'de O-polisakkarit içermeyen (R-LPS) *brucella* suşları, ökaryotik hücrelere lipid parçacıkları vasıtasıyla nüfuz etmez ve bu nedenle makrofajlar tarafından yok edilir

(Glowacka ve ark 2018). Lipid parçacıkları, kolesterol, GPI (glikosilfosfatidilinositol) ve GM1 (gangliosidler) bakımından zengindir. Lipidizasyon ile ilişkili proteinler: GPI ve GM1'in yanı sıra *Brucella* içeren makropinozomlarla kolesterol sağlar ve makrofajlara internalizasyonu kolaylaştırır. *Brucella*, TLR'ler tarafından tanınır, ancak modifikasyonlar nedeniyle TLR'ler ile etkileşimi Enterobakterilere göre 10 kat daha azdır (Glowacka ve ark 2018). Bu nedenle, Nükleer Faktör kappaβ (NF-κβ)'nın aktivasyonu ve inflamatuar sitokinlerin üretimi daha zayıftır (de Figureido ve ark 2015).



Şekil 1.4. Makrofaj hücrelerinde *Brucella*'nın hücre içi trafiği (de Figureido ve ark 2015).

Etkenin hücre içinde hayatta kalması, asitleşmiş intrafagosomal ortama direnme ve fagosom-lizozom füzyonunu inhibe etme yeteneğine bağlıdır (Neta ve ark 2010). Bu süreçler, hücre içi hareketi yönlendiren, fagozomun normal olgunlaşma sürecini değiştiren ve bakteri içeren fagozomların lizozomlarla füzyonunu bloke eden *Brusella'*nın fogosite olması ile tetiklenir (Gorvel ve Moreno 2002). Etkenin hücre içi iletişimi ve hücre içi hayatta kalma kabiliyeti tüm hücre tiplerinde aynı değildir. Örneğin, nötrofiller *Brusella'*nın hücre içi büyümesine izin vermezken, organizma, patojenin hücre içi trafiğinin fagositik olmayan hücrelere

benzer olduğu makrofajlar gibi diğer fagositlerde iyi hayatta kalır (Gorvel ve Moreno 2002, Nata ve ark 2010). *Brusella'*nın fagosite olmasından kısa bir süre sonra, küçük GTP-bağlayıcı protein Rab 5 ve Erken Endozomal Antijen 1 (EEA1) ekspresyonunu saplayan erken fagosomal kompleks oluşur (Chaves-Olarte ve ark 2002, Nata ve ark 2010). GTPazlar *Brucella* etkenin hücre içi iletişimi sırasında da aktive edilir, ancak invazyon işlemi sırasında aktive edilenlerden farklıdır. Dolayısıyla, invazyon ve hücre içi hareketten bağımsız görünmektedir (Guzman-Verri ve ark 2001, Gorvel ve Moreno 2002). Hücre içi hayatta kalmak için, enfeksiyonun erken aşamalarında Brusella içeren vakuolün (BCV) asitleştirilmesi de gereklidir. Bu asitleştirilmiş ortam, hücre içi sağ kalımı destekleyen bakteriyel gen ekspreyonu profilindeki değişimleri indükler (Porte ve ark 1999).

HeLa hücrelerine inokule edildikten 2 saat sonra *Brucella* etkeni, otofagosomlar için bir belirteç olan lizozom ile ilişkili membran glikoprotein 1 (LAMP1) ile işaretlenmiş çok membranlı hücre içi bölmelere lokalize olur. Brucella içeren vakuol daha sonra kalretikulin ve sec61b gibi rough endoplazmik retikulumun (RER) belirteçlerini alır. Bu bulgular, etkenin fagosom kompartımanından organizmanın replikasyon için optimal bir ortama sahip olduğu konakçı hücrenin RER'sine doğru harekette olduğunu göstermektedir. *Brucella* ile enfekte olmuş hücrelerin erken ultrastructurel analizi de RER'i replikasyon yeri olarak tanımlamıştır (Nata ve ark 2010). *Brucella* çok membranlı hücre içi bölmelerinde sınırlı replikasyona sahipken RER, optimum bakteri replikasyonunu sürdüren tek organelidir (Chaves-Olarte ve ark 2002, Gorvel ve Moreno 2002).

Brucella, ekzotoksinler, sitolizinler, kapsül, fimbria, flagellum, plazmidler, lizojenik fajlar, antijenik varyasyon, endotoksik lipopolisakkarit (LPS) ve konakçı hücre apoptoz indükleyicileri gibi klasik virülans faktörlerine sahip değildir (Moreno ve Mariyon 2001). *Brusella* türlerinin virülans mekanizmaları, organizmanın hücre içi replikasyon alanına ulaşmasına izin veren, invazyon ve hücre içi hayatta kalma yeteneği için gerekli olan faktörlerdir (Guzmán-Verri ve ark 2001, Moreno ve Moriyon 2001).

Brucella LPS, organizmanın konakçı hücreleri işgal etmeden önce hücre dışı ortamda virülansta önemli bir rol oynamaktadır (Ko ve Splitter 2003). Bununla birlikte, *Brucella* rough mutant suşlarının hücre içi olarak smooth suşlardan daha az

hayatta kalma yeteneği vardır, çünkü LPS-O zinciri makrofajlarda Brucella'nın hücre içine girişi ve erken hücre içi fazı için gereklidir (Lapaque ve ark 2005, Nata ve ark 2010).

Hücreye giriş sırasında *Brucella* etkeni, GTPazların toplanması ve dış zarın sürdürülebilmesi için gerekli olan BvrR/ BvrS adlı iki bileşenli bir düzenleyici sisteme dayanır. Böylece, bvrS-bvrR mutantları, fagositik olmayan hücrelerin invazyonu ve hücre içi sağkalım için bozulur (Lopez-Goni ve ark 2002). Bu sistemin iki bileşeni, histidin-kinaz süper ailesinin bir sensör protein üyesi olan BvrS ve bir regülatör protein olan BvrR'dir. Bu sistem konakçı hücrelerin invazyonunda rol oynayan dış zar proteinlerinin (Omp) ekspresyonunu düzenler (Nata ve ark 2010). Mutasyona uğramış bvrR ve özellikle bvrS'ye sahip olan *Brucella* suşları, Rho alt ailesinin, özellikle Cdc42'nin, aktin polimerizasyonu ve konakçı hücrelerin invazyonu için gerekli olan GTPazlarını alma yeteneğinden yoksundur. Ek olarak, konakçı hücrelerin bu mutantlar tarafından invazyonu enzimatik işlemlerle yapay olarak uyarıldığında mutantlar konakçı hücre öldürme mekanizmalarına daha duyarlıdır. Bu durumda hücre içi sağkalımdaki zayıflamaya, mutantların fagosom-lizozom füzyonunu önleyememesine neden olur (Lopez-Goni ve ark 2002).

Brucella siklik β-1,2-glukan sentetazının tükenmesi, farelerde *B. abortus*'un hayatta kalması ve HeLa hücrelerinde hücre içi replikasyon için gerekli olan dış zarın bileşenleri olan siklik β -1,2-glukan eksikliğine neden olur. Siklik β-1, 2-glukanlar, Brucella enfeksiyonunun erken hücre içi fazı esnasında gereklidir, çünkü etkenin RER'e hareketi için önemli olmasada, fagosom-lizozom füzyonunu önlerler (Nata ve ark 2010).

Brucella temel bir virülans mekanizması olan hücre içi çoğalma yeteneği için de gerekliliği olarak kabul edilen VirB tarafından kodlanan T4SS, hem HeLa hücreleri gibi fagositik olmayan hücrelerde hem de fagositik hücrelerde etkenin hücre içi büyümesi için gereklidir (Nata ve ark 2010).

T4SS, T yardımcı hücre tip 1 (Th1) polarizasyonuna katkıda bulunan IL-12 ve interferon (IFN)γ gibi sitokinlerin erken yanıtı için gereklidir (Rolan ve Tsolis 2008). *Brusella*'nın nötrofiller, makrofajlar ve dendritik hücreler (DC'ler) tarafından ilk kez tanınması, Toll benzeri reseptörleri (TLR'ler) içerir (Nata ve ark 2010). TLR'ler, patojen ilişkili moleküler modeller (PAMP) olarak bilinen

mikroorganizmaların korunmuş bileşenleri tarafından uyarılır. Lipoproteinler, LPS, flagellin ve DNA gibi bakterilerden gelen PAMP'ler, sırasıyla TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9 ile tanınır (Takeda ve Akira 2005).

Brucella enfeksiyonu sırasında, düzenleyici rol alan, T hücreleri tarafından IFNγ üretimi DC aktivasyonu ile sonuçlanır. Farelerde yapılan çalışmalarda, *Brucella* enfeksiyonuna karşı DC aktivasyonu ve olgunlaşmasında rol alan, T hücrelerinde IFNγ üretimi için MyD88 (Miyeloid Differentiation 88) proteininin gerekliliği ortaya konmuştur (Copin ve ark 2007, Macedo ve ark 2008). Önemli olarak, smooth Brucella LPS yapısı DC'leri IL-12 üretecek şekilde uyarır ve bu da CD4 + T hücrelerini uyarılmasına neden olur (Billard ve ark 2007). Oksidatif patlamalar ve nitrik oksit üretimi, makrofajların bakterileri öldürdüğü ve IFNγ ve tümör nekroz faktörü (TNFα) gibi doğuştan gelen bağışıklık sitokinleri tarafından uyarıldığı etkili mekanizmalardır (Nata ve ark 2010).

Doğal katil hücrelerin (NK) sitotoksik aktivitesi de etkene karşı doğal bağışıklığın bir parçasıdır. Hayvan NK hücreleri, makrofajların bakterisidal aktivitesini uyaran bir sitokin olan IFNγ 'nin salgılanması yoluyla doğrudan hareket edebilir. Kompleman sisteminin proteinleri, esas olarak hücre dışı *Brucella*'nın opsonizasyonundaki ve anında ortadan kaldırılmasındaki rolleri aracılığıyla ya da antikor tarafından nötralize edilen bakterilerle etkileşime girerek doğuştan gelen bağışıklık tepkisine katkıda bulunur (Nata ve ark 2010).

Brucella etkenine karşı etkili adaptif bağışıklık tepkisi, spesifik T hücresi aktivasyonu ile teşvik edilen hücre aracılı bir bağışıklık gerektirir. Etken, α/β reseptörleri ile ilişkili ko-reseptör moleküllerinden CD4+ barındıran T yardımcı hücreleri veya CD8+ barındıran sitotoksik T hücreleri tarafından tanınır ve sonrasında bakteriyel antijenler işlenerek, antijene özgü MHC sınıf II veya I yoluyla sunulur (Nata ve ark 2010). Bununla birlikte, γ/δ T hücreleri in vitro koşullarda litik aktiviteye sahiptir, TNFα ve IFNγ gibi sitokinler üretirler, böylece makrofajları aktive edebilir ve α/β T-hücre aktivasyonunu modüle edebilirler (Ottones ve ark 2000).

Th1 hücreleri tarafından üretilen başlıca sitokin, makrofaj aktivasyonundan ve *Brucella* enfeksiyonunun in vitro ve in vivo kısıtlanmasından sorumlu olan IFNγ dir. Ayrıca Thl hücrelerinden salgılanan IL-2 T-hücresi klonal genişlemesini

destekler ve makrofajlarda etkenin çoğalmasının kontrolüne katkıda bulunur. Bunların aksine, IL-10 gibi bir Th2 yanıtı ile ilişkili sitokinler, *Brucella* enfeksiyonu sırasında, inflamatuar yanıtı sınırlandıran ve farelerde kalıcı enfeksiyon oluşumunu destekleyebilen bir etki göstermektedirler (Nata ve ark 2010).

1.6. Klinik Bulgular

1.6.1. Hayvanlarda Klinik Bulgular

Brusellozlu hayvanlarda tek klinik tablonun şekillenebileceği gibi birden fazla da klinik semptomla görülebilecek hastalık olduğu bildirilmektedir (OIE 2012). Brusellozun ana semptomu hayvanlarda bakterinin plasenta ve fetüse olan afinitesi sonucu şekillenen abort semptomudur. Etken aborte olmuş fetüs ve plasenta dokularında önemli yoğunlukta mevcut olabilmektedir. Hayvanların gebelikleri esnasında etkenle karşılaşmadan sonra atık semptomu tek sefer görülebileceği gibi sonraki gebeliklerde atık semptomu görülebilmektedir. Ayrıca enfekte hayvan etkeni hayatlarının sonuna kadar taşımaya devam ederler. Doğum sonrası da sütü ile etkeni saçmaya devam ettikleri bildirilmektedir (Yumuk ve O'Callaghan 2012, Poester ve ark 2013). Abort görülen hayvanlarda yavru zarlarının atılamaması ile birlikte, infertilite ve mastitis vakaları sıklıkla yaşanabilmektedir. Etken çok sık olmamakla birlikte hayvanlarda bursa mukozaları, tendo zarları ve eklemlere affinite gösterip bu bölgelerde kronik yangılara neden olabilmektedir. Diz eklemlerinde artritislere de sebep olabilmektedirler (Songer ve Post 2012, OIE 2016). Erkek hayvanlarda etken kaynaklı seminal vezikülit, orşit ile epididimit sıklıkla görülebilmektedir (Megid ve ark 2010, OIE 2012, Poester ve ark 2013). Enfekte boğalarda sperma üretiminin azalması veya kalıcı infertilite semptomları görülmektedir (Poester ve ark 2013).

Gebe ineklerde 5 ile 8. aylar arasında abort meydana gelmektedir (Megid ve ark 2010). Genellikle gebe ineklerde abort bir kez meydana geldikten sonra bağışıklık kazanılır. Abortun ardından plasental retansiyon, metritise yol açabilir ve bu da kısırlığa neden olabilir. Bunların yanında bazı enfekte inekler hastalığın belirtilerini göstermeden de normal buzağıları doğurabilirler. Boğalardaki Bruselloz esas olarak orşit, epididimit, ampülit ve seminal vezikülite yol açan üreme sistemini etkiler. Orşit genellikle tek taraflıdır, ancak her iki testisin de etkilenme olasılığı vardır (Kaltungo ve ark 2014).

Dişi domuzlardaki Brusellozun en yaygın belirtisi gebeliğin herhangi bir zamanında meydana gelen aborttur (OIE 2012). Kronik enfekte dişi domuzlar da

vajinal akıntı genellikle yoktur. Hastalığın ekonomik olarak en önemli devamı abort yerine kısırlıktır. Üreme sırasında genital sistem yoluyla *B. suis*'e maruz kalan dişi domuzlar ve genç dişi domuzların abort oranının daha yüksek olduğunu ve abortların gebelik aşamasından ziyade *B. suis*'e maruz kalma süresinden daha fazla etkilendiğini bildirmişlerdir (Kaltungo ve ark 2014). Buna ek olarak, çiftleşmesinden sonraki 17 gün gibi kısa bir sürede embriyonik rezorpsiyonlara, *B. suis*'i yayan domuzlar ile karşılaşılmıştır (Acha ve Szyfres 2003). Bruselloz, üreme sisteminde lezyonlara neden olarak daha kalıcı olabilir ve bu da genellikle cinsel aktivitelere geçici veya kalıcı hasarlar ile sonuçlanır (OIE 2012). Her iki cinsiyette de enfeksiyon, daha sonra topallık ve bazen posterior felç olarak ortaya çıkabilen şişmiş eklemlere ve tendon kılıflarına neden olabilir. Çeşitli organ ve dokularda çeşitli boyutlarda apseler de olabilir. Genital enfeksiyon gelişmeyen domuzlar nadiren hastalıktan iyileşir. Bununla birlikte, aksesuar seks bezlerindeki enfeksiyonlar domuzlarda çok yaygındır, ancak her zaman doğurganlığı etkilemez (Kaltungo ve ark. 2014).

Bruselloz enfeksiyonu olan atlar semptom vermeden iyileşebilir ve temastan iki yıl sonra klinik belirtilerin görülebileceği bildirilmiştir (Cvetnic ve ark 2005). Bu türdeki enfeksiyon çoğunlukla *B. abortus*'u içerir. Hastalık esas olarak supraspinöz ve supra-atlantal bursa iltihabı olarak kabul edilir. Sendromlar sırasıyla "yumruklu solmalar" ve "anket kötülüğü" olarak bilinir. Bursa kesesi açık, viskoz, saman renkli bir eksüdat ile belirgin bir şekilde dağılır ve kalınlaşmış bir duvar geliştirir. Lezyonlar patlayabilir ve sekonder etkenler ile kontamine olabilir. Vajinal akıntılarda organizmanın atılımı kısraklarda kısa süre ile görülmektedir. *B. abortus* enfeksiyonu nedeniyle atlarda bildirilen diğer klinik bulgular artrit, aralıklı topallık, uyuşukluk ve karpal eklemin şişmesidir (Ocholi ve ark 2004, Kaltungo ve ark. 2014).

B. canis ile enfeksiyonun üreme sistemi ile ilişkili değişken klinik bulgularla sonuçlandığını bildirmektedir (Shin ve Carmichael 2012). Enfeksiyonun spesifik olmayan genel belirtileri arasında uyuşukluk, zayıf tüy tabakası, yorgunluk, kilo kaybı, egzersiz intoleransı ve hastalık sürecinin erken dönemlerinde lenfadenopati yer alabildiği bildirilmektedir (Wanke 2004, Hollet 2006, Casford 2018, Kauffman ve Petersen 2019). Bu enfeksiyon, yüksek morbidite ve düşük mortalite ile asemptomatik ve hafif olarak seyredebilmektedir (Hollet 2006). *B. canis* enfeksiyonu ilerledikçe splenomegali ve tekrarlayan üveit meydana gelebilir. Ek olarak, topallık,

kas güçsüzlüğü, omurga ağrısı ve nörolojik disfonksiyon gibi ortopedik sorunlar, spinal kompresyon ile ilişkilendirilebilir (Wanke 2004, Casford 2018, Hensel ve ark 2018). Omurga hastalığı erkek köpeklerde daha yaygındır, çünkü prostat *B. canis* için bir rezervuar görevi görür ve aralıklı bakteremiyi teşvik eder (Hensel ve ark 2018, Kauffman ve Petersen 2019). Damızlık köpeklerde görülen klinik belirtiler esas olarak testislerdedir. Akut epididimit ve prostatit daha yaygın belirtilerdir, orşit ise daha nadirdir (Olsen ve Palmer 2014, Casford 2018, Hensel ve ark 2018). Sperm aglütinasyonu, sperm anormallikleri ve enflamatuar hücreler gibi hastalıklar spermatik değişikliklere yol açabildiği bilgisi paylaşılmıştır (Wanke 2004, Hollet 2006, Kauffman ve Petersen 2019). Dişi köpek türlerinde Brusellozun karakteristik işareti, 30-57 gün arasında ortaya çıkabilecek geç dönem abort durumudur. Olguların yaklaşık %75'inde 45 ila 55 günlük gebelik daha sık görülebilmektedir. Abortu altı haftaya kadar devam eden mukoid, sero-sanguineous, kahverengimsi veya gri vajinal akıntı takip eder. Brusellozlu dişi köpeklerde östrus ve üreme şekli değişmez (Hollet 2006, Casford 2018, Hensel ve ark 2018, Kauffman ve Petersen 2019). Dişi köpekteki hastalık, doğum sonrası dönemde sıklıkla ölen hasta yavrularının tekrarlanan abortlarına veya doğumuna neden olabilir. Üreme sonrasında 2-3 hafta içinde emilim veya erken embriyonik ölüm de görülebilir. Daha sonra hastalıkta, görünüşte normal yavruların doğumu ortaya çıkabilir (Hollet 2006, Shin ve Carmichael 2012, Kauffman ve Petersen 2019). *B. suis* ile deneysel olarak enfekte olmuş köpeklerin ateşli ve asemptomatik olduğunu ve lezyon bulunmadığını bildirmişlerdir (Mathur ve ark 2007).

Develerin hangi *Brucella* türü için ana konakçı olduğu bilinmemektedir (Musa ve Shigidi 2001). Bununla birlikte, keçi, sığır ve koyun ile birlikte otlatıldıklarında *B. abortus* ve *B. melitensis* ile enfekte olabilirler. Enfekte sütlerin tüketilmesi ciddi bir halk sağlığı problemi ortaya çıkarmaktadır (Musa ve ark 2008, Gwida ve ark 2012). Develerde Brusellozun klinik belirtilerin nadiren görülmesinden dolayı, develer gizli taşıyıcı olarak kabul edilmektedir (Kaltungo ve ark. 2014).

1.6.2. İnsanlarda Bruselloz

İnsan Brusellozu, farklı klinik belirtilerle seyreden kronik bir enfeksiyondur (Kaltungo ve ark. 2014). Hastalığın seyrine bağlı olarak, insan Brusellozu üç şekilde sınıflandırılır: akut Bruselloz; güçsüzlük, dalgalı ateş, baş ağrısı, miyalji, kırmızı döküntü, splenomegali, hepatomegali ve gastrointestinal semptomlarla karakterize

hastalıktır. Akut faz ölümle, subakut veya kronik forma geçişle ya da iyileşme ile sonuçlanabilmektedir. Subakut Bruselloz akut seyre özgü hemen hemen tüm semptomların daha hafif olarak görüldüğü hastalıktır. Kronik Bruselloz, uzun süreli belirti ve semptomların yorgunluk, tekrarlayan ateşler, artrit, endokardit ve spondilit olabildiği hastalıktır (Corbel 2006, Purcell ve ark 2007, Xavier ve ark 2010, Galinska ve Zagorski 2013, Golshani ve Bouzari 2017,).

Hastalıkta en yaygın klinik bulgu, sıcaklığın sabahları 37ºC'den öğleden sonra 40ºC'ye kadar dalgalanan ateştir. Diğer belirtiler arasında tuhaf bir kokuya sahip gece terlemeleri, titreme, artralji, kas ağrısı ve halsizlik yer alır (Megid ve ark. 2010, Casford 2018, Hensel ve ark 2018). Ayrıca halsizlik, uykusuzluk, iştahsızlık, baş ağrısı, kabızlık, cinsel isteksizlik, sinirlilik ve depresyon da yaygın olarak görülen semptomlardır. Klasik bilgi Brusellozun insan uterusunda eritritol şekeri bulunmadığı için abortlara neden olmayacağını belirtmesine rağmen Brusellozun insanlarda konjenital ve neonatal enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir. Bu durum, *Brucella* türlerinin fetal veya plasental dokulardan izole edildiği birkaç vaka ile kanıtlanmıştır (Karcaaltincaba ve ark. 2010, Roushan ve ark. 2011). Etkilenen iç organlara bağlı olarak, spondilit, artrit, endokardit, orşit ve prostatit gibi komplikasyonlar fark edilebilir (Acha ve Szyfres 2003, Kaltungo ve ark. 2014). Menenjit, ensefalit, meningo ensefaliti, beyin apsesi, yüz felci, meningomiyeloensefalo-spondiloz ve iskemik ataklar gibi nörolojik komplikasyonların da hastalığın başlangıcı sırasında, iyileşme döneminde veya hatta bir akut enfeksiyon iyileşmeden sonra oluşabildiği bildirilmektedir (Tikare ve Mantur 2008). Hastalık zayıflatıcı ve kronik olsada, Bruselloz, endokardit nedeniyle tedavi edilmeyen birkaç vaka hariç, insanlarda nadiren ölümcüldür (Kaltungo ve ark. 2014). Genellikle iltihaplı lezyonlarla ilişkili uzun süreli bir hastalık, *B. suis* enfeksiyonları ile ilişkilidir. *B. abortus*, nadiren komplikasyonlara neden olan hafif ila orta şiddette sporadik hastalık ile ilişkilidir. *B. canis* enfeksiyonunun *B. abortus* enfeksiyonundan ayırt edilemeyen bir hastalık seyri vardır. (Lucero ve ark 2005, Kauffman ve Petersen 2019). *B. canis* enfeksiyonu, sık nükslere neden olan sinsi bir başlangıca sahiptir ve insanlarda yaygın olarak kronik hastalığa neden olmaz. *B. pinnipedialis* ve *B. cetaceae*'nin insanlarda Nörobruselloza neden olduğu bildirilmiştir (Kaltungo ve ark 2014).

1.7. Tanı Yöntemleri

1.7.1. Direkt Tanı Yöntemleri

Hastalığın teşhisi için en güvenilir yol direkt tanı yöntemi olan *Brucella*'nın izolasyonudur (Alton ve ark 1988, Perez-Sancho ve ark 2015). Hastalığın teşhisinde materyal olarak dalak, akciğer ve mide içeriğinin bulunduğu atık fötüs, vajinal akıntılar, süt, sperma ve eklem sıvıları kullanılır. Bunlardan başka meme, baş, genital lenf düğümleri, uterus ve meme dokusu teşhis için kullanılabilir (Robinson 2003, OIE 2012, Perez-Sancho ve ark 2015).

Bakteriyoskopik Tanı Yöntemleri

Brucella etkeni için önemli materyallerden frotiler hazırlanıp Modifiye Köster boyama yöntemi ya da Modifiye Ziehl-Neelsen boyama metoduyla boyanarak mikroskopta incelenebilir. *Brucella* bakterileri, hafif asitle dekolarizayona dirençli olmaları sebebiyle modifiye köster boyama ile kolayca ayırt edilebilme özelliği gösterirler. Bu boyama yöntemi ısı ile fikse edilmiş biyolojik maddenin incelenmesi için kullanılan genel kuraldır. Mikroskop altında mavi zeminde kırmızı tonlarında *Brucella* türleri tespit edilir. Ayrıca Gram boyama yöntemi de *Brucella* bakterisini tanı amaçlı kullanılmaktadır (Alton ve ark 1988, OIE 2016).

Kültür

Brucella bakterisinin izolasyonunda altın standart yöntem örneklerin katı besi yerine inokulasyonu olarak kabul edilmektedir. Çünkü hastalığın tanısında izolasyon yüksek spesifitesinden dolayı en güvenilir metot olarak kabul edilmektedir. OIE, Brusellozun kesin tanısının bakterinin izolasyonu ile olabileceğini bildirmiştir (Alton ve ark 1988, OIE 2012, Perez-Sancho ve ark 2015).

İzolasyon amacıyla Bakto-Triptoz, Tripkaz soy, Tripton soya, Triptik soy besiyerleri kullanılır. Dehidre ticari besiyerleri agar ve %2-5 serum ilavesi ile hazırlanmaktadır. İzolasyon için kullanılan diğer besiyerleri Blood agar base, Gliserol dekstroz agar, Columbia agar, Nutrient agar ve Serum dekstroz agardır. Non-selektif Casteneda's besiyeri, vücut sıvıları, süt ve kanda bulunan Brucella türlerinin dissosiyasyonuna engel olarak izolasyonunu kolaylaştırır. Selektif olarak Cita ve Farrell's, Kuzdas ve Modifiye Thayer Martin besiyerleri kullanılmaktadır (Alton ve ark. 1988, De Miguel ve ark. 2011, OIE 2016).

Biyotiplendirme

Bakterinin serolojik özellikleri, boyalar ve faj hassasiyeti genellikle rough kolonilerde değiştiğinden, aşağıda açıklanan tiplendirme testlerinde koloni morfolojisine dikkat etmek önemlidir. Koloni morfolojisini gözlemlemek için önerilen yöntemler, Henry'nin eğik olarak yansıyan ışık yöntemi, Braun & Bonestell tarafından tanımlanan akriflavin testi veya White & Wilson'un kolonileri boyamada kristal viyole yöntemidir (Alton ve ark. 1988).

Brucella spp.'lerin tanımlanması, Gram veya Stamp boyaması sonrası mikroskobik morfoloji, üreme özellikleri, üreaz, oksidaz testleri ve poliklonal anti-*Brucella* serum ile aglütinasyon testleri ile gerçekleştirilebilir (OIE 2016). Tür ve biyovar tanımlama; faj lizisi ve anti-A, -M veya -R monospesifik serumlarla aglütinasyon gibi ayrıntılı testler gerektirir. Tiflis, Weybridge, Izatnagar ve R/C fajlarının eşzamanlı kullanımı, *Brucella* türlerinin pratik bir şekilde tanımlanmasını sağlayan bir faj-tipleme sistemi sağlar. Bununla birlikte, H_2S üretimi, bazik fuksin, safranin ve tiyonin varlığında üreme için ilave CO_2 gereksinimi gibi çeşitli özellikler rutin testlerle ortaya çıkmaktadır (Alton ve ark. 1988; OIE 2016). İzolasyon sonrasında türlerin ayrımı için göstermiş oldukları özellikler aşağıdaki tabloda belirtilmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. *Brucella* türlerinin biyovarlarının ayrıcı özellikleri (Alton ve ark. 1988; Joint FAO / WHO Expert Committee on Brucellosis 1986, Whatmore 2009; ve Whatmore ve ark. 2014, OIE 2016).

		Boyalarda Üreme				Monospesifik serumla aglütinasyon			Referans Suşlar		
Tür	Biyotip	CO2 gerreksinimi	H_2S üretimi	Tiyonin	Bazik Fuksin	A	M	R	Suş	ATCC	NCTC
B. abortus	1	(+)	+	-	+	+	-	-	544	23448	10093
	2	(+)	+	-	-	+	-	-	86/8/59	23449	10501
	3	(+)	+	+	+	+	-	-	Tulya	23450	10502
	4	(+)	+	-	(+)	-	+	-	292	23451	10503
	5	-	-	+	+	-	+	-	B3196	23452	10504
	6	-	(-)	+	+	+	-	-	870	23453	10505
	9	+/-	+	+	+	-	+	-	C68	23455	10507
B. melitensis	1	-	-	+	+	-	+	-	16M	23456	10094
	2		-	+	+	+	-	-	63/9	23457	10508
	3	-	-	+	+	+	+	-	Ether	23458	10509
B. suis	1	-	+	+	(-)	+	-	-	1330	23444	10316
	2	-	-	+	-	+	-	-	Thomsen	23445	10510
	3	-	-	+	+	+	-	-	686	23446	10511
	4	-	-	+	(-)	+	+	-	40	23447	11364
	5	-	-	+	-	-	+	-	513	/	11996

Çizelge 1.2 (Devam). *Brucella* türlerinin biyovarlarının ayrıcı özellikleri (Alton ve ark. 1988; Joint FAO / WHO Expert Committee on Brucellosis 1986, Whatmore 2009; ve Whatmore ve ark. 2014, OIE 2016).

		Boyalarda Üreme				Monospesifik serumla aglütinasyon			Referans Suşlar		
Tür	Biyotip	CO2 gerreksinimi	H_2S üretimi	Tiyonin	Bazik Fuksin	A	M	R	Suş	ATCC	NCTC
B. neotoma		-	+	-	-	+	-	-	5K33	23459	10084
B. ovis		+	-	+	(-)	-	-	+	63/290	25840	10512
B. canis		-	-	+	(-)	-	-	+	RM6/66	23365	10854
B. ceti		(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	94-74	/	12891
B. pinnipedialis		(+)	-	+	(+)	(+)	(-)	-	94-73	/	12890
B. microti		-	-	+	+	-	+	-	CCM4915	/	/
B. inopinata		-	+	+	+	-	+		6436	/	/
B. papionis		-	-	-	-	+	-	-	958	/	13660
B. vulpis											

Moleküler Yöntemler

Moleküler tekniklerin ortaya çıkması ile klasik Brusella türleri arasında yüksek oranda DNA benzerlikleri olduğu ortaya konulmuştur. DNA-DNA hibridizasyonu çalışmaları altı klasik türler arasında %90'ın üzerinde homoloji olduğunu ortaya koymaktadır (Verger ve ark 1985, Whatmore 2009). Bu bulgular, sonraki yıllarda yapılan araştırmalarda moleküler belirleyicilerin tanımlanmasına ve cins üyeleri arasında ayrım yapmak için uygun çalışma yaklaşımlarına yöneltmiştir. Çoğu durumda, cins düzeyi tespit için basit bir tanımlama yeterli olsada, bazı durumlarda türlerin veya alt türlerin seviyesinin belirlenmesi değerlidir. Örneğin, eradikasyon programlarında, tür tayini önem arz eder ve alt tiplendirme, epidemiyolojik veri olarak oldukça değerlidir (Bricker 2002, Al Dahouk ve ark 2007a, Bounaadja ve ark. 2009).

Brucella türleri arasındaki yüksek DNA homolojisine rağmen, farklı türleri, biyovarları ve hatta aşı ya da saha suşlarını tanımlamak için farklı PZR protokolleri tarif edilmiştir (Mirnejad ve ark 2012, Nan ve ark 2014).

Brusella'nın insan ve hayvan dokuları ya da hayvan ürünlerinden elde edilen kültürlerden cins seviyesinde identifikasyonu için bir takım PZR analizleri, bakterideki gen bölgelerinin keşfedilmesiyle geliştirilebilmektedir. Bu gen bölgeleri; 16S rRNA, BCSP31 (Brucella cell surface salt extractable protein), IS711 ve omp2 gen bölümleridir. 16SrRNA kodlayan gen bölgesinden F4 ve R2 primeleri, outer membran protein bölgelerinden (omp31, omp2a, omp2b, omp25) proteinleri kodlayan gen bölgelerinden seçilen primerler ile omp2'yi kodlayan gen bölgesinden JPF ve JPR primerleri, BCSP31 proteinini kodlayan genomik bölgeden B4 ve B5 primerleri, IS711 bölgesinden IS639 ve IS313 kodlayan gen bölgesinden bruc1 ve bruc5 primeleri ile etkenlerin cins düzeyindeki tanısı gerçekleştirilmektedir (Yu ve Nielsen 2010).

Brucella'yı tür seviyesinde ayırmak için IS711 elemanı kullanılarak çeşitli analizler geliştirilmiştir. Bu amaç için en yaygın olarak kullanılan analiz, AMOS-PZR olarak bilinen *Brucella* türlerini tanımlayabilen PZR metodudur. Bu metot ile *B. abortus* biyovar 1, 2 ve 4, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis* biyovar 1 ayrımları yapılabilmektedir (Bricker ve Halling 1994). Bu analiz, IS711'e bağlanmış ortak primer ve bu ekleme bölgesine bağlanan ve farklı amplikon boyutları nedeniyle tür

ayrımına yol açan türe özgü bir primer kullanılmaktadır. Ayrıca bu analiz, S19 ve RB51 aşı suşlarını içerecek şekilde modifiye edilmiş ve eradikasyon programları için saha ve aşı izolatlarını ayırt etmesi için önemli bir gelişme sağlanmıştır. Primerlere uygulanan bazı modifikasyonlardan sonra analizin performansının artabileceği bildirilmektedir (Bricker 2002). Bunun aksine bu analizin *Brucella*' nın bazı türlerini veya tüm biyovarlarını tespit edememesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Whatmore 2009).

Bakterinin tüm genomunun çalışılması sonucunda; *B. abortus* RB51, S19 ve *B. melitensis* Rev-1'i aşı suşlarının ayrımını gerçekleştirebilen 'Bruceladder' isimli multipleks PZR analizi geliştirilmiştir (Garcia-Yoldi ve ark 2006). Analizde türe özgü farklılıklara dayanarak tasarlanmış sekiz primer çifti kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforez ile görüntüleme sağlanıp, her türe özgü ayrı profillerin oluştuğu bant skalası ile ayrım gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalarda incelenen *B. canis* ile *B. suis* izolatları arasındaki ayrımın tam olarak gerçekleşmediği diğer izolat ayrımlarının çok başarılı olduğu gösterilmektedir (Whatmore 2009).

Bruce-Ladder multipleks PZR'a ek olarak, bazı tek primer kullanılan PZR'larında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bunun için, *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* ilişkili olanlardan ayırt etmek için bp26 geni kullanılmaktadır (Cloeckaert ve ark 2000). Bazı çalışmalarda *B. ceti* kaynaklı enfeksiyonların tespitinde Bruce-Ladder bağımsız bir test olarak yararlı olduğu bildirilmektedir (Sohn ve ark 2003, McDonald ve ark 2006, Whatmore 2009).

Garcia-Yoldi ve ark (2006), tüm türlerin ayırımını yapabilen bir multipleks PZR metodunu geliştirmişlerdir. Bu metot ile *B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. neotomae, B. microti, B. ceti, B. pinnipedialis* ve *B. inopinata* ayrımları ile aşı suşları ayrımı rahatlıkla yapılabilmektedir. Laboratuvarlar, hızlı ve güvenilir olarak bu multipleks PZR metodunu Brusellozun rutin teşhisinde önemli araç olarak kullanmaktadırlar (Mayer-Scholl ve ark 2010).

Pulsed-Field Gel Elektroforez (PFGE), *Brucella* genomlarının karakterizasyonu amacıyla, elektrik alanının periyodik olarak değiştirilmesi ve bazı enzimler yardımıyla yüksek moleküler ağırlıklı fragmentleri üretmek için değişken alanlı jel elektroforez kullanılan metotdur. İlk çalışmalar, test edilen beş türün hepsinin XbaI adı verilen enzim ile birlikte kullanıldığında farklı profiller verdiğini,

ancak biyovarların ayırt edilemediğini göstermektedir (Allardet-Servent ve ark 1988). Sonraki çalışmalarda, tüm *Brucella*'nın PFGE profilleri ve fiziksel haritalarının, *B. suis* ve *B. canis* referans suşları dışında ayırt edilebilir olduğunu doğrulamak için PacI ve SpeI enzimleri kullanılmaktadır (Whatmore 2009).

PFGE tabanlı analizler genom yapısının anlaşılması için elverişli yöntemlerdir. Aynı zamanda, diğer birçok bakteri grubunda PFGE'nin yaygın olarak kullanılabilecek epidemiyolojik bir araç olmasına karşın, *Brucella* için biyovar seviyesinde alt tür ayrımı yapılamadığı için rutin olarak kullanılamayacağı bildirilmektedir (Whatmore 2009).

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP), Brusella'da polimorfik olduğu bilinen gen bölgelerine uygulanan tipleme aracı olarak kabul edilmektedir (Al Dahouk ve ark 2005a). Bu analiz, çeşitli bakterilerin dış zar proteinini (omp) kodlayan genlerine uygulanmaktadır. *Brusella* türlerinin ayrımında ve yeni türlerin tanımlanmasında kullanılabilen bir yöntemdir (Bricker 2002). Önceki çalışmalar omp2 lokusu üzerine yoğunlaşarak bu bölgenin omp2a ve omp2b olmak üzere iki zıt yönde sıralanmış olduğunu göstermektedir (Ficht ve ark 1989). Sonraki çalışmalar, analizi geliştirmek için, çalışılan farklı türlere özgü polimorfizm varlığını göstermektedir (Whatmore 2009). Cloeckaert ve ark (1995), yaptıkları çalışmada *B. abortus* biyovar 3, 5, 6 ve 9'un bazı *B. melitensis* izolatlarından ve *B. canis*'i, *B. suis* biyovar 3 ve 4'ten ayırmak için kullandıklarını bildirmişlerdir. *B. suis* biyovar 3 ve 4 ve *B. canis*'in hala ayırt edilemediği bilidirilmiştir (Cloeckaert ve ark 1995). İncelenen diğer omp genleri arasında *B. abortus*'ta silindiği bilinen ancak *B. canis*, *B. suis* biyovar 2 ve *B. ovis*' te mevcut olan omp31 yer almaktadır (Garcia-Yoldi ve ark 2005, Whatmore 2009).

Ekleme dizileri (Insertion sequence) (IS), mutasyonlara ve genomik yeniden düzenlemelere neden olan prokaryotik genomlar arasında yer değiştirebilen kısa DNA dizileridir. Rastgele yerleştirme ve birden fazla genomik bölgeye yerleşme eğilimleri olan IS elemanları, izolatlar arası ayrımı probları kullanarak gerçekleştirebilmektedir. Birçok bakteri için IS lokalizasyonu, tiplendirme ve epidemiyolojik amaçlar için kullanılmaktadır. *Brucella*'da, IS6501 olarak da bilinen IS711 bölgesi yerleşme dizisi, cins içinde önemli bir çeşitlilik kaynağını temsil ettiği bilgisi paylaşılmaktadır. IS711 bölgesi, işaretli IS711 probu ile genomik araştırmalar

yapmak için sentezlenebilir ve uygun bir veritabanı vasıtasıyla incelendiğinde belirli türlerin üyelerini tespit etmek için kullanılabilmektedirler. Ancak analizin, *B. abortus* biyovar 3, *B. suis* biyovar 3 ve 4 ve *B. canis* gibi farklı türlerin referans suşlarını belirlemede zorlukları mevcuttur (Whatmore 2009).

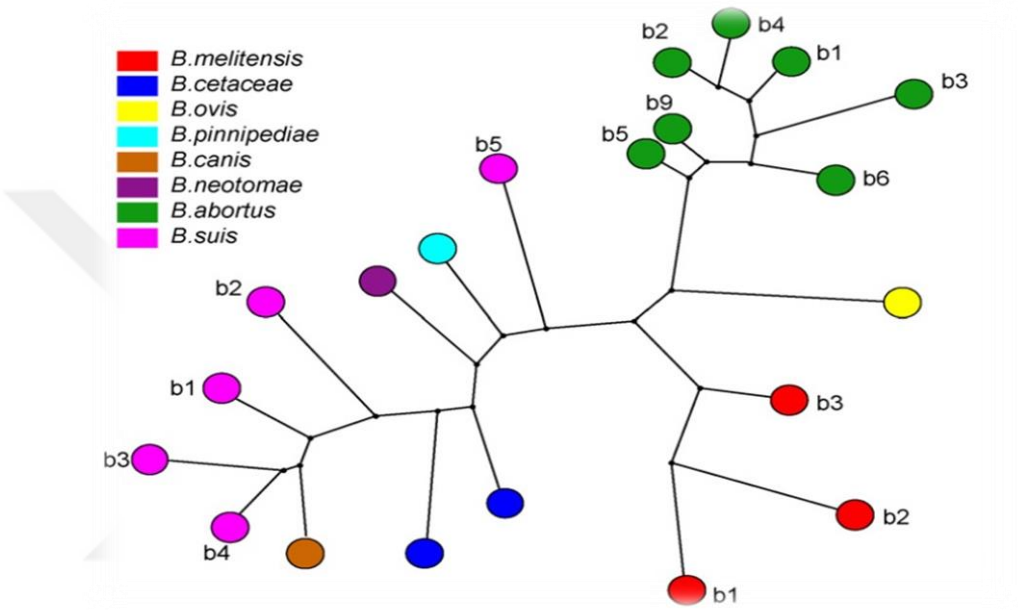
Genom tabanlı tipleme yaklaşımları ile yukarda bahsedilen metotların aksine alt tür düzeyinde güvenilir bir şekilde ayrım yapılabilmektedir. Bu metotlarda küçük istisnalar dışında klasik *Brucella* türlerinin genetik olarak ayrımları yapılarak doğrulanmıştır. Son yıllarda "genom temelli" yaklaşımlar, "bant temelli" yaklaşımların aksine daha çok kullanılır olmuştur. Tercih edilen yaklaşımlar, multilocus tandem tekrar esaslı veya multilocus sekans esaslıdır. Bu yaklaşımlarla elde edilen veriler, internet üzerinden erişilebilen uluslararası veri tabanlarının geliştirilmesine olanak sağlayıp izolatların karşılaştırılarak izlenebilmeleri için imkân sunmaktadır (Whatmore 2009).

VNTR'lerde DNA ipliklerin kayarak yanlış eşleşmeleri, replikasyon kayması veya homolog tekrar dizileri arasında DNA rekombinasyonu nedeniyle farklı sayıda allellikler saptanabilmektedir. Analizde kullanılan markırlar yüksek hızlı moleküler belirteçler olarak kabul edilmektedirler (Whatmore 2009). Bu tür markırlara dayanan analizlere, MLVA adı verilmektedir. Bu analizin, *Brucella* bakterisinin yanı sıra *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi çok az genomik çeşitlilik sergileyen bakterilerde de kullanışlı olduğu bildirilmektedir (Mazars ve ark 2001, Whatmore 2009).

VNTR analizinin *Brucella*'ya ilk uygulaması 2003 yılında yayınlanan Hiper değişken Octomeric Oligonükleotid Parmak-Baskıları şeması (HOOF-Prints) ile gerçekleşmiştir (Bricker ve ark 2003). Analize göre *B. suis* ve *B. melitensis*'in genom sekansları ile dokuz farklı genomik lokusta sekiz baz çifti tandem tekrar dizilerini *B. abortus*'un sekansının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Dokuz lokusun sekizi üç genom dizisi arasında değişken olduğu saptanıp her lokusta tekrarlanan birimlerin sayısını tanımlamak için PZR tabanlı bu yöntem geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarla analizin tür içinde ayrım gücü ile polimorfik lokuslar incelenerek izolatların takip edilebileceği düşüncesini ortaya koymaktadır (Bricker ve ark 2003).

MLVA, VNTR' ye dayalı olarak mikrobiyal izolatları alt tiplemek için kullanılan moleküler tiplendirme yöntemidir. VNTR analizi, yüksek oranda genetik

olarak benzerlik gösteren bakteri izolatları arasında bile çok fazla tekrar sayısı (allel) sergilemektedir. Seçilen gen bölgelerinin analizi ile belirlenen ardışık tekrar sayıları sayesinde bakteride mevcut olası varyasyonun tespiti gerçekleştirilmektedir. Analizde her bakteri için yeterince ayrım sağlayabilen VNTR lokusları seçilip primerler, her VNTR için ardışık tekrarın dışında tasarlanmaktadır (Whatmore ve ark 2006). Şekil 1.5; *Brucella* bakterisinin alt tür ve biyovarlarına ait dağılımları gösterilmektedir.



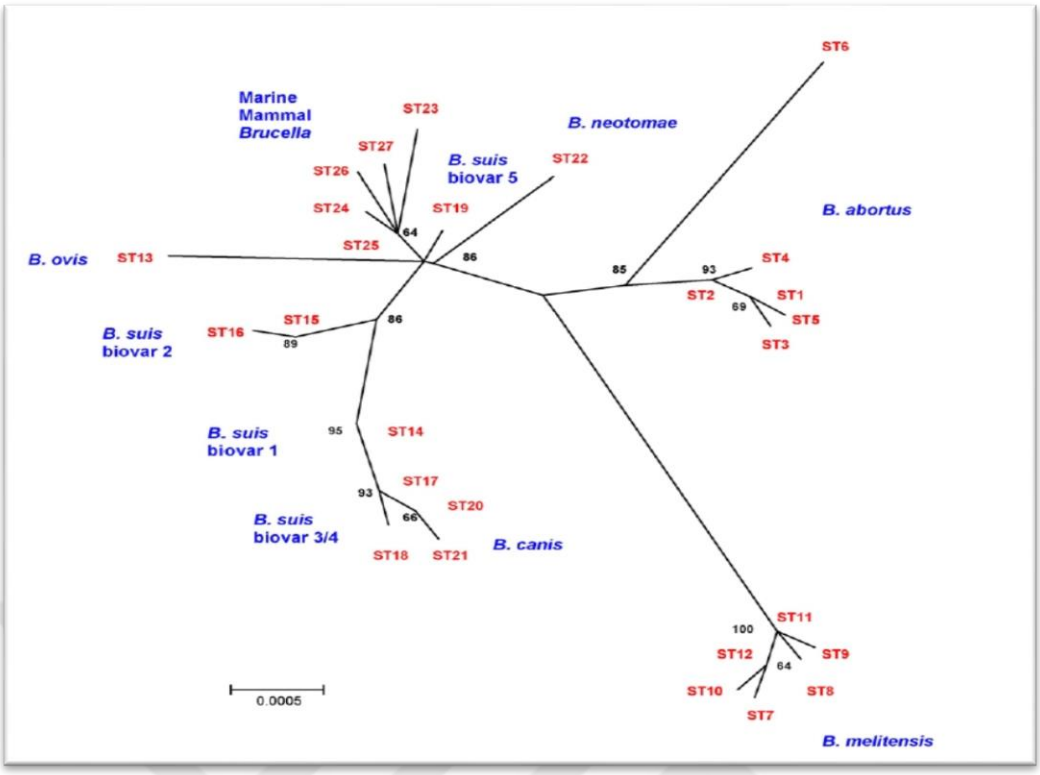
Şekil 1.5. *Brucella* farklı türlerinin biyovar dağılımları (Le Fleche ve ark 2006)

MLVA analizi nispeten daha ucuz olmasına ek olarak daha geniş veritabanına sahip olması gibi avantajları barındırmaktadır. Gelecekte, *Brucella* enfeksiyonları analizi için kesinlikle önemli bir epidemiyolojik araç olarak kalacaktır. Bu yöntemin güvenilirliği WGS-SNP tabanlı filogenetik analiz ile doğrulanmıştır (Sun ve ark 2017). MLVA'nın yeni çıkan hastalık vakalarının araştırılması, suş koleksiyonlarındaki izolatların profillerinin kalite kontrolü ve muhtemel yeni izolatların tanımlanması için yapılacak en uygun analiz olduğu kabul edilmektedir (Vergnaud ve ark 2018).

MLST, bakterilerin epidemiyolojisini incelemek için önemli bir metottur. Filogenetik çalışmalar için de sıklıkla kullanılmaktadır. Klasik haliyle Multilokus Sekans Tiplendirmesi, bakterideki varyasyona neredeyse uğramayan, değişmeyen gen bölgelerinin kısa fragmenlerinin dizilimini içermektedir (Whatmore 2009). Bakterilerdeki değişmeyen genlerde çok az polimorfik bölge olmasına rağmen,

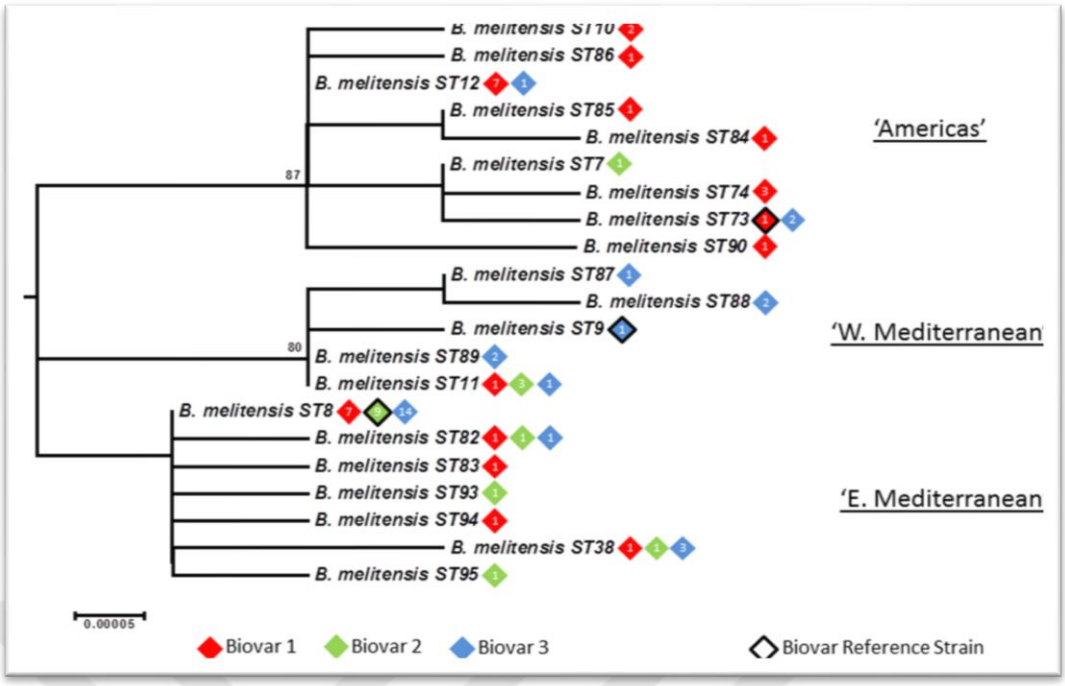
birden fazla değişmeyen genlerin birleşik dizilerinin kullanılması, uzun sürede gelişen varyasyonların izlenebilmesi ve yüksek ayrım gücü sağlamaktadır (Margos ve ark 2008). MLST metodunda yedi değişmeyen gen bölgesi (glyceraldehydes 3-phosphate) dhydrogenase (gap), 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transferase (aroA), glicokinase (glk), chaperone protein (dnaK), DNA gyrase B subunit (gyrB), anthranilate synthase (trpE) ve cobyric acid synthase (cobQ)), bir tane outer membrane proteini (omp25), bir tane upstream and extreme 5' of hypothetical protein (int-hyp) olmak üzere toplam 9 gen bölgesinden oluşmaktadır (Whatmore ve ark 2007). MLST ile, nokta mutasyonları dahi tespit edilebilmektedir. Bu nedenle, suşlar arasındaki toplam dizi benzerliğine bakılmaz. Bunun yerine, belirli bir lokus için her sekans, o lokus için önceden bilinen sekanslarla homojenlik açısından değerlendirilir. Dizi farklı ise, yeni bir allel olarak kabul edilir ve yeni bir allel numarası atanır. Dokuz gen bölgesinin çalışılması ile her bir suş dokuz allel numarasından oluşan bir profil ile karakterize edilir. Alellik profiller 9 karakterden oluşan set olarak düşünülebilir. MLST, genetik çeşitliliği ve ilişkileri değerlendirmek için bir genotipleme aracı olarak kullanılan metot olup bakteri çeşitliliğini ve epidemiyolojik karakterizasyonunu tanımlamak ve değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Cao ve ark 2018).

MLST analizinin yapıldığı çalışmada, o zamana ait bilinen tüm türlerin ve biyovarları içeren 160 adet *Brucella* izolatından dokuz farklı gen bölgesi incelenmiştir (Whatmore ve ark 2007). Genel olarak çalışma, *Brucella*'nın genetik homojenliğini, 160 izolatın tamamında polimorfik olduğu tespit edilen alanların sadece %1.5'i ile doğrulanmıştır. Bu konuyla ilgili ilk yapılan çalışmalara göre, 27 farklı Sequence Typing (ST) tanımlanmış olup ST'ler arasındaki ilişkiyi tanımlayabilmek adına filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Şekil 1.6). Bu, daha önce karakterize edilen dört klasik *Brucella* türü, *B. abortus, B. melitensis, B. ovis* ve *B. neotomae*'nin iyi ayrılmış kümelere karşılık geldiğini göstermektedir. *B. suis*, biyovar 5 hariç, farklı ST'ye sahip diğer dört biyovar aynı küme içerisinde yeralmaktadır. *B. canis* ve *B. suis* biyovar 3 ve 4 izolatları yakından ilişkili olsa da bunlardan ayırt edilebilir. Deniz memelisi izolatları oldukça zayıf desteklenmiş olmakla birlikte belirgin bir kümelenmeyi temsil etmiştir. *B. abortus* ve *B. melitensis*'in klasik biyovarları içinde ve arasındaki genetik ilişkileri belirlemek için yeterli sayıda örnek ile sonraki çalışmalarında elde edilen veriler rapor edilmiştir (Whatmore 2009).



Şekil 1.6. Multilocus Sequene Typing ile türlerin dağılımı (Whatmore ve ark 2007)

MLVA ile ilgili Le Fleche ve ark (2006), çalışmasında belirttiği ardından MLST ile ilgili Whatmore ve ark (2016), çalışmasında da teyit edildiği üzere, *B. melitensis* izolatlarında yapılan biyovar düzeyi değerlendirmelerde epidemiyolojik olarak sınırlı değere sahip olduğu biyovar ayrımını tam olarak gerçekleştiremediği görülmektedir. MLVA veya MLST ile epidemiyolojik açıdan izolatların genotipik profillerinin veritabanında yer alan izolatların verileri karşılaştırılmasında buna yönelik kullanılan özel programlar bulunmaktadır (Vergnaud ve ark 2018). Yapılan MLST analizinde tespit edilen ST değerleri ile MLVA8'e göre yapılan coğrafik orijinler karşılaştırıldığında ST8'in doğu Akdeniz grubu içerisinde olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda Rev-1 aşı suşu ST 7 olarak saptanmış ve MLVA8'e göre yapılan coğrafik orijinler karşılaştırıldığında ST7 genotipinin Amerika grubu içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Whatmore ve ark 2016) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. *Brucella melitensis* biyovarların Multilocus Sequence Typing analizindeki Sequence Typing değerleri ve coğrafik ilişkisi (Whatmore ve ark 2016)

Hem MLST hem de MLVA analizleri, *Brucella* türleri ve biyovarlarının genetik çeşitliliği ve moleküler epidemiyolojisini araştırmak için değerli tamamlayıcı araçlardır. *Brucella* türlerini tanımlamaya yönelik kabul edilen katkılarına ek olarak, her ikisi de biyovar seviyesinin altında bir coğrafi köken veya belirli bir konağı temsil eden bir suş seviyesine kadar ayrım yapabilmektedir (Vergnaud ve ark 2018).

1.7.2. İndirekt Tanı Yöntemleri

Serolojik Tanı Yöntemleri

Brusellozun bakteriyolojik tanısı için sınırlı bir besi yeri ve protokol seçeneği olmasına karşın çok fazla miktarda serolojik test bulunmaktadır (Alton ve ark 1988, de Miguel ve ark 2011). Büyük baş hayvanlarda *B. abortus* enfeksiyonu için kullanılan serolojik testlerin küçükbaş hayvanlarda *B. melitensis* enfeksiyonu tanısı için de yeterli olduğu varsayılmaktadır. Buna göre, Rose Bengal Plate Test (RBPT) ve Komplement Fikzasyon Test (CFT) ruminantlarda Brusellozun serolojik tanısı için en yaygın kullanılan testlerdir (Garin- Bastuji ve ark 2006). Kandan elde edilen serum için en sık kullanılan testler arasında RBPT, Serum Aglütinasyon Test (SAT), CFT, İndirekt Enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) ve competatif (cELISA) -ELISA, Floresan Polarizasyon Deneyi (FPA) ve lateral akış

immünokromatografi testleri bulunmaktadır. Bu testler sero-epidemiyolojik araştırmaların yanısıra hastalığı izlemek için de kullanılabilirler. RBPT taramasının ardından RBPT-pozitiflerin CFT testine tabi tutulması ve değerlendirilmesi, hastalığı eradikasyonu için mücadele veren ülkelerce yaygın olarak kullanılmaktadır (Ducrotoy ve ark. 2015).

Kültür ve PZR analizlerinin maliyeti ve düşük bireysel duyarlılığı nedeniyle ve hastalığın eradikasyonu için büyük ölçekli sürülerde söz konusu testlerden ziyade Bruselloz hastalığı için serolojik testlerin kullanımı daha pratik bir yaklaşımdır. Ancak, uygun bir etkinlik ve güvenilirlik için yeterli sayıda testler kullanılmalıdır. Dikkat edilmesi gereken konu, serolojik testlerin spesifite sorunudur, çünkü *Brucella* epitoplarına karşı gelişen antikorlar bazı Gram-negatif bakterileri (Yersinia enterocolitica O:9) ile çapraz reaksiyonlar verebilmektedir. Aynı zamanda seroloji temelli analizlerin biri ile teşhis yapmak doğru bir yaklaşım olmadığı için en az iki analiz yapılması zorunludur. Brusellozun ortadan kaldırılması için aşı, test ve kesim programlarının birlikte kullanımı gerekmektedir (Garin-Bastuji ve ark 2006).

Brusellozun kontrolü için tamponlanmış *Brucella* antijen testleri (Buffered *Brucella* antigen tests) (BBAT) *B. abortus* S99 veya S1119-3 adı verilen suşlardan hazırlanmaktadır. RBPT' de Rose Bengal boyası ve BPAT'de kristal viole ve brillant yeşili boylarının karışımları ile suşlar karıştırılıp, pH'sı 3,65 olan tampon solüsyonlarıdır. Bu testler oldukça yüksek sensitiviteye sahiptirler. Bu nedenle pozitif reaksiyonları tamamlayıcı testler ile birlikte kullanılmalıdırlar. Nadiren yanlış negatif sonuçlarda olabilmektedir. Bu testler, enfekte sürüleri tespit etmek için tarama testi olarak veya brusellozdan ari sürüleri izlemek amacıyla yeterli görünmektedir (OIE 2016).

CFT yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak testi uygulamak karmaşıktır ve kullanılan solüsyonların doğru şekilde titrasyonu ve hazır halde tutulması için laboratuvar alt yapısı ve yeterince eğitimli personel gerektirmektedir. CFT en yaygın kullanılan doğrulama testidir (OIE 2016). CFT, enfeksiyon ile Rev-1 aşısı arasında tam olarak ayrım yapmaz (Garin-Bastuji ve ark 2006).

I-ELISA, çok geniş kullanım alanı mevcut olan test, doğrulanmış antijen olarak tüm hücre, S-LPS veya OPS kullanılarak hazırlanan çeşitli ticari I-ELISA kitleri mevcut bulunmakdır. Antijen olarak S-LPS veya OPS kullanan I-ELISA'lar,

sığırlarda, koyun, keçi ve domuzlarda anti-Brucella antikorlarının tespiti için oldukça yüksek sensitiviteye sahiptirler. Ancak *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev-1 aşılarından kaynaklanan antikorları ayırt edemezler. Yanlış pozitiflikler, domuz rough *Brucella* suşlarından hazırlanan I-ELISA'lar ile azaltılabilir ancak tam olarak çözülemeyebilir. Pozitif reaksiyonlar, RBPT ve CFT testleri kullanılarak da doğrulanmalıdır (OIE 2016).

c-ELISA, antijen olarak S-LPS veya OPS kullanılarak hazırlanan çeşitli c-ELISA kitleri mevcuttur. Bu testlerin validasyonlarının OIE standardında tarif edildiği gibi yapılmış olması önerilmektedir. c-ELISA, her zaman olmamakla birlikte sığır, koyun ve domuzlarda RBPT veya I-ELISA'dan daha yüksek spesifiteye ancak daha düşük sensitiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (OIE 2016). Tüm bu ELISA testleri hem RBT hem de CFT açısından sensitivite ve spesifite açısından potansiyel avantajlara sahiptir, ancak bunların büyük ölçekte tanısal etkinlikleri bilinmemektedir ve hala çok sayıda standartlaştırma çalışması gerekmektedir (Garin-Bastuji ve Blasco 2004, Garin- Bastuji ve ark 2006).

FPA, antijen-antikor etkileşimini tespit etmek için kullanılan basit bir tekniktir. Çok hızlı sonuç verir. OIE tarafından sığır Brusellozu tanısı için kabul edilen bu test şu anda koyun ve keçilerdeki sonuçların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (McGiven ve ark 2003, Collective 2004, Garin- Bastuji ve ark 2006). Diğer serolojik testlerden farklı olarak, antijeni eklemeden önce her numune için bir boş numune ile okunması gerekmektedir. Bu nedenle, iki aşamadan oluşmaktadır. Antijen olarak *B. abortus* 1119-3 suşunun S-LPS tabakasında küçük moleküller kullanılmıştır. FPA'nın sığır brusellozundaki sensitivite ve spesifitesi, c-ELISA testindekine yakındır. FPA, aşılama sonucu oluşan antikora bağlı reaksiyonları azaltabilir ancak tamamen ortadan kaldıramaz. Pozitif reaksiyonlar diğer serolojik testlerde olduğu gibi doğrulayıcı metodlar kullanılarak araştırılmalıdır (OIE 2016).

SAT, sığır brusellozunun kontrol ve surveyans programları için Kuzey Avrupa'da uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kullanılan antijene Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) ilavesiyle spesifitesi önemli ölçüde artırılır. Antijen, fenol içeren fizyolojik tuzlu su (FFTS) içinde *B. abortus* 99 veya *B. abortus* 1119-3 suşlarının süspanse edilmesi ile hazırlanır. Bir serumdaki *Brucella* aglütinasyon

derecesi, ml başına İnternasyonel Ünite (IU) cinsinden ifade edilmelidir. Pozitifiliğin değerlendirilmesinde, 30 veya daha fazla IU içeren bir serum pozitif olarak kabul edilir (OIE 2016).

Native hapten (NH) ve sitosol (cytosol) protein tabanlı testler, sığırlarda, *B. abortus* S19 aşılama sonrası kullanımlarda spesifitesi oldukça yüksektir ve bir tarama testi olarak RBPT ile kombinasyonu başarıyla kullanılabilmektedir. Testin sensitivitesi CFT testine yakın ancak RBPT ve I-ELISA testlerinden düşüktür. Test ters dairesel immunodiffüzyon (RDI) (Reverse Radial İmmunodiffusion) ile çalışılmaktadır. NH testi ile 3-5 aylık buzağılar deri altı *B. abortus* S-19 aşısı ile aşılamadan 2 ay sonra tespit edilemezler. Ancak yetişkin sığırlar azaltılmış doz *B. abortus* S-19 aşılamasından 4-5 ay sonra tespit edilebilmektedirler. Konjoktival aşı ile aşılanan sığırlardan NH testi ile negatif sonuç alma süresi daha da kısalmıştır. Sığırlarda *Yersinia enterocolitica* O: 9 ve kaynağı bilinmeyen yanlış pozitif serolojik reaksiyonların, NH testi ile genellikle negatif sonuçlar verdikleri bildirilmiştir (Munoz ve ark 2005). Bununla birlikte, NH ile RDI testi, aşılamadan belirli bir zaman sonra, aşılanmış koyunlardan enfekte olan *B. melitensis*'in bağışıklık tepkilerini ayırt edebildiği bildirilmektedir (Marin ve ark 1999, Garin- Bastuji ve ark 2006). Koyun ve keçiler için çift jel difüzyon veya RID testlerinde optimal tanısal sensitiviteleri yaklaşık %90 olarak bildirilmiştir (OIE 2016).

Süt testleri, süt tanklarından sütün test edilmesi ile sütçü sürülerin taranması etkili bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Test sonucu pozitif olması durumunda, tanktaki süte katkıda bulunan tüm inekler için kan testi gerekmektedir. Süt I-ELISA ve Süt Halka Test (Milk Ring Test) (MRT)'leri olmak üzere iki farklı test bulunmaktadır. Süt I-ELISA sensitivitesi ve spesifitesi yüksek bir testtir. Özellikle büyük sürüleri kontrol etmek için çok önemli bir testtir (Perez-Sancho ve ark 2015). Yanlış pozitif serolojik reaksiyonlar kan testlerine oranla daha az sıklıkla süt I-ELISA'da gözlemlenebilmektedir. Koyun veya keçi sütündeki anti-*Brucella* antikorlarının teşhisi için kulanılacak I-ELISA sığırlar için kullanılan testin aynısıdır. MRT, süt I-ELISA mevcut değilse uygun bir alternatiftir. Sığır sürülerindeki brusellozu taramak için kullanılırlar. Küçükbaş hayvanlardan elde edilen süt için uygun değildir. Testin güvenilirliği 100 baş inekten fazla olan büyük sürülerde azalmaktadır. Sürüdeki hayvanlar 150 baştan az ise tanktan 1 ml, 150-450 baş arasındaki sürülerden 2 ml, 451-700 baş arası sürülerden 3 ml süt örneği kullanarak

test gerçekleştirilmelidir. Testten 4 ay önce aşılanan sığırlarda, kolostrum alınan veya mastitis olan hayvanlarda yalancı pozitif reaksiyonlar meydana gelebilmektedir (OIE 2016).

Enzimatik Hızılı İmmunofiltrasyon Testi (ERİFA) (Enzymatic rapid immunofiltration assay), tavuklarda *Mycoplasma gallisepticum* enfeksiyonunun teşhisi için kullanılan model Bruselloz teşhisi için hazırlanan ile aynıdır. Model, ayrı bir plastik kaset içinde bulunan büyük gözenekli nitroselüloz (NC) membran ile hazırlanmaktadır. NC membran, test sırasında kullanılan tüm reaktifleri yakalamak için ünitelere sabitlenen yüksek kapasiteli emici bir ped yardımı kullanılmaktadır. Serum numuneleri hazırlanan kimyasal reaktifler ile muamale edilip memrandan geçirilirler. Bir dakika inkübasyon sonrası renk gelişimine göre sonuçlar yoğunlukları ve görselleştirme sürelerine göre değerlendirilmektedir (Genc ve ark 2011).

1.7.3. Hücresel Bağışıklık Testleri

Brusellin (Brucellin) deri testi, saflaştırılmış ve standartlaştırılmış bir antijen preparatı kullanılması ile aşılanmış sürülerin taranmasında alternatif bir teşhis metodudur (OIE 2016). Brusellin ticari olarak temin edilebilen bir preparat olup, rough bir *B. melitensis* suşundan hazırlanmaktadır (Garin- Bastuji ve ark 2006). Brusellin deri testi yüksek bir spesifiteye sahiptir ve aşılama yapılmadığında en spesifik tanı testlerinden biri olarak kabul edilir (Alton ve ark 1988, Garin- Bastuji ve ark 2006, OIE 2016). Saha çalışmaları *Brucella* ile enfekte domuzlarda spesifitesinin oldukça iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bu test ile çapraz reaksiyona giren bakteri enfeksiyona bağlı yanlış pozitif serolojik reaksiyonların yorumlanmasına yardımcı olabilir, çünkü çapraz reaksiyon veren bakteri enfeksiyonları her zaman deri testinde negatif sonuç verir (Dieste-Pérez ve ark 2014, OIE 2016). Ülkemizde Konya bölgesinde bir çalışmada, koyun ve keçi Brusellozis'inin sürü bazında taramalarında deri testlerinin kolay, kısa sürede değerlendirilmesi ve pratik uygulanışı sayesinde aşılanmış veya enfeksiyon şüpheli hayvanları, sağlıklı hayvanlardan ayırmak için kullanılabileceği ve allerjik deri testlerinin eradikasyon programlarına da dahil edilmesinin faydalı olabileceği paylaşılmıştır (Kaya 1992). Kars bölgesinde sığır Brusellozu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada da mukoid *B. abortus* suşlarından hazırlanan allerjenlerin rough suşlardan hazırlananlara kıyasla kronik Brusellozis'in tespitinde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Aslantaş 2006). Yüksek sensitiviteye

rağmen, enfekte olmuş tüm hayvanlar deri testi ile pozitif sonuç vermeyebilir. Ayrıca Rev-1 ile aşılanmış hayvanlar bu testte yıllarca reaksiyon gösterebilir. Bu nedenle, bu test tek tanı testi olarak veya uluslararası ticaret amacında kullanımı önerilmemektedir. Sığır tüberkülozunda iyi bilinen tekrarlanan deri testi ile gelişen anerji, Brusellozda mutlak değildir. Ayrıca olumlu bir deri testini takip eden 24 gün içinde yanıtların azaldığı bildirilmektedir (Garin- Bastuji ve ark 2006).

İnterferon gama salınım testi (IFN-γ), tam kandaki lenfositlerin brusellin gibi uygun bir antijen ile uyarılması esasına dayanmaktadır. Oluşan IFN-γ üretiminin tespiti Capture ELISA ile yapılmaktadır. Bu test ile brusellozun yanlış pozitif serolojik reaksiyonlarının ayırt edilmesinde faydalı olmasına rağmen, daha spesifik antijenlere hala ihtiyaç duyulmaktadır. Protokolün farklı hayvan türleri ve epidemiyolojik koşullarda standartlaştırılması ve uygun şekilde doğrulanmalarının yapılması gerekmektedir. Bu test için şu anda doğrulanmış bir protokol bulunmamaktadır (OIE 2016).

1.8. Tedavi

Brucella hastalığı, ‘’ İhbari Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine İlişkin Yönetmeliği’’nin içerisinde ihbari mecburi hayvan hastalıkları kısmında Sığır Brusellozu ve Koyun-Keçi Brusellozu olarak belirtilmiştir (İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine İliskin Yönetmelik 2011). Brusella mücadele yönetmeliğinde sığır, koyun, keçi gibi hayvanlarda Bruselloz hastalığının varlığı ya da şüphe edilmesi durumunda derhal yetkili birimlere bildirilme zorunluluğu olduğu açıklanmıştır. Ayrıca söz konusu yönetmelikte yine sığır, koyun ve keçi cinsi hayvanların hastalık tedavilerinin yasak olduğu da bildirilmiştir (Bruselloz ile Mücadele Yönetmeligi 2009). *Brucella*'nın hücre içine yerleşebilen bakteri olması ve çevresel koşullara adapte olabilmesi nedeniyle, tedavi başarısızlığı ve nüks oranları yüksektir ve tedavi başarısı doğru ilaç kombinasyonuna ve hastanın uyumuna bağlıdır. (Yang ve ark 2013, Glowacka ve ark 2018).

Bruselloz, insanlarda nadiren ölüme yol açan ve çeşitli terapötik stratejilere iyi yanıt veren bir hastalıktır (Solis ve ark 2015). Bruselloza karşı başarılı bir tedavi uygulamak için, makrofajlara nüfuz eden ve asidik ortamda aktif olan antibiyotikler gereklidir (Ranjbar 2015). Bununla birlikte, tek antibiyotik tedavisi, hastalığın nüksetmesine yol açtığı için Brusellozda yetersizdir (Pappas ve ark 2006b). Benzer

şekilde, oksetetrasiklin, rifampin veya doksisiklin gibi tek bir ajanla yapılan tedavi, yüksek oranda nükslere (%9-25) neden olur ve tedavinin uzaması ile tatmin edici etkiler gözlenememektedir. Trimetoprim-sülfametoksazol veya siprofloksasin ile tedavi, vakaların sırasıyla %30 ve %83'ünde nüks ile sonuçlandığı bildirilmektedir (Ranjbar 2015). Tedavi, hastalığın nüksetmesini, artrit, spondilit, sakroileit vb. komplikasyonları önleyerek semptomların hızla giderilmesini sağlamaktır. *Brucella* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde iki antibiyotiğin kombinasyonu tek antibiyotik uygulamalarından daha etkili oldukları belirtilmiştir. DSÖ 1986' da altı hafta boyunca rifampisin ile doksisiklin tedavisi önermiş olup, daha sonra bunun yerini streptomisin ile birlikte tetrasiklin tedavi prosedürü almıştır. Günümüzde, fluorokinolonlar veya rifampisin, doksisiklin-streptomisin ve doksisiklin-rifampisin ile birlikte trimoksazol gibi diğer antibiyotiklerin kombinasyonları kullanılmaktadır (Skalsky ve ark. 2008, Glowacka ve ark 2018).

Brusellozun streptomisin ve doksisiklin (SD) ile tedavisi sırasında, sırasıyla %7.4 ve %4.8'de tedavi başarısızlığı ve nüks oranları kaydedilmiştir. Doksisiklin ve rifampin (DR) veya streptomisin ile tetrasiklin (ST) ile tedavi sırasında neredeyse benzer tedavi sonuçları gözlemlenmiştir; bununla birlikte nüksetme oranları SD tedavisinde daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Brusellozun başka ikili kombinasyonları olduğu bilinmektedir. Örneğin doksisiklin ve gentamisin (DG) ve çocuklarda kullanılan kortimoksazol ve rifampisin antibiyotikleridir. Doksisiklin, kotrimoksazol, rifampisin ile siprofloksasin veya ofloksasin ile tedavinin, nüks oranı ortalama %11,4 ve başarısızlık oranı %12,2 olarak bildirilmiştir (Alavi ve Alavi 2013, Glowacka ve ark 2018).

Doksisiklin, rifampisin ve aminoglikosit ile üçlü ilaç tedavisi kullanılan üç klinik çalışma yapılmıştır. Üçlü ilaç tedavisinin üstünlüğüne ilişkin olarak iki ilaçlı tedaviye kıyasla açık bir kanıt yoktur. Bununla birlikte, üçlü ilaç tedavisinin nüksleri önlemede daha etkili olduğu, ancak kısa süreli tedavide ikili ilaç tedavisinden daha az başarılı olduğu görülmektedir (Solis ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada iki ilaç tedavisinden daha düşük tedavi başarısızlık oranları nedeniyle karmaşık vakalarda (spondilit veya artritli) sekiz hafta boyunca üçlü tedavi önerilmektedir. Komplike olmayan kronik veya akut vakalarda ve endokardit, spondilit, artrit olmayan karmaşık vakalarda doksisiklin ve aminoglikozit tedavisi önerilmektedir. Komplike

olmayan vakalarda streptomisin ve doksisiklin veya gentamisin de savunulmaktadır (Alavi ve Alavi, 2013, Glowacka ve ark 2018).

Brusellozu tedavi etmek için yeni stratejiler geliştirildiği bilinmektedir. *Brucella* vakuollerinin endoplazmik retikulum (ER) ile bağlantısı, ER yapısının modifikasyonunun konakçıda stres yanıtı sırasında ER'nin yeniden modellenmesi ile sağlanabileceği belirtilmiştir. Tauroursodeoksikolik asit vasıtasıyla konakçının protein cevabının bozulması ve *Brucella* spp. nükslerinin engellenebileceği paylaşılmıştır. Konakçının protein cevabı Brusellozda yeni hedef olarak seçilip çalışmaların yapılabileceği paylaşılmaktadır (Smith ve ark. 2013, Glowacka ve ark 2018).

Brusellozla mücadelesinde ginseng saponin fraksiyonu A'nın (RGSF-A) etkisinin araştırılması ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada bakteriyel enfeksiyonun ortadan kaldırılması için RGSF-A'nın etkisini incelemiştir. RGSF-A, Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinazların (MAPK) düzenlenmesinde yer alır ve bu nedenle F-aktinin polimerizasyonunu sınırlar ve hücrelere bakteriyel nüfuzu engeller. RGSF-A, *B. abortus*'un hücre içi iletişimini de etkiler ve *B. abortus* içeren fagosomların (BCP) LAMP-1 ile etkileşimini destekler. LAMP-1, lizozomların fagosomlarla hücreye girmesinden sorumlu olan, BCP'lerin lizozom ile bağlanmasını ve bakterilerin yok edilmesini sağlayan transmembran proteinidir (Arayan ve ark 2015, Reyes ve ark 2016, Huy ve ark 2017). RGSF-A'nın ginsenosid Rg3- panaxadiol saponin bileşenlerinin Brusellozu kontrol eden ana faktör olduğunu kanıtlamıştır. Kuşkusuz, biyoaktif maddeleri (flavonlar, flavonoidler, antosiyaninler ve taninler) önleyen veya hatta Brusellozla savaşmada etkili olabilecek diğer umut verici bitkisel bitkiler Teucrium polium, Scophularia deserti, Alhagi, Okaliptüs, sarımsak ve kızamık kökleri de vardır (Naghadi ve ark 2016, Huy ve ark 2017, Glowacka ve ark 2018).

1.9. Koruma ve Kontrol

Dünyada hastalığın hayvanlarda ve insanlarda yaygınlığı ve ekonomik etkileri göz önünde bulundurularak kontrol programları hazırlanmıştır. Hayvan Brusellozunun kontrol ve eradikasyonuna yönelik olarak hazırlanan programlar test ve kesim, sanitasyon ve aşılamayı içermektedir (Olsen ve Stoffregen 2005, Erganiş 2010).

DSÖ tarafından hayvan Brusellozunu eradike etmek için hazırlanan Akdeniz Zoonoz Kontrol Programında önerilen genel stratejiler şunlardır: Hayvanlar arasında yayılmanın önlenmesi, Brusellozdan ari sürü ve bölgelerin izlenmesi, ari sürü ve bölgeleri oluşturmak için enfekte hayvanların itlafı ve aşılanmasıdır (WHO 1998). Bruselloza karşı hijyen tedbirleri, enfekte olmuş hayvan veya kontamine ortamlarda bakteri ile temas olasılığının azaltılması yönünde çalışmalar tedbirler olarak sayılabilir (Perez-Sancho ve ark 2015).

Her ülke için en uygun kontrol stratejisinin seçimi, hayvancılık uygulamaları, hastalığın epidemiyolojik modeli gibi çeşitli faktörlerle birlikte veterinerlik hizmetlerinin altyapısı ve finansmanına, hayvancılık ekonomisinin değerine ve ulusal düzeydeki yürütülen politikalara bağlıdır. FAO, Bruselloz hastalığının azaltma ve halk sağlığının korumasına yönelik yürütülmesi gereken stratejileri dört ana kolda belirtmiştir; 1-) Hastalığın durumununu bilinmediği ve kontrol programlarının olmadığı durumlarda, hastlık durumunun daha iyi anlamak gerekir. Bunun için temel anket ve epidemiyolojik araştırmaların gerçekleştirilmesi ve uygun kontrol stratejisi ve eylem planı geliştirilmesi gerekir. 2-) Hastalığın durumunun bilindiği ve kontrol programının devam ettiği durumlarda, hastalık oranı düşer. Kontrol programı uygulamaya devam ederek kalite ve ilerleme durumları izlenmeli ayrıca halk ve hayvan sağlığı arasındaki iş birliğinin artması gerekmektedir. 3-) Hastalığın çiftlik hayvanlarında düşük seviyelerde olduğu durumlarda, Hastalığın insan ve çiftlik hayvanlarında etkisi azalır. Bunun için uygulanan stratejileri revize etmek için risk analizi yapılır ve sonrasında o plan uygulanır ve izleme ve gözetim geliştirilir. 4-) Çiftlik hayvanlarında ve insanlarda hiç Bruselloz olmadığı durumlarda, aşılı ya da aşısız Bruselloz-arilik beyan edilir. Olası tüm şüpheli Bruselloz vakalarını araştırılır ve temizlenir. Hastalıksız durumu izleyerek, sürdürme yoluna gidilir (FAO 2014).

Hastalık durumunun bilinmediği ve kontrol stratejisinin olmadığı durumlarda ciddi serosurvey çalışması gerekir. Çıkan sero-prevalans sonucuna göre stratejiler belirlenir. Buna göre genel kaide sero-prevalans yüksekse kitle aşılması en uygun strateji olarak kabul edilmektedir. Çıkan sero-survey sonuçları %5'ten yüksekse sadece kitle aşılama, %5ten az ise damızlıkların aşılanması, %1 altı ise test ve kesim stratejisi uygulamak uygundur. Sero-prevalansın kitle aşılamayla hastalık oranının düşürülerek test ve kesim yapılabilecek seviyelere getirmek en uygun stratejidir. Ülkemizdede 2011'de tamamlanan serosurvey çalışmasında sığırlarda sürü

prevelansı %7,8 koyunlarda sürü prevalansı %22,5 olması nedeniyle kitle aşılama ile mücadele yöntemi strateji olarak seçilmiştir (Garin-Bastuji ve ark 2006, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü 2012).

Epidemiyolojik olarak hastalığın girişini önlemek için uygun biyogüvenlik önlemlerinin kullanılması kritik öneme sahiptir. Bu önlemler, yeni hayvanların sürüye dâhil edilmeden önce karantinada bekletilmesini, şüpheli hayvanların ayrılmasını, hayvan hareketlerinin kontrolünü, gebe dişilerin doğumdan önce izolasyonunu ve hastalık etkeni içermeyen sperma kullanımını içerir. Vahşi hayvanların enfeksiyon kaynağı olarak görüldüğü ortamlarda, hayvan ve yaban hayatı arasındaki temastan kaçınılması veya teması sınırlandırmak, hastalıktan korunma açısından oldukça önemlidir (Alton 1990, Adone ve Pasquali 2013, Rhyan ve ark 2013, Kreizinger ve ark 2014, Perez-Sancho ve ark 2015).

Göçebelik, ortak meraların kullanılması gibi bazı yönetim uygulamaları, bakteri kontaminasyonuna sebep olurken, kontrol stratejilerini de olumsuz etkiler (Reviriego ve ark 2000, Robinson 2003, Perez-Sancho ve ark 2015).

Gelişmiş ülkelerde, kırk yılı aşkın bir süredir, hayvancılıktaki Brusellozun kontrol ve eradikasyon programları ulusal veterinerlik hizmetleri tarafından uygulanmaktadır. Klasik olarak, enfeksiyonun zorunlu aşılama ile kontrol edildiği ilk aşamadan sonra, aşılama kademeli olarak kısıtlanır ve enfeksiyonu ortadan kaldırmak için "test ve kesim" politikası uygulanır (Garin-Bastuji ve ark 2006). Bu politikayı tamamlamak için genellikle on yıldan fazla bir süreye ihtiyaç vardır. Ayrıca politikanın başarılı olarak uygulanabilmesinin enfekte hayvanlara tazminat uygulaması ile mümkün olabileceği bildirilmektedir. Avrupa Birliği (AB), bu tür ulusal programları üye ülkeler nezdinde desteklemektedir. Bu politika AB' nin kuzeyinde büyükbaş hayvanların yanı sıra koyun ve keçi Brusellozu için başarılı bir şekilde uygulanırken, AB'nin güneyinde bazı eradikasyon programları, özellikle de koyun ve keçi Bruselloz eradikasyon programları henüz tamamlanmamıştır (Godfroid ve ark 2013).

İnsan Brusellozunun yayılmasını önlemek için en etkili strateji, süt ürünlerinin pastörizasyonunun yanı sıra, sığır, koyun ve keçilerin aşılanması yoluyla dolaylı olarak gerçekleşmektedir. Brusellozu kontrol altına almak için etkili aşılar olmasına rağmen, hastalık dünyadaki çoğu ülkede ortadan kaldırılamamıştır

(Dorneles ve ark 2015). Mevcut aşılar, serolojik testlerde pozitif reaksiyon verdiğinden aşı, hastalık ayrımı yapılamamaktadır (Olsen ve Stoffregen 2005, Dorneles ve ark 2015). Ölü aşıların koruyuculuğu bulunmamakta, tüm dünyada aşılama canlı aşılar ile gerçekleştirilmektedir (Erganiş 2015). Aşılama programları çoğunlukla dişilere odaklanır çünkü bazı aşıların erkek üreme sistemine zarar verebileceği öne sürülmüştür (Avila-Calderon ve ark 2013).

Aşılama, endemik bölgelerde Brusellozun kontrolü için muhtemelen en ekonomik önlemdir. Şu anda aşılama programları, esas olarak *B. melitensis* ve *B. abortus'a* bağlı Brusellozun kontrolüne yönelik uygulanmaktadır (Oliveira ve ark 2011, Marzetti ve ark 2013).

1.9.1. İdeal *Brucella* Aşısı

Enfekte hayvanları tespit etmek için tanı testlerinde karışıklık oluşturabilecek antikorların üretimini tetiklememeli, güçlü bir Th1 tipi yanıt oluşturabilen canlı bakteri içermeli, hayvanda hastalığa veya kalıcı enfeksiyona neden olmayan zayıflatılmış bir suş içermeli, insanlar için patojenik olmamalı, gebe dişilere uygulandığında abortlara neden olmadan tek bir dozla uzun süreli koruma sağlayabilmeli, serolojik testlerde karışıklığa sebep olmamalı, stabil olup in vivo veya in vitro şartlarda virülan durumuna geri dönmemeli, uygulaması ekonomik, üretilmesi ve yönetilmesi kolay olmalıdır (Schuring ve ark 2002, Ko ve Splitter 2003, Nicoletti 2010, Dorneles ve ark 2015).

Şu anda kullanılan aşıların çoğu, *B. abortus* ve *B. melitensis* neden olduğu hastalığı önlemeyi amaçlamaktadır (Olsen ve Stoffregen 2005, Pandey ve ark 2016). *B. suis*, *B. ovis* ve *B. canis* için aşı suşları, deneysel olarak geliştirilmiştir (Lopez-Santiago ve ark 2019). Kas içi veya deri altı yolla aşılama, hayvancılıkta en sık kullanılan yöntemdir, ancak intra konjunktival uygulamanın daha iyi sonuç verdiği paylaşılmaktadır (Olsen ve Stoffregen 2005). Sığırlarda *B. abortus* enfeksiyonunun kontrolü için: *B. abortus* 45/20, *B. abortus* suşu 19 (S19) ve *B. abortus* RB51 olmak üzere 3 canlı attenüe aşı tavsiye edilmektedir (Schuring ve ark 2002, Moriyon ve ark 2004).

Brucella abortus S-19

B. abortus türü ilk olarak 1923'te sütten izole edilmiştir. Oda sıcaklığında bir yıl tutulduktan sonra yanlışlıkla zayıflatılmıştır. *B. abortus* S-19 ismiyle sığırlarda aşı

olarak kullanımı 1941'de başlamıştır (Schuring ve ark 1991, Scguring ve ark 2002, Olsen ve Stoffregen 2005). S19 suşu, erkek yetişkinlerde epididimitise neden olduğu ve gebe dişilerde abortla ilişkili olduğu için buzağılarda uygulanması tercih edilir (He ve ark 2001). *B. abortus* S19 ile aşılanan hayvanlar, suş smooth olduğundan LPS'ye karşı antikorlar geliştirir. Bu nedenle, bu suş ile aşılanmış hayvanlar ile doğal olarak enfekte hayvanlar arasında ayrım yapmak serolojik testler ile mümkün değildir. Uygulaması SC ve konjuktival olarak gerçekleştirilmektedir. Ayrıca *B. abortus* S-19 aşı suşu insanları enfekte edebilir (Olsen ve Stoffregen 2005, Dorneles ve ark 2015, Simpson ve ark 2018). Son zamanlarda bağışıklık tepkisinin sığır ırkları arasında farklı olduğu tespit edilmiştir (Kumar ve ark 2019).

***Brucella abortus* 45/20**

B. abortus 45/20 suşu, 1922'de enfekte bir inekten elde edilen smooth suş izolasyonundan türetilmiştir. Suş 45 kobaya uygulandıktan sonra elde edilmiştir ve 20 pasajdan sonra rough faz izole edilmiştir; bu nedenle suş 45/20 olarak adlandırılmıştır. Bu suş, bir adjuvan ile birlikte ısıtılarak inaktive edilerek uygulanmaktadır. Virülan smooth formuna geri dönebilir, bu nedenle aşı olarak uygulanmadan önce inaktive edilmesi gerekir (Scguring ve ark 2002, Moriyon ve ark 2004, Olsen ve Stoffregen 2005). Maalesef, koruma ve antikor yanıt deneyleri, aşının etkinliği ile ilgili değişkenlik göstermiştir. Ek olarak, bazı hayvanlarda aşının enjeksiyon bölgesinde aşırı duyarlılık reaksiyonları gözlemlenmiştir. Bu problemler nedeniyle bu türün aşı olarak kullanılmaması gerektiği düşünülmektedir (Dorneles ve ark 2015).

***Brucella abortus* RB51**

B abortus RB51 suşu, virülan smooth *B abortus* 2308 suşunun rifampisin veya penisilin içeren bir kültür ortamında arka arkaya pasajlamaları sonucunda elde edilmiştir. RB51 suşu, rough bir fenotip gösterir ve LPS O-zincirinden yoksundur. Oldukça stabildir ve patojen smooth fenotipe geri dönmez (Schuring ve ark 1991). O-zincirinin yokluğu, aşıdan kaynaklanan antikor oluşumuna izin vermez. Böylece serolojik testlerde aşı ya da saha kaynaklı enfeksiyonların ayrımı gerçekleşir. Ancak ELİSA testlerinde aşı ve saha suşundaki c-oligosakkarit yapılarının ortak olmasından kaynaklı cut-off değerinin üstünde yalancı pozitiflikler sıklıkla görülebilmektedir. (Dorneles ve ark 2015). Aşılama ile yüksek koruma sağlayan güçlü bir Th1 tipi hücre tepkisine neden olur. Bu tepki, enfekte olmuş hücreleri inhibe eden ve makrofajların

bakterisit aktivitesini artıran sitotoksik T lenfositlerin aktivasyonuna yol açan IFN-γ yanıtının uyarılmasından kaynaklanmaktadır (He ve ark 2001). Aşı rifampisin ve streptomisin antibiyotiklerine dirençli olması kullanım açısından risk teşkil etmektedir (Moriyon ve ark 2004).

***Brucella melitensis* Rev1**

Canlı *B. melitensis* Rev1 aşısı, koyun ve keçilerde Brusellozun kontrolü için kullanılmaktadır. Bu suş, 1953 yılında Herzberg ve Elberg tarafından geliştirilmiştir ve *Brucella* türlerinin ortak özelliklerini göstermektedir, ancak streptomisine dirençlidir ve penisilin G'ye duyarlıdır (Avila-Calderon 2013). Rev1 türü smooth formdadır. *B. melitensis* 16M kökenlidir ve üremesi için ortama streptomisinin eklenmesi gerekir (Schuring ve ark 2002, Moriyon ve ark 2004, Avila-Calderon ve ark 2013). Uygulaması SC ve konjuktival olarak gerçekleştirilmektedir. Bu aşı suşu ayrıca serolojik olarak tanıda antikorların üretimini de uyararak saha suşları ile aşı suş ayrımı yapılamamasına sebep olur (Avila-Calderon ve ark 2013). Canlı suşlarla aşılamanın sığır ve yaban hayatı hayvanların için oldukça koruyucu bir etkinliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır. Bunun nedeni, bakterinin konakta belirli bir süre canlı kalması ve çoğalmasıdır (Ko ve Splitter 2003, Zabalza-Barangua ve ark 2019). Ayrıca *B. melitensis* Rev. 1 insanları enfekte edebilir. Gebe hayvanlarda abortu önlemek için aşı ilk gebelikten önce 3-7 aylıkken önerilir (Banai 2002, Avila-Calderon ve ark 2013). Bir çalışmada, *B. melitensis* Rev1 aşısının Omp19 bölgesinden hazırlanan aşı kullanılarak aşılanan hayvanlardan enfekte olan hayvanları ELİSA yöntemiyle ayırt edilebileceği bilgisi paylaşılmıştır (Uslu ve Erganiş 2021).

Diğer Aşılar

Subunit aşılar, rekombinant proteinler gibi, ümit verici aşı adaylarıdır. Çünkü bunlar daha az biyolojik tehlike içerir. İyi tanımlanmışlardır, avirülandırlar, bulaşıcı değillerdir ve cansızlardır (Pasquevich ve ark 2011). Bruselloza karşı etkili bir aşının geliştirilmesi için, yeterli bir immünolojik yanıtın ortaya çıkarılması ve ardından koruyucu bağışıklığı uyaran en iyi antijenin seçilmesi gerekir. Subunit aşılar, daha güvenli aşıları geliştirmek için umut verici bir seçenek olarak görünmektedir. Çünkü canlı türlerin aksine virülansı yeniden kazanamazlar (Avila-Calderon ve ark 2013). Zayıf immunojenik olduklarından, bir adjuvanın birlikte uygulanması gerekir. Subunit aşının başarısı, uygun tipte immünomodülatör özelliklere sahip maddelerin

kullanımına bağlıdır. Ayrıca, subunit aşının başarısı, uygulama yolu ile ilişkilidir (Pasquevich ve ark 2010, Lopez-Santiago ve ark 2019).

DNA aşıları hem humoral hem de hücresel immün yanıtı uyarabilmektedirler. Protein aşılarına oranla daha az immun yanıt oluşturdukları bildirilmiştir (Avila-Calderon ve ark 2013). Bruselloz da; örneğin, Omp 31 ihtiva eden bir DNA aşısı, IFA ile birleştirilmiş rekombinant protein ile benzer koruma oluşturmaktadır (Cassataro ve ark 2005). Ayrıca bir BSL-DNA aşısının, *B. abortus* a karşı aynı rekombinant proteinden daha etkili olduğu bildirilmektedir (Velikovsky ve ark 2002). DNA aşılarının etkinliğini artırma çalışmaları devam etmektedir. Bu aşılar hedef hayvan ve insanlara uygulanabilirliği açısından çalışmaları oldukça önemlidir (Avila-Calderon ve ark 2013).

1.9.2. Ülkemizde Koruma ve Kontrol Programı

Ülkemizde koyun ve keçi Brusellozuna karşı ilk mücadele 1952 yılında devlet çiftliklerinde başlatılmıştır. Hayvanlar serolojik olarak test edilmiş ve prevalansları %10'un üzerinde bulunmuştur. Taşıyıcı olarak tespit edilen hayvanlar kesime sevk edilmiştir. Daha sonra test ve kesimden ziyade kitlesel aşılamanın daha doğru bir yol olacağı kanısına varılmış ve Rev-1 ile ilk aşılamaya geçiş 1968 yılında başlatılmıştır. Özel çiftlikler ise aşılamaya 1974 yılı itibari ile geçmişlerdir. Hastalığın eradikasyonu için 1984 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından "Ulusal *Brucella* Kontrol ve Eradikasyon Projesi" adlı projede 26 yıl süresince doğan dişi koyun, keçi ve sığır yavrularının uygun yaşta aşılanması hedeflenmiştir. Proje süresinin sonunda da seroprevalansı %1'in altına çekmek amaçlanmıştır. Hastalığın yaygınlığını tespiti amacıyla 1998 yılında yapılan çalışmada sığırda sürü prevalansı %11,4 (fert prevalansı %1,43), koyunlarda sürü prevalansı %15 (fert prevalansı 1,97) olarak tespit edildiği bildirilmektedir. Kontrol programının sonrasında ise 2011 yılında seroprevalans çalışması gerçekleştirilmiş ve sığırlarda fert prevalansı %2,7 ve sürü prevalansı %7,8 iken koyunlarda fert prevalansı %3,4 ve sürü prevalansı %22,5 olarak bildirilmiştir (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü 2012, Yumuk ve O'Callaghan 2012).

Yapılan prevalans çalışması sonucunda "*Brucella*'nın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi" 2012 yılında başlatılmıştır. Bu kapsamda koyun-keçiler için 6 yıl, sığırlar için 10 yıllık eylem planları hazırlanmıştır. Bu projede

koyun ve keçilere 3-6 aylık dönemlerinde tek doz, sığırlarda 6-12 aylık dönemlerinde çift dozla aşılama yapılması kararlaştırılmıştır (Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü 2012).

Koyun ve keçiler için ön görülen eylem planı sonrasında tüm Türkiye'yi temsil eden numuneler toplanarak serosurvey çalışması 2017 yılında gerçekleştirilmiştir. Ülke genelinde Koyun ve Keçi Brusellozu yönünden fert prevalansı %2,10 ve sürü prevalansı %12,34 olarak hesaplanmıştır. Bulgular hastalık prevalansında, Haziran 2012'de tamamlanan ''*Brucella*'nın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi" (fert prevalansı %4,7 ve sürü prevalansı %30) ne kıyasla düşüş olduğu bildirilmiştir (GTHB 2018). Sığırlar için yapılacak olan serosurvey ise 2022 yılında planlanmaktadır (Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı-Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü 2012).

Bruselloz insan vakaları 2005 yılından itibaren azalma eğiliminde olmakla birlikte 2016'dan itibaren tekrar bir artış yaşanmıştır, 2005 yılında 14.644 olan vaka sayısı 2019 yılında 10244'e inmiştir (Çizelge 1.3) (WAHİS 2019).

Çizelge 1.3. Yıllara göre insan Brusellozu vaka ve ölüm sayıları (WAHİS 2019).

Yıl	İnsan vakaları	Ölüm
2005	14644	1
2006	10790	0
2007	11803	0
2008	9818	1
2009	9324	0
2010	7658	0
2011	7177	0
2012	6759	0
2013	7225	0
2014	4475	0
2015	4173	0
2016	5148	0
2017	6457	0
2018	7219	1
2019	10244	0

2012/03 sayılı "*Brucella'*nın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Projesi" nin yerini 2019/6 ''*Brucella'*nın Konjuktival Ası Ile Kontrol ve Eradikasyonu Genelgesi'' almıştır. 2019/6 *Brucella'*nın Konjuktival Aşı ile Kontrol ve Eradikasyonu Genelgesi Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda Kontrol Genel

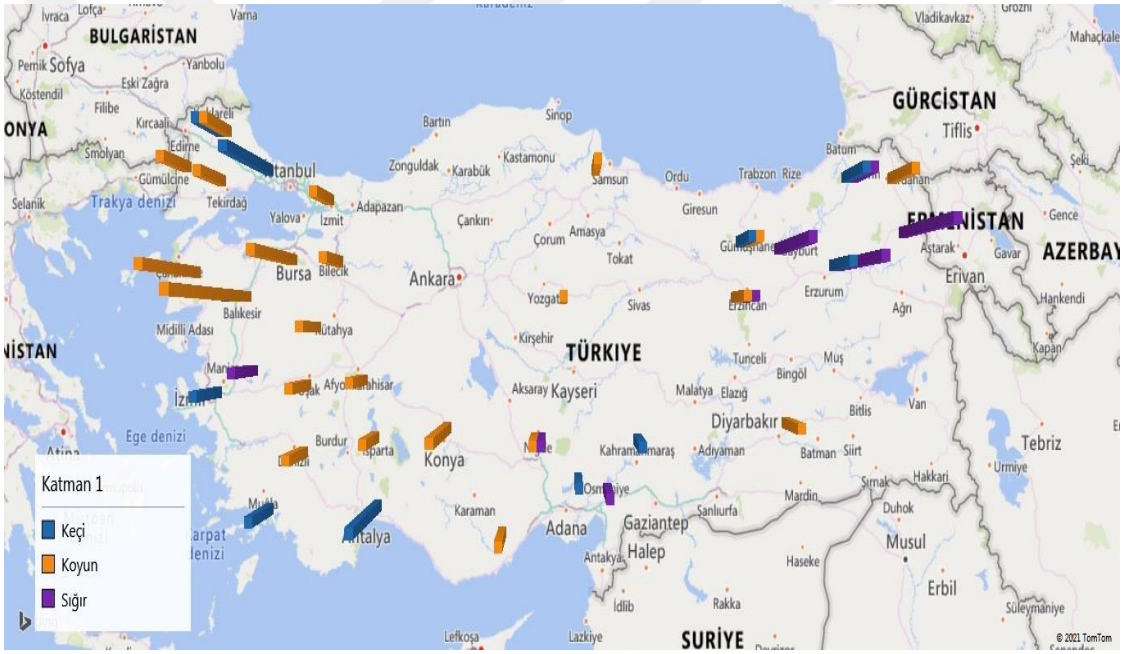
Müdürlüğü tarafından yayınlanmıştır. Genelgeye göre; 2 yıl boyunca aşılama devam edilecek olup sonrasındaki yıl serosurvey çalışması yapılıp sonuçlara göre aşılama süresi uzatılabilecektir. Aşı uygulama programı kapsamında Trakya'da; 3-6 aylık dişi buzağılar *B. abortus* S-19 ile aşılanacak, 4-12 ay sonra ilk aşılanan hayvanlar tekrar aşılanacak, aşı kaydına bakılarak aşılanmamış ergin hayvanlar *B. abortus* S-19 ile aşılanacak, gebe hayvanlar doğumdan sonra aşılanacak, 3-6 aylık dişi kuzu ve oğlaklar ile damızlık erkek hayvanlar *B. melitensis* Rev-1 aşısıyla aşılanmasına karar verilmiştir. Hastalık mihrakının yoğun olduğu iller de (Ağrı, Ankara, Ardahan, Bayburt, Çankırı, Erzincan, Erzurum, Kars, Konya, Sivas) genç dişi buzağılar *B. abortus* S-19 ile aşılanacak 4-12 ay sonra tekrar aşılamaları yapılacak, aşı geçmişine bakılmaksızın tüm dişiler *B. abortus* S-19 ile aşılanacak, gebe hayvanlar doğumdan sonra aşılanacak, 3-6 aylık dişi kuzu ve oğlaklar ile damızlık erkekler *B. melitensis* Rev-1 aşısıyla aşılanmasına karar verilmiştir. Diğer Anadolu illerinde genç dişi buzağılar *B. abortus* S-19 ile aşılanacak 4-12 ay sonra tekrar aşılamaları yapılacak, 3-6 aylık dişi kuzu ve oğlaklar ile damızlık erkekler *B. melitensis* Rev-1 ile aşılanmasına, ayrıca isteyen yetiştiriciler il müdürlüklerinin bilgisi dâhilinde ilk aşılamalarını *B. abortus* S-19 subcutan- deri altı olarak uygulayıp, 4-12 ay sonra *B. abortus* S-19 konjoktival aşısı ile aşılanacaktır. Aşılamadan bir yıl sonra gönderilecek kan numuneleri RBPT ve CFT testleri ile değerlendirilecek olup, 30 İnternational Complement Fikzation Test (İCFT) Unit'den yüksek titreler pozitif olarak değerlendirilerek şartlı kesime gönderileceği belirtilmektedir (TOB 2019). Ancak subcutan aşılama da titre yarılanma süresi 1 yılın üzerindedir (Erganiş 2019).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. İzolatlar

Bu çalışmada; 2012 ve 2017 yıllarında diğer Enstitü Müdürlüklerinden *Brucella* spp. olarak identifiye edilen ve Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'ne biyotiplendirme için gönderilen 50 adet izolat kullanıldı. Ancak 2012 yılında gönderilen suşlarda *Brucella melitensis* biyotip 2 bulunmadığı için 1 adet numune 2009 yılından seçildi. Ayrıca 2 adet numune Güneydoğu Anadolu bölgesini temsil etmesi adına 2011 ve 2013 yılından seçilerek tüm bölgeyi temsil etmesi için 50 adet numune içine eklendi. Çalışmada kullanılan izolat bilgileri Şekil 2.1 ve Çizelge3.1'de gösterildi.



Şekil 2.1. Çalışma izolatlarının coğrafi dağılımı

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gelen numuneler biyotip özelliklerine ve tüm coğrafi bölgeleri temsil edecek şekilde farklı konakçılardan olmak üzere seçildi. Numune seçiminden sonra biyotip doğrulaması yapıldı. Bu doğrulama için numuneler Tibilisi, İzatnagar ve R/C fajı ile birlikte %3 dekstroz ve %5 yeni doğmuş buzağı serumu içeren Triptik Soy Agar (TSA agar)'a pasajlandı. Beş gün inkübasyon süresinin sonunda faj sonuçları kayıt edildi ve daha sonra petriden bakteri %15' lik gliserol broth içeren kroviallerde toplandı. Streptomisinli, penisilinli, i-eritritollü, bazikfuksinli, tiyoninli ve safraninli besiyerlerine ve H_2S'de üretimi görmek

amacıyla TSA içeren yatık agarlara ekimleri yapıldı. İnkübasyon süresinin sonunda üreme özelliklerine göre değerlendirildi ve kayıt altına alındı. Biyotiplendirilen ve raporlandırılan izolatlar -80 ºC'de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.1.2. İzolasyon Besiyeri

Tryptone Soy Agar Besiyeri (TSA)

Numunelerin ilk izolasyonunda ve identifikasyonunda seçici olmayan TSA agar kullanıldı.

TSA (CM0131, Oxoid) hazırlarken 1 litre için 40 gram TSA tartımı yapıldı. Tartılan miktar 1 litre distile su içeren 2 litrelik bir şişeye aktarılıp karıştırıldı. Sterilizasyon işlemi için 121 °C ± 3 °C de 20 dakika otoklavlandı. Daha sonra sıcaklığı 56 Cº olan benmaride soğutma işlemi gerçekleştirildi. Karışımın üzerine steril yeni doğmuş buzağı serumundan (RM0437, HiMedia) 50 ml eklendi. Diğer tüm bileşenler ilave edildikten sonra iyice karıştırılıp, 90 mm çaplı steril boş petri kaplarına her biri 23 ml olacak şekilde otomatik pipet aracılığıyla taksim edildi (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

2.1.3. Biyotiplendirme Besiyerleri

Suşların biyotiplendirilmesi amacıyla boyalı (bazikfuksin, tiyonin, safranin), antibiyotikli (penisilin, streptomisin) ve eritritol içeren besiyerleri kullanıldı.

Tiyonin Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Tiyonin besiyerinin 1 litresindeki bileşenler:

Stok tiyonin boyası (%0,1)	20 ml
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dektroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml

Distile su

Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA (236950, BD Difco) besiyeri, soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml steril (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), 50 ml steril yeni doğmuş buzagı serumu (RM0437, HiMedia) ve 20 ml boya solüsyonu (T-3387, Sigma-Aldrich) eklendi. Tüm bileşenler eklenip karıştırıldıktan sonra besiyeri steril 90 mm çaplı boş petrilere

20 ml olacak şekilde dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

Bazik Fuksin Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Bazik fuksin besiyerinin 1 litresindeki bileşenler:

Stok bazik fuksin boyası (%0,1)	20 ml
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dekstroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml
Distile su	

Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA besiyeri (236950, BD Difco), soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml steril (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), 50 ml steril yeni doğmus buzagı serumu (RM0437, HiMedia) ve 20 ml boya solüsyonu (632-99-5, Merck) eklendi. Sonra tüm bileşenler eklendip karıştırıldıktan sonra taksim için steril 90 mm çaplı boş petrilere dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

Safranin Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Safranin besiyerinin 1 litresindeki bileşenler:

Stok safranin boyası (%0,5)	20 ml
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dekstroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml
Distile su	

Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA besiyeri (236950, BD Difco), soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml sterilize edilmiş (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), 50 ml sterilize edilmiş yeni doğmuş buzağı serumu (RM0437, HiMedia) ve 20 ml boya solüsyonu (S-2255, Sigma) eklendi. Tüm bileşenler eklenip karıştırıldıktan sonra taksim için steril 90

mm çaplı boş petrilere 20 ml dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

Penisilin Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Penisilin besiyerinin 1 litresinde ki bileşenler:

Penisilin	5000IU
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dekstroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml

Distile su

Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA besiyeri (236950, BD Difco), soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml sterilize edilmiş (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), 50 ml sterilize edilmiş yeni doğmuş buzağı serumu (RM0437, HiMedia) ve 20 ml antibiyotik solüsyonu (AppliChem A1837,0025, 113-98-4) eklendi. Sonra tüm bileşenler eklenip karıştırıldıktan sonra taksim için tüm steril 90 mm çaplı boş petrilere dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

Streptomisin Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Streptomisin besiyerinin 1 litresinde ki bileşenler:

Streptomisin	2,5 mg
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dektroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml

Distile su

Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA besiyeri (236950, BD Difco), soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml sterilize edilmiş (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), 50 ml steril yeni doğmuş buzağı serumu (RM0437, HiMedia) ve 20 ml antibiyotik solüsyonu (3810-74-0, AppliChem A1852,0025) eklendi. Sonra tüm bileşenler eklendip karıştırıldıktan

sonra taksim için besiyeri steril 90 mm çaplı boş petrilere 20 ml olarak dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

Eritritol Besiyeri

TSA agara doğrulamak için ekilen suşların biyotiplendirme işlemlerini yapmak için kullanılan besiyeridir. Eritritol besiyerinin 1 litresinde ki bileşenler:

Eritritol	1 gr
Triptik soyagar	40 gr
Steril Yeni Doğmuş Buzağı Serumu	50 ml
Steril dektroz solüsyonu (%20'lik)	50 ml
Distile su	

On ml distile suda 10 gr eritritol (149-32-6, Sigma E7500) çözdürülüp sonrasında filtre edilerek steril edildi. Sterilizasyon işlemi için otoklavlanan TSA besiyeri (236950, BD Difco), soğutmak için 56 Cº ye ayarlanmış benmaride bekletildi. Üzerine 50 ml sterilize edilmiş (%20' lik) dekstroz solüsyonu (MC013, LABM), eritritol solüsyonu ve 50 ml steril yeni doğmuş buzağı serumu (RM0437, HiMedia) eklendi. Sonrasında tüm bileşenlerde eklenip karıştırıldıktan sonra taksim için besiyeri steril 90 mm çaplı boş petrilere 20 ml olarak dağıtıldı (Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Aşıları Üretim Laboratuvarı 2015).

2.1.4. Diğer Besiyerleri

%15'lik Gliserinli Triptik Soy Broth

İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan *Brucella* spp.'leri uzun süre muhafaza etmek amacıyla %15 Gliserin (104092, Merck) içeren triptik soy broth (1309881013, LabM) kullanıldı ve -20 ºC'de muhafaza edildi (Alton ve ark 1988). Sterilizasyon amacıyla triptik soy broth, %15 gliserin ve distile su ilave edilerek hazırlandıktan sonra 121 ºC'de 20 dakika otoklavlandı. Bu işlemden sonra steril kriyoviyallere her biri 1 ml olacak şekilde dağıtıldı ve sonra kullanılmak üzere +4 ºC'de saklandı.

2.1.5. Morfolojik, Serolojik, Biyokimyasal ve Faj Test Gereçleri

Bakteri Saflığı ve Morfolojisinin Belirlenmesi

İzolatların saflığını belirlemek için ekilen kültürdeki koloniler ticari Gram boya seti ile Gram boyaması yapıldı (111885, Merck). Gram boyama için, Kristal-viyole, lugol, asit-alkol ve Safranin boyaları kullanıldı. Bu işlem için taze

kolonilerden öze ucu kadar alındı ve bir damla distile su ile lam üstüne yayıldı, kurutma işlemi gerçekleştirildi ve sonra 45 derecelik açı ile 3 defa lam ateşten geçirilerek tespit işlemi gerçekleştirildi. Sonrasında hazırlanan preparat üzerine kristal-viyole boya çözeltisi damlatıldı ve 1 dakika bekletildikten sonra bol distile su ile yıkandı. Preparat üstü lugol boya solüsyonu ile kaplandı ve 1 dakika bekletildikten sonra bol distile su ile yıkandı. Preparatın üzeri asit-alkol karışımı ile kaplandı ve 10-15 saniye bekletildikten sonra distile su ile yıkandı. Daha sonra preparat üzerine safranin boya solüsyonu kaplandı ve 30 saniye bekletildi sonra bol distile su ile yıkandı. Kurutma kağıdında bekletildikten sonra mikroskopta incelendi. Pembe- kırmızı renkte görülen Gram negatif koko-basiller *Brucella* olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1975).

Antiserumlar

Biyotiplendirme aşamasında, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde üretilen liyofilize *Brucella* Monospesifik A ve M Antiserumları (2010-1; PVKE) ile *Brucella* Poliklonal A-M Antiserumu (2008-1; PVKE) 1 ml distile suyla sulandırılarak kullanıldı (Alton ve ark 1988, OIE 2015).

Biyokimyasal Test Gereçleri

Hidrojen Peroksit (H_2O_2) %3'lük (108597, Merck) katalaz testi için, oksidaz identifikasyon stikleri (113300, Merck) oksidaz testi için kullanıldı. Serum Dekstroz Agar (SDA) yatık agar tüplerinde, kurşun asetat (32307, Sigma Aldrich) emdirilmiş sterilize whatman kağıtları (1442-1, GE Healthcare) H_2S üretiminin tespit edilmesi amacıyla kullanıldı (Alton ve ark 1988, OIE 2015).

Fajlar

Biyotiplendirme aşamasında faj testleri için, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde üretilen liyofilize Tibilisi (TbØ 10_4 RTD) (FTb-01-07; PVKE), İzatnagar (FIz-05-07; PVKE) ve R/C (FR/C-08-07; PVKE) fajları, distile suyla 1 ml karıştırılıp kullanıldı (Alton ve ark 1988, OIE 2015).

Standart Suşlar

Referans suşlar, *B. melitensis* Rev-1 (ATS-PVKE-08-04), *B. melitensis* 16M (ATCC 23456) biyotip 1, *B. melitensis* 63/9 (ATCC 23457) biyotip 2 ve *B. melitensis* Ether (ATCC 23458) biyotip 3 suşları kullanıldı. Bu suşlar Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü *Brucella* Referans ve Aşı Üretim Laboratuvarının bünyesindeki suş koleksiyonundan temin edildi. Çalışma örneklerinin

biyotiplendirmesinde test ve kontrol amacıyla, besiyerlerinin kontrolü için pozitif ve negatif kontrol olarak bu suşlar kullanıldı (Alton ve ark 1988). Bu çalışmada kullanılan her iki test metodunda da referans suşların DNA'ları pozitif kontrol amacıyla ekstakte edilip çalışmaya dahil edildi. Özellikle MLVA metoduna başlamadan önce kapillar cihazında off-set değerlerinin belirlenmesi için söz konusu DNA'lar kullanıldı (Whatmore ve ark 2007, Garofolo ve ark 2013).

2.1.6. Moleküler Yöntemlerde Kullanılan Gereçler

DNA Ekstaksiyon Kiti

DNA ekstraksiyonu için ticari kit (High Pure FFPET DNA Isolation Kit, 06650767001, Roche) kullanıldı.

MLVA Primerleri

B. melitensis 16M referans suşuna ait ilgili gen bölgelerinde yer alan tekrarlı ünitelerin çoğaltılmasında primer olarak kullanılan oligonukleotid dizileri 100uM (Letgen, Türkiye) olacak şekilde sentezlettirildi (Çizelge 2.1). Stok primerler 10 uM olacak şekilde Nuclease-free su ile 10 kat sulandırıldı.

Çizelge 2.1. MLVA primer dizileri ve uzunlukları (Garofolo ve ark 2013)

Gen Bölgesi/ Primer İsmi	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Beklenen PZR ÜrünToplam Uzunluğu (Bp)
Bruce 30	PET-TGACCGCAAAACCATATCCTTC	TATGTGCAGAGCTTCATGTTCG	119-199
Bruce 08	PET-ATTATTCGCAGGCTCGTGATTC	ACAGAAGGTTTTCCAGCTCGTC	312-384
Bruce 11	6FAM-CTGTTGATCTGACCTTGCAACC	CCAGACAACAACCTACGTCCTG	257-1076
Bruce 45	6FAM-ATCCTTGCCTCTCCCTACCAG	CGGGTAAATATCAATGGCTTGG	133-187
Bruce 19	NED-GACGACCCGGACCATGTCT	ACTTCACCGTAACGTCGTGGAT	79-205
Bruce 06	NED-GATTGCGGAACGTCTGAACT	TAACCGCCTTCCACATAATCG	312-714
Bruce 42	VIC-CATCGCCTCAACTATACCGTCA	ACCGCAAAATTTACGCATCG	164-914
Bruce 12	NED-CGGTAAATCAATTGTCCCATGA	GCCCAAGTTCAACAGGAGTTTC	302-452
Bruce 18	PET-TATGTTAGGGCAATAGGGCAGT	GATGGTTGAGAGCATTGTGAAG	130-186
Bruce 55	PET-TCAGGCTGTTTCGTCATGTCTT	AATCTGGCGTTCGAGTTGTTCT	193-553
Bruce 21	6FAM-CTCATGCGCAACCAAAACA	GTGGATACGCTCATTCTCGTTG	431-463
Bruce 04	VIC-CTGACGAAGGGAAGGCAATAAG	TGGTTTTCGCCAATATCAACAA	313-473
Bruce 07	NED-GCTGACGGGGAAGAACATCTAT	ACCCTTTTTCAGTCAAGGCAAA	134-246
Bruce 09	VIC-GCGGATTCGTTCTTCAGTTATC	GGGAGTATGTTTTGGTTGTACATAG	124-292
Bruce 43	6FAM-TCTCAAGCCCGATATGGAGAAT	TATTTTCCGCCTGCCCATAAAC	170-194
Bruce 16	6FAM-ACGGGAGTTTTTGTTGCTCAAT	GGCCATATCCTTCCGCAATA	227-353

MLST Primerleri

B. melitensis 16M referans suşuna ait ilgili gen bölgelerinde yer alan tekrarlı ünitelerin çoğaltılmasında primer olarak kullanılan oligonukleotid dizileri 100uM olacak şekilde sentezlettirildi. Stok primerler 10 uM olacak şekilde Nuclease-free su 10 kat sulandırıldı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2.MLST yönteminde kullanılacak genlere özgü primer dizileri ve uzunlukları (Whatmore ve ark 2007)

Gen Bölgesi/ Primer İsmi	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tekrar Ünitesi (Bp)	Bant Büyüklüğü (Bp)
Gap	YGCCAAGCGCGTCATCGT	GCGGYTGGAGAAGCCCCA	6	589
aroA	GACCATCGACGTGCCGGG	YCATCAKGCCCATGAATTC	7	565
Glk	TATGGAAMAGATCGGCGG	GGGCCTTGTCCTCGAAGG	10	475
dnaK	CGTCTGGTCGAATATCTGG	GCGTTTCAATGCCGAGCGA	7	470
gyrB	ATGATTTCATCCGATCAGGT	CTGTGCCGTTGCATTGTC	6	469
trpE	GCGCGCMTGGTATGGCG	CKCSCCGCCATAGGCTTC	6	486
cobQ	GCGGGTTTCAAATGCTTGGA	GGCGTCAATCATGCCAGC	7	422
omp25	ATGCGCACTCTTAAGTCTC	GCCSAGGATGTTGTCCGT	10	490
int-*hyp*	CAACTACTCTGTTGACCCGA	GCAGCATCATAGCGACGGA	5	430

MLST ve MLVA Analizlerinde Kullanılan Kimyasallar

MLVA analizi için Hi-Di formamid (4311320, Applied Biosystems) ve 1200 LizGene Scan Standart (4379950, Applied Biosystems) kullanıldı.

MLST ve MLVA analizlerinin ilk PZR aşamalarında 2x Taq PZR Master mix (201443, Qiagen) kullanıldı.

2.1.7. Görüntüleme ve Elektroforez Cihazları

Jel elektroforez aşaması için, %1,5 oranında agaroz jel hazırlandı. Bu işlemde kullanılmak üzere 50 X TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (A4686, AppliChem Panreac), 1X oranına indirmek için distile su ile karıştırılarak kullanıldı.

Jel hazırlamak için, agaroz (A9539, Sigma)'dan 4,5 gr olarak alındı ve 1X TAE buffer solüsyonu ile 300 ml'ye tamamlanıp homojenliği sağlanana kadar eritildi. Eritilen agarozlu solüsyon biraz soğutuldu ve üzerine 5µl %1'lik ethidium bromide (Applichem, A1152) eklenilip iyice karıştırıldı. Kalıp tepsisinin üzerine taraklar yerleştirildikten sonra jel solüsyonu döküldü. Katılaşması için oda

sıcaklığında belirli süre beklenildi. Katılaştıktan sonra taraklar tepsiden çıkarıldı. Hazır haldeki jel elektroforez tankına uygun olucak şekilde yerleştirilip yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yükleme işlemi için 6X DNA Loading dye (G190A, Promega) ve jelde DNA marker görmek için 2000 bp'lik ladder (Norgen Low Ranger) kullanıldı.

Sekans verilerinin fasta formatları Genestudio Professional software ve AliView software (İsveç) programları kullanılarak okuma işlemleri gerçekleştirildi.

Kapillar elektroforez işlemi için, Genetic Analyzer 3130/3130xl (Applied Biosystems®) cihazı kullanıldı. Bu işlem için ABI PRISM gene analyser ve GeneMapper Software 6 programları kullanıldı.

2.1.8. Kullanılan Diğer Gereçler

MLST ve MLVA analizlerinde kullanılan diğer gereçler; otomatik pipetler (100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl; Eppendorf), DNase / RNase'dan arındırılmış düz kapaklı PZR tüpleri (Axygen), UV jel görüntüleme sistemi (Vilber-Lourmat), DNase / RNase'dan içermeyen steril filtreli pipet uçları (Kırgen), ısı döngü cihazı (Palm-Cycler), elektroforez sistemi (Thermo EC105) ve Agaroz jel Elektroforez tankı (Maxicell Primo EC340)'dır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Etkenin İdentifikasyonu ve Biyotiplendirilmesi

Karbondioksit (CO2) İhtiyacının Belirlenmesi

İzolatlar krovialler içerisinde 1 ml FTS olacak şekilde süspanse edildi. Süspansiyonlar eküvyon çubuğu ile TSA agara ince hat şeklinde ekildi. Daha sonra petriler 37 ºC'de aerobik koşullarda, etüvde 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üremenin olması negatif ve üremenin olmaması pozitif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

Hidrojen Sülfür (H2S) Çıkışının Belirlenmesi

Seçilen izolatlar, TSA yatık agar içeren tüplere eküvyon çubuklarıyla ekimleri yapıldı. Daha sonra, kurşun asetat emdirilmiş whatman kağıtları, besiyerlerinin yüzeylerine değmeyecek şekilde tüp ile kapağı arasına sıkıştırıldı. Ekilen tüpler %6 CO_2'li etüvde 37 ºC'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kurşun asetat emdirilmiş kâğıt siyah renge dönüşmüşse test poztif olarak değerlendirildi (Alton ve ark 1988).

Penisilin, Streptomisin, Eritritol, Tiyonin, Bazik Fuksin ve Safranin Varlığında Üreme

Krovialler içerisindeki süspansiyonlar, eküvyon çubuğu ile TSA agara her petride 5 örnek olacak şekilde ekimleri yapıldı. Daha sonra petriler 37 ºC'de %6 CO_2'li etüvde 5 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yapılan değerlendirmede üremenin olması pozitif ve üremenin olmaması negatif olarak kabul edildi (Alton ve ark 1988).

Faj Testleri

Krovialler içerisindeki süspansiyonlar eküvyon çubuğu ile TSA agar ekimleri gerçekleştirildi. Ekim alanının sağ tarafı tibilisi ortası izatnagar sol tarafına R/C fajlarından 20'şer µl damlatıldı. Petrilerin kuruması için biraz beklenildi. Sonra %6 CO2'li etüvde 37 ºC'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından fajların damlatıldığı alanlarda, lizisin tam görülmesi pozitif, fajların damlatıldığı alanda lizisin görülmeme durumu negatif olarak kabul edildi (Alton ve ark 1988).

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

İzolatlar krovialler içerisinde 1 ml FTS olucak şekilde süspanse edildi. Bu süspansiyonların inaktive işlemleri için 65 ºC'lik sıcak su banyosunda 1 saat süre ile bekletildi. İnaktive edilen izolatlar daha sonra temiz bir lam üzerine 25 µl olucak şekilde damlatılıp üzerlerine M ve A monospesifik antiserumları 25 µl ilave edilip 1-2 dakika karıştırıldı. Değerlendirme aşamasında aglütinasyon oluşması pozitif olarak kabul edildi (Alton ve ark 1988).

2.2.2. Moleküler Yöntemler

Örneklerden DNA İzolasyonu

Brucella izolatlarından DNA izolasyonu; High Pure FFPET DNA Izolasyon Kiti (Roche, 06650767001) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre, 54 numunenin DNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. İzolatları pozitif kontrol, steril distile su negatif kontrol olarak kullanıldı Örneklerden 200'er µl alındı ve 1,5 ml'lik tüplere konuldu. Aynı tüplere 180'er µl bağlanma tamponu, 70 µl proteinaz K solüsyonu (25 U/mg) eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Bu karışım 600 rpmde 56°C'de 60 dk inkube edildikten sonra aynı tüplerin üzerine 200'er µl DNA bağlanma tamponu ilave edilerek vortekslendi. On dakika 15°C'de inkübe edildi. Karışımın üzerine 100 µl izopropanol ilave edildi. Karışım pipetlenerek karıştırıldı ve toplama tüpleri içerisine

yerleştirilen filtreli tüplere aktarılarak 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Santrifüjü takiben sıvı biriken toplama tüpleri atıldı. Daha sonra filtreli tüpler yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Tüplere 500 µl yıkama tamponu 1 eklenip 8000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta sıvı biriken toplama tüpleri atıldı. Üstteki filtreli tüpler yeni toplama tüpleri içine yerleştirilerek üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. Ardından filtrede kalan etanolün tamamen uzaklaştırılması için 14000 g'de 10 saniye santrifüj edildi. Daha sonra filtreli tüpler yeni tüpler içine yerleştirildi ve üzerine elüsyon tamponundan 50'şer µl eklendi 5 dakika 15°C'de inkübe edildi ve 8000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Son olarak üstteki tüpler atıldı ve saf DNA elde edildi, ektraktlar PZR testinde kullanılıncaya kadar, -20°C'de muhafaza edildi.

Örneklerin DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Sulandırılması

B. melitensis olduğu tespit edilen 50 adet saha suşu ve 4 adet Referans suş (Aşı suşu Rev-1, *B. melitensis* bt1(16M), *B. melitensis* bt2(63/9), *B. melitensis* bt3(Ether)) biyotiplendirildi. Biyotiplendirme için elde edilen kültürlerden manuel olarak DNA ekstaksiyonları yapıldı ve DNA'lar elde edildi. DNA'ların konsantrasyonlarını ve saflıkları nonodrop cihazında (Thermo Scientific 1000, Amerika) tespit edildi. Ürünlerin nanogram değerleri 25 ile 340 arasında bulundu. Saflık değerleri (260/280) değerleri 1,6 ile 1,8 olarak, (260/230) değerleri ise 1,8 ile 2,0 arasında değiştiği görüldü. Daha sonra 50 nanogram üzeri olanlar yoğun olarak değerlendirildi ve sulandırma işlemine tabi tutuldu. Bunun için 200 µl'lik ependorflara her birinde 100 µl ve herbirinin OD (Optik Dansite) değeri 10 nanogram olacak şekilde sulandırma işlemi gerçekleştirildi.

MLVA Metodu için Primer Karışımlarının Hazırlanması

Birinci PZR aşaması için, ilgili gen bölgelerine uygun primerler ile PZR gerçekleştirildi (Garofolo ve ark 2013). Primer karışımı hazırlarken Çizelge 2.3'de primerlerin uzunlukları ve dizilimleri belirtilen florasan işaretli 16 çift primerler kullanılarak 4'lü multipleks hazırlandı. Primer Mixler forwardlar için ayrı olarak M1fw, M2fw, M3fw, M4fw şeklinde reverseler için ayrı olarak M1rw, M2rw, M3rw, M4rw şeklinde ayrı olarak dörderli tüpler halinde hazırlandı.

Çizelge 2.3. Multiplekslerin primer dizilimleri ve uzunlukları, florasan işaret renklerine göre dizaynı (Gorofolo ve ark 2013, LeFleche ve ark 2006)

Paneller		Lokuslar	Vntr uzunlukları (bp)	Kromozom yerleri	Tekrar sayıları (bp)	Beklenen uzunlukları (bp)	Florasan İşaret Renkleri
Panel 1	Multipleks1	Bruce 30	1505	1	8	151	Kırmızı (PET)
		Bruce 08	1134	1	18	348	Kırmızı (PET)
		Bruce 11	211	1	63	257	Mavi(FAM)
		Bruce 45	233	1	18	151	Mavi(FAM)
		Bruce 19	324	2	6	163	Sarı(NED)
	Multipleks 2	Bruce 06	1322	1	134	408	Sarı(NED)
		Bruce 42	424	1	125	539	Yeşil (VİC)
Panel 2A	Multipleks 3	Bruce 12	73	2	15	392	Sarı(NED)
		Bruce 18	339	2	8	146	Kırmızı (PET)
		Bruce 55	2066	1	40	273	Kırmızı (PET)
		Bruce 21	329	1	8	148	Mavi(FAM)
		Bruce 04	1543	1	8	152	Yeşil (VİC)
Panel 2B	Multipleks 4	Bruce 07	1250	1	8	158	Sarı(NED)
		Bruce 09	588	1	8	156	Yeşil (VİC)
		Bruce 43	379	1	12	182	Mavi(FAM)
		Bruce 16	548	2	8	152	Mavi(FAM)

MLVA Metodu için DNA Amplifikasyonu Hazırlanması

Birinci PZR aşaması: DNA ekstraktından, Garofolo ve ark (2013) bildirdikleri yöntem kullanılarak ilgili gen bölgelerine uygun primerler ile birinci PZR aşaması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı, ısıya dayanıklı 200 µl'lik nükleazdan arındırılmış PZR tüpleri içerisinde, finalde 10 µl miktarda olmak üzere; 5 µl 2X master mix PZR kit karışımı (Qiagen, 201443), 1 µl 10x Forward Primer karışımı, 1 µl 10x Reverse Primer karışımı (Her primer için 10 pmol/ µl), 1 µl Q (buffer) solüsyonu, 1 µl nükleazdan arındırılmış ultra safsu ve 1 µl (10 ng) DNA örneği içermektedir. DNA amplifikasyonu (Multipleks2 hariç); 95 ºC'de 5 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra, 95 ºC'de 30 saniye (denatürasyon), 60

ºC'de 90 saniye (ilk bağlanma), 72 ºC'de 30 saniye (uzama) toplam 30 döngü olacak şekilde 60 ºC'de 45 dakika (son uzatma), 4 ºC'de ürünler çıkartılana kadar (sonlanma), Multipleks 2 için ise başlangıç denatürasyon işlemi sonrası döngü sayısını 26'ya düşürerek diğer ısı ve zaman değerleri aynı olacak şekilde protokol ThermalCycler (PalmCycler) cihazında yürütülerek amplifikasyon işlemleri tamamlanmıştır (Qiagen Kit Protokolü).

MLVA Metodu için Hazırlanan PZR Ürününün Doğrulanması

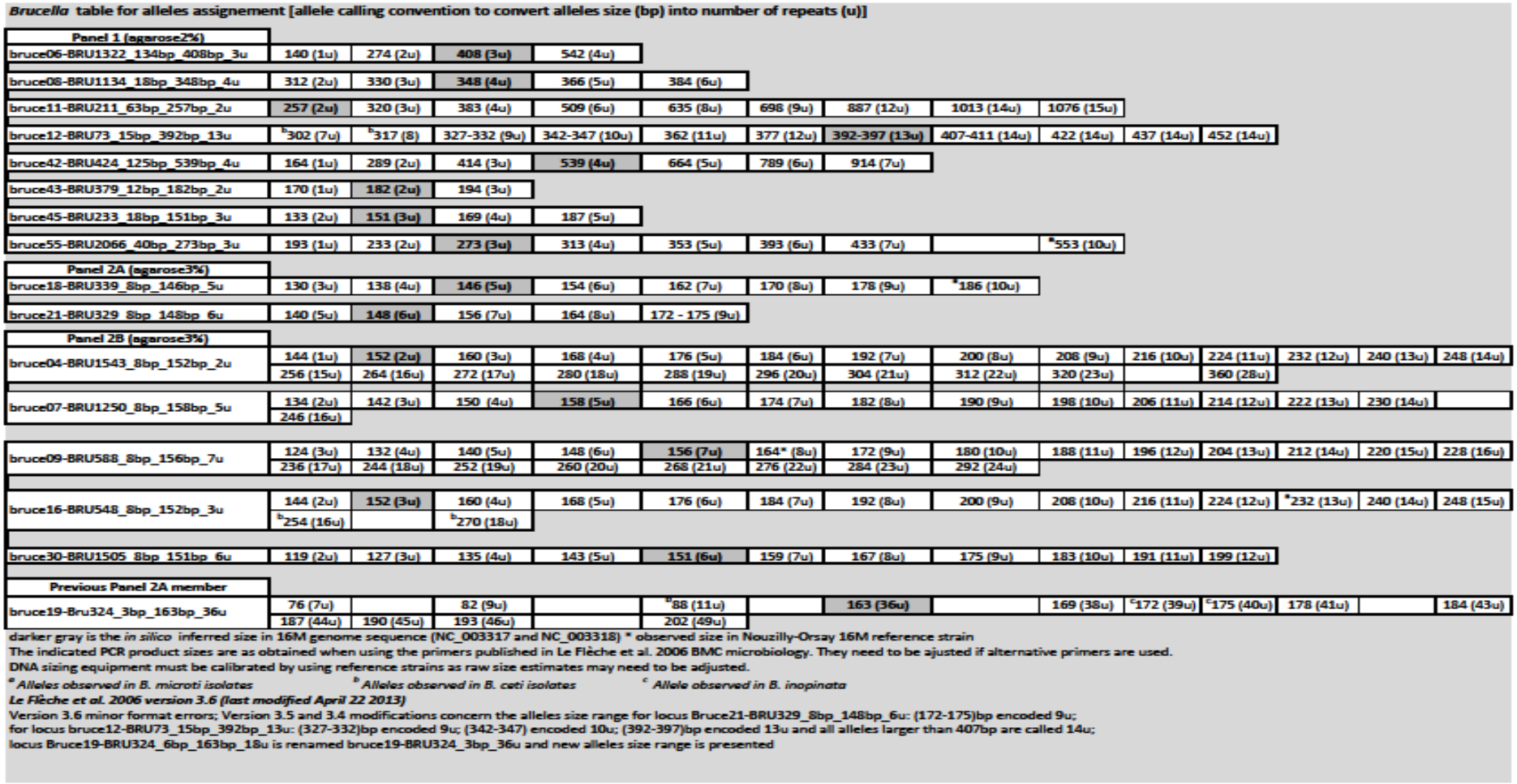
Elde edilen PZR ürünlerinin varlığının kanıtlanması ve Fragment analizi öncesi kontrolü amacıyla %1,5 'lik agaroz jelde, jel elektroforez cihazında (Bio-Rad) bantlar görüntülenmiştir. DNA bant büyüklükleri 100 bp'lik ladder kullanılarak ölçülmüştür.

MLVA Metodu için Hazırlanan PZR Ürününün Fragment Analizi

Elde edilen amplifikasyon ürünleri jel üzerinde doğrulandıktan sonra fragment analizleri yapılmak üzere Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer kapillar elektroforez cihazına yüklendi ve binler (piklerin görüleceği aralıklar) oluşturulmuştur. Numuneyi cihaza yükleme sırasında uygulanan protokol ise; Hi-Di formamid 10,25µl, GeneScan liz 1200 standart 0,3µl ve PZR ürünü 1µl M1 ve 1µl M2 toplam 2µl toplam hacim 12,55 olacak şekilde ilk kuyucuk, daha sonra Hi-Di formamid 10,25µl, GeneScan liz 1200 standart 0,3µl ve 2µl M3 PZR ürünü toplam hacim 10,55µl ikinci kuyucuğa ve Hi-Di formamid 10,25µl, GeneScan liz standart 0,3µl ve 2µl M4 PZR ürünü toplam hacim 12,55µl olacak şekilde üçüncü kuyucuğa yerleştirilerek 4lü multipleks hazırlanmıştır.

Karışımlar kuyucuklara yüklenmeden önce denatürasyon amacıyla önce 3 dakika Thermal Cycler'da daha sonra 1 dakika buz bloğunda şoklanarak pleyt septası kapatıldı ve Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer cihazına yüklendi. Kapillar elektroforez cihazının ABI PRISM gene analyser programı kullanılarak yeni proje oluşturuldu ve run modülü komutu yine Garofolo ve ark (2015), yöntemindeki gibi ayarlanarak Referans numunelerin yürütülme işlemi gerçekleştirildi. Öncesinde yürütme modülü oluşturuldu. Bunun için; long fragment analiz kısmına 50-pop7, ısıtma sıcaklığı 60 ºC, yürütme öncesi zamana 180 saniye, yürütme öncesi voltajı 15 kvolts, yürütme voltajı 8.1 kvolts, püskürtme zamanı 10 saniye, hafıza gecikmesi 480, püskürtme voltajı 1.6 kvolts ve yürütme zamanı 6000 saniye olarak alet protokolü yazılarak cihaz hazır hale getirildi (Garofolo ve ark 2015).

GeneMapper software 6 programına yürütme öncesi bazı tanıtımlar yapıldı. Projeye isim verildi ismi MLVA *Brucella* oldu ve yeni binler (piklerin görüleceği aralık) *Brucella* ismi ile oluşturuldu. Daha sonra 3 tane panel oluşturuldu. M1-M2, M3 ve M4 olarak isimlendirildi. Sonrasında her bir panele markırlar eklendi. Öncelikle M1-M2 panelin içine bruce06, bruce08, bruce11, bruce19, bruce30, bruce42 ve bruce45 eklendi. M3 panelinin içine bruce04, bruce12, bruce18, bruce21 ve bruce55 eklendi. M4 paneline ise bruce07, bruce09, bruce16 ve bruce43 eklendi ve panneller GeneMapper software 6 programına bu şekilde tanıtıldı. GeneMapper yönetim sekmesinde yeni analiz seçildi ve binler (piklerin görüldüğü aralık) oluşturuldu. Bu binler LeFleche ve ark. (2006) da paylaştıkları nükleotide (bp) karşılık gelen allel unit (tekrar üniteleri) tablosu aynı zamanda mlva.net'de (http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/brucella/IMG/pdf/bru_table_allele_assignement_version3.6.pdf) bulunan tabloya göre binler tekrar sayıları oluşturularak binlerde tanımlandı. Bunun için önce *B. melitensis* 16M referans çalışılarak değerleri belirlendi. Diğer *B. melitensis* referanslarda çalışılarak off- set (tekrar sayısının belirlendiği aralık) değerleri ayarlamaları yapıldı. Binlerin belirlendiği fragmentlerin uzunlukları Şekil 2.2'de verildi. Tabloda altı çizili olan değerler Referans 16M'e göre hazırlandı. Daha sonra Liz standart 1200 seçilerek yürütme işlemine geçildi. Yürütme işleminden sonra öncelikle Liz standart 1200 test edilir kaymalar varsa olması gereken standarda göre düzeltilir ve okuma işlemine geçilir.



Brucella **table for alleles assignement [allele calling convention to convert alleles size (bp) into number of repeats (u)]**

Panel 1 (agarose2%)														
bruce06-BRU1322_134bp_408bp_3u	140 (1u)	274 (2u)	**408 (3u)**	542 (4u)										
bruce08-BRU1134_18bp_348bp_4u	312 (2u)	330 (3u)	**348 (4u)**	366 (5u)	384 (6u)									
bruce11-BRU211_63bp_257bp_2u	**257 (2u)**	320 (3u)	383 (4u)	509 (6u)	635 (8u)	698 (9u)	887 (12u)	1013 (14u)	1076 (15u)					
bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u	[b]302 (7u)	[b]317 (8)	327-332 (9u)	342-347 (10u)	362 (11u)	377 (12u)	**392-397 (13u)**	407-411 (14u)	422 (14u)	437 (14u)	452 (14u)			
bruce42-BRU424_125bp_539bp_4u	164 (1u)	289 (2u)	414 (3u)	**539 (4u)**	664 (5u)	789 (6u)	914 (7u)							
bruce43-BRU379_12bp_182bp_2u	170 (1u)	**182 (2u)**	194 (3u)											
bruce45-BRU233_18bp_151bp_3u	133 (2u)	**151 (3u)**	169 (4u)	187 (5u)										
bruce55-BRU2066_40bp_273bp_3u	193 (1u)	233 (2u)	**273 (3u)**	313 (4u)	353 (5u)	393 (6u)	433 (7u)		[*]553 (10u)					
Panel 2A (agarose3%)														
bruce18-BRU339_8bp_146bp_5u	130 (3u)	138 (4u)	**146 (5u)**	154 (6u)	162 (7u)	170 (8u)	178 (9u)	[*]186 (10u)						
bruce21-BRU329_8bp_148bp_6u	140 (5u)	**148 (6u)**	156 (7u)	164 (8u)	172 - 175 (9u)									
Panel 2B (agarose3%)														
bruce04-BRU1543_8bp_152bp_2u	144 (1u)	**152 (2u)**	160 (3u)	168 (4u)	176 (5u)	184 (6u)	192 (7u)	200 (8u)	208 (9u)	216 (10u)	224 (11u)	232 (12u)	240 (13u)	248 (14u)
	256 (15u)	264 (16u)	272 (17u)	280 (18u)	288 (19u)	296 (20u)	304 (21u)	312 (22u)	320 (23u)		360 (28u)			
bruce07-BRU1250_8bp_158bp_5u	134 (2u)	142 (3u)	150 (4u)	**158 (5u)**	166 (6u)	174 (7u)	182 (8u)	190 (9u)	198 (10u)	206 (11u)	214 (12u)	222 (13u)	230 (14u)	
	246 (16u)													
bruce09-BRU588_8bp_156bp_7u	124 (3u)	132 (4u)	140 (5u)	148 (6u)	**156 (7u)**	164* (8u)	172 (9u)	180 (10u)	188 (11u)	196 (12u)	204 (13u)	212 (14u)	220 (15u)	228 (16u)
	236 (17u)	244 (18u)	252 (19u)	260 (20u)	268 (21u)	276 (22u)	284 (23u)	292 (24u)						
bruce16-BRU548_8bp_152bp_3u	144 (2u)	**152 (3u)**	160 (4u)	168 (5u)	176 (6u)	184 (7u)	192 (8u)	200 (9u)	208 (10u)	216 (11u)	224 (12u)	[*]232 (13u)	240 (14u)	248 (15u)
	[b]254 (16u)		[b]270 (18u)											
bruce30-BRU1505_8bp_151bp_6u	119 (2u)	127 (3u)	135 (4u)	143 (5u)	**151 (6u)**	159 (7u)	167 (8u)	175 (9u)	183 (10u)	191 (11u)	199 (12u)			
Previous Panel 2A member														
bruce19-Bru324_3bp_163bp_36u	76 (7u)		82 (9u)		[a]88 (11u)		**163 (36u)**		169 (38u)	[c]172 (39u)	[c]175 (40u)	178 (41u)		184 (43u)
	187 (44u)	190 (45u)	193 (46u)		202 (49u)									

darker gray is the *in silico* inferred size in 16M genome sequence (NC_003317 and NC_003318) * observed size in Nouzilly-Orsay 16M reference strain
The indicated PCR product sizes are as obtained when using the primers published in Le Flèche et al. 2006 BMC microbiology. They need to be ajusted if alternative primers are used.
DNA sizing equipment must be calibrated by using reference strains as raw size estimates may need to be adjusted.
[a] *Alleles observed in B. microti isolates* [b] *Alleles observed in B. ceti isolates* [c] *Allele observed in B. inopinata*
Le Flèche et al. 2006 version 3.6 (last modified April 22 2013)
Version 3.6 minor format errors; Version 3.5 and 3.4 modifications concern the alleles size range for locus Bruce21-BRU329_8bp_148bp_6u: (172-175)bp encoded 9u;
for locus bruce12-BRU73_15bp_392bp_13u: (327-332)bp encoded 9u; (342-347) encoded 10u; (392-397)bp encoded 13u and all alleles larger than 407bp are called 14u;
locus Bruce19-BRU324_6bp_163bp_18u is renamed bruce19-BRU324_3bp_36u and new alleles size range is presented

Şekil 2.2. Brucella Nükleotid(bp) karşılık allel değerleri tablosu (Le Fleche ve ark. 2006). (Altı çizili olan değerler B. melitensis 16M Referans suşu belirtmektedir) (http://mlva.i2bc.paris-saclay.fr/brucella/IMG/pdf/bru_table_allele_assignement_version3.6.pdf)

Daha sonra yürütülen numuneler GeneMapper Software programında değerlendirildi. İlk olarak deneme Referans *B. melitensis* 16M ile denendi daha sonra diğer referanslar ve çalışma örnekleriyle devam edildi. Buna göre *B. melitensis* bt1 (16M) referans sonuçlarına göre Şekil 2.2'de belirtilen allel değerlerine göre bin setler oluşturuldu. Referans 16M'e ait piklerin görüldüğü sonuçlar Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmektedir. *B. melitensis* suşlarının tekrar sayıları ve HGDI değerleri http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/index.php kullanılarak hesaplandı (Huston ve Guston 1998).

MLST Metodu için DNA Amplifikasyonu Hazırlanması

Birinci PZR aşaması: DNA izolasyon aşamasından sonra Whatmore ve ark (2007), bildirdikleri yöntem kullanılarak Çizelge 2.2. belirtilen gen bölgelerine ait dizilimleri ve uzunlukları belirtilen primer çiftleri kullanıldı. Reaksiyon karışımı, ısıya dayanıklı 200 µl'lik nükleazdan arındırılmış PZR tüpleri içerisinde, finalde 20 µl miktarda olmak üzere; 10 µl 2X master mix PZR kit karışımı (Norgen, 28009), 1 µl Forward Primeri (2,5µM), 1 µl Reverse Primeri (2,5µM), 7 µl nükleazdan arındırılmış ultrasaf su ve 1 µl (10 ng) DNA örneği eklenerek karışım vortekslenerek spin işlemi uygulandı. 95 ºC'de 2 dakika başlangıç denatürasyon işleminden sonra, 95 ºC'de 30 saniye (denatürasyon), 58 ºC'de 30 saniye (ilk bağlanma), 72 ºC'de 60 saniye (uzama) toplam 30 döngü olacak şekilde 72 ºC'de 5 dakika (son uzatma), 4 ºC'de ∞ dakika (sonlanma) olarak protokol ThermalCycler (PalmCycler) cihazında yürütülerek amplifikasyon işlemleri tamamlandı (Norgen Kit Protokolü).

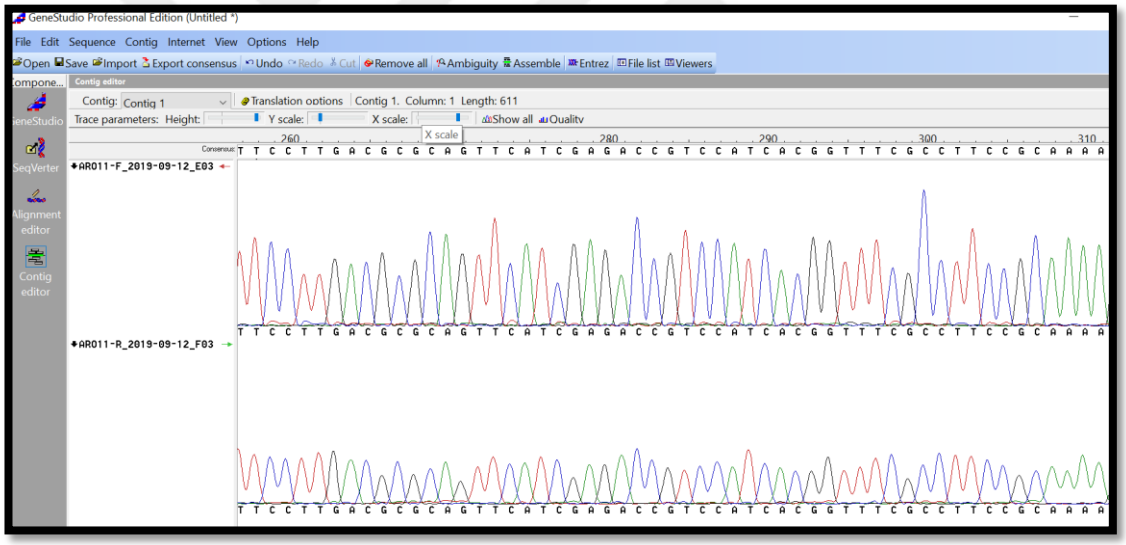
MLST Metodu için Hazırlanan PZR Ürününün Doğrulanması

Hazırlanan her PZR ürünü singelplex olarak hazırlanmış ve sekans analizi öncesinde daha ucuz maliyetle yapılan işlemin kontrollü ve doğru olarak yapıldığının göstergesi adına %1,5 'luk agaroz jelde, jel elektroforez cihazında (Bio-Rad) bantların görüntüleme işlemleri yapıldı.

Elde edilen bant görüntüleriyle PZR ürün varlığından emin okunduktan sonra tüm örnekler sekansları için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Genetik Laboratuvarına gönderilerek analizleri tamamlandı.

MLST Metodu için Hazırlanan PZR Ürünün Sekans Verilerinin Okunması, Değerlendirilmesi ve Allel Numaralarının Belirlenmesi

Laboratuvardan elde edilerek sekans ham verileri Şekil 2.3'de belirtildiği gibi GeneStudio programında değerlendirilmiş olup, düşük kalitedeki sekans verileri tekrardan PZR ürünleri oluşturularak sekansları yapıldı. Tüm örnek sekansları ideal uzunlukta okunup değerlendirildi. Hatalı veriler ya da istenilen uzunlukta olmayan veriler PZR aşamasından itibaren tekrarlandı. Okunan ham veriler AliView programında bölgelere göre Align (dizileme) işlemleri gerçekleştirildi. Tüm veriler MLST veritabanı (https://pubmlst.org/*Brucella*/)'na yüklendi ve Allel numaraları ve ST numaraları tespit edildi. 50 Adet çalışma örnekleri ve 4 Adet Referans suşlarının (*B. melitensis* Rev-1 bt1, *B. melitensis* bt1 (16M), *B. melitensis* bt2(63/9), *B. melitensis* bt3 (Ether)) tüm gen bölgelerinin allel numaraları ve ST değerleri aşağıda Çizelge 3.4'de verilmektedir.



Şekil 2.3. aroA gen bölgesi GeneStudio programında değerlendirilmesi

3.BULGULAR

3.1. Biyotiplendirme Sonuçları

Çalışma izolatlarını doğrulamak amacıyla biyotiplendirme işlemleri gerçekleştirildi. Seçilen izolatlara ait numune bilgileri ve biyotiplendirme ile ilgili veriler aşağıdaki Çizelge 3.1' de verildi. Buna göre sığırlara ait izolatlardan 2 adedinin *B.melitensis* bt1, 6 adedinin *B. melitensis* bt3, 1 adedinin bazik fuksine ve safranine duyarlı *B.melitensis* bt3 ve 1 adedinin penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3 olan toplam 10 adet izolat, keçilerde 9 adedinin *B. melitensis* bt1, 2 adedinin *B.melitensis* bt3, 1 adedinin penisiline duyarlı *B.melitensis* bt1, 1 adedinin penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3 olan toplam 13 adet izolat ve koyunlara ait 6 adet *B.melitensis* bt1, 15 adet *B. melitensis* bt3, 2 adet *B.melitensis* bt2, 2 adet penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3, 1 adet safranine duyarlı *B.melitensis* bt3 ve 1 adedinin penisiline duyarlı streptomisine dirençli *B.melitensis* bt3 olduğu toplam 27 adet izolat biyotip özelliklerine göre çalışmaya alındı.

Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen *Brucella* izolatlarının Biyotiplendirme sonuçları

Numune Bilgileri					***Brucella* spp. Üreme Özellikleri**												**Sonuç**
SIRA NO	**Suş Numarası**	**HAYVAN TÜRÜ**	**GELDİĞİ İL**	**GELDİĞİ İLÇE**	**CO_2 Gereksinimi**	**H_2S üretimi**	**Tiyonin**	**Bazik fuksin**	**Safranin**	**Penisilin**	**Streptomisin**	**İ-eritritol**	**Tibilisi fajı**	**R/C fajı**	**A antiserum**	**M antiserum**	**DEĞERLENDİRME**
1	2017/89-9	Keçi	Antalya	Korkuteli	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
2	2017/40-1	Keçi	İstanbul	Şile	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
3	2017/24	Koyun	Balıkesir	Altıeylül	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
4	2017/22-25	Keçi	Erzurum	Hınıs	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
5	2017/97	Sığır	Manisa	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
6	2017/20-29	Koyun	Konya	Ahırlı	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
7	2017/43	Koyun	Bilecik	Osmaneli	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
8	2017/49	Koyun	Tekirdağ	Süleymanpaşa	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
9	2017/20-28	Koyun	Isparta	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
10	2017/22-86	Sığır	Kars	Arpaçay	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
11	2017/22-134	Sığır	Erzurum	Pasinler	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
12	2017/20-25	Koyun	Afyonkarahisar	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
13	2017/22-122	Koyun	Ardahan	Hanak	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
14	7.07.2017	Koyun	Samsun	Çarşamba	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Penisiline duyarlı, Streptomisine dirençli *B.melitensis* bt3
15	2017/89-14	Koyun	Konya	Çumra	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
16	2017/20-23	Koyun	Niğde	Merkez	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Safranine duyarlı *B.melitensis* bt3
17	2017/22-164	Sığır	Bayburt	Aydıntepe	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	Bazik fuksin ve Safranine duyarlı *B.melitensis* bt3
18	2017/99	Keçi	Kırklareli	Merkez	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Penisiline duyarlı *B.melitensis* bt1

Çizelge 3.1. (Devam). Çalışmaya dahil edilen *Brucella* izolatlarının Biyotiplendirme sonuçları

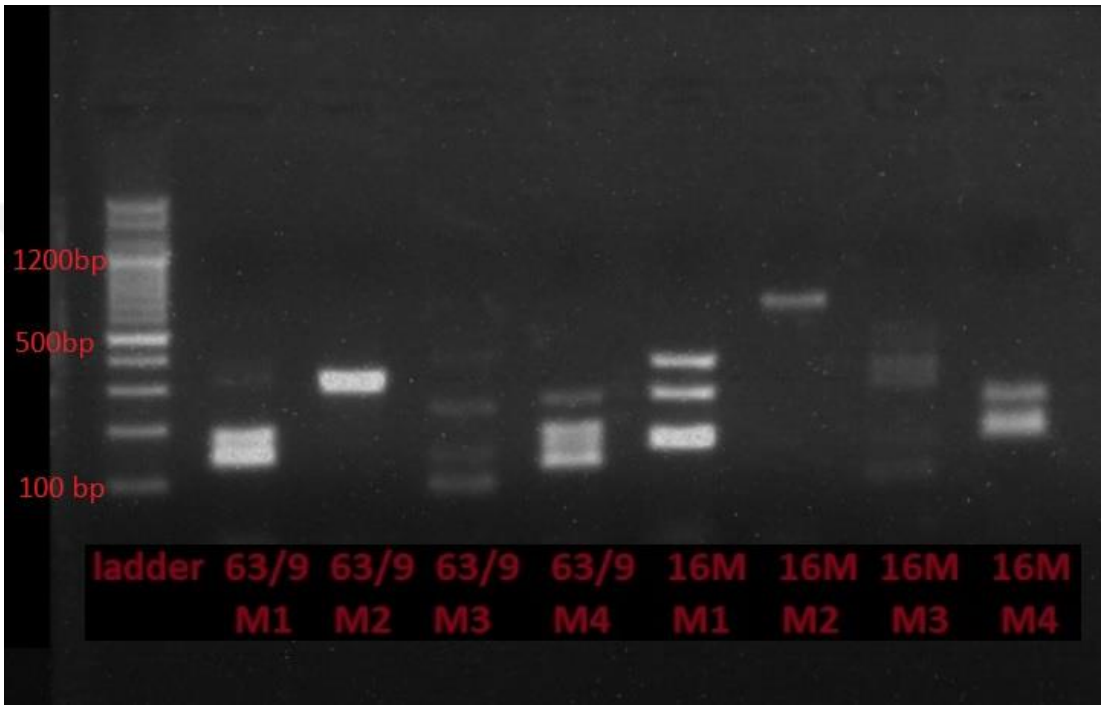
SIRA NO	SUŞ NUMARASI	HAYVAN TÜRÜ	GELDİĞİ İL	GELDİĞİ İLÇE	CO_2 Gereksinimi	H_2S üretimi	Tiyonin	Bazik fuksin	Safranin	Penisilin	Streptomisin	İ-eritritol	Tibilisi fajı	R/C fajı	A antiserum	M antiserum	DEĞERLENDİRME
19	2017/89-17	Keçi	Antalya	Alanya	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3
20	2017/51-5	Sığır	Niğde	Çiftlik	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3
21	2017/71	Koyun	Balıkesir	Gönen	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3
22	2017/15-3	Koyun	Yozgat	Merkez	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	Penisiline duyarlı *B.melitensis* bt3
23	2009/32	Koyun	Kocaeli	Körfez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	*B.melitensis* bt2
24	2012/15	Keçi	Adana	Karaisalı	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
25	2012/19	Koyun	Bursa	Osmangazi	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
26	2012/20-32-2	Keçi	Gümüşhane	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
27	2012/56-14	Keçi	İzmir	Kemalpaşa	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
28	2012/56-7	Koyun	Uşak	Ulubey	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
29	2012/31	Keçi	Balıkesir	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
30	2012/72	Keçi	İstanbul	Maltepe	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
31	2012/56-41	Koyun	Denizli	Sarayköy	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
32	2012/33-29	Sığır	Artvin	Şavşat	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
33	2012/38-75	Sığır	Erzurum	Olur	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
34	2012-26	Koyun	Edirne	Keşan	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
35	2012/44-36	Sığır	Erzincan	Refahiye	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
36	2012/66-48	Sığır	Bayburt	Aydıntepe	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
37	2012/1	Koyun	Mersin	Mezitli	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
38	2012/56-44	Keçi	Muğla	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
39	2012/56-35	Koyun	Kütahya	Domaniç	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
40	2012/60	Koyun	Kırklareli	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3

Çizelge 3.1. (Devam). Çalışmaya dahil edilen *Brucella* izolatlarının Biyotiplendirme sonuçları

SIRA NO	SUŞ NUMARASI	HAYVAN TÜRÜ	GELDİĞİ İL	GELDİĞİ İLÇE	CO_2 Gereksinimi	H_2S üretimi	Tiyonin	Bazik fuksin	Safranin	Penisilin	Streptomisin	İ-eritritol	Tibilisi fajı	R/C fajı	A antiserum	M antiserum	DEĞERLENDİRME
41	2012/48	Koyun	Çanakkale	Biga	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
42	2012/44-52	Koyun	Gümüşhane	Kelkit	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
43	2012/44-148	Keçi	Artvin	Şavşat	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
44	2012/38-52	Koyun	Erzincan	Refahiye	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
45	2012/36	Koyun	Balıkesir	Dursunbey	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
46	2012/41	Sığır	Osmaniye	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
47	2011/77	Koyun	Diyarbakır	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3
48	2013/206	Koyun	Çanakkale	Gelibolu	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	*B.melitensis* bt2
49	2012/77	Koyun	Bursa	Yıldırım	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
50	2011/15-1	Keçi	Kahramanmaraş	Merkez	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
51	Referans Rev-1 Aşı Suşu				-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	Rev-1
52	Referans *B.melitensis* bt1 (16M)				-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	*B.melitensis* bt1
53	Referans *B.melitensis* bt2 (63/9)				-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	*B.melitensis* bt2
54	Referans *B.melitensis* bt3 (Ether)				-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	*B.melitensis* bt3

3.2. MLVA Metodunda Kullanılan PZR Ürünlerinin Doğrulanması Sonuçları

Referans16M (*B. melitensis* bt1) ve Referans 63/9 (*B. melitensis* bt2)'a ait PZR ürünlerinin doğrulama sonuçları Şekil 3.1'de sunulmuştur. İki adet referans izolatın Çizelge 2.3'e göre hazırlanan multipleks1(M1), multipleks2(M2), multipleks3 (M3) ve Multipleks4(M4)'e ait PZR ürünlerinin bant uzunlukları Şekil 3.1'de görülmektedir.



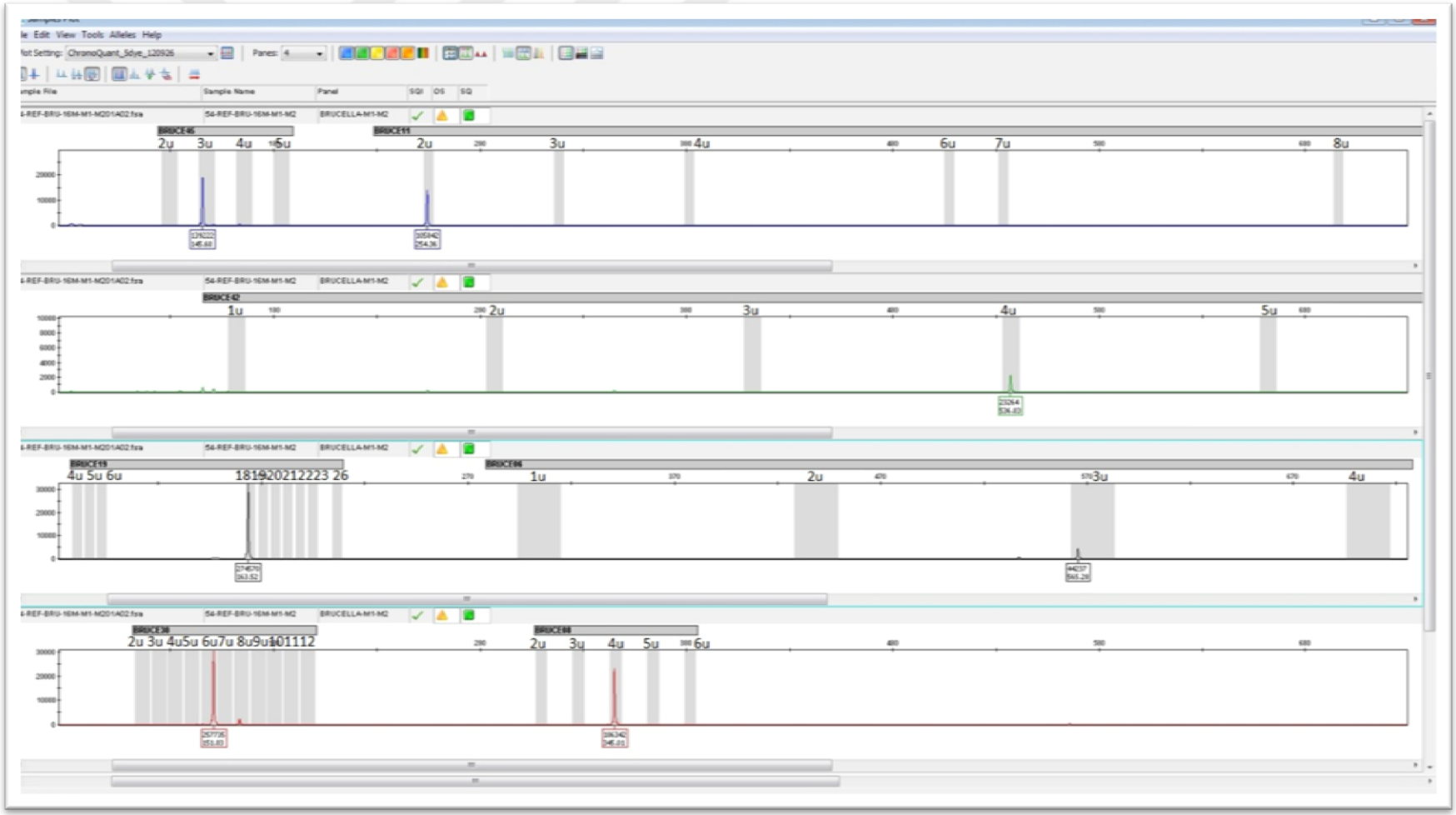
Şekil 3.1. MLVA-PZR agaroz jel görüntüsü Referans16M ve Referans 63/9'a ait jel görüntüsü. Referans63/9M1:145-250 ile 320-465 bp arası Referans63/9M2: 300-400 bp arası, Referans63/9M3:120-200 ile 280- 450bp arası, Referans63/9M4: 160-350bp arası. Referans 16M M1:180-320 bp arası, Referans 16M M2:565bp, Referans 16M M3:130-465bp arası, Referans 16M M4:220-380bp arası bantlar görüldü.

3.3. MLVA Metodu için Hazırlanan PZR Ürününün Fragment Analiz Sonuçları

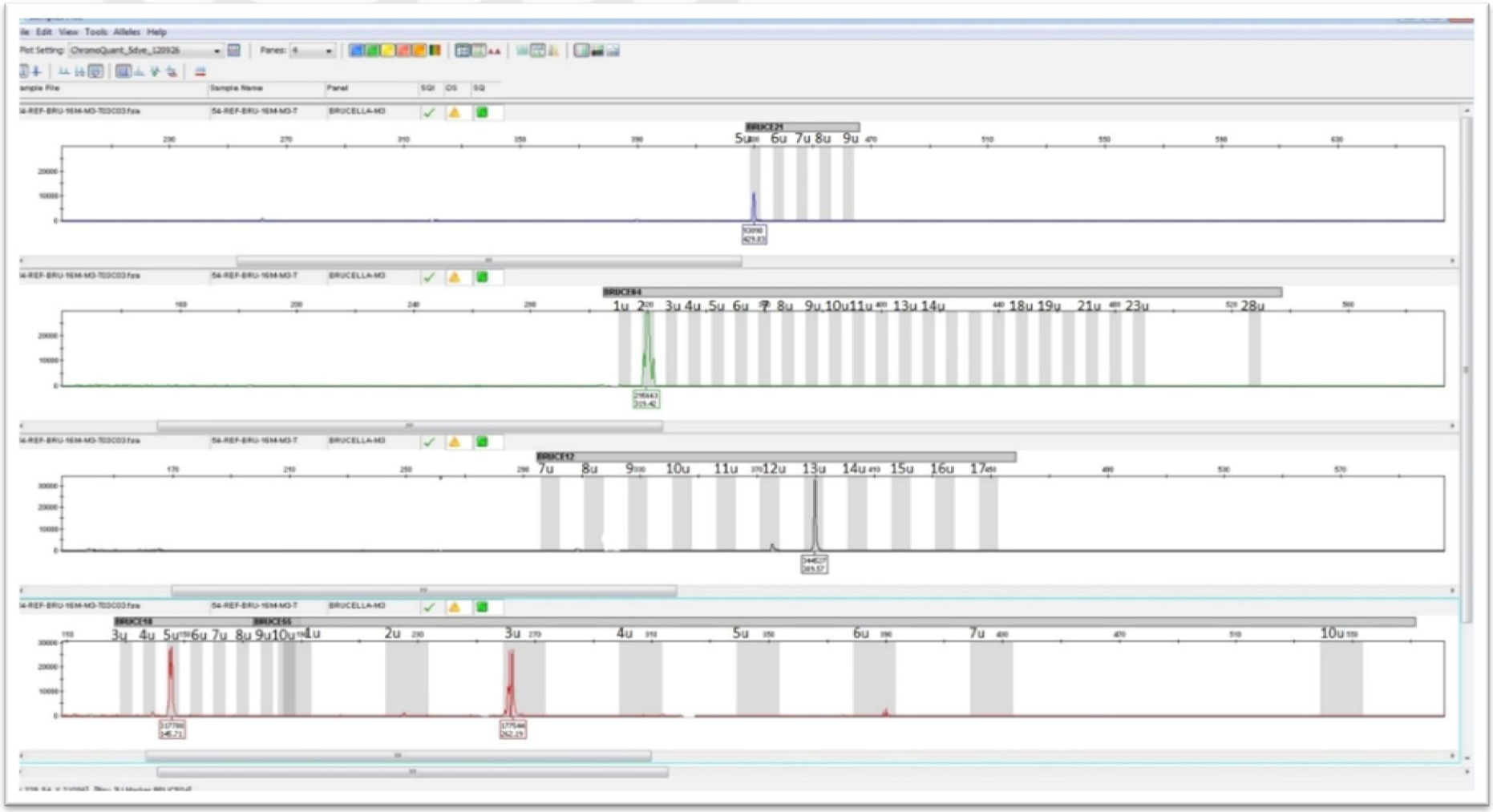
Elde edilen PZR ürünlerinin fragment analizleri için Applied Biosystems® 3130/3130xl Genetic Analyzer cihazı kullanıldı. Cihaza yüklenen PZR ürünleri GeneMapper version6 programı ile yürütüldü. Bu yürütme işleminde ilk olarak 4 adet referans suş (*B. melitensis* Rev-1, *B. melitensis* 16M, 63/9, Ether) ve daha sonra tüm numuneler çalışıldı. Tekrar eden unite (allel) sayıları Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Referans *B. melitensis* bt1 (16M)'e ait Panel1 Şekil 3.2, Panel 2A Şekil 3.3 ve

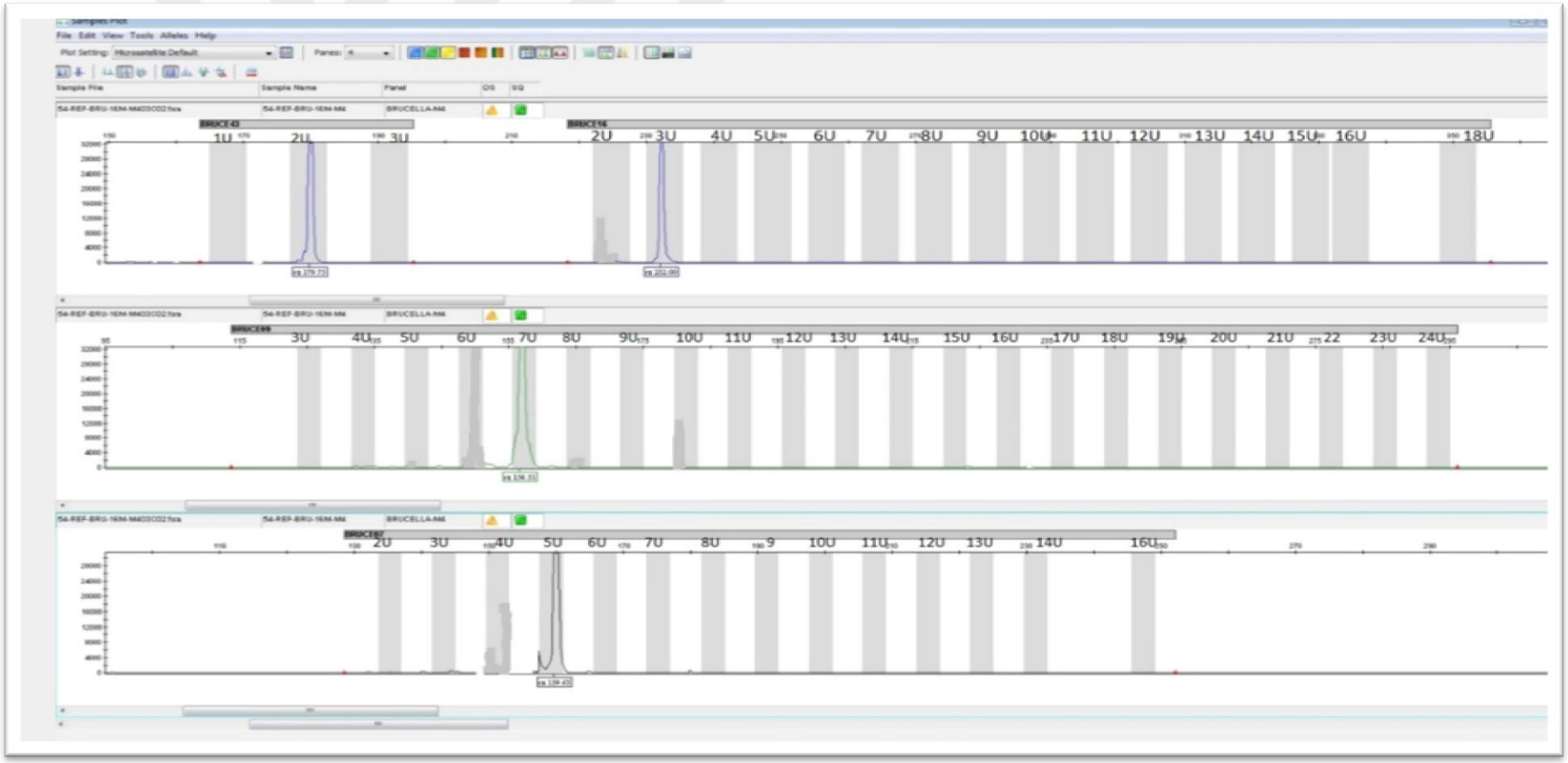
Panel 2B Şekil3.4’te ait lokuslara ait pikler ve piklere karşılık gelen tekrar (allel) sayıları verilmiştir. Şekil3.2’de Bruce 45 (145 bp=3u), Bruce 11 (254 bp=2u), Bruce 42 (536 bp=4u), Bruce 19 (163 bp=18u), Bruce 06 (565 bp=3u), Bruce30 (151 bp=6u) ve Bruce08 (345 bp=4u), Şekil 3.3’de Bruce 21 (429 bp=5u), Bruce 04 (319 bp=2u), Bruce 12 (389 bp=13u), Bruce 18 (145 bp=5u)ve Bruce 55 (262 bp=3u), Şekil 3.4.’de ise Bruce 43 (179 bp=2u), Bruce 16 (232 bp=3u), Bruce 09(156 bp=7u) ve Bruce 07(159 bp=5u) ait piklerin floresans işaretlerine göre olması gereken allel (tekrar) sayıları görülmektedir.



Şekil 3.2. Referans 16M multipleks1 ve multipleks 2 lokuslarının pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



Şekil 3.3. Referans 16M multipleks 3 lokusların pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



Şekil 3.4. Referans 16M multipleks 4 lokusların piklerinin GeneMapper ekran görüntüsü

Oluşturulan binsetlerin offset (tekrar sayısının belirlendiği aralık) değerleri, yürütülen diğer referans numunelerin (*B. melitensis* bt2 (63/9), *B. melitensis* bt3 (Ether)) pikleri ile database'de mevcut allel numaralarına göre revize edilerek binsetler son halleri aldırıldı. Buna göre Referans numunelerin tekrar (allel) (u) numaraları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir.

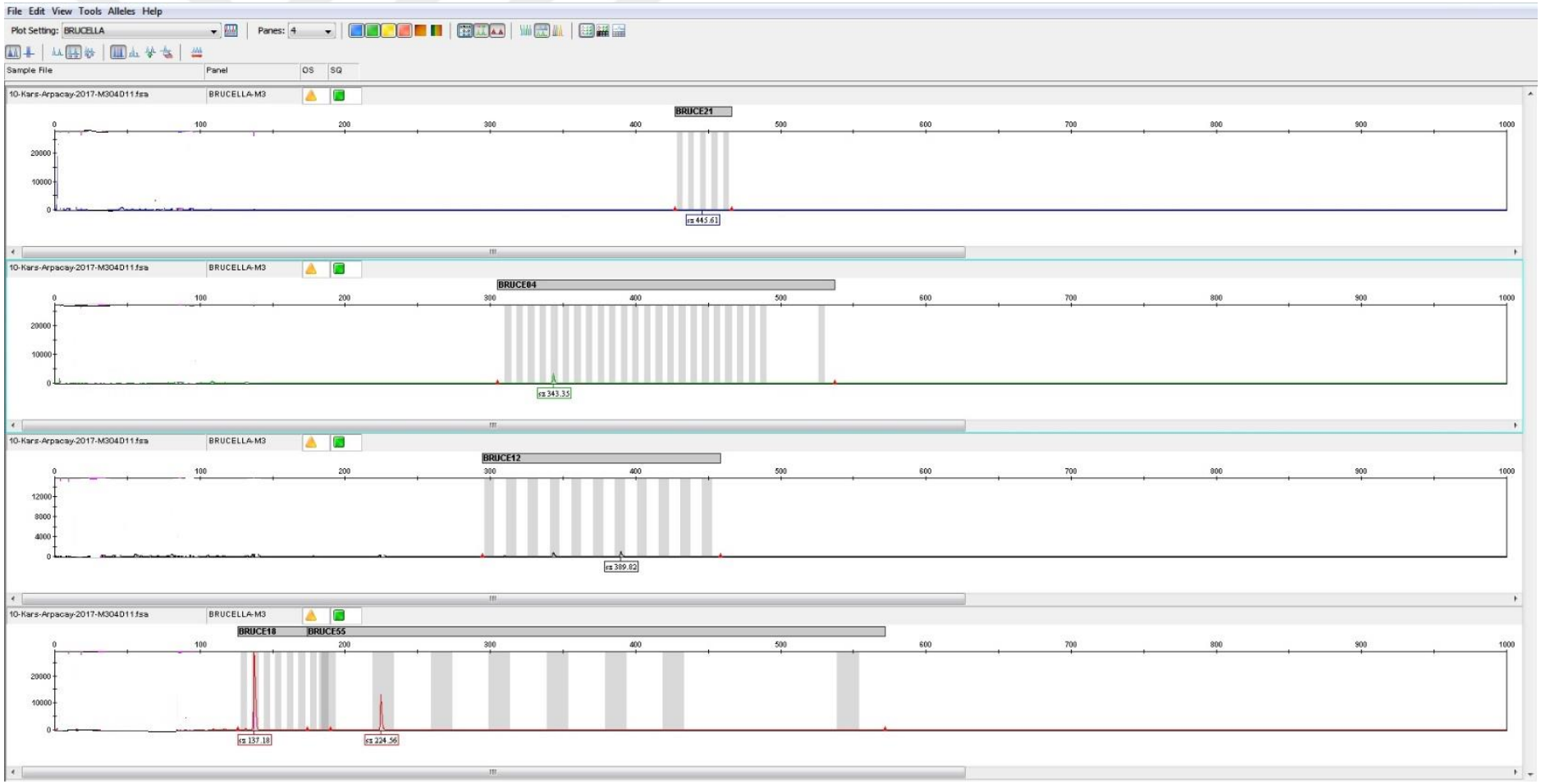
Çizelge 3.2. Referans numunelerin tekrar (allel) sayıları

Örnek Adı	Bruce45	Bruce11	Bruce42	Bruce19	Bruce06	Bruce30	Bruce08	Bruce21	Bruce04	Bruce12	Bruce18	Bruce55	Bruce43	Bruce16	Bruce09	Bruce07
Ref-Bru-Ether	3	3	1	21	3	3	5	7	7	13	7	3	1	10	13	5
Ref-Bru-16M	3	2	4	18	3	6	4	5	2	13	5	3	2	3	7	5
Ref-Bru-63-9	3	3	2	20	1	4	5	7	7	12	4	2	2	5	3	4
Ref-Rev1	3	2	4	18	3	6	4	6	2	13	8	3	3	3	6	4

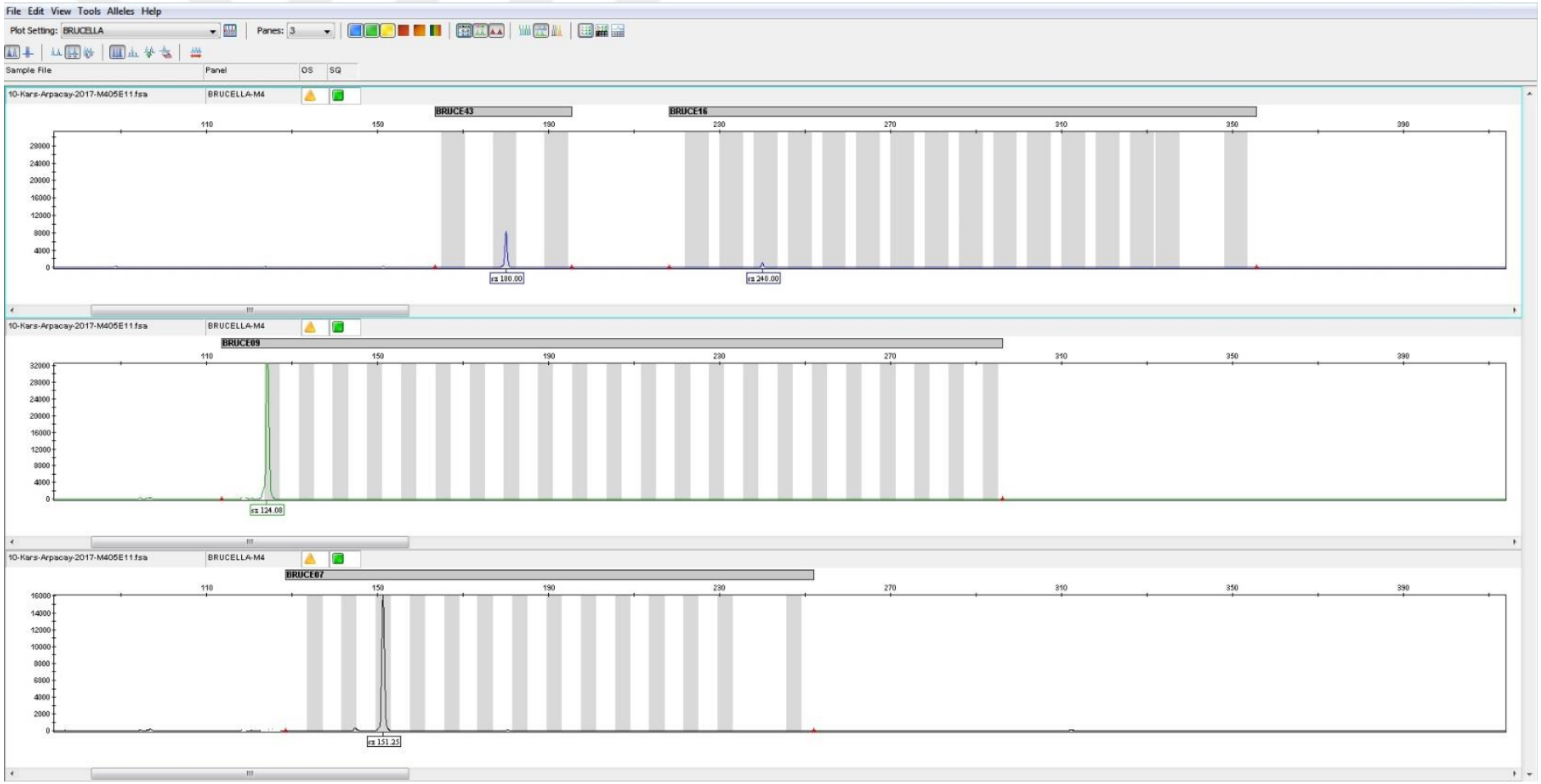
Saha izolatlarından Kars-Arpaçay ve Afyonkarahisar-Merkez'e ait izolatın Panel1 ,2A ve 2B'ye ait lokuslarının uzunlukları (bp) ve bunlara karşılık gelen allel (tekrar) sayılarına karşılık numaralar Şekil3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterildi. Şekil3.5'te Kars iline ait Panel 1'de Bruce 45 (145 bp=3u), Bruce 11 (316 bp=3u), Bruce 42 (412 bp=3u), Bruce 19 (178 bp=41u), Bruce 06 (310 bp=1u), Bruce30 (134 bp=4u) ve Bruce08 (363 bp=5u), Şekil 3.6'da Panel2A'ya ait Bruce 21 (445 bp=8u), Bruce 04 (343 bp=5u), Bruce 12 (389 bp=13u), Bruce 18 (137 bp=4u)ve Bruce 55 (224 bp=2u), Şekil 3.7'de ise Panel2B'ye ait Bruce 43 (180 bp=2u), Bruce 16 (240 bp=4u), Bruce 09(124 bp=3u) ve Bruce 07(151 bp=4u), Şekil 3.8'de Afyonkarahisar iline ait Panel1'de Bruce 45 (145 bp=3u), Bruce 11 (316 bp=3u), Bruce 42 (288 bp=2u), Bruce 19 (178 bp=41u), Bruce 06 (310 bp=1u), Bruce30 (143 bp=5u) ve Bruce08 (310 bp=2u), Şekil 3.9'da Panel2A'ya ait Bruce 21 (444 bp=8u), Bruce 04 (359 bp=7u), Bruce 12 (389 bp=13u), Bruce 18 (137 bp=4u)ve Bruce 55 (223 bp=2u), Şekil 3.10'da ise Panel2B'ye ait Bruce 43 (180 bp=2u), Bruce 16 (263 bp=7u), Bruce 09(124 bp=3u) ve Bruce 07(159 bp=5u) belirlendi.



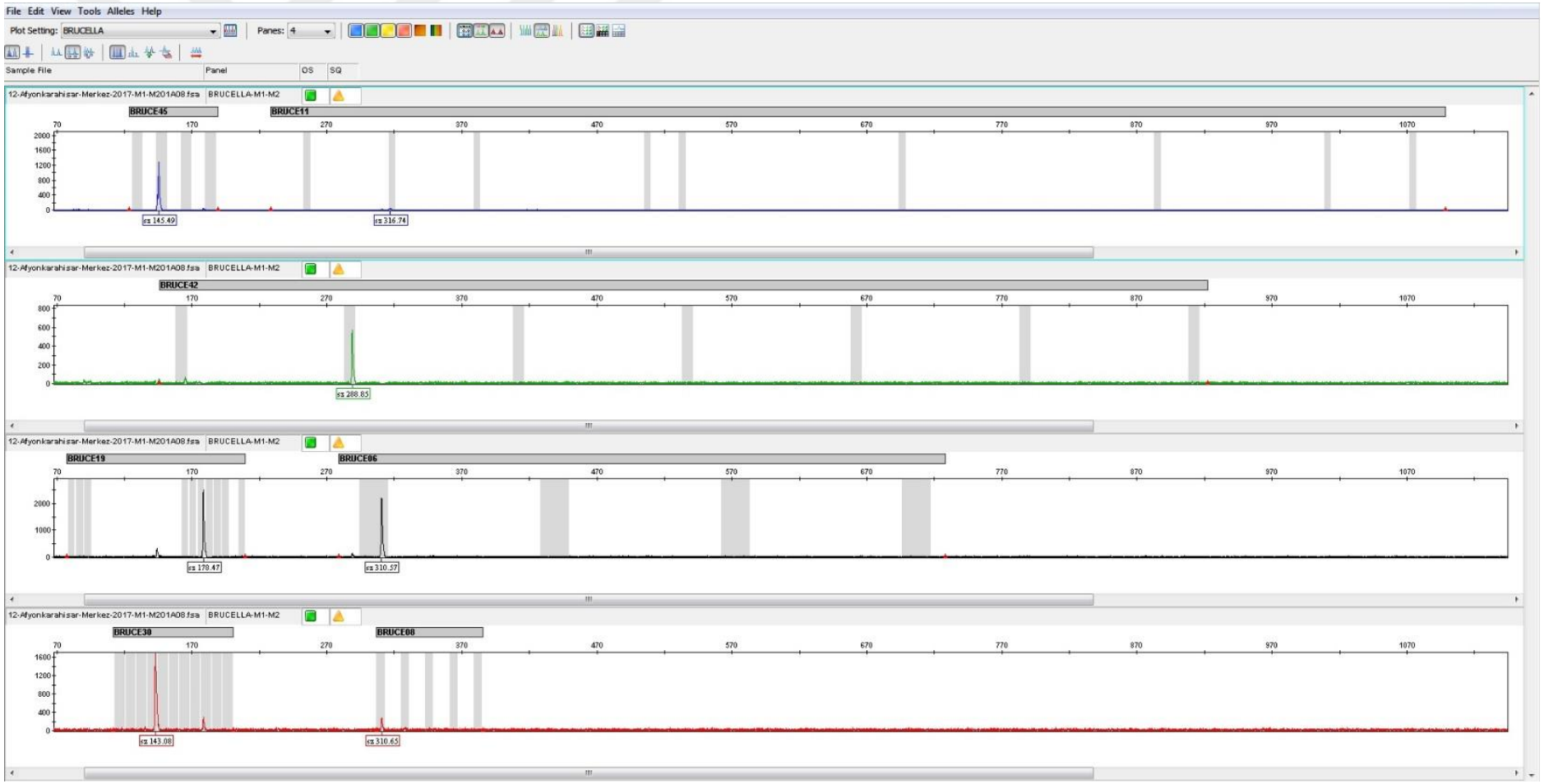
Şekil 3.5. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks 1 ve multipleks 2 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



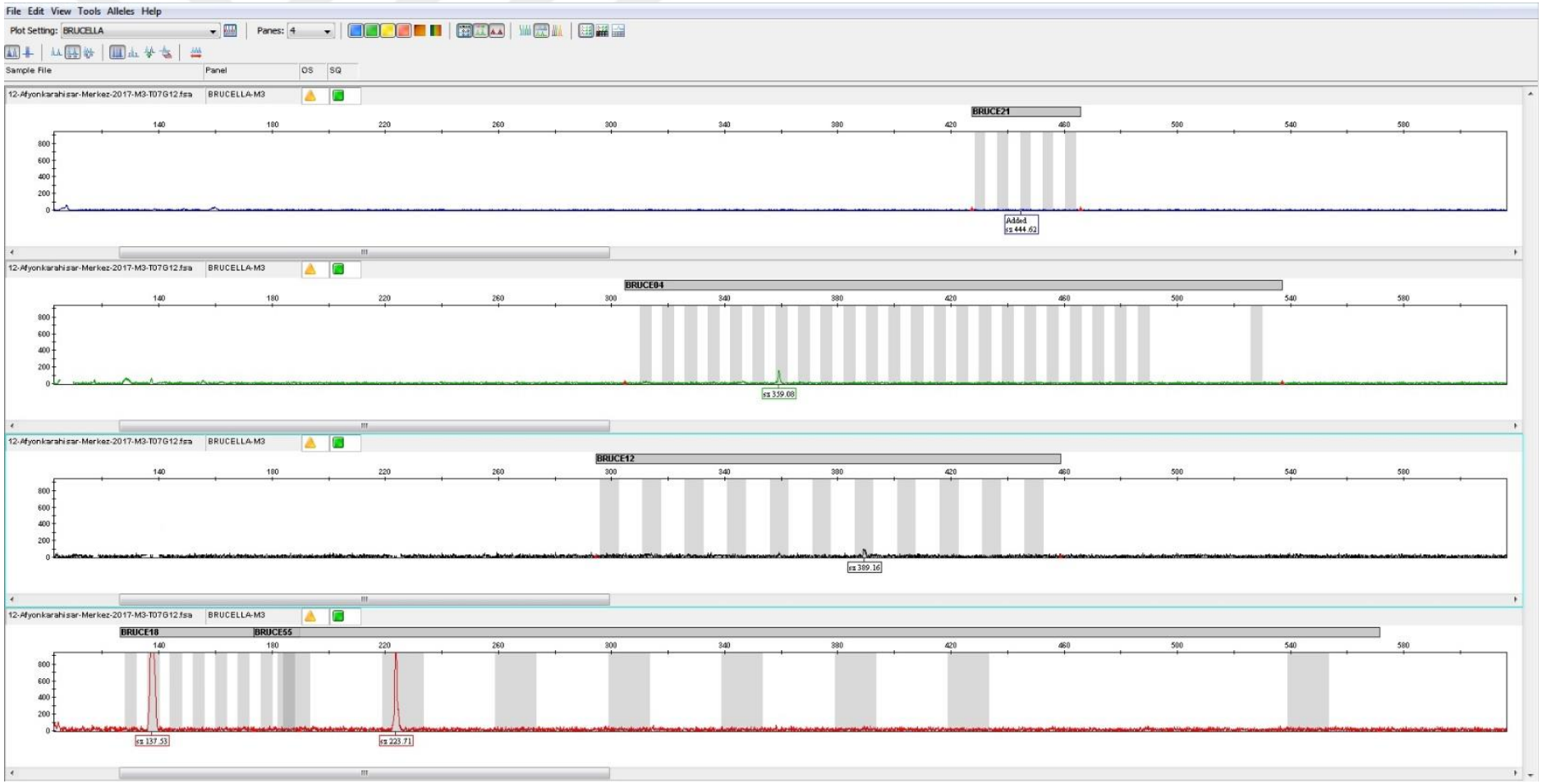
Şekil 3.6. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks 3 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



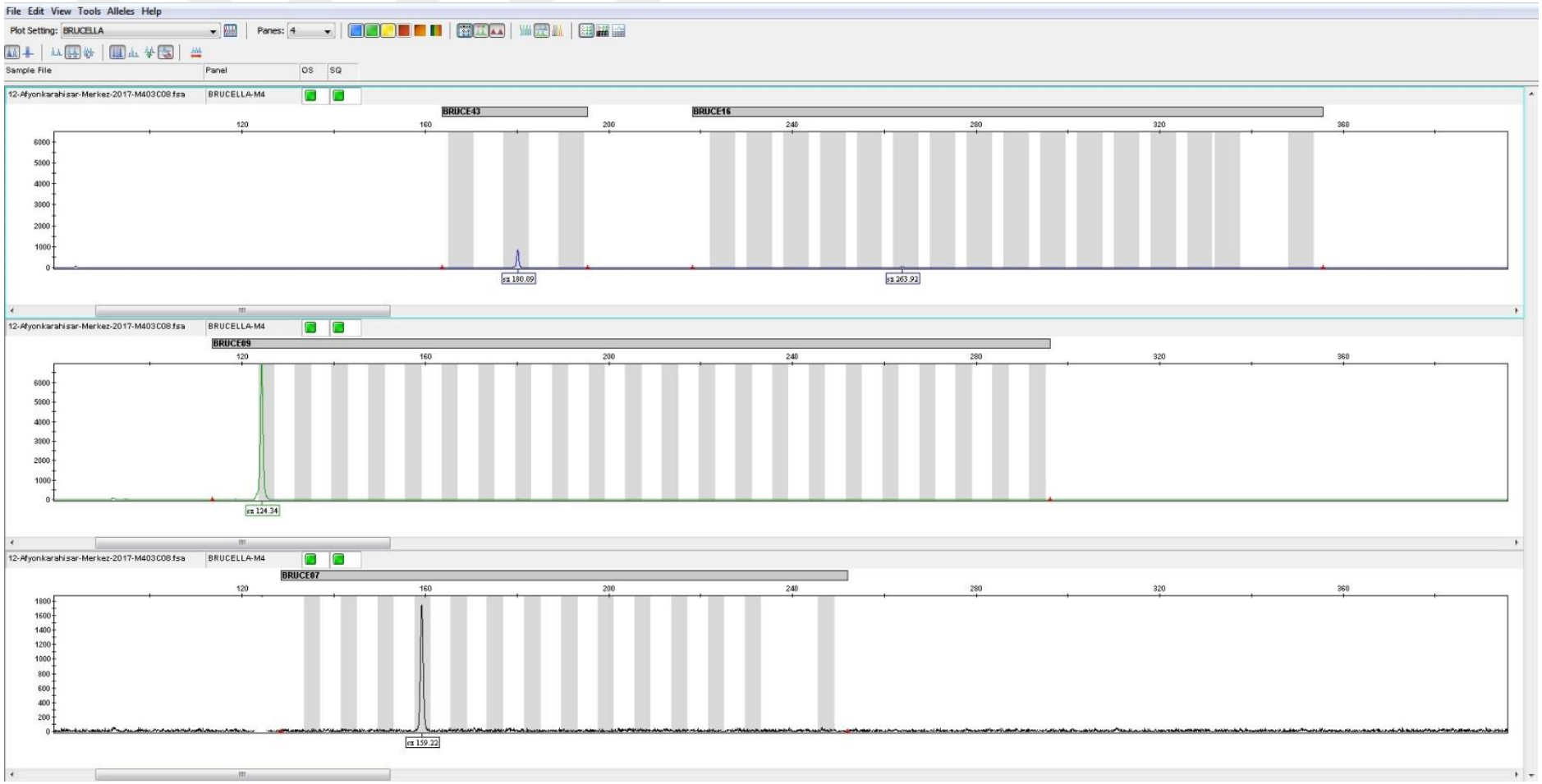
Şekil 3.7. Saha izolatı Kars-Arpaçay multipleks 4 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



Şekil 3.8. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez multipleks 1 ve multipleks 2 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



Şekil 3.9. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez multipleks 3 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü



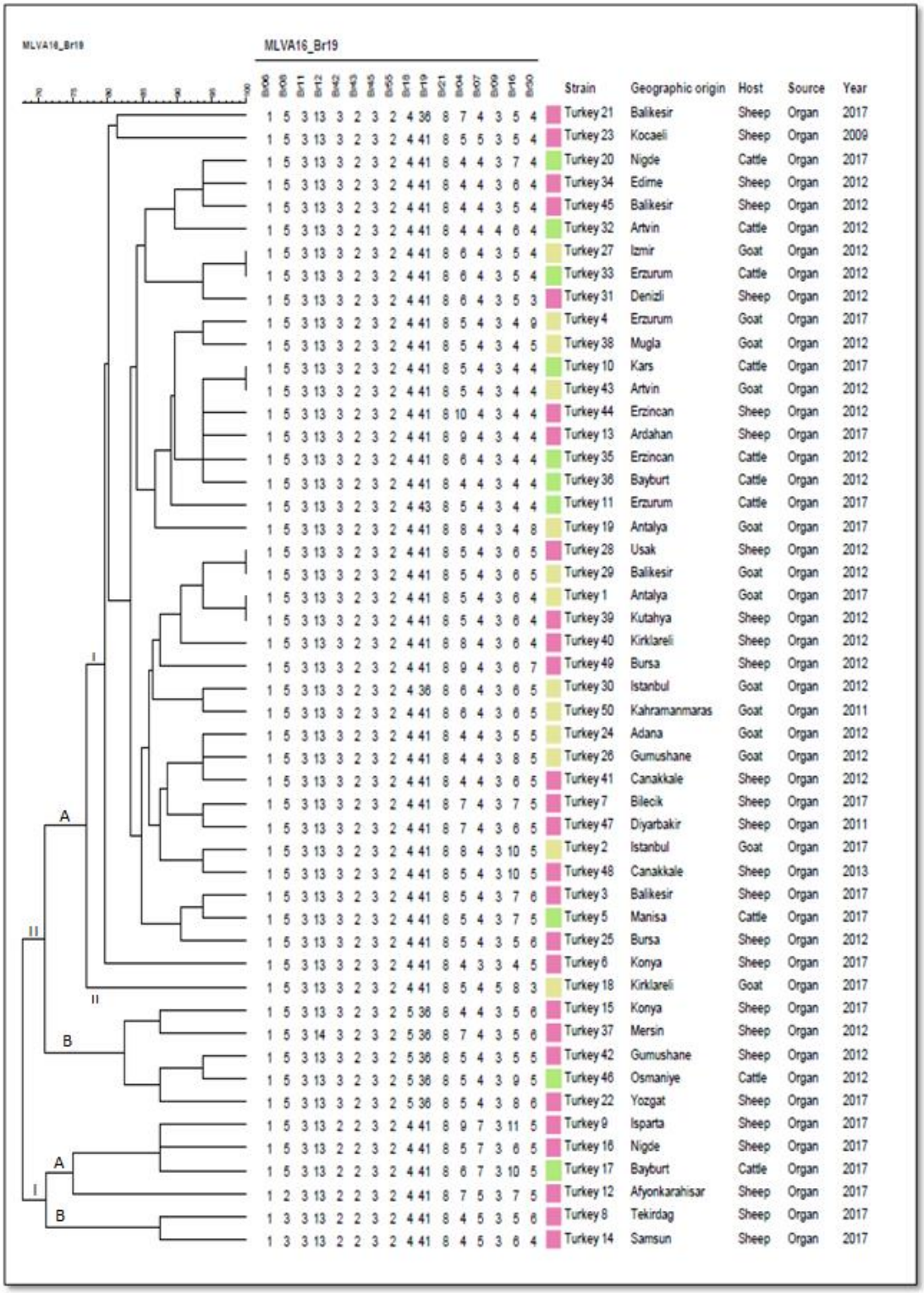
Şekil 3.10. Saha izolatı Afyohkarahisar-Merkez mültipleks 4 lokuslarına ait pikleri GeneMapper ekran görüntüsü

3.4. MLVA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

MLVA metot optimizasyonu işlemleri için referans suşlar kullanıldıktan sonra 50 adet saha izolatı analiz edildi.

Tüm veriler BioNumerics yazılım versiyonu 5.1 (Applied Maths, Sint-Martins-Latem, Belçika) kullanılarak Şekil 3.11'de görülen filogenetik ağaçta ilişkileri gösterildi. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) yöntemi ve izolatlar arasındaki ilişki bantlara dayalı "Dice" benzerlik katsayısına göre değerlendirildi ve dendrogram oluşturuldu.

MLVA16 metodu ile 46 farklı genotip tespiti yapıldı. İki farklı kümeden oluşan %68 oranında benzerliğin şekillendiği tespit edildi. Grup analiz sonuçlarına göre çalışma suşlarının temelde iki ana kola ayrıldığı tespit edildi. Grup I'nin 6 adet suştan (8, 9, 12, 14, 16, 17) ve Grup II'in 44 adet suştan (1-7, 10, 13, 15, 18-50) oluştuğu ve Grup I ve grup II'yi oluşturan suşların benzerliğinin %71 olduğu belirlendi. Grup I'i meydana getiren suşların %83,3'ünün 2017 yılı koyun suşu olduğu ve tüm keçi suşlarının grup II'de yer aldığı belirlendi. Grup II-B'nin benzerliği %83 olup 5 adet suştan (15, 22, 37, 42, 46) oluşmaktadır. Bayburt-Aydıntepe'ye ait olduğu 2012 ve 2017 yıllarına ait konakçısı sığır olan numuneler iki ayrı genotip profile sahip ayrıca iki farklı kümede yer almaktadır. Erzincan-Refahiye'ye ait 2012 yılı konakçısı koyun ve sığır izolatları aynı küme içerisinde yer almasına karşın farklı profil genotiplerine, Kırklareli-Merkez'e ait 2012 ve 2017 yıllarına ait konakçısı koyun ve keçi olan izolatların aynı kümede yer almasına karşın farklı profil genotiplere sahip oldukları belirlendi. Artvin-Şavşat'a ait 2012 yılına ait konakçısı sığır ve keçi olan izolatlar aynı küme içerisinde yer almasına karşın yine farklı profil genotiplerine sahiptirler. Ancak 2012 yılı Artvin-Şavşat konakçısı keçi izolatı ile 2017 yılı Kars-Arpaçay konakçısı sığır izolatı profil genotipleri birebir eşleştiği belirlendi. Yine aynı şekilde 2012 yılı Uşak-Ulubey konakçısı koyun izolat ile Balıkesir-Merkez konakçısı keçi izolatı birebir aynı profil genotiplerine, 2017 yılı Antalya-Korkuteli konakçısı keçi izolatı ile 2012 yılı Kütahya-Domaniç konakçısı koyun izolatları aynı profil genotipleri, 2012 yılı İzmir-Kemalpaşa konakçısı keçi izolatı ile Erzurum-Olur konakçısı sığır izolatları aynı profil genotiplerine sahip oldukları belirlendi. Sonuç olarak elde edilen filogenetik analiz sonuçlarına göre suşların konakçılarına, yıllarına, bölgeye göre ayrım yapılamadığı tespit edildi.



Şekil 3.11. Multilokus Variable Tandem Repeat Analiz ile çalışılan 50 adet saha izolatına ait dendogram analiz sonuçları

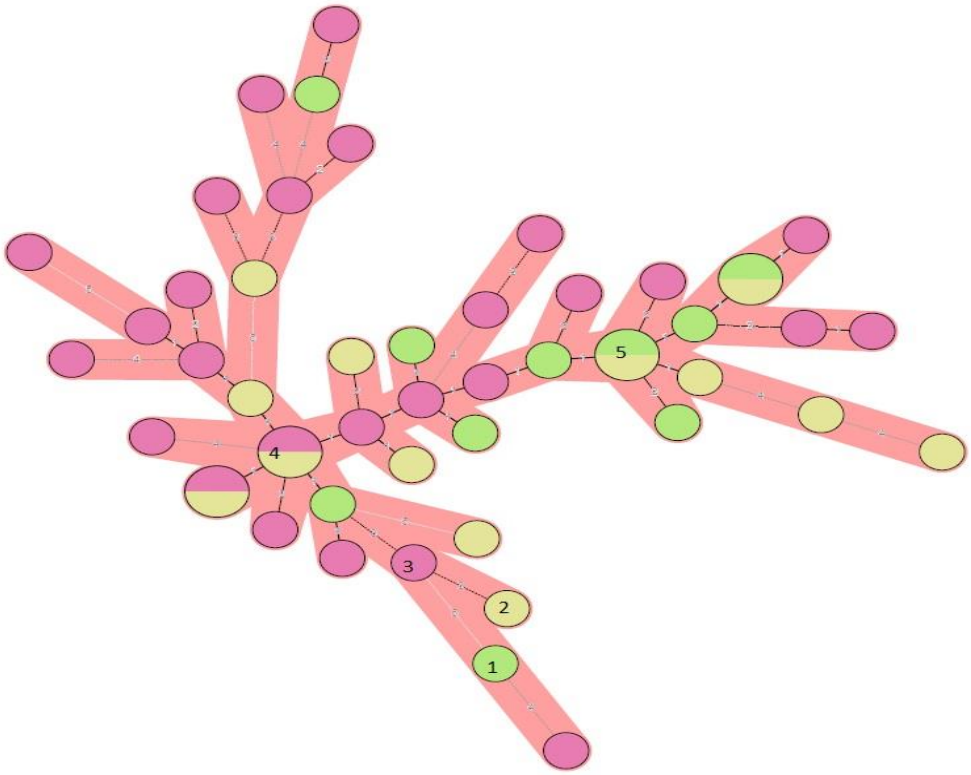
*Brucella*v4_5 MLVA veritabanında yapılan MLVA8 (Panel1)'e göre değerlendirmede 5 farklı genotip tespit edildi. Çalışılan 50 adet izolatın 43 adeti genotip 43 (%86), 3 adeti genotip 42 (%6), 2 adeti genotip 62 (%4), 1 adeti genotip 61 (%2) ve 1 adedide daha önce tesbit edilememiş bir genotipe (1-2-3-13-2-2-3-2)

(%2) ait olduğu belirlendi. MLVA8 değerlendirmesine göre Türkiyede hâkim genotipin 43 olduğu belirlendi.

Brucella MLVA veritabanında yapılan MLVA11 (Panel1 ve Panel 2A) değerlendirmesine göre, 8 farklı genotip bulundu. Bunlar sırasıyla 103,104,114,116,121,122,125 ve daha önce tanımlanmamış bir genotip olduğu tespit edildi. Çalışmada kullanılan 50 adet izolattan 1 adeti genotip 103 (%2), 4 adeti genotip 104 (%8), 2 adeti genotip 114 (%4), 3 adeti genotip 116 (%6), 2 adeti genotip 121 (%4), 1 adeti genotip 122 (%2), 36 adeti genotip 125 (%72) ve 1 adeti de daha önce tespit edilemeyen genotipe (1-2-3-13-2-2-3-2-4-41-8) (%2) ait olduğu saptandı. Çalışma izolatlarının %72'si genotip 125'e ait olduğu tespit edildi. MLVA11 değerlendirmesine göre Türkiyede hâkim genotipin 125 olduğu belirlendi.

Ayrıca *Brucella*v4_5 veritabanı MLVA16 (Panel1+Panel2A ve 2B) için yapılan aramasında 50 adet izolatın 30 adedinin veritabanında birebir eşleştiği tespit edilmiştir. Geri kalan 20 adet izolat veritabanında herhangi genotiple eşleşmemiş ve yeni genotip olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen 46 adet farklı genotipin konakçılara göre aralarındaki ilişkiyi gösteren dendogram Şekil 3.12'da görülmektedir. Yeşil renkteki 1 numara sığıra, sarı renk 2 numara keçiye, pembe renk 3 numara koyuna, sarı-pembe renk 4 numara keçi-koyuna, sarı-yeşil renk 5 numara keçi-sığır genotiplerine aittir. Etkenin koyun-keçi, keçi-sığır konakçıları içerisinde geçişleri görülmektedir. Bu genotiplerin yakınlıkları tespit edilmiştir.



Şekil 3.12. MLVA'ya göre genotiplerin yakınlık ilişkileri. Genotiplerin konakçı ilişkilerini göstermek adına kullanılan program ile farklı renklendirmeler yapılmıştır 1: sığır 2: keçi 3: koyun 4: keçi-koyun 5: keçi-sığır

MLVA ile çalışma izolatlarının ortalama HGDI değeri 0,9572 olarak hesaplandı. Buna göre Panel1'deki Bruce06, Bruce11, Bruce43, Bruce45 lokusları ve Panel 2A' daki Bruce21 lokusunun oldukça homojen olduğu ve çeşitliliğinin olmadığı görüldü. Panel1 de Bruce 08 (0,68), Bruce12 (0,68), Bruce42 (0,6), Bruce55 (0,66) lokusların ayrıca Panel2A'da Bruce18 (0,55), Bruce19 (0,67) ve Panel2B' de Bruce04 (0,86), Bruce07 (0,76), Bruce09 (0,71), Bruce16 (0,88), Bruce30 (0,86) tüm lokusların tekrar sayılarının farklı olduğu ve genetik olarak çeşitliliğe sebep olan lokuslar olduğu belirlenmiştir. MLVA16' da Panel 2B'de yer alan lokusların ayırt edici güçlerinin diğer panellere oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. HGDI değerlerinin 0,55 ile 0,88 arasında değiştiği, ama en ayırt edici lokusun Bruce16 (HGDI=0,88) olduğu, sonra onu Bruce04 (HGDI=0,86) ve Bruce30'un (HGDI=0,86) takip ettiği belirlendi (Çizelge 3.3).

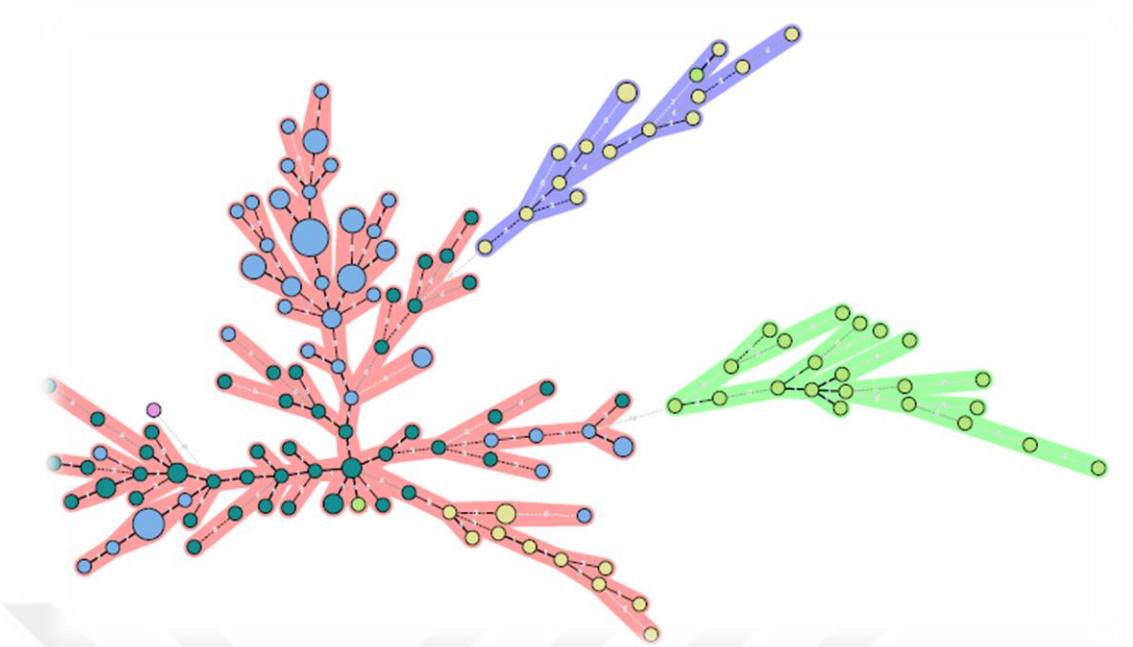
Çizelge 3.3. MLVA-16 sonucunda toplam 50 adet *Brucella melitensis* izolatının allel (tekrar) durumları ve HGDI değerleri

No	Panel	Lokus	Allel Sayisi	Tekrar Sayisi	HGDI*
1	Panel1	Bruce06	1	1 (50)	0
2		Bruce08	3	2(1),3(2),5(47)	0,68
3		Bruce11	1	3(50)	0
4		Bruce12	3	12(1),13(48),14(1)	0,68
5		Bruce42	2	3(43),2(7)	0,6
6		Bruce43	1	2(50)	0
7		Bruce45	1	3(50)	0
8		Bruce55	2	1(1),2(49)	0,66
9	Panel2A	Bruce18	2	4(45),5(5)	0,55
10		Bruce19	3	36(7),41(42),43(1)	0,67
11		Bruce21	1	8(50)	0
12	Panel2B	Bruce04	7	4(12),5(19),6(7),7(5),8(3),9(3),10(1)	0,86
13		Bruce07	4	3(1),4(42),5(4),7(3)	0,76
14		Bruce09	3	3(48),4(1),5(1)	0,71
15		Bruce16	9	3(1),4(11),5(12),6(13),7(5),8(3),9(1),10(3),11(1)	0,88
16		Bruce30	7	3(3),4(18),5(20),6(6),7(1),8(1),9(1)	0,86
		Toplam**	46		0,9572

*HGDI: Hunter-Gaston diversity index.

Yapılan MLVA8 (Panel1) ve MLVA11 (Panel1 ve Panel2A) değerlendirmelerinde farklı genotiplerin olmasının sebebi bu lokuslardaki değişik tekrar sayılarından (varyantlardan) kaynaklanmıştır. MLVA16 değerlendirmesinde 50 suştan 46 farklı genotip eldesi ise Panel2B'de mevcut çeşitlilikle alakalı olduğu görüldü.

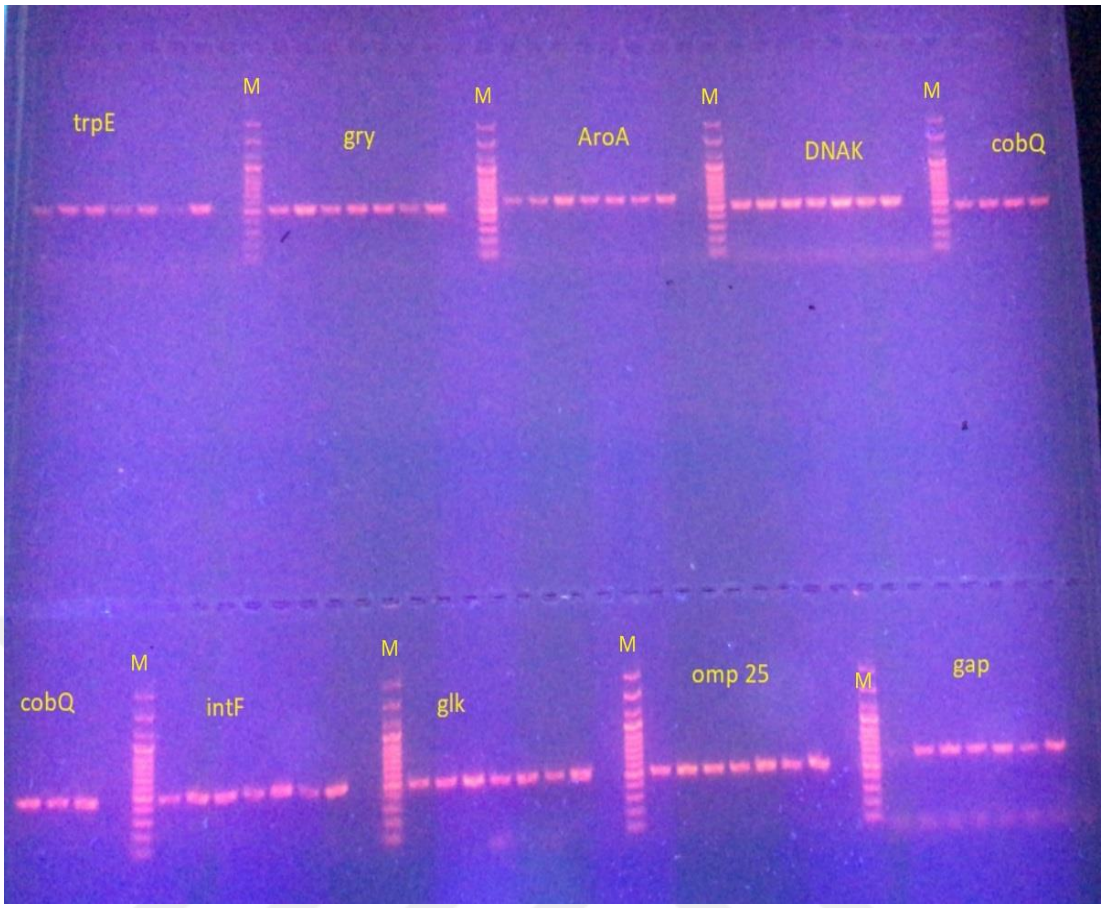
Bionumerics software ile Akdeniz ülkeleri içerisinde yer alan ve MLVA ile tiplendirme yapılarak veri sağlanan önceki çalışma sonuçları (Wareth ve ark 2020) ile ülkemiz izolatlarının benzerliğinin değerlendirildiğinde, Yunanistan ve bazı Portekiz izolatları ile genetik olarak yakın ilişkili olduğu ancak İtalya, Tunus ve Mısır izolatları ile yakınlıklarının bulunmadığı tespit edildi. İzolatlar arası bu ilişki Şekil 3.13'de gösterilmektedir.



Şekil 3.13. Çalışma izolatlarının Akdeniz izolatları arasındaki genotiplerin ilişkilerinin belirlenmesi. İzolatların kökenlerini belirtmek adına kullanılan program ile farklı renklendirmeler yapılmıştır. Koyu yeşil: Türkiye, Mavi: Yunanistan, Açık yeşil: İtalya, Pembe: Tunus, Sarı renk: Portekiz

3.5. MLST Metodundaki PZR Ürünlerinin Doğrulanması Sonuçları

Referans ve saha suşlarından toplam 54 adet çalışma numunelerinden PZR ürünleri elde edildi. Elde edilen PZR ürünleri analiz için sekansa gönderilmeden önce primerlerin çalıştığını ve PZR ürün aşamasında protokolün düzgün olarak çalıştığını gösterebilmek adına jel görüntülemesi gerçekleştirildi. Jel görüntüleri beğenilmeyen ya da gerçekleşmeyen PZR ürünlerin PZR aşamalarından itibaren çalışma tekrarlandı. Şekil 3.14'de Referans16M (*B. melitensis* bt1)' e ait 9 adet gen bölgesine (trpE, gyr, aroA, dnaK, cobQ, int-hyp, glk, omp25, gap) ait PZR ürünleri MLST analizinde değerlendirmeye alındı.



Şekil 3.14. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: Marker, trpE: 486 bp, gry: 469 bp, aroA: 565 bp, dnaK: 470 bp, cobQ: 422 bp, intF: 430 bp, glk: 475, omp25: 490, gap: 589 bp

3.6. MLST Metodu için Sekans Veri Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Referans suşlar, saha izolatlarının sonuçlarını doğrulamak için kullanılmış olup, tüm gen bölgelerine ait sekans analizleri veritabanına yüklendiğinde elde edilen allel (tekrar) sayılarının uyumlu olduğu görüldü. Sekanstan gelen ham veri dataları okunma işlemleri gerçekleştirilmiş ve her gen bölgesine ait consensuslar elde edilmiştir. Fasta formatındaki veriler veritabanına yüklenerek gen bölgelerine karşılık gelen tekrar (allel) sayıları belirlendi. Her suşa ait gen bölgelerinin allel profilleri veritabanına karşılık gelen ST değerleri saptandı. Saha ve referans izolatlara ait tekrar(allel) sayıları ve ST değerleri Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Multilocus Sequence Typing tüm genlerin allel numaraları ve Sequence Typing değerleri

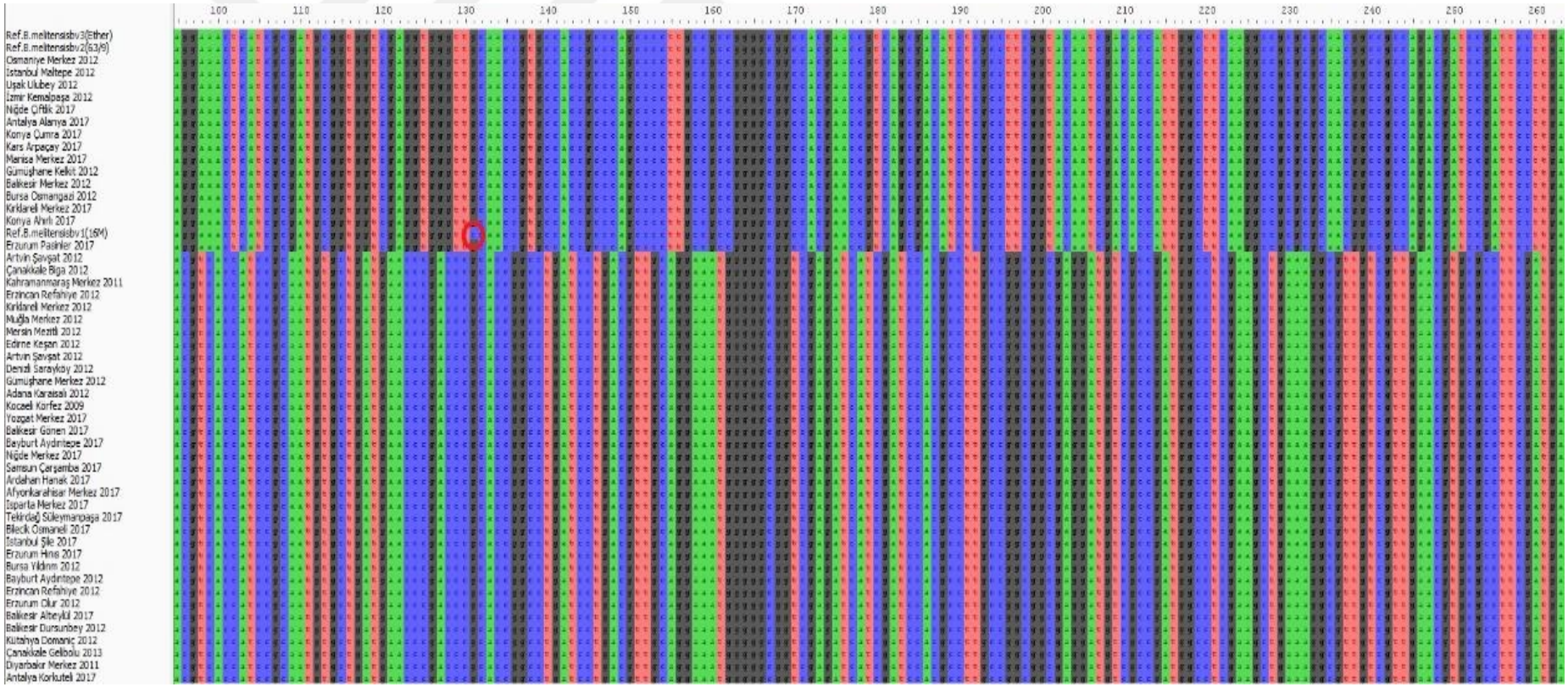
İzolatlar	Gap	aroA	Glk	dnaK	gyrB	trpE	cobQ	int_hyp	omp25	ST
1	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
2	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
3	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
4	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
5	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
6	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
7	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
8	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
9	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
10	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
11	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
12	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
13	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
14	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
15	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
16	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
17	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
18	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
19	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
20	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
21	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
22	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
23	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
24	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
25	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
26	3	2	35	2	1	5	3	2	8	Yeni
27	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
28	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
29	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
30	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
31	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
32	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni

Çizelge 3.4 (Devamı). Multilocus Sequence Typing tüm genlerin allel numaraları ve Sequence Typing değerleri

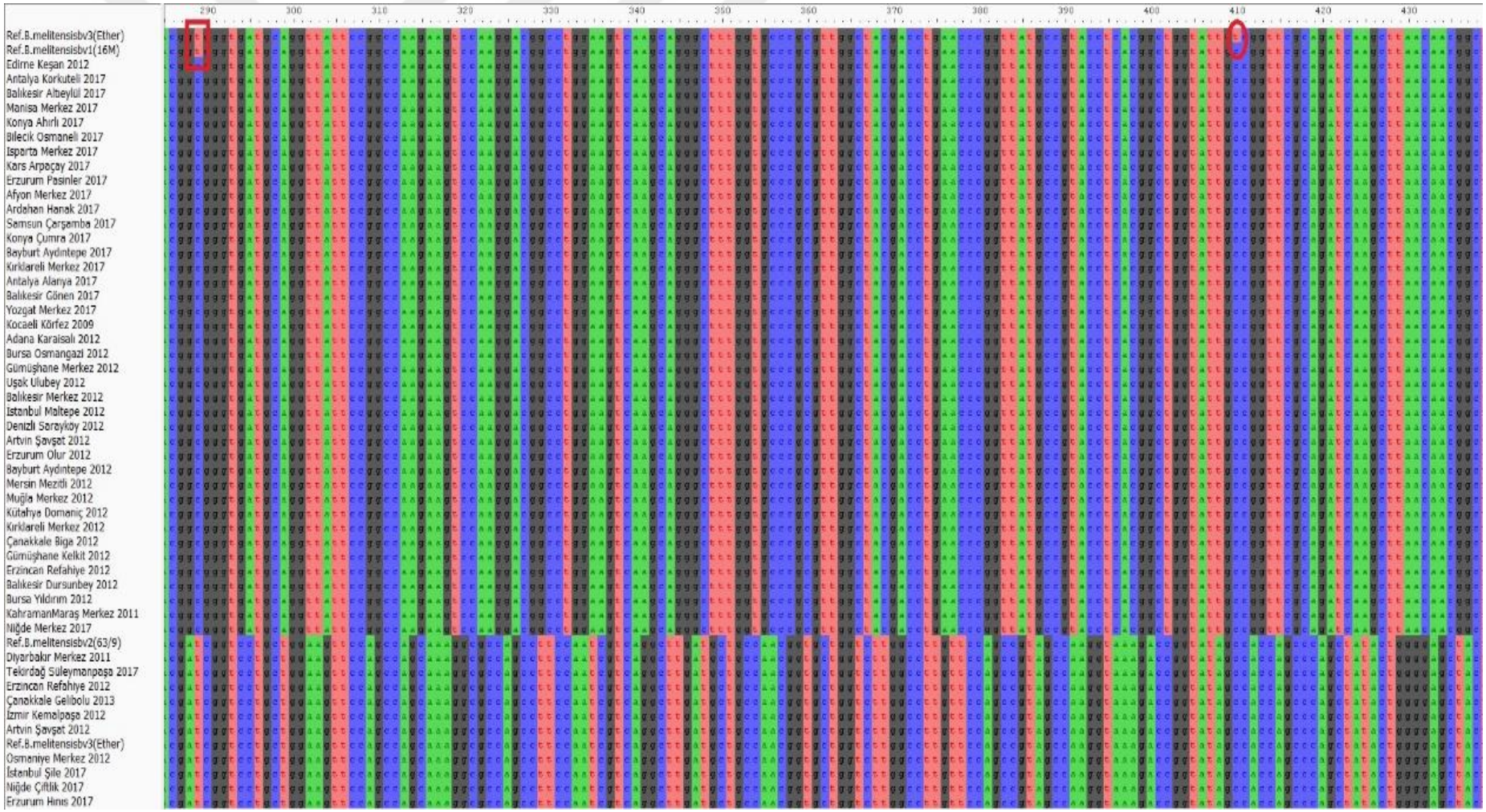
İzolatlar	Gap	aroA	Glk	dnaK	gyrB	trpE	cobQ	int_hyp	omp25	ST
34	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
35	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
36	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
37	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
38	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
39	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
40	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
41	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
42	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
43	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
44	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
45	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
46	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
47	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
48	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
49	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
50	3	2	**35**	2	1	5	3	2	8	Yeni
51(Rev-1)	3	**5**	3	2	1	5	**2**	2	**10**	7 (REV-1)
52(Referans)	3	**5**	3	2	1	5	**2**	2	**10**	7 (16M)
53(Referans)	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8 (63/9)
54(Referans)	3	2	3	2	1	5	3	2	**9**	9 (ETHER)

Aşı suşu Rev-1 ST7, *B. melitensis* bt1 (16M) ST7, *B. melitensis* bt2 (63/9) ST8, *B. melitensis* bt3 (Ether suşu) ST9 olarak bulunmuştur. Bu sonuçların veritabanı ile uyumlu oldukları saptandıktan sonra saha suşları çalışılmış ve tablodaki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlara göre Türkiyede hâkim genotip ST8 (3-2-3-2-1-5-3-2-8) olup, bu genotip dışında daha önce raporlanmamış, yeni genotip (3-2-35-2-1-5-3-2-8) tespiti de gerçekleşmiştir. Saha suşları arasındaki iki farklı genotip, MLST analizinde kullanılan tüm gen bölgeleri glk hariç (gap, aroA, dnaK, gyrB, trpE, cobQ, int-hyp ve omp25) kalan 8 gen bölgesinin de birbirleriyle homojen oldukları görülmüştür. Glk gen bölgesinin ise hâkim olan ST8'deki tekrar sayısının 3 olduğu yeni olarak tespit edilen genotipin tekrar sayısının 35 olarak belirlenmiş olup bu gen bölgesinden

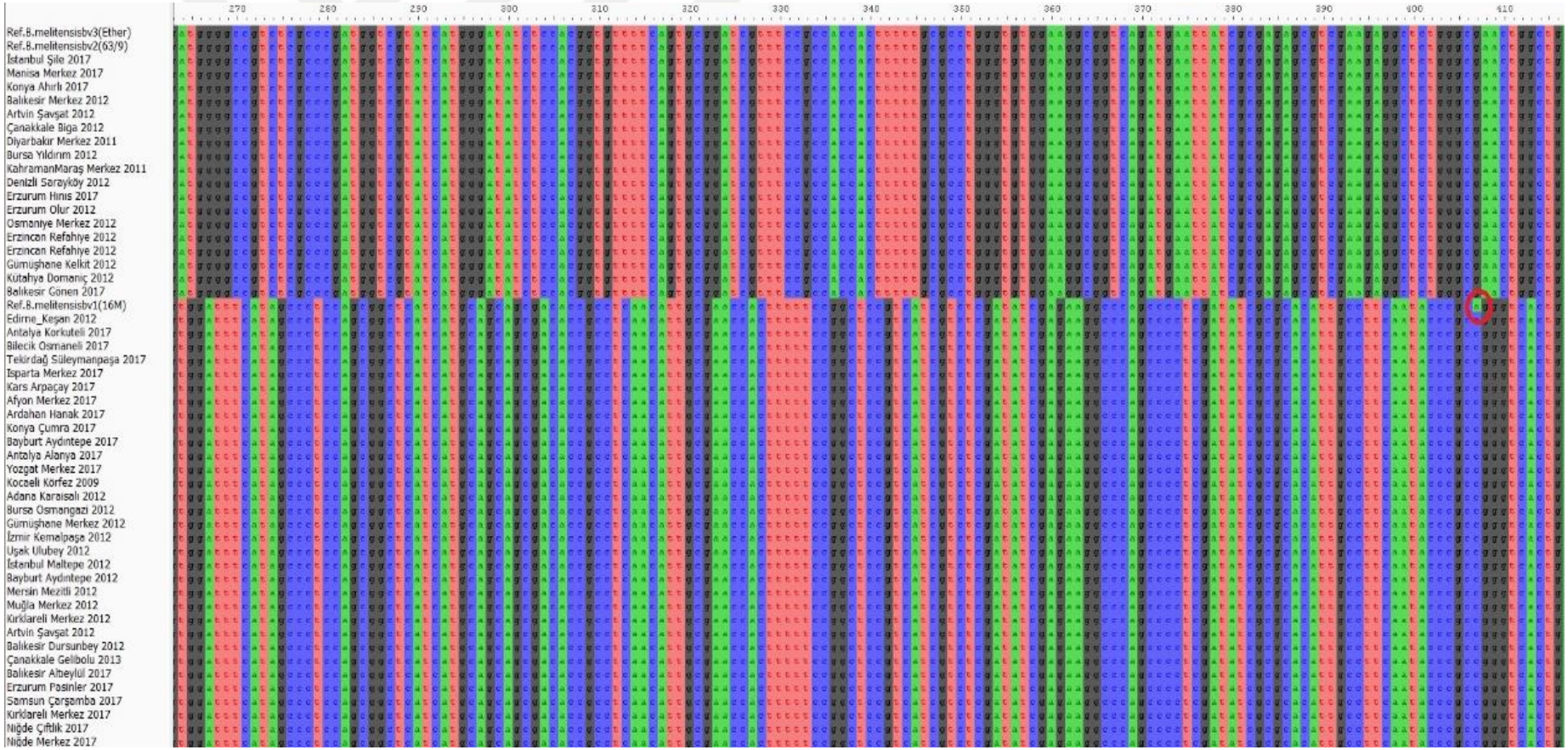
kaynaklanan varyasyondan dolayı olduğu görülmektedir. Aşı suşu *B. melitensis* Rev-1 suşunun genetik profili ise ST7 olarak bulunmuştur. Bu durum saha suşları ile aşı suşu arasındaki farkı ortaya koymaktadır. Saha izolatları ile referans izolatlar arası farklı alleller Çizelge 3.4'te bolt ile gösterilmiş olup, Şekil 3.15' aroA, Şekil3. 16'da omp25, Şekil 3.17'de cobQ, Şekil 3.18'te glk gen bölgelerine ait sekans verilerinin farklılaşma sebepleri gösterilmektedir. Şekil 3.19'da trpE, Şekil 3.20'de dnaK, Şekil 3.21'de gap, Şekil 3.22'de gyrB ve Şekil 3.23'te int-hyp gen bölgelerine ait sekans verileri ve genetik olarak mutasyon olmadığı gösterildi.



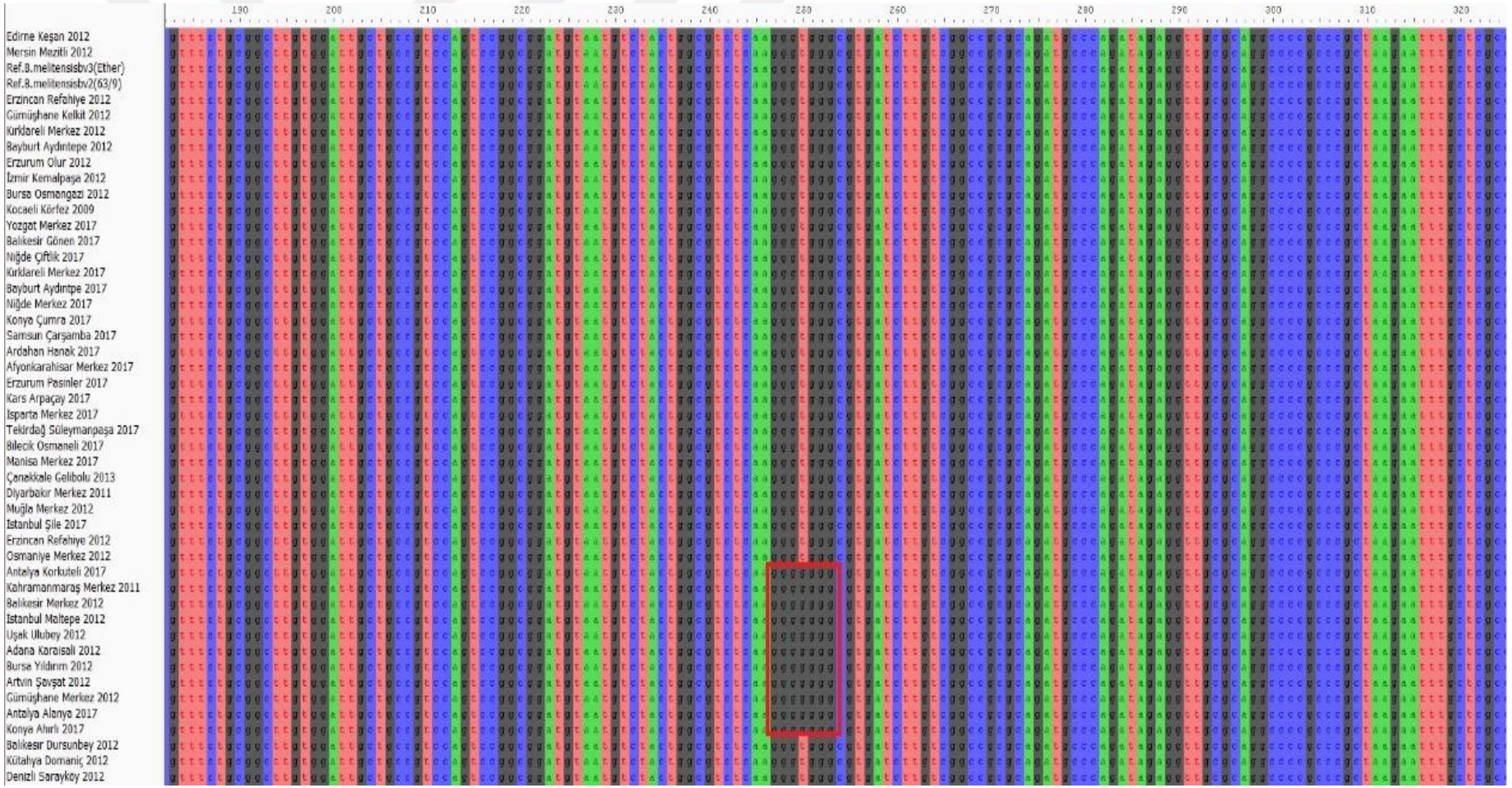
Şekil 3.15. aroA gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



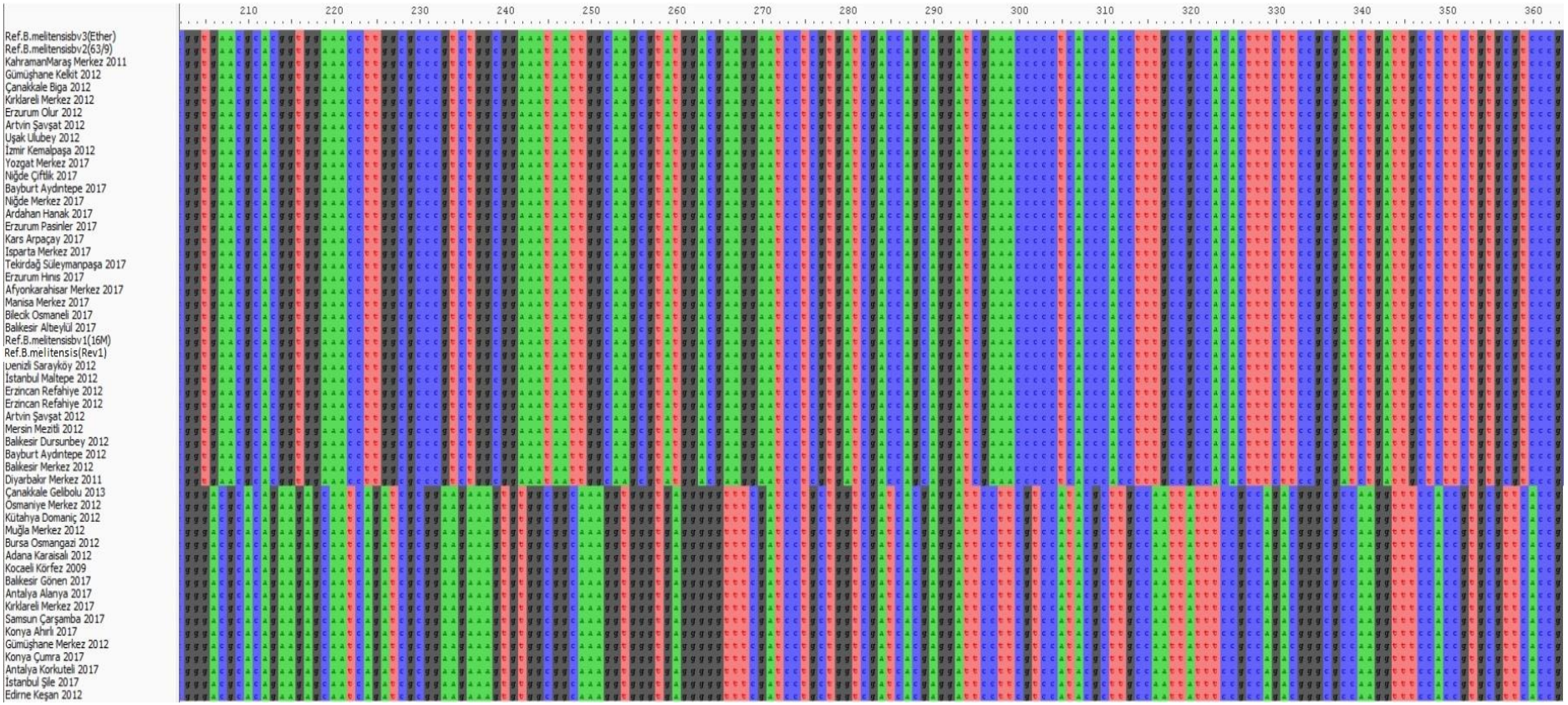
Şekil 3.16. omp25 gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



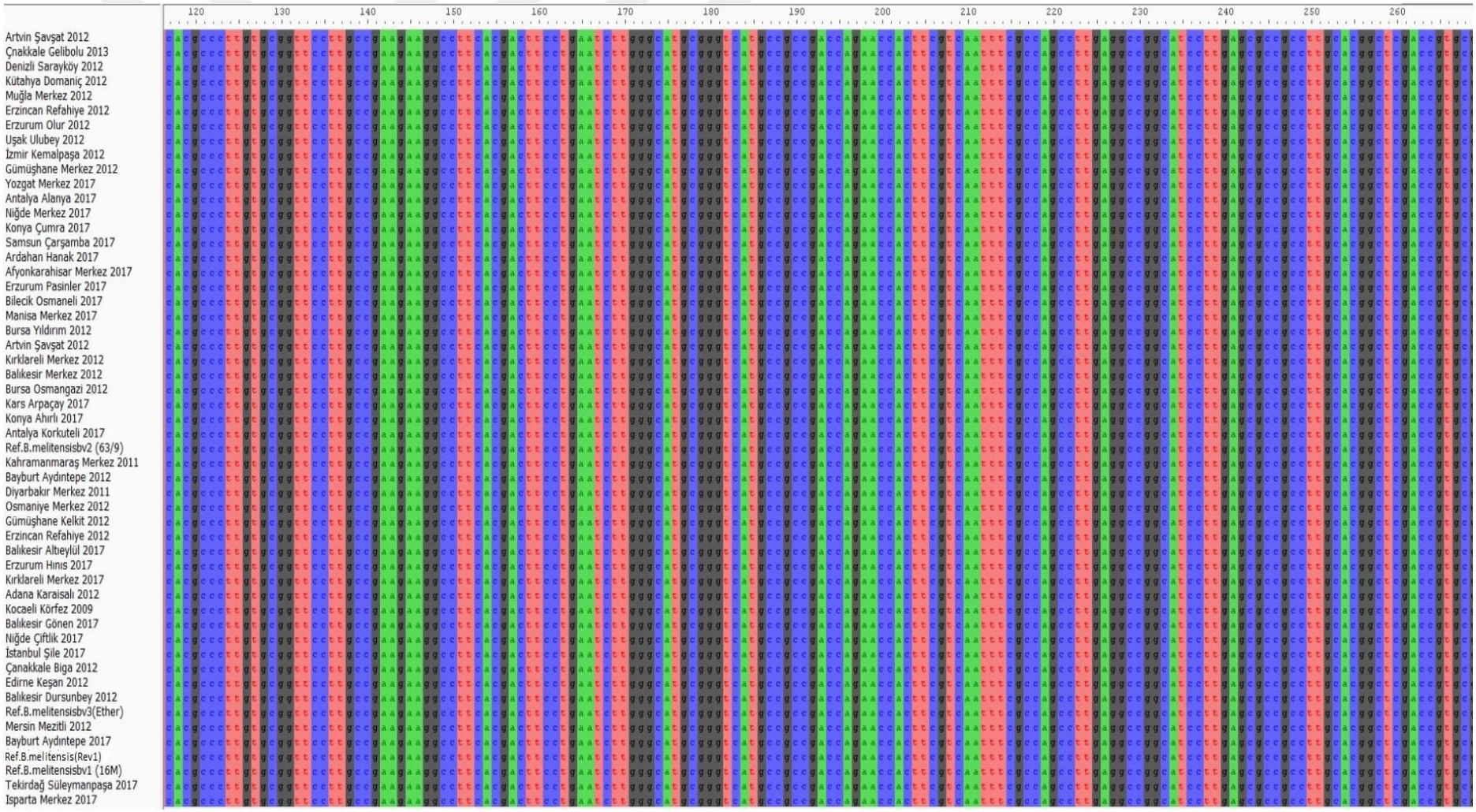
Şekil 3.17. cobQ gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



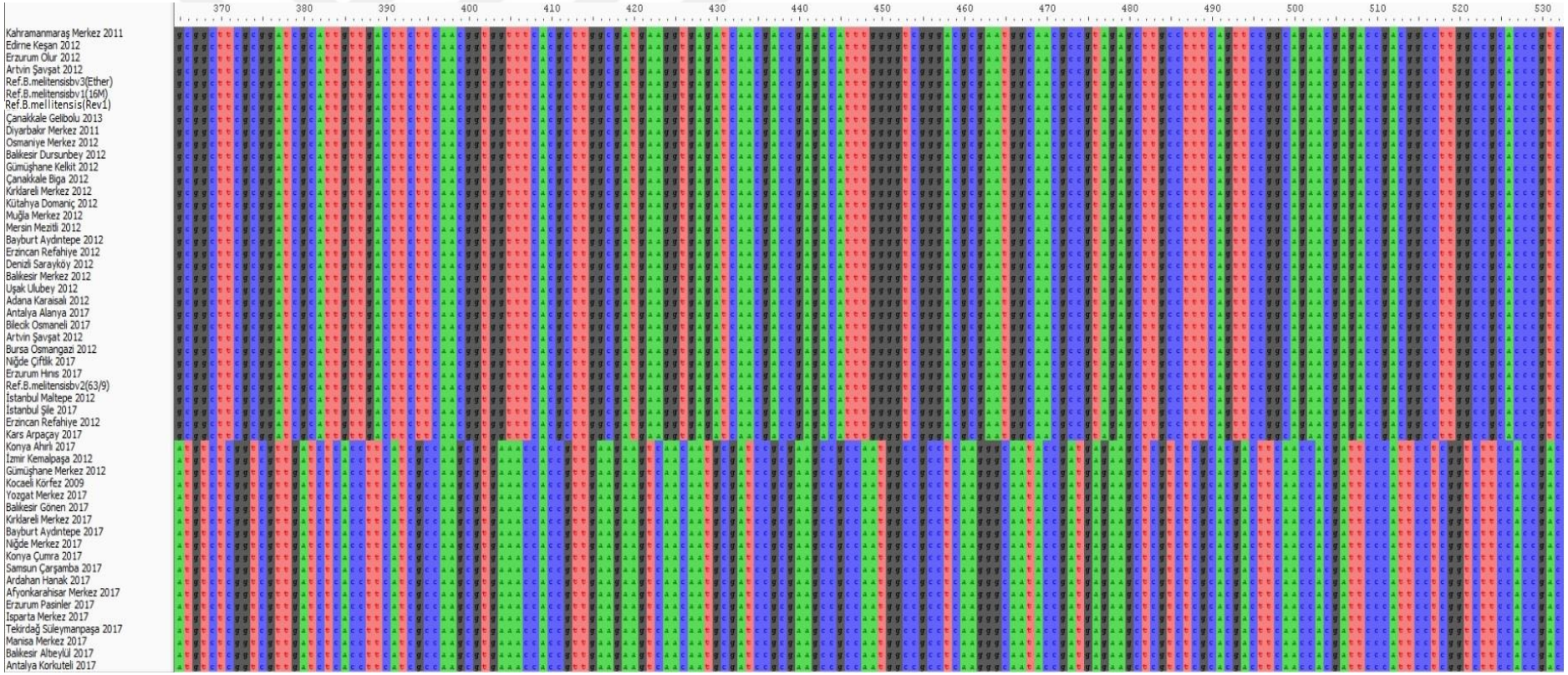
Şekil 3.18. glk gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



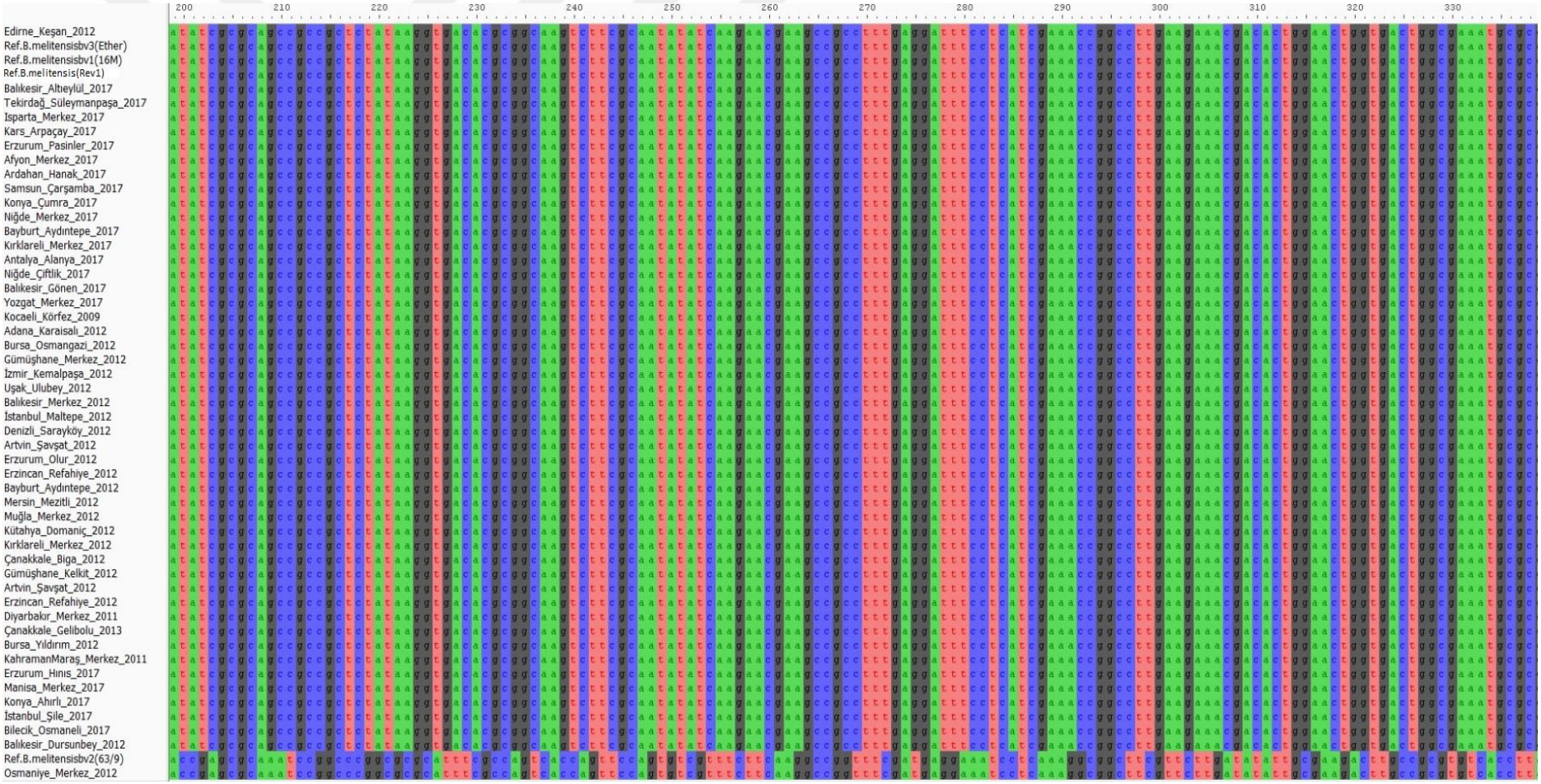
Şekil 3.19. trpE gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



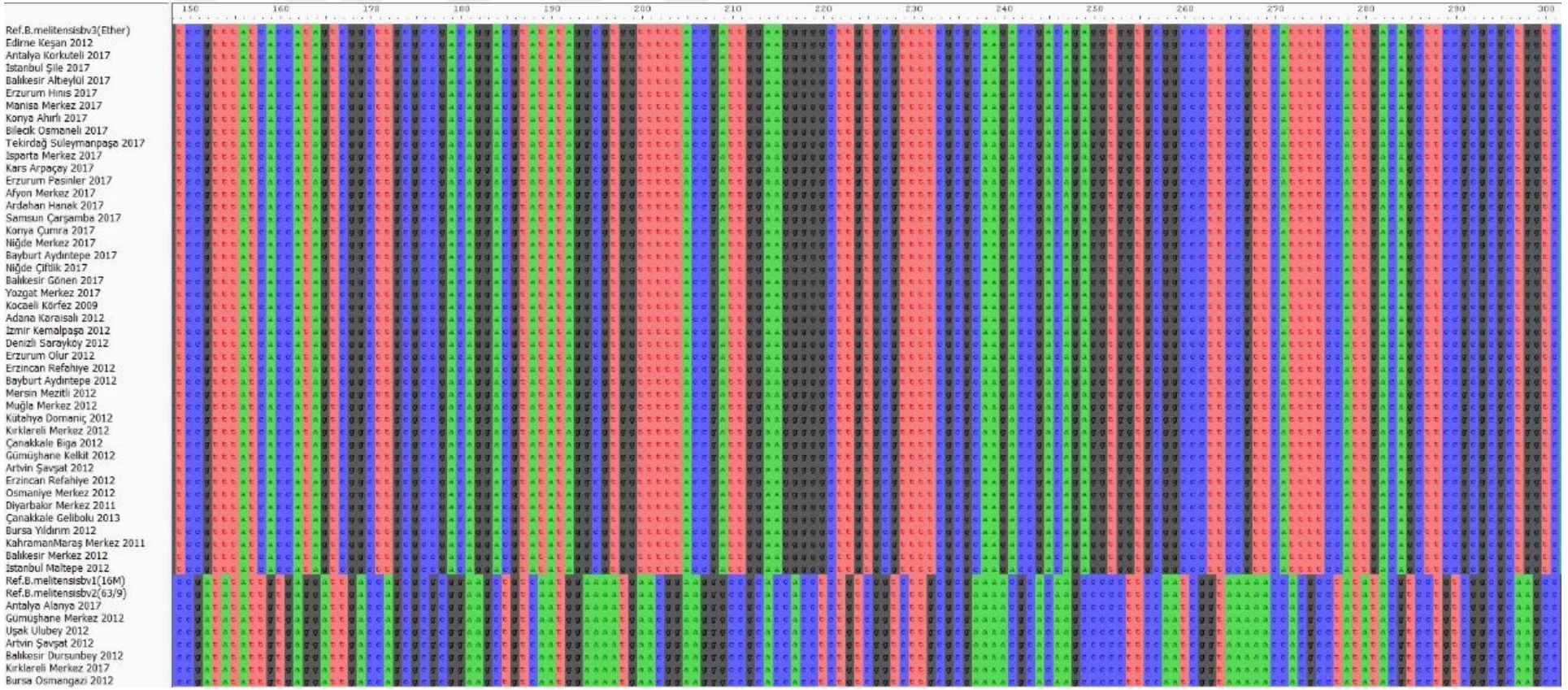
Şekil 3.20. dnaK gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



Şekil 3.21. gap gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



Şekil 3.22. gyrB gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü



Şekil 3.23. int-hyp gen bölgesine ait sekans verilerin görünümü

3.7. MLST Metodundaki Değerlendirme Sonuçları

Tüm biyovarlara ait izolatlar ST8 (3-2-3-2-1-5-3-2-8)'e ait olduğu görüldü. Yeni olarak belirlenen genotipe (3-2-35-2-1-5-3-2-8) ait spesifik biyovar ayrımı yapılamadı. Çalışılan izolatların 39 adedinin (%78) ST8'e ait olduğu, 11 adedinin (%22) ise veritabanında herhangi bir genotip ile eşleşmemiş ve yeni genotip olarak isimlendirilmiştir. Çalışılan izolatlara ait yıllar (2009-2017) göz önünde bulundurularak yapılan değerlendirme sonucu; profillerin değişmediği tespit edildi. Veritabanından alınan Çizelge 3.5'te Türkiye'ye ait suşların farklı yıllardaki insan ve koyun suşuna ait ve tamamının ST8 olduğu belirlenmiştir. Bu durum bu çalışma ile örtüşmektedir.

Çizelge 3.5. Veritabanında Türkiye'ye ait izolatların Multilocus Sequence Typing değerleri (pubmlst.org)

Konakçı	Biyovar	Yıl	gap	aroA	glk	dnaK	gyrB	trpE	cobQ	int_hyp	omp25	ST (MLST)
Bilinmeyen	3	2005	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
Koyun	3	1965	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
İnsan	2	2001	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
İnsan	3	2007	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
İnsan	3	2011	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
İnsan		2007	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8
İnsan		2014	3	2	3	2	1	5	3	2	8	8

Yapılan MLST analizi neticesinde incelenen izolatların *Brucella*'ya ait oldukları belirlendi ve hâkim olan genotip tespiti yapıldı. Yapılacak olası filogenetik analiz sadece iki koldan oluşacağı için herhangi bir filogenetik ağaç oluşturulmadı.

4.TARTIŞMA

MLST ve MLVA metotları, salgın yapan suş kaynaklarının belirlenmesi ve bu suşların kökenlerine ışık tutulmasını amaçlamaktadır. Ayrıca hastalığın görüldüğü bölgelerdeki genotiplerin tespit edilmesi, hayvan ve insanlar arasındaki etken sirkülasyonunun izlenebilmesi, tedavi veya eradikasyon için hazırlanacak aşıda hâkim genotipin seçilmesi gibi avantajları vardır (Vergnaud ve ark 2018). *Brucella* türleri arasındaki yüksek DNA homolojisi ve alt tiplendirme metotlarının sınırlı ayrım yapması, hastalığın epidemiyolojik kökeninin araştırılmasını ve *Brucella* izolatlarının alt tiplendirmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle MLST ve MLVA gibi genetik profilleri ortaya koyan metotlar, araştırmacılar tarafından daha çok tercih edilmektedir. Bu amaçla birçok çalışma, genetik profil prensibini hedef alarak yürütülmektedir. MLVA analizinin kullanıldığı bir diğer alan da aşıların genetik stabilitelerinin kontrolüdür. MLVA16 analizi ile çok küçük genomik varyasyonları saptamak mümkün olduğundan sahada kullanılan aşıların genetik stabilitelerini kontrol etmek mümkündür (Garcia-Yoldi ve ark 2007, Dorneles ve ark 2013). Genetik çeşitliliğin olmaması veya çok az olması aşının genetik olarak stabil olduğunun kanıtı olarak kabul edilebilir. MLVA16 analizinin bu özelliğine dayanarak, Garcia-Yoldi ve ark (2007) ve Dorneles ve ark (2013), *B. melitensis* Rev-1 ve *B. abortus* S-19, RB51 aşı suşlarının stabilitesini kontrol etmişlerdir. Her iki çalışmada da aşı suşları arasında çalışmaya ait gen bölgelerinde değişken varyant tespit edilmemiş ve aşıların stabil oldukları ortaya konmuştur. Çalışma sonunda, MLVA16 analizinin resmi olarak aşıları kontrol eden test metodları arasına girmesi gerektiği önerisinde bulunmuşlardır.

Bu çalışmada *B. melitensis* izolatlarının MLST ve MLVA yöntemleriyle genetik profilleri değerlendirilmesi amaçlandı. Bu analizlerden elde edilen sonuçlar, bölgede hâkim olan genotiplerin belirlenmesi, ayrıca sirküle olan diğer genotiplerin tespit edilmesi ve bunların epidemiyolojik olarak değerlendirmesini sağlayacaktır. Çalışma esnasında ulaşılan kaynaklar göz önüne alındığında Türkiye' de MLST ile ilgili herhangi bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada seçilen her iki metodun beraber kullanımı ülkemizde yürütülmüş çalışmalar arasında ilk olma özelliğini taşımaktadır. Bu çalışma ile Türkiye'nin tüm bölgelerine ait çiftlik hayvanları kökenli *B. melitensis* suşlarının genotipleri elde edildi.

4.1. MLVA ile Sonuçların Değerlendirilmesi

4.1.1. Akdeniz ve Avrupa Ülkelerindeki Durum

Bricker ve ark (2003), *Brucella* cinsi içindeki yüksek genetik homojeniteye bağlı alt tiplendirmenin zorluğu nedeniyle DNA dizilimindeki değişkenliği araştırmak için üç *Brucella* türünün genom sekansını yapmıştır. Yapılan çalışma ile *B. abortus* genomunun 9 lokusunda 8 baz çiftinin birbirini izleyen tekrar dizileri ortaya konulmuştur. Geliştirdikleri bu metot ile hastalığın kontrolü için epidemiyologların da erişebileceği MLVA tabanlı uluslararası bir *Brucella* DNA veri bankasını oluşturulmuştur. MLVA16 analizi yapılmak suretiyle MLVA8, MLVA11 ve MLVA16 için *Brucella* MLVA database (http://mlva.u-psud.fr)'i incelenmiş ve suşlara ait genotipler belirlenmiştir. Whatmore ve ark (2006), türler arasındaki moleküler ayrımı daha da geliştirmek ve gelecekte oluşturulacak standardize edilmiş *Brucella* MLVA analizi için ilave farklı lokuslar seçtikleri bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada önceden bildirilmiş 8 lokus ve ek olarak 13 lokustan oluşan 21 farklı gen bölgesinin, VNTR metodu ile moleküler alt tiplendirme sistemi incelenmiştir. Tür tayini için 6 lokusun kullanımının yeterli olduğu belirtilmiştir. Daha fazla sayıda değişken lokus kullanımı ile endemik coğrafi bölgelerden gelen izolatların, bu analiz yardımıyla ayırt edilebileceği ortaya konulmuştur. Çalışma sonucunda MLVA analizinin epidemiyolojik araç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, *Brucella* türlerinin epidemiyolojik olarak izlenmesi ve dünyadaki izolatların MLVA profilleriyle karşılaştırılarak aralarındaki ilişkinin ortaya konulması açısından önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan çalışmada 16 lokus analiz edilmiş, ayrım gücünün yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hâkim genotiplerin belirlenmesi ve epidemiyolojik olarak izlenebilirliği ile ilgili literatürlerle uyumlu bulgular saptanmıştır.

Le Flech ve ark (2006), *Brucella* cinsine ait referans suşları da içeren 257 adet izolat (117 *B. suis,* 43 *B. melitensis*, 52 *B. abortus*, 24 *B. ovis*, 1 *B. neotamae,* 17 *B. canis*, 1 *B. pinnipedialis* ve 2 *B. ceticea*) ve 3 aşı suşu ile çalışma yapmışlardır. MLVA15 (Panel1'de 8 ve Panel2'de 7) analizi yaparak polimorfizim olan lokusları tespit ederek, tür tanımlama ve klasik biyotiplendirme ile uyumluluklarını incelemişlerdir. Referans suş ve saha izolatlarının uyumları kümeler oluşturularak değerlendirmeye alınmıştır. Her iki panel birlikte (MLVA16) değerlendirildiğinde 204 farklı genotip saptanmıştır. *B. suis* bt4 ile *B. canis* suşlarının ayrımı

yapılamamıştır. *B. melitensis* biyovarlarının (*B. melitensis* bt 1, 2, 3) uyumunun da orta düzeyde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çalışma izolatları referans suşlarla paralel çalışılmış ve klasik biyotiplendirme özellikleri yönünden bazı lokuslarda homojenlik bazı lokuslarda farklılıklar saptanmıştır. Çalışma sonuçları, türlerin ayrımı ve klasik biyotiplendirme için kısmen uyumlu olduğunu göstermiş olup tam olarak biyotiplendirme ile ilişki kuramamışlardır.

Al Dahouk ve ark (2007), izolatların coğrafi orijinlerini belirlemek için sadece Panel 1'deki lokusları kullanmışlardır. Kullandıkları izolatları ''Doğu Akdeniz, Batı Akdeniz ve Amerika'' olmak üzere üç bölgeye ayırmışlardır. Bu lokuslar arasında Panel 1 (Bruce06, Bruce08, Bruce11, Bruce12, Bruce42, Bruce43, Bruce45, Bruce55) kullanılmış ve MLVA8'e göre değerlendirme yapılarak izolatların coğrafik açıdan kökenleri ile ilgili bilgi edinilmiştir. Çalışmalarında genotip 42, 43, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66'nın Doğu Akdeniz grubuna ve genotip 49, 51 'in Batı Akdeniz grubuna ait olduğu tespit edilmiştir. Genotip 47, 52, 53, 54, 55, 56'nın ise Amerika grubu içerisinde yer aldığı ortaya konulmuştur. Al Dahouk ve ark (2007)'nın yaptığı çalışmada Türkiye'ye ait suşların genotip 42, 43, 61, 62, 57 ve 58 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Türkiye'deki izolatların çok büyük bir kısmının genotip 42, 43'e ait olduğu ve tamamının Doğu Akdeniz grubu içerisinde yer aldığı bildirilmiştir.

Valdezate ve ark (2010), 13 yıl boyunca İspanya'daki 108 adet insan izolatı çalışmışlar ve MLVA16'ya göre 86 farklı genotip tespit etmişlerdir. İzolatların MLVA8'e göre Amerika (genotip 47, 48, 53, 55, 80 ve yeni genotip), Batı Akdeniz (genotip 51) ve Doğu Akdeniz (genotip 42, 43, 63) gruplarına ait oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca Doğu Akdenize grubuna ait genotip 42'nin İspanya'da yaygın genotip olduğu (%55) saptanmıştır.

Aftab ve ark (2011), Danimarka'daki insanlardan elde edilen, 14 adedi *B. melitensis* olarak identifiye edilmiş 17 adet izolat kullanmışlardır. İzolatların tamamının Doğu Akdeniz grubu içinde yer aldığı bildirilmiştir. Hastaların çoğunun Türk vatandaşı oldukları ya da Türkiye'de bulundukları bilgisi paylaşılmıştır. MLVA8 (panel1) değerlendirmesine göre 11 izolatın genotip 42, 43, 57 olduğu saptanmıştır. Bu genotiplerin Türkiye, Yunanistan, Beyrut ve Suriye ile yakın ilişki içinde oldukları görülmüştür. Diğer üç izolat genotip 63, genotip 65 ve daha önce

raporlanmamış bir genotip olarak tespit edilmiştir. Genotip 63'ün İran ile ilişkili olduğu, genotip 65'in Pakistan'a ait suşla yakın ilişkili olduğu ve raporlanmamış yeni genotipin ise Somali'de bulunan çok miktarda deve sütü tüketen bir hastadan izole edildiği bilgisi paylaşılmıştır. Danimarka'da artan Bruselloz vakalarının nedeninin çoğunlukla Akdeniz ülkelerinden kaynaklı *B. melitensis* olduğu raporlanmıştır.

Ferreira ve ark (2012), Portekizdeki insan ve hayvanlara ait, 126'sı *B. melitensis* olan 290 adet *B. melitensis, B. abortus* ve aşı suşunu MLVA16 ile analiz etmişlerdir. İzolatlar arası çeşitliliği değerlendirmek ve epidemiyolojik ilişkiyi araştırmak için yapılan bu analizde, MLVA8'e göre izolatların %17'sinin Amerikan grubu, %83'nün Doğu Akdeniz grubu içerisinde olduğu saptanmıştır. Batı Akdeniz grubunda izolata rastlanmadığı bildirilmiştir. MLVA11 değerlendirmesinde insan izolatlarının %85'inin genotip 116 ya ait olduğu görülmüştür. Portekiz'deki suşların diğer Akdeniz ülkelerinden farklı olarak evrimleştiği bilgisi paylaşılmıştır.

Garofolo ve ark (2013), İtalyada yaptıkları çalışmada 84'ü *B. melitensis* ve 122'si *B. abortus*'a ait olmak üzere 206 adet izolat çalışmışlardır. MLVA16'ya göre 56 farklı genotip tespit etmişlerdir. Tespit ettikleri genotipleri, MLVA11 analizi ile küresel veri tabanında kıyaslamışlardır. MLVA11 analizinde 15 farklı genotip saptamışlardır. Bunlar; 87, 91, 92, 96, 125, 138, 154, 155, 162 ve altı yeni genotiptir. Baskın genotiplerin 87, 91 ve 96 olduğu bildirilmiştir. *B. melitensis* izolatlarının MLVA8'e göre yapılan değerlendirmesinde, Batı Akdeniz grubuna ait 81 adet, Amerika grubuna ait 1 adet ve Doğu Akdeniz grubuna ait 2 adet genotip olduğu saptanmıştır. Nadir olarak farklı gruplar tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak ülkeler arası geçiş düşünülmüştür.

Gyuranecz ve ark (2016), Birleşik Arap Emirlikleri'nde, 11 adet deve, 2 adet sığır, 1 adet keçi ve 1 adet ceylan olmak üzere toplam 15 adet *B. melitensis* izolatı ile çalışmışlardır. MLVA8 değerlendirmesinde genotip 42, 43, 64 ve iki adet raporlanmamış yeni genotip, MLVA11 değerlendirmesinde genotip 108, 122 ve beş adet raporlanmamış yeni genotip ve MLVA16 değerlendirmesinde 10 farklı genotip tespit edilmiştir. Birleşik Arap Emirlikleri'nden izolatlar, Doğu Akdeniz grubunda bulunduğu bildirilmiştir.

Hanot-Mambres ve ark (2017), Belçika'da 1996-2015 yılları arasında yaptıkları çalışmada 37 adet insan izolatı kullanmışlardır. Klasik biyotiplendirmede çoğunun *B. melitensis* olduğu ve biyotip 3 olduğu vurgulanmıştır. MLVA8 (Panel1) değerlendirmesinde genotip 42, 43, 45, 51 ve MLVA11 değerlendirmesinde genotip 91, 96, 104,115, 116, 125 saptanmıştır. MLVA11 değerlendirmesinde suşların izole edildiği hastaların İtalya, Türkiye, Lübnan ve Peru'ya seyahat ettikleri bilgisi paylaşılmıştır. Elde edilen genotipler seyahat edilen ülke suş genotipleri ile uyumludur. MLVA16 değerlendirmesinde 37 izolattan 33 farklı genotip saptanmıştır. Çalışmanın bir diğer çıktısı *B. melitensis* biyovarlarının tek başına MLVA yöntemi ile ayırt etmenin mümkün olmadığıdır. Çalışmada, *Brucella* izolatlarının sürveyansı için klasik biyotipleme ve MLVA karakterizasyonunun birlikte kullanılması gerektiği ortaya konulmuştur.

Duvnjak ve ark (2018), Hırvatistan ve Bosna Hersek'ten 43 adet insan ve hayvan *B. melitensis* izolatını çalışmışlardır. MLVA16'da 25 yeni genotip ve MLST'de 2 yeni genotip tanımlamışlardır. MLVA8'de tüm izolatların Doğu Akdeniz grubu içerinde yer aldığını, MLVA11'e göre yeni hiçbir izolat saptanamadığını ve MLVA16'da 27 farklı genotipin tespit edildiğini bildirmişlerdir. İzolatların Türkiye, Yunanistan, Suriye izolatlarıyla yakın ilişki içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Vergnaud ve ark (2018), Fransa'da 1974-2006 yılları arasında oluşturdukları suş koleksiyonlarından, 1404 adet insan ve hayvan izolatını coğrafi kökeni ve biyotip özelliklerine göre seçmişlerdir. Seçilen izolatlar; *B. melitensis* (1050 adet), *B. abortus* (213 adet), *B. suis* (122 adet), *B. canis* (1 adet), *B. ovis* (2 adet), *B. neotamae*, *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* (7 adet)'dır. Yapılan bu çalışmayla, MLVA analizinin bakteri popülasyonlarının genetik çeşitliliğini büyük ölçekte ve hızla değerlendirmek için güçlü bir araç olduğu gösterilmiştir. MLVA11' e göre yapılan değerlendirmede 377 genotip saptanmıştır. Saptanan bu genotiplerin 63 adedi daha önce hiç raporlanmamıştır. Çalışma sonucunda MLVA'nın ayırt edici gücü nedeniyle, tüm genom dizilimi için *Brucella* suşlarının seçilmesinde ilk adım olması gerekliliği vurgulanmıştır.

Wareth ve ark (2020), Mısıra ait suşlarla ve İtalya, Portekiz, Yunanistan, Tunus suşlarını karşılaştırmışlar ve genetik olarak yakınlıkları saptamışlardır. Buna göre Mısır'daki *B. melitensis* izolatlarının MLVA16 değerlendirmesinde 21 farklı

genotip tespit edilmiştir. Ayrıca İtalya izolatları ile daha yakın oldukları bildirilmiştir. Mısır'da yapılan bu çalışma Akdeniz ülkeleri hakkında az sayıda veri olması nedeniyle oldukça değerlidir.

Sayour ve ark (2020), Mısır'da yaptıkları çalışmada insan, sığır, manda ve develerden izole edilen 118 adet *B. melitensis* biyotip 3 izolatlarını kullanmışlardır. MLVA8 ile yapılan değerlendirmede 3 farklı genotip olduğu ve izolatların büyük çoğunluğunun Batı Akdeniz kökenli olduğu tespit edilmiştir. MLVA11 ve MLVA 16 değerlendirmelerinde sırasıyla 8 ve 70 farklı genotip tespit edilmiştir.

Bu çalışmada MLVA analizi, panel1, panel 2A ve panel 2B den oluşan 16 lokus ile yapıldı. Çalışmada MLVA8 (panel1)'e göre 5 adet genotip tespit edildi. Kullanılan izolatların %86'sının MLVA8 (panel1)'e göre genotip 43 olduğu saptandı. Ayrıca genotip 42, 61, 62 ve daha önce tanımlanmamış bir genotip daha tespit edildi. Literatürlerdeki (Al Dahouk ve ark 2007) gruplama sistemine göre bu çalışmada kullanılan izolatların Doğu Akdeniz grubuna ait olduğu belirlendi. Batı Akdeniz veya Amerika grubuna ait hiçbir genotip saptanmadı. Bu çalışmada MLVA8 değerlendirilmesine göre elde edilen sonuçlar, Al Dahouk ve ark (2007), Valdezate ve ark (2010), Aftab ve ark (2011), Ferreira ve ark (2012), Gyuranecz ve ark (2016), Hanot-Mambres ve ark (2017) ve Duvnjak ve ark (2018)'nın tespit ettikleri genotipler ile benzer olduğu belirlendi. Ayrıca Al Dahouk ve ark (2007)' nın çalışmalarında Türkiye izolat sonuçları, önceki yapılan çalışma (Aftab ve ark 2011, Hanot-Mambres ve ark 2017) ile uyumludur. Yapılan MLVA11 (Panel1 ve Panel 2A) değerlendirmesine göre 8 farklı genotip bulundu. Bunlar sırasıyla 103,104,114,116,121,122,125 ve daha önce tanımlanmamış bir genotiptir. Ayrıca baskın genotipin 125 olduğu görüldü. MLVA11 değerlendirilmesine göre elde edilen bu sonuçlar, Ferreira ve ark (2012) çalışmasında saptadığı baskın genotip 116 ile Garofolo ve ark (2013) çalışmasında tespit ettiği genotip 125' ile Gyuranecz ve ark (2016)'nın çalışmalarında genotip 108 ve 122 tespit etmeleri bakımından benzerlik göstermektedir. Ayrıca Hanot-Mambres ve ark (2017) çalışmalarındaki hâkim genotipi 125 bulması ve genotip 104, 116 çalışma sonuçlarında tespiti ile uyumludur. Ancak bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Vergnaud ve ark (2018), Sayour ve ark (2020) ve Wareth ve ark (2020) çalışmalarında elde ettikleri genetik profiller ile benzerlik göstermemektedir. Çalışmadaki MLVA16 değerlendirmesinde 50 izolattan 30 adedinin Le Flech ve ark (2006), Al Dahouk ve ark. (2007), Aftab ve ark (2011),

Ferreira ve ark (2012), Garofolo ve ark (2013), Gyuranecz ve ark (2016), Hanot-Mambres ve ark (2017), Vergnaud ve ark (2018) çalışmalarına ait izolatlardan birebir aynı profiller ile eşleştiği saptandı. Değerlendirmedeki 20 adet izolat ise veri tabanı ile eşleşmemiş yeni profiller oldukları görüldü. Vakaların çoğunun sebebi, endemik ülkelere seyahatler ve dünyanın birçok yerinde hayvan kontrol önlemlerinin olmaması nedeniyle göçlere bağlı olduğu görülmektedir (Hanot-Mambres ve ark (2017). Çalışmaların yapıldığı ülkelerle görülen bu birebir izolat eşleşmesinin nedenleri arasında Türkiye'de sirküle olan hayvan izolatları ile insanların ve hayvanların teması ya da insan ve hayvan hareketleri ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu benzerliklerin bir diğer sebebi olarak ortak bir genotipten farklılaşmaların sonucun da elde edilebileceği düşünülmektedir. Suşların bölgesel özellikleri, benzerlikleri ve farklılıkları gibi bilgiler, Brusellozun yayılmasının olası kaynaklarına, zayıf noktalarına ve yönlerine işaret edebilir.

4.1.2. Orta Asya ve Uzak Doğu Ülkelerindeki Durum

Orta Asya ve Uzak Doğuda, MLVA analizinin kullanıldığını gösteren birçok literatür bulunmaktadır. Jiang ve ark (2011), Çin'de 105 adet insan *B. melitensis* izolatı kullanılarak MLVA16 analizi yapmışlardır. Çalışma sonunda, MLVA8 (Panel1) değerlendirmesinde baskın genotipin 42 olduğu ve tüm izolatları Doğu Akdeniz grubu içinde yer aldığı belirlenmiştir. Diğer gruplara ait izolat tespiti yapılamamıştır. MLVA16 değerlendirmesinde 69 farklı genotip tespit edilmiştir. Çin'de insan Bruselloz vakalarının sebebinin *B. melitensis*'e ait olduğu ve MLVA analizi ile biyovar ayrımının klasik biyotiplendirme düzeyinde yapılamayacağı bilgisi paylaşılmıştır.

Tay ve ark (2015), Malezya'da ilk defa insan izolatlarını kullandıkları çalışmalarında, 43 adet *B. melitensis* insan izolatı ve 2 adet *B. suis* izolatı ile MLVA16 (Panel1, Panel 2A ve Panel 2B) analizi yapmışlardır. MLVA8 (Panel1) değerlendirmesine göre *B. melitesis'e* ait izolatların genotip 43 ve 44 olduğunu saptamışlardır. Ancak hâkim genotipin 43 olduğu ve izolatların tamamının Doğu Akdeniz grubu içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. Yapılan MLVA11 (Panel1 ve Panel 2A) değerlendirmesinde, genotip 125 ve 109 tespit edilmiş ancak baskın genotipin 125 olduğu saptanmıştır. MLVA16'ya göre 9 farklı genotip bulunmuştur. Ülkedeki farklı genotipleri saptamak için daha fazla izolat çalışılması gerektiği çalışma sonuçlarında bildirilmiştir. Bu çalışmada MLVA8 ve MLVA11'de yapılan

değerlendirmelerde aynı genotipler saptanmıştır. Bu sonuç Türkiye'deki izolatların Malezya'daki izolatlarla yakın ilişkide olduğunu göstermektedir. Malezya'ya çok sayıda çiftlik hayvanlarının ithal etmesinin hayvan popülasyonunda Brusellozun kalıcı olmasına neden olduğu düşünülmektedir (Tay ve ark 2015). İki ülke araasındaki genotipik benzerliğin ülkelerarası hayvan transportu sebebiyle oluşabileceği düşünülmektedir. MLVA16'ya göre ise farklılığı oluşturan lokusların Bruce16 ve Bruce30'dan kaynaklandığı belirlenmiştir.

Shevtsova ve ark (2015), Kazakistan'da 128 adet *B. melitensis* ve 124 adet *B. abortus* olmak üzere 252 adet hayvan izolatını çalışmışlardır. MLVA8'e göre değerlendirilen *B. melitensis* izolatlarının, genotip 42, 43 ve 63 olduğu, en yaygın genotipin 42 ve Doğu Akdeniz grubu içinde yer aldığını bildirilmiştir. MLVA16'ya göre *B. melitensis* izolatlarında 25 farklı genotip saptanmıştır. Türkiye, Kazakistan ve Çin izolatları ile yakın ilişki içerisinde oldukları görülmüştür. Shevtsova ve ark (2019), Kazakistan'da yaptıkları çalışmada, 1327 insan *Brucella* izolatı kullanmışlardır. MLVA8'e göre değerlendirmede en yaygın genotipin 42 (%91,25) olduğu ve Doğu Akdeniz grubunda yer aldığı bildirilmiştir. MLVA11 değerlendirmesine göre çalışma sonunda, 9'u ilk kez olmak üzere 16 farklı genotipi tespit edilmiş ve yaygın genotipin 116 (%86,8) olduğu saptanmıştır. Genotip 116'nın Kazakistanın her yerinde mevcut olduğu ve Orta Asya'da *B. melitensis* suşları arasında da oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonunda, insan izolatlarında görülen çeşitliliğin daha önce hayvan izolatlarından yapılan model ile örtüştüğü ortaya konulmuştur.

Ma ve ark (2016), Çin' deki insanlardan, evcil ve vahşi hayvanlardan elde edilen 65 adet *Brucella* izolatını MLST ve MLVA metotları ile çalışmışlardır. MLVA yöntemi ile izolatlar *B. melitensis, B. abortus* ve *B. suis* olmak üzere 3'e ayrılmış ve verilerin *Brucella* 2012 MLVA veri tabanındaki herhangi bir veri ile eşleşmediği tespit edilmiştir. MLVA8 (Panel1)'de *B. melitensis* izolatlarında genotip 42, 43, 47, 63 saptamışlar ve yaygın genotipin 42 olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında Doğu Akdeniz (Genotip 42,43,63) ve Amerikan grubunu (Genotip 47) tespit etmişlerdir. MLVA16' ya göre 60 adet *B. melitensis* izolatında 34 farklı genotip tespit edilmiştir. Bu değerlendirmeye göre MLVA2012 database'de hiçbir genotip eşleşmediği bildirilmektedir.

Sun ve ark (2016), 50 adet *B. melitensis* ve 9 adet *B. abortus* izolatlarında MLVA16 ve MLST metotlarını kullanmışlardır. MLVA8 değerlendirmesine göre 42, 63 ve daha önce raporlanmamış bir genotip olmak üzere 3 genotip tespiti yapılmıştır. İzolatların Doğu Akdeniz grubu içinde olduğu bildirilmiştir. MLVA16' ya göre 28 farklı *B. melitensis* genotipi tespit edilmiş, bunların 15 adedinin bölgeye özgü olduğu ve 10 tanesinin komşu ülkeler ve Kazakistan'da görülen genotiple ortak özellikte olduğu bildirilmiştir. Sun ve ark (2017), 110 adet *B. melitensis* izolatını MLVA8'e göre değerlendirmişler ve 5 farklı genotip tespit etmişlerdir. Bunlar 42, 43, 63 ve 2 adet yeni belirlenen genotiplerdir. En baskın genotip 42'dir. İzolatların Doğu Akdeniz grubu içerinde olduklarını rapor etmişlerdir. MLVA16'ya göre 57 farklı genotip belirlenmiş ve bunların 41 adedinin daha önce hiç raporlanmadığı belirtilmiştir. Geriye kalan 16 genotipin daha önce Kazakistan (Shevtsova ve ark. 2015) ve Türkiye'de (Kılıç ve ark. 2011) belirlenen genotipler oldukları bildirilmiştir.

Liu ve ark (2019), Çin'in Guanji bölgesinde *B. melitensis* (16), *B. suis* (17) ve *B. canis* (7)' e ait toplam 40 adet izolatı MLST ve MLVA yöntemleriyle çalışmışlardır. MLVA8 değerlendirmesine göre *B. melitensis* izolatlarından genotip 42, 58 ve 114 tespit edilmiştir. Bu genotiplerden en baskın olanın genotip 42 olduğu ve tüm *B. melitensis* izolatlarının Doğu Akdeniz grubunda olduğu bildirilmiştir. MLVA11' e göre baskın genotip 116 (%81,2) olarak saptanmıştır. MLVA16'ya göre ise 12 farklı genotip tespit edilmiştir. Genotiplerin MLVA veritabanı ile uyum göstermediği belirtilmiştir.

Bu çalışmada, MLVA8, MLVA11 ve MLVA16 değerlendirmelerine göre elde edilen sonuçlar Uzakdoğu ve Orta Asya'da yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Tay ve ark (2015)'nın MLVA8'e göre genotip 43'ü ve MLVA11'e göre genotipi 125'i saptamaları çalışma sonucu ile uyumludur. Ayrıca Jiang ve ark (2011)'nın MLVA8'e göre hâkim genotipi 42 saptaması, Shevtsova ve ark (2015 ve 2019) MLVA8'e göre genotip 42 ve 43'ü tespit etmesi, Ma ve ark (2016), Sun ve ark (2016 ve 2017) ve Liu ve ark (2019) MLVA8'e göre genotipi 42'yi hâkim genotip olarak saptamaları bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca, MLVA16 değerlendirmesinde çalışmamıza ait Bursa 2012 izolatı ile Jiang ve ark (2011)'na ait Çin izolatı ile birebir eşleştiği saptandı. Orta Asya ve Uzak Doğu'da yapılan bu çalışmalarda elde edilen sonuçların,

Doğu Akdeniz ve Türkiye izolat profilleri ile uyumlu olduğu görüldü. Brusellozun tarihsel olarak varlığı orta çağa dayandığı metagenomik çalışmalarla ortaya konulmuştuır (Kay ve ark 2014). Çin'deki çalışma sonuçları vakaların ithalat kaynaklı olabileceğini göstermektedir (Jiang ve ark 2011). Türkiye'de sirküle olan izolatların Uzakdoğu ve Orta Asya'daki izolatlarla uyumlu olması; ülkeler arasında mesafelerin uzun olmasına rağmen, hayvan ticaretleri ve tarihte bu bölgeden Anadolu topraklarına göç sırasında bile hastalığın bu coğrafyaya taşınma fikrini akla getirmektedir.

4.1.3. Ülkemizdeki Durum

Kılıç ve ark. (2011), Türkiye'deki tüm coğrafi bölgelerden gelen 162 adet insan izolatı arasındaki epidemiyolojik ilişki ve genetik çeşitliliği MLVA analizi ile araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, MLVA genotip profillerinin, bazı coğrafi bölgelerde sınırlanmış olduğu, yıllık olarak herhangi bir değişiklik göstermediği ve minimum 10 yıllık zaman diliminde belirli alanlarda süreklilik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Elde edilen diğer bir veri, Türkiye ve Doğu Akdeniz'de yer alan komşu ülkelerdeki *B. melitensis* insan izolatları arasındaki yakın ilişkidir. Yaptıkları bu çalışmada MLVA8 değerlendirmesinde 9 farklı *B. melitensis* genotipi saptamışlar ve hâkim genotip 43 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca MLVA11 değerlendirmesinde 14 farklı genotip ve MLVA16 değerlendirmesinde 105 farklı genotip tespit etmişlerdir. Kılıç ve ark (2011) yaptıkları çalışma sonucunda MLVA analizinin, *Brucella* enfeksiyonunun kontrolü ve epidemiyolojik geri izlenmesinde önemli ölçüde katkı sağlayacağı vurgulanmışlardır. Aslan (2015), doktora tez çalışmasında Türkiye'deki klinik izolatların epidemiyolojik özelliklerini Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) ve MLVA yöntemleriyle incelemiştir. Aslan (2015) 'ın tez çalışmasında fenotipik olarak biyotiplendirilmiş 118 adet hayvan *Brucella* izolatı (*B. melitensis, B. abortus, B. suis*) PCR ile tür düzeyinde identifiye edilmiş ve izolatların genotipik özelliklerini belirlemek için PFGE ve MLVA-16 yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan MLVA8 (Panel1) ve MLST11(Panel1+2A) değerlendirmelerinde 6 şar farklı genotip tespit edilmiştir. MLVA8 değerlendirmesine göre hâkim izolatı genotip 43 olarak saptamıştır.

Bu çalışmada, MLVA8 (panel1)'değerlendirmesinde elde edilen genotiplerin Doğu Akdeniz grubu içerisinde yer aldığı ve çalışmada kullanılan izolatların 2009-2017 yılları arasında yıllık olarak genotipik değişkenlik göstermediği saptandı.

MLVA8 değerlendirmesine göre hâkim genotip 43'tür. Bu veriler, Kılıç ve ark (2011) çalışmalarının sonuçları ile uyumludur. Ayrıca bu çalışmada MLVA16 (panel1, panel 2A ve panel 2B)' değerlendirmesinde tespit edilen 16 adet izolat Kılıç ve ark (2011)'nın çalışmalarının sonuçları ile birebir eşleşdi. Bu çalışmada MLVA8 (Panel1) değerlendirmesi ile elde edilen hâkim genotip profili ile Aslan (2015)'ın çalışmasındaki hâkim genotip aynıdır. MLVA16 (Panel1+2A ve 2B) değerlendirmesine göre gerek bu çalışma gerek Aslan (2015) çalışması arasında panel2A ve 2B küçük farklılıklar tespit edildi.

Şekil 3.1'deki grup analiz sonuçlarına göre, GrupI'de yer alan suşların Akdeniz, Karadeniz, Marmara, Ege ve İç Anadolu Bölgesine ait olduğu belirlendi. Grup II'nin ise Türkiye'nin 7 bölgesine ait suşlar olduğu tespit edildi. Bu veriler kontrolsüz hayvan hareketlerinin bölge içinde yakın illerde olabileceği gibi bölgeler arası uzak iller arasında olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca keçi-sığır, koyun-keçi konakçıları arasında geçişlerin olması aynı profil genotiplerinin farklı konakçılarda da olabileceği dolayısıyla genetik profilleri konakçı ayrımı yapılamayacağı görülmektedir. Aynı zamanda 2012 ve 2017 yıllarındaki Kütahya ve Kırklareli izolatlarının farklı yıllarda farklı konakçılarda (keçi-koyun) bulunması yine profil genotiplerinin yıl ayrımı yapmaksızın sahada sirküle olup saçılama sebep olabileceği tespit edildi. Yapılan veritabanı karşılaştırılmasında 30 adet izolata ait profil genotiplerinin birebir eşleştiği, veritabanında eşleşen izolatların coğrafik olarak çoğu Türkiye'ye ait olmasına karşın İspanya, Portekiz, Belçika, Fransa, İsviçre, Suriye, Irak ve Birleşik Arap Emirlikleri ülkelerine ait profil genotipleri ile birebir eşleştiği ve tüm izolatların insan izolatları olduğu tespit edildi. Diğer ülkelerle eşleşme durumları da Türkiye'den o ülkelere giden kişiler ya da o ülkelerden gelen insanların burada hastalığa yakalanması ile olduğu düşünülmektedir. Bu durum yine konakçılar arası geçişlerin rahatça olduğunu göstermektedir.

4.2. MLST Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Multilokus sekans tiplendirme, bakteriyel tipleme ve epidemiyolojik çalışmalar için bir araç olarak kabul edilmiştir ve elde edilen veriler, filogenetik çalışmalar için de idealdir (Sun ve ark 2017). Hem MLVA hem de MLST, *Brucella* türleri ve biyovarlarının genetik çeşitliliğini ve moleküler epidemiyolojisini araştırmak için değerli tamamlayıcı araçlar olarak kabul edilmektedir (Vergnaud ve ark 2018). *Brucella* cinsi içindeki genetik çeşitliğinin karakterize edilmesi amacıyla

MLST analizi kullanılmaktadır. Türkiye'de yapılmış olan MLST analizi ile ilgili literatür bilgisi ile karşılaşılmamıştır.

Whatmore ve ark. (2007), 160 *Brucella* izolatının 9 lokustaki genetik profilini MLST ve MLVA ile analiz etmişlerdir. Elde edilen sekans verileri ile 27 sekans tipi arasındaki ilişkiyi şematize etmişlerdir. İncelenen lokusların büyük bir kısmı değişmeyen gen lokuslarını temsil etmektedir. Sekans verileri ile izolat profilleri arasındaki ilişkiyi gösterecek şekilde komşu-ağaç dendogramı oluşturulmuştur. Sekans/gen dizi analizi verileri ile *Brucella* taksonomisindeki var olan çelişkiyi ortadan kaldırmak için, atipik olarak yeni ortaya çıkan izolatlar komşu-ağaç dendogramına yerleştirilmiştir.

Chen ve ark. (2013), Moğolistan'ın iç bölgelerinde yaptıkları çalışmada; Brusellozun etiyolojik değişimini göstermek için 60 adet izolat kullanmışlardır. Seçilen izolatlar klasik biyotiplendirme ile doğrulanmış ve MLST analizi ile genotipleri incelenmiştir. Çalışmanın yapıldığı yıllar arasında *Brucella* izolatlarının hem biyovar hem de genotiplerinde farklılıklar görülmüştür. Sonuç olarak 14 farklı ST değeri saptanmıştır. Bunların 9 adeti (ST28-ST36) çalışma numunelerinin %64,3 kısmı olduğu ve daha önce raporlanmamış genotip oldukları bildirmişlerdir. Çalışmaya göre 1950-60'lı dönemler ve 1990-2000 yılları arası dönemde ST8 hâkim genotip iken 1970-80'li dönemlerde ST2 hâkim genotip olduğu vurgulanmıştır. Bu değişikliklerin Çin'deki Bruselloz hastalığının insidansındaki farklılıkları belirlemede yardımcı olduğu bildirilmektedir.

Whatmore ve ark (2016), genetik çeşitliliğin ayrım gücünü arttırmak için daha önce kullanılan 9 gen bölgesine ilave olarak 12 gen bölgesi ekleyerek toplam 21 gen bölgesi incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada *Brucella*'ya ait tüm türleri içeren, 508 adet izolat kullanmışlardır. Bu amaçla; 172 adet *B. abortus*, 84 adet *B. melitensis*, 100 adet *B. suis*, 24 adet *B. canis*, 11 adet *B. ovis*, 73 adet *B. ceti*, 20 adet *B. pinnipedialis*, 7adet *B. microti*, 3 adet *B. neotamae*, 2 adet *B. papionis*, 2 adet *B. vulpis*, 1 adet *B. inopinata* ve 9 adet sınıflandırılamamış *Brucella* izolatı kullanmışlardır. Çalışma sonucunda 100'den fazla ST değeri tanımlanmıştır. Çalışma izolatlarını Al Dahouk ve ark (2007), yaptığı MLVA değerlendirmesindeki coğrafik orjinler ve MLST metodu sonucu bulduğu ST değerleri ile karşılaştırmışlardır. MLST değerlendirmesi sonucunda bulunan ST8'in *B. melitensis* izolatları içerisinde

Portekiz'den Afganistan ve Moğolistan'a kadar Avrupa ve Asya'da yaygın olarak dağılmış olduğu tespit edilmiştir. Al Dahouk ve ark (2007), yaptığı üç gruplamada her biri *B. melitensis* biyovar referans suşlarından birini içerirken ("Batı Akdeniz" Ether, biyovar 3; "Doğu Akdeniz" 63/9 biyovar2; "Amerikan" 16M biyovar1) genotip ve biyovar arasında net bir ilişki tespit edilmemiştir. Yaptıkları çalışmada "Amerika" grubundaki izolatların çoğunluğu biyovar 1'e (%81) ve "Batı Akdeniz" grubundaki biyovar 3'e (%64) ait olduğu belirtilmiştir. "Doğu Akdeniz" grubu ise her üç biyovarın da eşit sayıda dağıldığı bildirilmiştir. Biyotiplendirme ile genotiplendirme arasında *B. suis, B. abortus* ve *B. melitensis* arasında azalan bir uyum olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda sadece klasik biyotiplendirme ile elde edilen biyovar özelliklerinin epidemiyolojik olarak yeterli olmadığı moleküler metodlarla birlikte kullanılması gerektiği ortaya konulmuştur.

Ma ve ark (2016), Çin' in Qinghai-Tibet bölgesindeki insan, evcil ve vahşi hayvanlardan elde edilen 65 adet *Brucella* izolatı ile çalışmışlardır. Bu izolatların türleri ve genotiplerini belirlemek için MLST ve MLVA metotları kullanılmıştır. MLST metotu ile *B. melitensis* izolatları içerisinde 3 farklı ST tipi rapor edilmiştir. Bunların; ST7, ST8 ve ST8'in atipik varyantı olduğu olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda *B. melitensis*'in incelenen alan içerisinde baskın tür olduğu saptanmıştır. Ayrıca elde edilen verilerin incelenen alandaki *Brucella* popülasyonu için karakteristik olduğu görülmüştür. Çalışmada elde edilen diğer sonuçlar ise, insan, evcil ve vahşi hayvanlar arasında çok fazla genotip çeşitliliğinin olmadığı ve bölgedeki zoonotik konakçının insan olduğudur.

Sun ve ark (2016), Çin'in Xinjiang bölgesinden 2010-2015 yılları arasında izole edilen 50 adet *B. melitensis* ve 9 adet *B. abortus* izolatına MLVA16 ve MLST analizleri yapmışlardır. MLST analizinde 59 izolattan 4 farklı genotip elde edilmiş ve tüm genotiplerin daha önce raporlandığı görülmüştür. 50 adet *B. melitensis* izolatları içerisinde 49 adeti ST8 ve 1 adeti yeni genotip ST37 olmak üzere toplam iki farklı genotip tespiti yapılmıştır. Sun ve ark (2017), Çin'de yaptıkları çalışmada 110 adet *B. melitensis* izolatını MLST analizi ile incelemişlerdir. İzolatların 91 adedinin hâkim genotip olan ST8 olduğunu bildirmişlerdir. Tespit edilen diğer genotipler ST137, ST138, ST139, ST140 ve ST141'dir. İzolatlardan 15 adetinin ST139'a ve geriye kalan izolatların ise ST137, ST138, ST140, ST141 ait olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada saptanan tüm yeni ST'ler, baskın ST8 ile birlikte Doğu

Akdeniz soyunda yer almaktadır. Çin'deki *B. melitensis* suşlarının Doğu Akdeniz bölgesinden olanlarla yakın bir filogenetik ilişkisi görülmüştür. Bu sonuç, çalışmadaki MLVA analizinde elde edilen bulgularla uyumludur. Veritabanına göre ST8, *B. melitensis'*te tanımlanan en yaygın ST'dir. Ayrıca birçok Avrupa ve Asya ülkesini kapsayan geniş bir coğrafi dağılım gösterir.

Cao ve ark (2018), 2015-2016 yllarında Çin'in birçok bölgesindeki farklı hayvan türlerinden izole ettikleri 66 adet izolatla MLST analizi yapmışlardır. Çalışılan 59 adet *B. melitensis* izolatının genotipleri ST8 (n=54), ST7 (n=3) ve ST3 (n=2) olarak saptanmıştır. Çin'de en hâkim genotipin ST8 olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda, *Brucella* hastalığının izlenmesi ve etkenin genetik varyasyonlarını anlamak için çok sayıda izolatla çalışılması gerekliliği vurgulanmıştır.

Piao ve ark (2018), 1953 ile 2013 yılları arasında Çin'de izole edilen 206 adet *Brucella* izolatından MLST analizini yapmışlardır. Yapılan bu çalışmada 32 adet farklı MLST genotipi elde edilmiştir. Bu genotiplerden ST8'in hâkim genotip olduğu ortaya konulmuştur. Elde edilen 32 farklı genotipin 13 adedinin yeni ST (ST71-83) olduğu tespit edilmiştir.

Liu ve ark (2019), Çin'de 1961-2016 yılları arasında insan, köpek ve domuzdan izole edilen 40 adet *Brucella* izolatına MLST ve MLVA analizi yapmışlardır. Guangxi özerk bölgesinde yapılan bu çalışmada *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. canis* olmak üzere 3 tür incelenmiştir. Bölgedeki popülasyonlarda 2000 yılından önce ST17 ve ST21 hâkim genotipken, 2012 yılından sonra elde edilen izolatlar arasında ST8'in hâkim genotip olduğu tespit edilmiştir. 2012 yılından sonra ST8'in hâkim genotip olması insan brucellosis vakalarındaki artışa bağlanmıştır. Yapılan MLST analizi ile bu bölgedeki *Brucella* suşlarının genetik yapısının önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada Whatmore ve ark (2007) çalışmasındaki metot birebir uygulandı. Buna göre ülkemizdeki tüm bölgeleri temsil eden 50 adet izolat arasında 2 farklı genotip elde edildi. Türkiye'deki *B. melitensis*' ler içinde hâkim genotipin ST8 (n=39) (3-2-3-2-1-5-3-2-8) olduğu ve elde edilen diğer genotipin ise daha önce raporlanmayan yeni bir genotip (3-2-35-2-1-5-3-2-8) (n=11) olduğu tespit edildi. Her iki genotip arasında sadece glk gen bölgesinde farklılaşmanın olduğu diğer gen

bölgelerinde herhangi bir varyant değişimi olmadığı tespit edildi. Çalışma sonunda elde edilen bulgular Whatmore ve ark. (2007), Chen ve ark. (2013)'nın ST8 genotipini saptaması, Whatmore ve ark (2016)'nın tüm ST değerlerini ülke coğrafik orjinlerine göre değerlendirerek ST8 genotipinin Türkiye ve Uzak Doğuda hâkim genotip olarak bildirmesi, Ma ve ark (2016), Sun ve ark (2016 ve 2017), Cao ve ark (2018), Piao ve ark (2018) ve Liu ve ark (2019)'nın yaptıkları çalışmalarda ST8 genotipini çalışma bölgelerinde hâkim genotip olarak tespit etmeleri ve bu çalışmada da ST8 genotipinin hakim olarak belirlenmesi ile uyumludur.

MLST analizinde; konakçısı koyun, sığır, keçi farketmeksizin ST8 ve yeni ST genotipine sahip oldukları ayrıca bölge, yıl farketmeksizin aynı profil genotipleri belirlendi. Dolayısıyla bu analiz ile profil genotipleri coğrafya, yıl, konakçı, biyotip ayrımına göre belirlenememektedir. Ancak bu metod ile daha önce Whatmore ve ark (2016), paylaştıkları sonuç ST8 genotipi Türkiye'nin içinde bulunduğu coğrafya ile uyumlu olduğu görüldü. Sonraki çalışmalarda yeni ST ler ile ilgili yapılan çalışmalara da bu elde edilen veriler ışık tutacaktır. Ayrıca referans *B. melitensis* Rev1 Aşı suşunun ST7 olarak saptanması da saha suşlarından ayrıldığı görüldü. Eradikasyon çalışmalarının temeli olan aşılama programları için saha suşlarının genetik profillerine yönelik çalışmaların yapılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tüm Türkiye'yi temsil edebilecek sayıdaki *B. melitensis* suşunun ve referans suşlarının tiplendirilmesinde MLST ve MLVA metodlarının kullanılabileceği,

2. MLVA-16 ile 46 farklı genotip tespiti yapıldı.

3. MLVA-16, kıtalararası izlemeye olanak tanıyan geniş bir ölçekte genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi için güçlü bir araçtır.

4. Ülkemizde mevcut kullanılan aşıların kalitelerini ve genetik stabilitelerini kontrol edilmesinde MLVA16 analizinin yer alabileceği,

5. MLST analizi ile saha suşları ile aşı suşları ayrımı yapılabileceği,

6. MLST analizi ile çalışılan izolatlarda bölgelere, yıllara, konakçılara ve hatta biyovarlarına göre tayin yapılamadığı,

7. ST8 ve yeni genotip tespit edildi.

8. Özellikle yeni ST ile çalışma yapılmasının gerekliliği,

9. *B. melitensis* Rev-1 aşı suşunun ve *B. melitensis* 16M bt1'in genotipi ST7 iken diğer referans suşlarında baskın genotip ST8 (%78) olmakla beraber yeni ST (%22) varlığı tespit edildi. Bu sebeple yeni aşılama stratejilerinin geliştirilmesinin gerektiği,

10. Kullanılan iki metot sadece *B. melitensis* suşlarına uygulanarak Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Brusella Referans Teşhis Laboratuvarına kazandırılmış olup, ilerleyen dönemlerde diğer *Brucella* türlerini de içeren çalışmalarla daha da güzel sonuçlar elde edilebileceği,

11. Ülkemizde daha önce MLST metodu ile *Brusella* spp.'nin filogenetiği çalışılmamış olup kendi izolatlarımızı daha güvenilir değerlendirebilmek adına veri tabanımızın oluşturulması ve daha fazla izolatın çalışılmasının gerekliliği,

12. MLST ve MLVA metodlarının çalışılması sonrasında suşların konakçılarla olan ilişkilerini daha da iyi anlayabilmek için WGS (Whole Genome Sequence) yapılması,

13. WGS metoduna ek olarak suşların proteomik ve genomik çalışmalarla ilişkilerinin daha da detaylı bilgiler sağlayacağı kanaatine varıldı.

BRUCELLA MELİTENSİS SUŞLARININ GENETİK PROFİLLERİNİN MLVA (MULTİLOKUS DEĞİŞKEN SAYIDA ARDIŞIK TEKRAR ANALİZİ) VE MLST (MULTİLOKUS DİZİ TİPLENDİRME) YÖNTEMLERİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%6	%2	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tarimorman.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	kms.kaysis.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.mikrobiyoloji.org İnternet Kaynağı	<%1
5	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1
6	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<%1
8	www.oie.int İnternet Kaynağı	<%1

6.KAYNAKÇA

Abernethy DA, Moscard-Costello J, Dickson E, Harwood R, Burns K, McKillop E, McDowell S, Pfeiffer DU, 2011. Epidemiology and management of a bovine brucellosis cluster in Northern Ireland. Prev. vet. Med., 98 (4), 223–229.

Acha NP, Szyfres B, 2003. Zoonoses and Communicable Diseases of Man and Animals, 3rd edn. Pan American Health Organization, Scientific and Tech. Publications, Washington, DC. 1:2.

Adone R, Pasquali P, 2013. Epidemiosurveillance of brucellosis. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 32(1):199-205.

Aftab H, Dargis R, Christensen JJ, Le Fleche P, Kemp M, 2011. Imported brucellosis in Denmark: molecular identification and multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) genotyping of the bacteria. Scand J Infect Dis 43:536–8.

Akpinar O, 2016. Historical perspective of brucellosis: a microbiological and epidemiological overview. Le Infezioni in Medicina. 24(1):77-86.

Akyay N, Gursel A, 1957. An outbreak of brucellosis and brucellosis in Turkey. Turk Hij Tec Biyol Derg 7:208–15.

Al Dahouk S, Fleche PL, Nockler K, Jacques I, Grayon M, Scholz HC, Tomaso H, Vergnaud G, Neubauer H, 2007. Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis. J Microbiol Methods. 69(1):137–45.

Al Dahouk S, Scholz HC, Tomaso H, Bahn P, Gollner C, Karges W, Appel B, Hensel A, Neubauer H, Nockler K, 2010. Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. BMC Microbiol 10, 269.

Alavi SM, Alavi L, 2013. Treatment of brucellosis: a systematic review of studies in recent twenty years. Caspian. J. Intern. Med. 4(2): 636–641.

Ali S, Akhter S, Neubauer H, Melzer F, Khan I, 2015. Serological, cultural, and molecular evidence of *Brucella* infection in small ruminants in Pakistan. J Infect Dev Ctries. 9: 470±475. https://doi. org/10.3855/jidc.5110 PMID: 25989166

Alton GG, Forsyth JRL, 2004. *Brucella*, General Concepts. Medical Microbiology. 2004; 4th edn. Accessed 28 February; 2013. Available: http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch028.htm.

Alton GG, Jones LM, Pietz DE, 1975. Laboratory techniques in brucellosis 2nd edn. World Health Organization monograph series No.55, WHO, Geneva.

Alton GG, 1990. In: Nielsen KH, Duncan JR (eds.) Animal brucellosis CRC: Boca Raton.

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988. Techniques For The Brucellosis Laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agromique- INRA.

Alvarez J, Saez JL, García N, Serrat C, Pérez-Sancho M, González S, Ortega MJ, Gou J, Carbajo L, Garrido F, Goyache J, Domínguez L, 2011. Management of an outbreak of brucellosis due to B. melitensis in dairy cattle in Spain. Res Vet Sci. 90:208–211. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.028. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20579679.

Arayan ST, Simborio HL, Reyes AW, Hop HT, Min W, Lee HJ, 2015. The effects of red ginseng saponin fraction-A (RGSF-A) on phagocytosis and intracellular signaling in Brucella abortus infected RAW 264.7 cells. FEMS Microbiol. Lett. 362(11). doi:10.1093/femsle/fnv070.

Arellano-Reynoso B, Suárez-Güemes F, Mejía EF, Michel-Gómez F, Hernández-Castro R, Beltrán AR, Díaz-Aparicio E, 2013. Isolation of a fi eld strain of *Brucella* abortus from RB51 vaccinated and brucellosis-seronegative bovine yearlings that calved normally. Trop. anim. Hlth Prod., 45 (2), 695–697.

Aslan S, 2015. Klinik örneklerden izole edilen *Brucella* izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin multi-locus variable number tandem repeat analysis ve pulsed field gel electrophoresis yöntemleri ile tespiti. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Aslantaş Ö. 2006. Sığır brusellozis'inin allerjik deri testleri ile teşhisi üzerine çalışmalar. Kafkas Üniv Vet Fak Derg.12 (1): 57-61.

Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A, 2013. A history of the development of Brucella vaccines. Biomedical medical international. doi: 10.1155/2013/743509.

Bamaiyi PH, Hassan L, Khairani-Bejo S, Zainal Abidin M, Ramlan M, Krishnan N, Adzhar A, Abdullah N, Hamidah N HM, Norsuhanna MM, Hashim SN, 2012. Isolation and molecular characterization of *Brucella* melitensis from seropositive goats in Peninsula Malaysia. Trop Biomed. 29(4):513-8. PMID: 23202595.

Bamaiyi PH, Hassan L, Khairani-Bejo S, Zainal AM, 2014.Updates on brucellosis in Malaysia and Southeast Asia. Malaysian J Vet Res. 5: 71±82.

Banai M, Corbel M, 2010. "Taxonomy of Brucella." The Open Veterinary Science Journal 4. 85 101.

Benkirane A, 2006. Ovine and caprine brucellosis: World distribution and control / eradication strategies in West Asia / North Africa region. Small Rum Res. 62: 19±25.

Billard E, Dornand J, Gross A, 2007. Interaction of Brucella suis and Brucella abortus rough strains with human dendritic cells. Infection and Immunity 75, 5916–5923.

Blasco JM, Molina-Flores B, 2011. Control and eradication of *Brucella* melitensis infection in sheep and goats. Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.), 27 (1), 95–104.

Blasco JM, 2010. Control and eradication strategies for *Brucella* melitensis infection in sheep and goats. Prilozi, 31 (1), 145–165.

Bounaadja L, Albert D, Chenais B, Henault S, Zygmunt MS, Poliak S, Garin-Bastuji B, 2009. Real-time PCR for identification of Brucella spp.: a comparative study of IS711, bcsp31 and per target genes. Vet. Microbiol. 137, 156–164.

Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM, 2003. *Brucella* ªHOOF-Printsº: strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs) 13.

Bricker BJ, 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol. 90, 435– 446.

Bricker BJ, Halling SM, 1994. Differentiation of Brucella abortus bv. 1, 2, and 4, Brucella melitensis, Brucella ovis, and Brucella suis bv. 1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 2660–2666.

Bruselloz ile Mücadele Yönetmeligi. 2009. Resmi Gazete, Sayısı: 27189.

Campero CM, Ladds PW, Hoffmann D, Duffield B, Watson D, Fordyce G, 1990. Immunopathology of experimental Brucella abortus strain 19 infection of the genitalia of bulls. Veterinary Immunology and Immunopathology 24, 235–246.

Cao X, Shang Y, Liu Y, Li Z, Jing Z, 2018. Genetic Characterization of Animal *Brucella* Isolates from Northwest Region in China. Biomed Res Int. 2186027.

Capasso L, 2002. Bacteria in two-millennia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. J. Infection. 45, 122-127.

Carmichael LE, 1990. In: Nielsen KH, Duncan JR (eds.) *Brucella* canis. Boca Raton: CRC Press.

Cassataro J, Velikovsky CA, de La Barrera S, 2005. "A DNA vaccine coding for the Brucella outer membrane protein 31 confers protection against B. melitensis and B. ovis infection by eliciting a specific cytotoxic response," Infection and Immunity, vol. 73, no. 10, pp. 6537–6546.

Castaneda-Roldan OU, Ahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendon MA, Dornand J, Girón JA, 2006. Characterization of SP41, a surface protein of Brucella associated with adherence and invasion of host epithelial cells. Cell Microbiology 8, 1877–1887.

Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Méresse S, Desjardins M, Pizarro-Cerdá J, Gorvel JP, Moreno E, 2002. Activation of Rho and Rab GTPases dissociate Brucella abortus internalization from intracellular trafficking. Cell Microbiology 4, 663–676.

Chen Y, Ke Y, Wang Y, Yuan X, Zhou X, Jiang H, Wang Z, Zhen Q, Yu Y, Huang L, 2013. Changes of predominant species/biovars and sequence types of *Brucella* isolates, Inner Mongolia, China. BMC Infect Dis.13:514.

Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH, 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. Vet Microbiol. 20;90(1-4):229-47. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00211-0. PMID: 12414146.

Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O, 2000. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of Brucella spp. isolated from marine mammals. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 835–839.

Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O, 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of Brucella. Microbiology 141, 2111–2121.

Copin R, De Baetselier P, Carlier Y, Letesson JJ, Muraille E, 2007. MyD88- dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection. Journal of Immunology 178, 5182–5191.

Corbel MJ, 2006. Brucellosis In Human And Animals. Geneva, Switzerland: WHO Press. Erisim 24.09.2016,

Corbel MJ, 1997. Brucellosis: an over view. Emerging Infectious Diseases 3, 213–221.

Cosford KL, 2018. Brucella canis: An update on research and clinical management. Can Vet J. 59(1):74-81.

Cvetnic Z, Spicic S, Curic S, Jukic B, Lojkic M, Albert D, Thiebaud M, Garin-Bastuji B, 2005. Isolation of Brucella suis biovar 3 from horses in Croatia, Vet. Rec.156:584-585.

Çelik O, 1937. A case of abortus. Türk Tip Cem Mecmuasi 3:14–6.

Çetin ET, Çoral B, Bilgiç A, 1990. Türkiye'de insanda bruselloz insidansının saptanması. Doğa-Turk. J. Med. Sci. 14,324-334.

D'Anastasio R, Zipfel B, Moggi-Cecchi J, Stanyon R, Capasso L, 2009. Possible Brucellosis in an Early Hominin Skeleton from Sterkfontein, South Africa. PLoS ONE 4(7): e6439. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006439

De BK, Stauffer L, Koylass MS, 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection, J Clin Microbiol. 46:43-9.

De Miguel MJ, Marin CM, Munoz PM, Dieste L, Grillo MJ, Blasco JM, 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main Brucella species. Journal of Clinical Microbiology, 49(4), 1458-1463.

Dıeste-Pérez L, Blasco JM, De Mıguel MJ, Marín CM, Barberán M, Conde Álvarez R, Morıyón I, Muñoz PM, 2014. Performance of skin tests with allergens from B. melitensis B115 and rough B. abortus mutants for diagnosing swine brucellosis. Vet. Microbiol., 168, 161–168.

Díaz Aparicio E, 2013. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella* melitensis, *Brucella* suis and *Brucella* abortus. Rev Sci Tech.32(1):43-51, 53-60. English, Spanish. PMID: 23837364.

Dorneles EMS, Sriranganathan N, Lage AP, 2015. Recent advances in Brucella abortus vaccines. Vet Res 46: 76.

Dorneles EM, De Faria AP, Pauletti RB, Santana JA, Caldeira GA, Heinemann MB, Titze-de-Almeida R, Lage AP, 2013. Genetic stability of *Brucella* abortus S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16). 31, 4856–4859.

Durusoy R, Karababa AO, 2010. Completeness of hepatitis, brucellosis, syphilis, measles and HIV/AIDS surveillance in Izmir, Turkey. BMC Public Health 10:71.

Duvnjak S, Racic I, Spıcıc S, Zdelar-Tuk M, Reil I, Cvetnıc Z, 2018. Molecular Epıdemıology of *Brucella* Melıtensıs Straıns Causıng Outbreaks in Croatıa and Bosnıa and Herzegovına. Acta Veterinaria Hungarica. 66 (2).177–188. https://doi: 10.1556/004.2018.017.

Eisenberg T, Hamann HP, Kaim U, Schlez K, Seeger H, Schauerte N, Melzer F, Tomaso H, Scholz HC, Koylass MS, Whatmore AM, Zschöck M, 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. Appl Environ Microbiol 2012, 78:3753–3755.

Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, DelVecchio VG, Enright FM, 2002. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Vet. Microbiol., 90 (1–4), 425–431.

Erganiş O, 2010. Dünya' da Brusellosis Eradikasyon Programları ve Ülke Modelleri. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. 01-02 Kasım. Ankara.

Erganiş O, 2015. Süt İneği İşletmelerinde Reprodüktif Aşılamalar. Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics.1(1):78-85.

Erganiş O, 2019. Brucella Hastalığında İzlenecek Yol Haritası. Tarım İsletmeleri Genel Müdürlüğü.

European Food Safety Authority (EFSA) 2009. Porcine brucellosis (*Brucella* suis). EFSA J., 1144, 1–112. Available at: www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1144.pdf (accessed on 12 July 2012).

European Food Safety Authority (EFSA) 2010. The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J*., 8, 1496.

Ewalt DR, Payeur JB, Martın BM, Cummins DR, Miller WG, 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (Tursiops truncates). J. Vet. Diagn. Invest. 6, 448-452.

FAO, 2010. *Brucella* melitensis en Eurasia and the Middle East. In: FAO, editor; Rome, Italy. pp. 57 pp.

FAO. 2014. FAO works to curb the burden of brucellosis in endemic countries: Case studies from Eurasia and the Near East. FOCUS ON, No. 8, Rome

Ferreira AC, Chambel L, Tenreiro T, Cardoso R, Flor L, Dias IT, Pacheco T, Garin-Bastuji B, Le Fleche P, Vergnaud G, 2012. MLVA16 typing of Portuguese human and animal *Brucella* melitensis and *Brucella* abortus isolates. PLoS One. 7(8):e42514.

Fischer D, Lorenz N, Heuser W, Kampfer P, Scholz HC, Lierz M, 2012. Abscesses associated with a *Brucella* inopinata-like bacterium in a big-eyed tree frog (Leptopelis vermiculatus). J Zoo Wildl Med 43, 625–628.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (6th report). WHO Technical Report Series, No. 740. WHO, Geneva.

Foster G, Osterman BS, Godfroid J, 2007. *Brucella* ceti sp. nov and *Brucella* pinnipedialis sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts, Int J Syst Evol Micr. 57:2688-93.

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

Fugier E, Pappas G, Gorvel JP, 2007. Virulence factors in brucellosis: Implications for aetiopathogenesis and treatment. Expert Rev Mol Med. 9:1-10.

Galińska EM, Zagórski J, 2013. Brucellosis in humans- etiology, diagnostics, clinical forms. Annals of agricultural and environmental medicine 20(2): 233-238.

García-Yoldi D, Le Fleche P, Marín CM, 2007. Assessment of genetic stability of Brucella melitensis Rev 1 vaccine strain by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Vaccine. 25(15):2858-2862. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.09.063.

Garcia-Yoldi D, Marin CM, De Miguel MJ, Munoz PM, Vizmanos JL, Lopez-Goni I, 2006. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all Brucella species and the vaccine strains Brucella abortus S19 and RB51 and Brucella melitensis Rev-1. Clinical Chemistry, 52(4), 779-781.

Garcia-Yoldi D, Marin CM, Lopez-Goni I, 2005. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of Brucella spp. FEMS Microbiol. Lett. 245, 79–84.

Garcia-Yoldi D, Marin CM, Lopez-Goni I, 2005. Restriction site polymorphisms in the genes encoding new members of group 3 outer membrane protein family of Brucella spp. FEMS Microbiol. Lett. 245, 79–84.

Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marin JM, Albert D, 2006. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. Small Ruminat Research, 62, 63-70.

Garofolo G, Ancora M, Di Giannatale E, 2013. MLVA-16 loci panel on *Brucella* spp. using multiplex PCR and multicolor capillary electrophoresis. J. Microbiol. Meth. 92, 103–107.

Garofolo G, Di Giannatale E, De Massis F, Zilli K, Ancora M, Camma C, Calistri P, Foster JT, 2013. Investigating genetic diversity of *Brucella* abortus and *Brucella* melitensis in Italy with MLVA-16. Infect. Genet. Evol. 19, 59-70. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.021.

Genç O, Büyüktanır Ö, Yurdusev N, 2011. Development of an individual rapid test based on enzymatic immunofiltration assay for detection of anti-Brucella abortus antibody in bovine sera. J Vet Diagn Invest. 23(1):49-56. doi: 10.1177/104063871102300107. PMID: 21217027.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı- Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, 2018. Türkiye Genelinde Koyun ve Keçilerde Brusellozis Aktif Survey Raporu. 2018-Mayıs.

Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlıgı-Gıda ve Kontrol Genel Müdürlügü, 2012. Brusellanın Konjuktival Ası ile Kontrol ve Eradikasyon Projesi-Genelge No:2012/03

Głowacka P, Żakowska D, Naylor K, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A, 2018. Brucella - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. Pol J Microbiol. 67(2):151-161. doi:10.21307/pjm-2018-029

Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C, 2010. Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. Croat Med J 51:296–305.

Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ, 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Med. 1;102(2):118-31. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.007. Epub 2011 May 14. PMID: 21571380.

Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brusellosis has continously been a re-emerging zonosis. Veterinary Research, 36, 313–326.

Godfroid J, Sascha AD, Pappas G, Rothf F, Matopeg G, Mumah J, 2013. A "One Health" surveillance and control of brucellosis in developin gcountries: Moving away from improvisation. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 36, 241– 248.

Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Prev Vet Med 102, 118–131.

Golem SB, 1943. Serological investigation of human and animal brucellosis in Turkey. Turk Hij Tec Biyol Derg 105.

Golshani M, Buozari S, 2017. A review of Brucellosis in Iran: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis, Control, and Prevention. Iran Biomed J. 21(6):349-359. doi:10.18869/acadpub.ibj.21.6.349.

Gorvel J, Moreno E, 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. Vet. Microbiol. 90(1–4): 281–297.

Grillo MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E, 2012. What have we learned from brucellosis in the Mouse model *Vet. Res*., **43**, 29.

Guzmán-Verri, C, Chaves-Olarte E, Von Eichel-Streiber C, López-Goñi L, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP, Moreno E, 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for Brucella abortus internalization in non Professional phagocytes: direct activation of CDC42. Journal of Biological Chemistry 276, 44435–44443.

Gwida M, Al Dahouk S, Melzer F, Rosler U, Neubauer H, 2010. BrucellosisÐregionally emerging zoonotic disease? Croat Med J.51: 289±295. https://doi.org/10.3325/cmj.2010.51.289 PMID: 20718081

Gwida M, El-Gohary A, Melzer F, Khan I, Rösler U, Neubauer H, 2012. Brucellosis in camels. Res Vet Sci. 92(3):351-5.

Gyuranecz M, Wernery U, Kreizinger Z, Juhász J, Felde O, Nagy P, 2016. Genotyping of *Brucella* melitensis strains from dromedary camels (Camelus dromedarius) from the United Arab Emirates with multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. Veter Microbiol. 186, 8–12.

Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC, 2005. Completion of the genome sequence of *Brucella* abortus and comparison to the highly similar genomes of *Brucella* melitensis and *Brucella* suis. J. Bacteriol. 187, 2715–2726.

Hanot Mambres D, Boarbi S, Michel P, Bouker N, Escobar-Calle L, Desqueper D, 2017. Imported human brucellosis in Belgium: Bio and molecular typing of bacterial isolates, 1996-2015. PLoS ONE 12(4): e0174756. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174756

Harmon BG, Adams LG, Frey M, 1988. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am J Vet Res*. 49(7):1092–1097.

He Y, Vemulapalli R, Zeytun A, Schurig GG, 2001. Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with Brucella abortus RB51. Infect Immun. 69:5502–8. doi: 10.1128/IAI.69.9.5502-5508.2001.

He Y, 2012. Analyses of Brucella Pathogenesis, Host Immunity and Vaccine Targets Using Systems Biology and Bioinformatics. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2: 1-17.

Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa AM, 2018. Brucellosis in dogs and public health risk. Emerg Infect Dis 24(8):1401–6.

Herrera E, Rivera A, Palomares EG, 2011. Isolation of *Brucella* melitensis from a RB51-vaccinated seronegative goat. Trop Anim Health Prod 43, 1069–1070. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9822-4

Hollett RB, 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. Theriogenology. 66:575-87.

Hull NC, Schumaker BA, 2018. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. Infect Ecol Epidemiol. 8(1):1500846.

Huy TX, Reyes AW, Hop HT, Arayan LT, Min W, Lee HJ, 2017. Intracellular trafficking modulation by ginsenoside Rg3 Inhibits Brucella abortus uptake and intracellular survival within RAW 264.7 cells. J. Microbiol. Biotechnol. 27(3): 616–623.

Iyisan AS, Akmaz O, Duzgun GS, Ersoy Y, Guler L, Eskiizmirli S, 2000. Seroepidemiology of ovine and bovine brucellosis in Turkey. Pendik Vet Kont Arast Enst Derg 3:21–75.

İhbarı Mecburi Hayvan Hastalıkları ve Bildirimine İliskin Yönetmelik, 2011. Resmî Gazete, Sayısı: 27823.

Jiang H, Fan M, Chen J, Mi J, Yu R, Zhao H, Piao D, Ke C, Deng X, Tian G, Cui B, 2011. MLVA genotyping of Chinese human *Brucella* melitensis biovar 1, 2 and 3 isolates. BMC Microbiol. 11, 256. https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-256.

Jiang H, Wang H, Xu L, Hu G, Ma J, Xiao P, Fan W, Di D, Tian G, Fan M, Mi J, Yu R, Song L, Zhao H, Piao D, Cui B, 2013. MLVA genotyping of *Brucella* melitensis and *Brucella* abortus isolates from different animal species and humans and identification of *Brucella* suis vaccine strain S2 from cattle in China. PLoS One 8(10), e76332. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076332.

Jimenez de Bagues MP, Dudal S, Dornand J, Gross A, 2005. Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. Clin. Immunol., **114**, 227–238.

Kaltungo BY, Saidu SNA, Musa IW, Baba AY, 2014. Brucellosis: A neglected zoonosis. British Microbiology Research Journal. 4:1551-1574.

Kandemir Ö, 2015. Bruselloz Derleme. Türkiye Klinikleri. Inf Dis-Special Topics 2015;8(2).

Karagül MS, Baklan EA, Saytekin AM, Yıldız Öz G, Erdenlig Gürbilek S, 2015. Biovar Distribution of *Brucella* Isolates from Livestock in Turkey between 2010-2014. 32nd World Veterinary Congress, _stanbul-Turkey 13-17 September 2015.

Karcaaltincaba D, Sencan I, Kandemir O, Guvendag-Guven ES, Yalvac S, 2010. Does brucellosis in human pregnancy increase abortion risk. Presentation of two cases and review of literature. J Obstet Gynaecol Res. 36(2):418-23.

Kauffman LK, Petersen CA, 2019. Canine Brucellosis: Old Foe and Reemerging Scourge. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 49(4):763-779. doi: 10.1016/j.cvsm.2019.02.013. Epub 2019 Apr 5. PMID: 30961996.

Kay GL, Sergeant MJ, Giura V, Bandiera P, Milanese M, Bramanti B, Bianucci R, Pallen MJ, 2014. Recovery of a medieval Brucella melitensis genome using shotgun metagenomics. 5, e01337-14.

Kaya O. 1992. Koyun ve keçi Brucellosis'inin allerjik deri testleri ile teşhisi üzerinde çalışmalar. Veterinarium. 3 (1): 13-18.

Kilic ES, Ivanov IN, Durmaz R, Bayraktar MR, Ayaşlioğlu E, Uyanik MH, 2011. Multiple-locus variable number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. J Clin Microbiol 49:3276±83. https://doi.org/10.1128/JCM.02538-10 PMID: 21795514.

Kim S, 2015. The interaction between Brucella and the host cell in phagocytosis, pp. 45–60. In: Baddour M. (ed.). Updates on Brucellosis. InTech, Jinju.

Ko J, Splitter GA, 2003. Molecular host–pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. Clinical Microbiology Reviews 6, 65–78.

Kreizinger Z, Foster JT, Ronai Z, Sulyok KM, Wehmann E, Janosi S, Gyuranecz M, 2014. Genetic relatedness of Brucella suis biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. Veterinary Microbiology. 172(3-4):492-498.

Kudi AC, Kalla DJU, Kudi MC, 1997. Brucellosis in camels J Arid Environ. 37:413-7.

Kumar DR, Sivalingam J, Mishra SK, Kumar A, Vineeth MR, Chaudhuri P, 2019. Differential expression of cytokines in PBMC of Bos indicus and Bos Taurus x Bos indicus cattle due to Brucella abortus S19 antigen. Anim. Biotechnol. 5:1–7. doi: 10.1080/10495398.2018.1555167

Lalsiamthara J, Lee JH, 2017. Development and trial of vaccines against *Brucella*. Journal of Veterinary Science. 18(S1):281-290. DOI: 10.4142/jvs.2017.18.s1.281.

Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP, 2005. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Current Opinion in Microbiology 8, 60–66.

Le Fleche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F, Nockler K, Neubauer H, Guilloteau LA, Vergnaud G, 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 6:9.

Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Garcia-Cantu J, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP, 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella* abortus biovar 1 in infected goats. Vet Microbiol. 75: 91±97. PMID: 10865155

Liu ZG, Di DD, Wang M, Liu RH, Zhao HY, Piao DR, Tian GZ, Fan WX, Jiang H, Cui BY, 2017. MLVA Genotyping Characteristics of Human *Brucella* melitensis Isolated from Ulanqab of Inner Mongolia, China. Front Microbiol. 8:6.

Liu ZG, Wang M, Zhao HY, Piao DR, Jiang H, Liu RH, 2019. Investigation of the molecular characteristics of *Brucella* isolates from Guangxi Province, China. BMC Microbiology. 19:292. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1665-6.

López-Goñi I, Guzmán-Verri C, Manterola L, Sola Landa A, Moriyón I, Moreno E, 2002. Regulation of Brucella virulence by the two-component system BvrR/ BvrS. Veterinary Microbiology 90, 329–339.

López-Santiago R, Sánchez-Argáez AB, De Alba-Núñez LG, Baltierra-Uribe SL, Moreno-Lafont MC, 2019. Immune Response to Mucosal Brucella Infection. Front Immunol. 10:1759. Published 2019 Aug 20. doi:10.3389/fimmu.2019.01759.

Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR, 2008. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect. 136(4):496-503. doi: 10.1017/S0950268807008795. Epub 2007 Jun 11. PMID: 17559694; PMCID: PMC2870831.

Lucero NE, Jacob NO, Ayala SM, 2005. Unusual clinical presentation of brucellosis caused by Brucella canis. J Med Microbiol 54(Pt 5):505–8.

M. Banai, 2002. “Control of small ruminant brucellosis by use of Brucella melitensis Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations,” VeterinaryMicrobiology, vol. 90,no. 1–4, pp. 497– 519.

Ma JY, Wang H, Zhang XF, Xu LQ, Hu GY, Jiang H, Zhao F, Zhao HY, Piao DR, Qin YM, Cui BY, Lin GH, 2016. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. Infect. Dis. Poverty 5, 26. https://doi.org/10.1186/s40249-016-0123-z.

Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC, 2008. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control Brucella abortus infection. Journal of Immunology 180, 1080–1087.

Mantur BG, Amarnath SK, 2008. Brucellosis in India-a review. J. Biosci. 33, 539-547.

Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP, 2011. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. Immunol. Rev., **240**, 211–234.

Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE, 2013. Recent trends in human Brucella canis infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 36(1):55-61. doi: 10.1016/j.cimid.2012.09.002. Epub 2012 Oct 4. PMID: 23040615.

Matthew LL, Leland SR, 2004. Brucellosis. Infecitous Diseases in Clinical Practice 12, 7-14.

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

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P, 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of Mycobacterium tuberculosis molecular epidemiology. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 1901–1906.

McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, 2006. Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marinemammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. J. Clin. Microbiol. 44, 4, 363-370.

Megid J, Mathias LA, Carlos AR, 2010. Clinical Manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans. The Open Vet Sci J. 4:119-126.

Miller R, Nakavuma JL, Ssajjakambwe P, Vudriko P, Musisi N, Kaneene JB, 2016. The Prevalence of Brucellosis in Cattle, Goats and Humans in Rural Uganda: A Comparative Study. Transbound Emerg Dis. 63(6):e197-e210. doi: 10.1111/tbed.12332. Epub 2015 Feb 7. PMID: 25660343.

Moreno E, Moriyón I, 2001. The genus Brucella. In: Dworking, M., Falkow, S., Rosemberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes. Springer, New York, USA.

Moreno E, 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Front Microbiol. 5:213. doi:10.3389/fmicb.2014.00213

Moriyon I, Grillo MJ, Monreal D, 2004. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. Vet. Res. 35(1), 1–38.

Munoz PM, Marin CM, Monreal D, Gonzales D, Garin–Bastuji B, Diaz R, 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for the diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false positive serological results due to Yersinia enterocolitica O:9. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12(1), 141–151.

Musa MT, Eisa MZ, El Sanousi EM, Abdel Wahab, MB, Perrett L, 2008. Brucellosis in camels (Camelus dromedarius) in Darfur, Western Sudan. J Comp Pathol. 138:151–155.

Musa MT, Shigidi MTA, 2001. Brucellosis in Camels in intensive animal breeding areas in the Sudan: Implications in abortions and early-life infections. Rev. de Elv. Medicine Veterinary Pays trop. 54(1):11-15.

Naghadi N, Assanzad-Azar H, Delpisheh A, 2016. The most important medicinal plants for treatment of brucellosis. J. Prev. Epi. 1(2): e20.

Neta AVC, Mol JPS, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, Santos RL, 2010. Review Pathogenesis of Bovine Brucellosis. Veterinary Journal. 184: 146-155.

Nicoletti P, 2002. A short history of brucellosis. Vet Microbiol. 90:5–9.

Nicoletti P, 2010. Brucellosis: past, present and future. Prilozi.31:21–32.

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

Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JOO. Phenotypic Characterization of Brucella Strains Isolated from Livestock In Nigeria. J Vet Microbiol. 2004;103:47-53.

Office International des Epizooties, 2009. Terrestrial Manual. Bovine brucellosis. Accessed February 02, 2012. Available: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.Pdf.

OIE Terrestrial Manual 2012 Chapter 2.4.3, 2012. Bovine Brucellosis Erisim, 09.24.2016, http://web.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.04.03_BOVINE_BRUCELL.pdf

OIE Terrestrial Manual Chapter 2.1.4, 2016. Brucellosis (B.abortus, B.melitensis, B.suis) (Infection with B.abortus, B.melitensis, B.suis). Erisim 09.24.2016, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLOSIS.pdf

Oliveira SC, Giambartolomei GH, Cassataro J, 2011. onfronting the barriers to develop novel vaccines against brucellosis. Expert Review of Vaccines, vol. 10, no. 9, pp. 1291–1305.

Olsen SC, Palmer MV, 2014. Advancement of knowledge of Brucella over the past 50 years. Vet Pathol 51(6):1076–89.

Olsen SC, Stoffregen WS, 2005. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. Expert Review of Vaccines. 4(6):915-928.

Ottones F, Liautard J, Gross A, Rabenoelina F, Liautard JP, Favero J, 2000. Activation of human Vc9Vd2 T-cells by a Brucella suis non-peptidic fraction impairs bacterial intracellular multiplication in monocytic infected cells. Immunology 100, 252–258.

Outbreak in Asia 2019. Erişim. Erişim adresi, https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_terrestrial=182&species_t=0&disease_id_aquatic=999&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2018&selected_report_period=1&selected_start_month=1&date_submit=OK

Pandey A, Cabello A, Akoolo L, Rice-Ficht A, Arenas-Gamboa A, McMurray D, 2016. The case for live attenuated vaccines against the neglected zoonotic diseases brucellosis and bovine tuberculosis. PLoS Negl Trop Dis. 10:e0004572. doi: 10.1371/journal.pntd.0004572.

Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N, 2006. *Brucella* as a biological weapon. Cell. Mol. Life Sci. 2229–2236 (a).

Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV, 2006. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 6:91-99 (b).

Pappas G, 2010.The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. Int J Antimicrob Agents. 36 Suppl 1:S8-11. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013. Epub 2010 Aug 8. PMID: 20696557.

Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E, 2005. Brucellosis. N. Engl. J. Med. 352, 2325-2336.

Pasquevich KA, Samartino CG, Coria LM, 2010. “The protein moiety of Brucella abortus outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces aTh1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis,” Journal of Immunology, vol. 184, no. 9, pp. 5200–5212.

Pasquevich KA, Ibanez AE, Coria LM, Garcia-Samartino C, Estein S, Zwerdling M, 2011. An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against B. abortus mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice. PLoS ONE. 6:e16203. doi: 10.1371/journal.pone.0016203.

Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, *Brucella* Asıları Üretim Laboratuvarı, 2015. *Brucella* cinsine ait mikroorganizmların tür, biyotip ve ası susları (S19, Rev1) seviyesinde identifikasyonları analiz talimatı. İstanbul.

Perez-Sancho M, Garcia-Seco T, Dominguez L, Alvarez J, 2015. Control of animal brucellosis: the most effective tool to prevent human brucellosis.. Updates on Brucellosis. Ed. 1. InTech. ISBN: 978-953-51-2211-1.

Piao DR, Liu X, Di DD, Xiao P, Zhao ZZ, Xu LQ, Tian GZ, Zhao HY, Fan WX, Cui BY, Jiang H, 2018. Genetic polymorphisms identify in species/biovars of *Brucella* isolated in China between 1953 and 2013 by MLST. BMC Microbiol. 18(1), 7. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1149 0.

Poester FP, Samartino LE, Santos RL, 2013. Pathogenesis and pathology of brucellosis in live stok. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 32(1) 105-115.

Poester FP, Samartino LE, Lage AP, 2005. Diagnóstico da Brucelose Bovina. Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia 47, 13–29.

Porte F, Liautard JP, Kohler S, 1999. Early acidification of phagosomes containing Brucella suis is essential for intracellular survival in murine macrophages. Infection and Immunity 67, 4041–4047.

Purcell B, David L. Hoover DL, Friedlander AM, 2007. Brucellosis. In: Martha K. Lenhart MK, Colonel MC, editors. Medical aspects of biological warfare. Washington, DC: The Office of the Surgeon General US Army Medical Department Center and School Borden Institute publishing; p.185-198.

Ranjbar M, 2015. Treatment of brucellosis, pp. 171-184. In: Baddour M. (ed.). Updates on Brucellosis. InTech, Teheran.

Reviriego FJ, Moreno MA, Dominguez L, 2000. Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. Preventive Veterinary Medicine. 44(3-4): 167-173.

Reyes AW, Simborio HL, Hop HT, Arayan LT, Min WG, Lee HJ, Rhee MH, Chang HH, Kim S, 2016. Inhibitory effect of red ginseng acidic polysaccharide from Korean red ginseng on phagocytic activity and intracellular replication of Brucella abortus in RAW 264.7 cells. J. Vet. Sci. 17(3): 315–321.

Rhyan JC, Nol P, Quance C, Gertonson A, Belfrage J, Harris L, Straka K, Robbe- Austerman S, 2013. Transmission of brucellosis from elk to cattle and bison, Greater Yellowstone area, U.S.A., 2002-2012. Emerging Infectious Diseases. 19(12): 1992-1995.

Robinson A, 2003. Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO Animal Production and Health Paper. 156.

Rolan HG, Tsolis RM, 2008. Inactivation of the type IV secretion system reduces the Th1 polarization of the immune response to Brucella abortus infection. Infection and Immunity 76, 3207–3213.

Roop RM, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW, 2009. Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. Medical Microbiology and Immunology198, 221–238.

Rossetti CA, Arenas-Gamboa AM, Maurizio E, 2017. Caprine brucellosis: A historically neglected disease with significant impact on public health. PLoS Negl Trop Dis 11(8): e0005692. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005692

Roushan MR, Baiani M, Asnafi N, Saedi F, 2011. Outcomes of 19 pregnant women with brucellosis in Babol, northern Iran. Trans R Soc Trop Med Hyg. 105(9):540-2.

Ryan KJ, Ray CG, 2004. Brucellosis. Sherris Medical Microbiology 4th Edition McGraw Hill ISBN08388529-9.

Samartino L, 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina, Rocha, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar,

Argentina. Available at: www.mgap.gub.uy/DGSG/ Capacitación/JornadasBrucelosis/ (accessed on 12 July 2012).

Samartino LE, Enright FM, 1996. Brucella abortus differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 19, 55–63.

Santos RL, Barreto Filho JB, Marques Júnior AP, Andrade JS, 1996. Erythrophagocytosis in caprine trophoblast. Theriogenology 46, 1077–1083.

Sayour AE, Elbauomy E, Abdel-Hamid NH, Mahrous A, Carychao D, Cooley MB, Elhadidy M, 2020. MLVA fingerprinting of *Brucella* melitensis circulating among livestock and cases of sporadic human illness in Egypt. Transbound. Emerg. Dis.

Saytekin AM, Karagül MS, Baklan EA, Erdenlig Gürbilek S, 2015. Current Stiuation of Brucellosis Outbreaks in Turkey after Mass Vaccination started in 2012. 32nd World Veterinary Congress. İstanbul.

Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, 2009. Isolation of *Brucella* microti from mandibular lymph nodes of red foxes, Vulpes vulpes, in lower Austria. Vector Borne Zoonotic Disease. 9, 2, 153-155.

Scholz HC, Hubalek Z, Sedlácek I, 2008. *Brucella* microti sp. nov., isolated from the common Vole Microtus arvalis. IJSEM. 58:375-382.(a).

Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK, 2010. *Brucella* inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 4):801-808. doi: 10.1099/ijs.0.011148-0. Epub 2009 Aug 6. PMID: 19661515.

Scholz HC, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, 2016. Brucella vulpis sp. nov., a novel Brucella species isolated frommandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes) in Austria. Int J Syst Evol Microbiol. 66: 2090–2098.

Scholz HC, Banai M, Cloeckaert A, Kämpfer P, Whatmore AM, 2018. *Brucella*. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). doi:10.1002/9781118960608.gbm00807.pub2.

Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, AlDahouk S, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Gollner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K, 2008. *Brucella* microti sp. nov. ,isolated from the common vole Microtus arvalis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology58,375–382. (b).

Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ, 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. Vet Microbiol 90, 479-496.

Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, Srirangananathan N, 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of Brucella abortus. Vet. Microbiol. 28, 171–188.

Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N, 2012. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Vet Microbiol 140:392–398.

Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarlykov P, Filipenko M, 2015. Genetic diversity of *Brucella* abortus and *Brucella* melitensis in Kazakhstan using MLVA-16. Infect Genet Evol. 34:173±80. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.008 PMID: 26160544

Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarlykov P, Filipenko M, 2019. Genetic diversity of *Brucella* abortus and *Brucella* melitensis in Kazakhstan using MLVA-16. Infect Genet Evol. 34:173±80. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.008 PMID: 26160544

Shin S, Carmichael LE, 2012. Canine Brucellosis caused by B. canis. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Available: http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/shin/ivis.pdf.

Simpson GJG, Mercotty T, Rouille E, Chilundo A, Letteson JJ, Godfroid J, 2018. Immunological response to Brucella abortus strain 19 vaccination of cattle in a communal area in South Africa. J S Afr Vet Assoc. 89:e1–7. doi: 10.4102/jsava.v89i0.1527

Skalsky KD, Yahav J, Bishara S, Pitlik L, Leibovici, Paul M, 2008. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. BMJ. 336(7646): 701 704.

Skendros P, Pappas G, Boura P, 2011. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes Infect*., **13**, 134–142.

Sofian M, Aghakhani A, Velayati AA, Banifazl M, Eslamifar A, Ramezani A, 2008. Risk factors for human brucellosis in Iran: a case-control study. International journal of infectious diseases 12(2): 157-161.

Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. Emerg. Infect. Dis. 9, 485-488.

Solis J, del Pozo G, Solera J, 2015. Treatment of human brucellosis-review of evidence from clinical trials, pp. 186–189. In: Baddour M. (eds). Updates on Brucellosis. InTech, Villarrobledo, Albacete.

Sun MJ, Di DD, Li Y, Zhang ZC, Yan H, Tian LL, 2016. Genotyping of *Brucella* melitensis and *Brucella* abortus strains currently circulating in Xinjiang, China. Infect Genet Evol. 44:522±9. https://doi. org/10.1016/j.meegid.2016.07.025 PMID: 27521159

Sun MJ, Di DD, Li Y, Zhang ZC, Yan H, Tian LL, 2017. Genotyping of *Brucella* melitensis and *Brucella* abortus strains currently circulating in Xinjiang, China. Infect Genet Evol. 44:522±9. https://doi. org/10.1016/j.meegid.2016.07.025 PMID: 27521159

Takeda K, Akira S, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. International Immunology 17, 1–14.

Tay BY, Ahmad N, Hashim R, Mohamed Zahidi J, Thong KL, Koh XP, Mohd Noor A, 2015. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) genotyping of human *Brucella* isolates in Malaysia. BMC Infect Dis. 15:220.

T.C. Sağlık Bakanlığı, 2011. Zoonotik Hastalıklar Hizmet İçi Eğitim Modülü, https://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/Zoonotik%20Hastaliklar%20Katilimci%20Kitabi.

The Center for Food Security&Public Health, 2012. Canine Brusellosis: *Brucella canis.* Erisim 11.19.2015, http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf.

Tikare NV, Mantur BG, 2008. Brucella meningitis in an infant-Evidence for human breast milk transmission, J Trop Pediatr. 54(4):272-4.

TOB, 2019. Brusellanın Konjuktival Aşı İle Kontrol ve Eradikasyonu Genelgesi. 71037622-325.01-E.1842426. Resmi Gazete Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü. 2019-6.

Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, Neubauer H, Scholz HC, 2010. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of brucellae in tissue using quantitative real-time PCR. BMC Infect Dis 10:100. https://doi.org/10.1186/1471 -2334-10-100.

Tosser-Klopp G, Bardou P, Bouchez O, Cabau C, Crooijmans R, 2014. Design and characterization of a 52K SNP chip for goats. PLoS ONE. 9: e86227. https://doi.org/10.1371/journal.pone. 0086227 PMID: 24465974.

Uslu A, Erganis O, 2021. Development of Brucella melitensis Rev.1 ΔOmp19 mutants with DIVA feature and comparison of their efficacy against three commercial vaccines in a mouse model. Molecular Immunology. May;133:44-52. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.02.006.

Valdezate S, Navarro A, Villalon P, Carrasco G, Saez-Nieto JA, 2010. Epidemiological and phylogenetic analysis of Spanish human *Brucella* melitensis strains by multiple-locus variable-number tandem-repeat typing, hypervariable octameric oligonucleotide fingerprinting, and rpoB typing. J. Clin. Micro. 48, 2734–2740.

Vassallo DJ, 1992. The Corps Disease: Brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. J. R. Army Med. Corps. 138,140-150.

Vassallo DJ, 1996. The saga of brucellosis: controversy over the credit for linking Malta fever with goat's milk. Lancet. 348, 804-808.

Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, 2002. "A DNA vaccine encoding lumazine synthase from Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice," Infection and Immunity, vol. 70, no. 5, pp. 2507–2511.

Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M, 1985. *Brucella*, a mono specific genus as shown by deoxyribonucleic-acid hybridization. International Journal of SystematicBacteriology35, 292–295.

Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, 2018. Genotypic expansion within the population structure of classical *Brucella* species revealed by MLVA16 typing of 1404 *Brucella* isolates from different animal and geographic origins, 1974-2006. Front Microbiol. 9:1545.

von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP, 2012. Internal affairs: investigating the Brucella intracellular lifestyle. FEMS Microbiol. Rev. 36(3): 533–562.

Wanke MM, 2004. Canine brucellosis, Animal Reproduction Science, 82-83: 195-207.

Wareth G, Böttcher D, Melzer F, Shehata AA, Roesler U, Neubauer H, Schoon HA, 2015. Experimental infection of chicken embryos with recently described *Brucella* microti. Pathogenicity and pathological findings. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 41:28-34. doi: 10.1016/j.cimid.2015.06.002. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26264524.

Wareth G, El-Diasty M, Melzer F, Schmoock G, Moustafa SA, El-Beskawy M, Khater DF, Hamdy MER, Zaki HM, Ferreira AC, Ekateriniadou LV, Boukouvala E, Abdel-Glil MY, Menshawy AMS, Pérez Sancho M, Sakhria S, Pletz MW, Neubauer H, MLVA-16 Genotyping of *Brucella* abortus and *Brucella* melitensis Isolates from Diferent Animal Species in Egypt: Geographical Relatedness and the Mediterranean Lineage. Pathogens. 2020, 9, 498. https://doi:10.3390/pathogens9060498.

Westhusin ME, Shin T, Templeton JW, Burghardt RC, Adams LG, 2007. Rescuing valuable genomes by animal cloning: a case for natural disease resistance in cattle. J. Anim. Sci., 85 (1), 138–142.

Whatmore AM, Dawson CE, Groussaud P, Koylass MS, King AC, Shankster SJ, Sohn AH, Probert WS, McDonald WL, 2008. Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection. Emerg Infect Dis. 14(3):517-8. doi: 10.3201/eid1403.070829. PMID: 18325282; PMCID: PMC2570841.

Whatmore AM, Perrett LL, MacMillan AP, 2007. Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. BMC Microbiol. 7:34. https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-34 PMID: 17448232.

Whatmore AM, Shankster SJ, Perrett LL, Murphy TJ, Brew SD, Thirlwall RE, 2006. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Typing of *Brucella* spp. 44:1982±93.

Whatmore AM, 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol. 9:1168–1184.

Whatmore AM, Koylass MS, Muchowski J, Edwards-Smallbone J, Gopaul KK, Perrett LL, 2016. Extended Multilocus Sequence Analysis to Describe the Global Population Structure of the Genus *Brucella*: Phylogeography and Relationship to Biovars. Front. Microbiol. 7, 2049. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02049.

Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, AlDahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, 2014. *Brucella* papionis sp.nov.,isolated from baboons. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64,4120–4128. doi:10.1099/ijs.0.065482-0

WHO/MZCP, 1998. Human and Animal Brucellosis, WHO, Damascus, Syria.

World Organisation for Animal Health (OIE) 2010. Porcine brucellosis, Chapter 2.8.5. [Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009]. In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris. Available at: www.oie.int/fi leadmin/home/eng/health_ standards/tahm/2.08.05_porcine_bruc.pdf (accessed on 13 November 2012).

Wyatt HV, 1999. Royal Navy surgeons and the transmission of brucellosis by goats' milk. *J. R. Nav. Med. Serv*., **85**, 112–117. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.

Wyatt HV, 2004. Give a disease a bad name. *Br. med. J.*, **329**, 272. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.

Wyatt HV, 2005. How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *J. roy. Soc. Med.*, **98**, 451–454. Available at: sites.google.com/site/vivianwyatt/.

Wyatt HV, 2013. Lessons from the history of brucellosis. Rev Sci Tech. 32(1):17-25. doi: 10.20506/rst.32.1.2181. PMID: 23837362.

Xavier MN, Paixao TA, Hartigh AB, Tsolis RM, Santos RL, 2010. Pathogenesis of Brucella spp. The Open Veterinary Science Journal. 4: 109-118.

Yagupsky P, 2004. Use of BACTEC MYCO/F LYTIC medium for detection of *Brucella melitensis* bacteremia. *J Clin Microbiol*. 42:2207–2208.

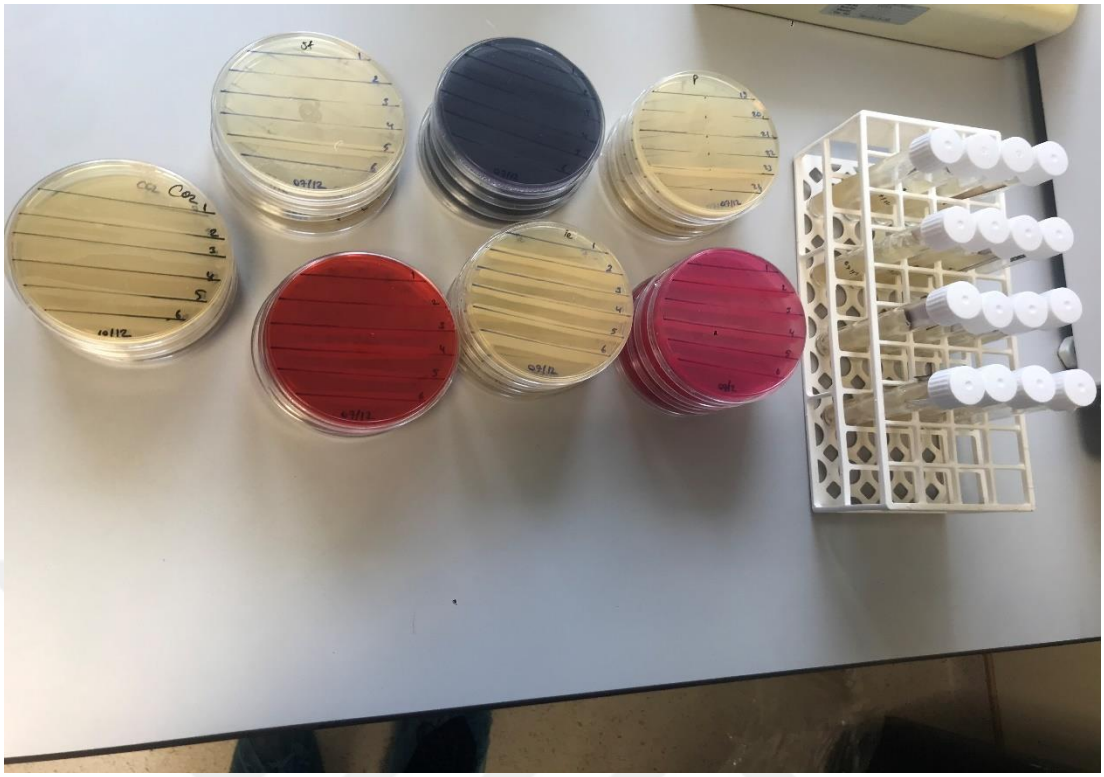
Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW, 2013. Progress in Brucella vaccine development. Front. Biol. 8(1): 60–77.

Yu WL, Nielsen K, 2010. Review of detection of Brucella spp. by polimerase chain reaction. Croatian Medical Journal, 51, 306-313.

Yumuk Z, O'Callaghan D, 2012. Brucellosis in Turkey -- an overview. Int J Infect Dis. 16(4):e228-35. doi: 10.1016/j.ijid.2011.12.011. Epub 2012 Feb 12. PMID: 22333223.

Zabalza-Baranguá A, San-Román B, Chacón-Díaz C, de Miguel MJ, Muñoz PM, Iriarte M, 2019. GFP tagging of Brucella melitensis Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. Transbound Emerg. Dis. 66:505–16. doi: 10.1111/tbed.13053

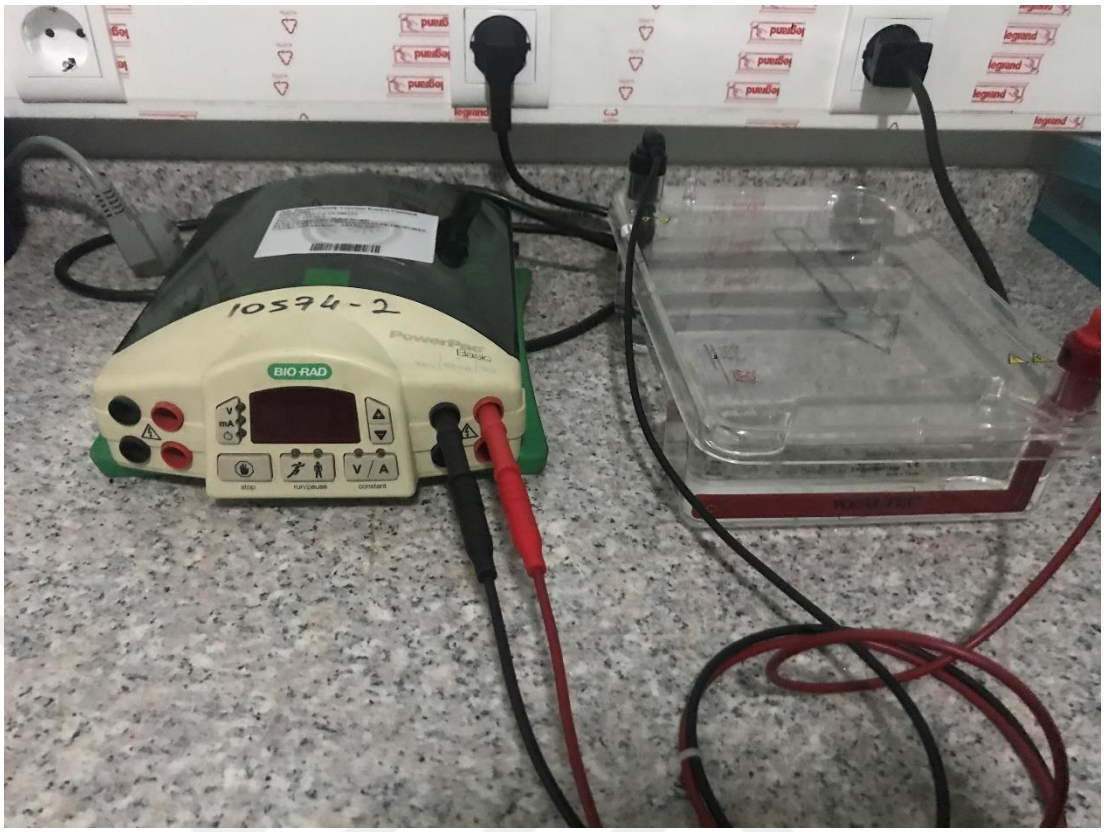
EK-B



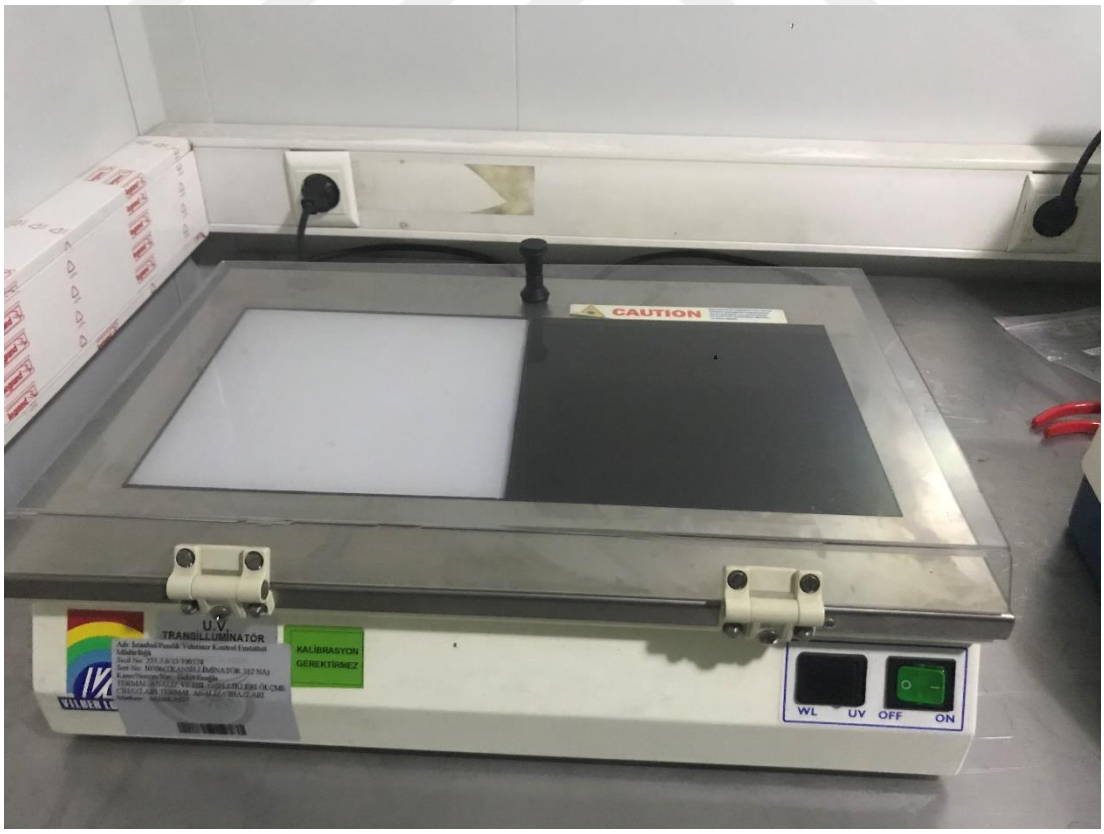
Ek 1.1: İzolatların biyotiplendirme ile doğrulama aşaması



Ek 1.2.: Thermal- Cycler cihazı



Ek 1.3.: Jel Elektroforez cihazı



Ek 1.4.: UV. görüntüleme cihazı



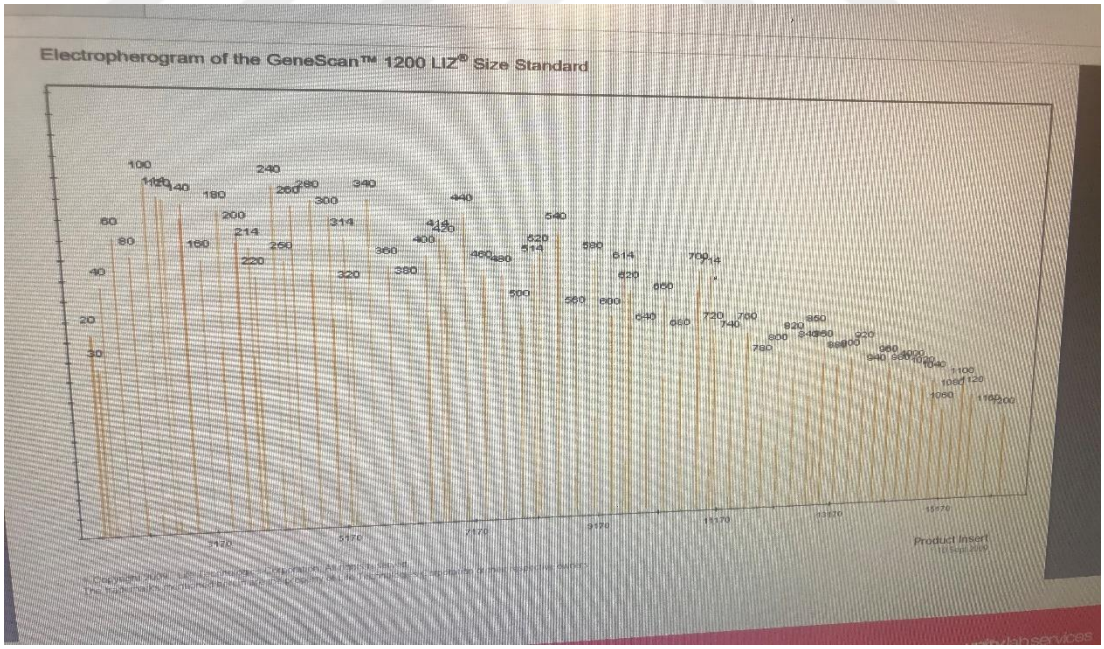
Ek 2.1.: DNA'ların nanodrop cihazı ile OD değerlerinin belirlenmesi



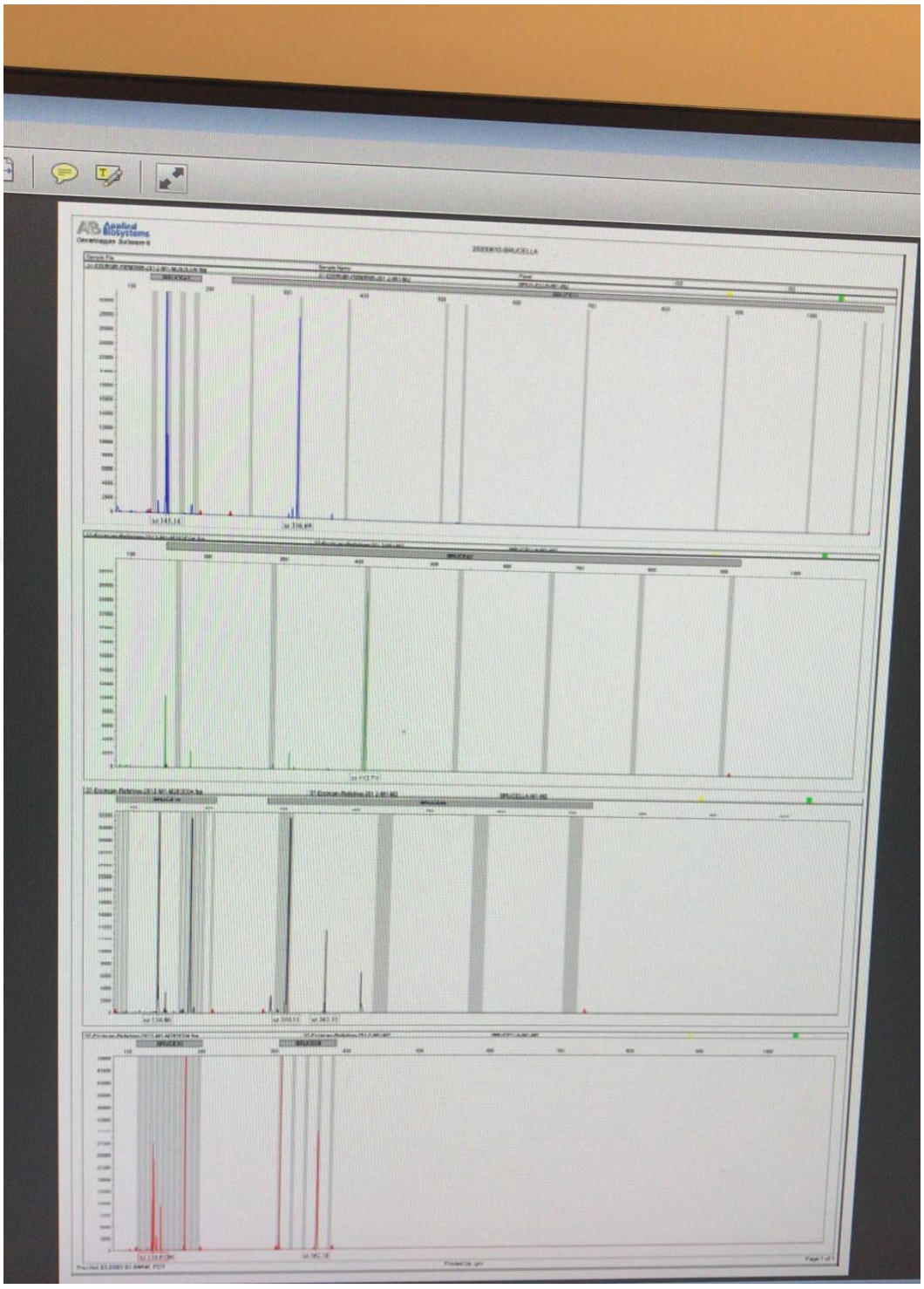
Ek 2.2.: PZR ürünlerin hazırlanışı



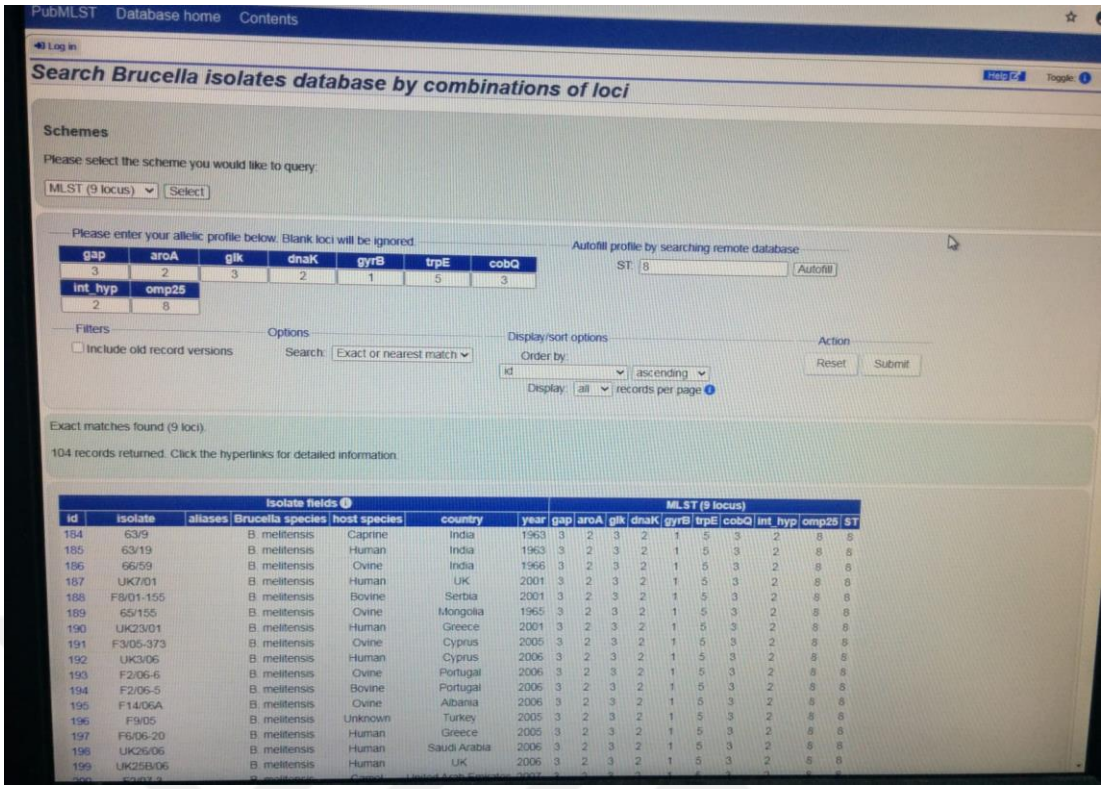
Ek 2.3.: Numunelerin Kapillar Elektroforez cihazı ile yürütülmesi



Ek 2.4.: GeneScan 1200 Size standardın düzenlenmesi



Ek 2.5.: GeneMapper version 6 programında elde edilen pikleri değerlendirmesi



Ek 2.6.: MLST veritabanında verilerin değerlendirmesi