

İnsan Kaynaklı *Brucella* İzolatlarının Tanımlama ve Tiplendirmesinde Konvansiyonel Yöntemler ile Gerçek Zamanlı Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Karşılaştırılması*

Comparison of Conventional Methods and Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction for Identification and Typing of *Brucella* Isolates of Human Origin

Ayşe ÇEREKCI¹, Selçuk KILIÇ², Mehmet BAYRAKTAR³, M. Hamidullah UYANIK⁴, Ekrem YAŞAR⁵, Berrin ESEN²

¹ Kahramanmaraş Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kahramanmaraş.

¹ Kahramanmaraş State Hospital, Microbiology Laboratory, Kahramanmaraş, Turkey.

² Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Ankara.

² Refik Saydam National Public Health Agency, Department of Communicable Diseases Research, Ankara, Turkey.

³ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

³ Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sanliurfa, Turkey.

⁴ Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

⁴ Atatürk University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Erzurum, Turkey.

⁵ Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Diyarbakır.

⁵ Diyarbakır Pediatric Hospital, Microbiology Laboratory, Diyarbakir, Turkey.

* Bu çalışma, ilk yazarın Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğünde yaptığı uzmanlık tez çalışmasıdır.

Geliş Tarihi (Received): 31.01.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 22.02.2011

ÖZET

Bruselloz tüm dünyada yaygın olarak görülen zoonotik bir hastalıktır ve endemik olarak görüldüğü ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, 2001-2007 yılları arasında Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgesinde bruselloz tanısı almış hastaların klinik örneklerden izole edilen 187 *Brucella* suşunun konvansiyonel yöntemler ile tür/biyovaryalarının saptanması amaçlanmış ve konvansiyonel yöntemlere alternatif olabilecek multipleks-gerçek zamanlı poli-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Selçuk Kılıç, Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Bakteriye Zoonozlar Referans ve Araştırma Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 312 458 2169, **E-posta (E-mail):** selcuk.kilic@rshm.gov.tr

meraz zincir reaksiyonu (M-RT-PCR) yönteminin performansı değerlendirilmiştir. Suşların CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, üreaz aktivitesi, tiyoin ve bazik fuksin boyalarına duyarlılığı, Tbilisi ve Berkeley faji ile lizis ve A ve M monovalan antiserumları ile aglütinasyon reaksiyonları değerlendirilerek tür tayini ve biyotiplendirilmesi yapılmıştır. Konvansiyonel yöntemler ile *Brucella* suşlarının tamamı *Brucella melitensis* biyovar 3 olarak tanımlanmıştır. M-RT-PCR yönteminde *bcs31* geni ve *Brucella* genomundaki IS711 elementinin özgül insersiyon bölgeleri hedef olarak seçilmiş; cins düzeyinde tanımlama amacıyla 31 kDa büyüklüğündeki proteini kodlayan *bcs31* genini amplifiye etmek için primer ve prob seti kullanılmıştır. *Brucella abortus* için *alkB* genindeki ve *B.melitensis* için *BME1162* genindeki insersiyon dizisine (IS711) özgül primer ve probler seçilmiştir. M-RT-PCR yöntemi ile de suşların tamamı *B.melitensis* olarak saptanmıştır. M-RT-PCR yönteminin sonuçları, referans yöntem olarak kabul edilen konvansiyonel biyotiplendirme ile %100 uyumlu olarak bulunmuştur. Yüksek duyarlılığı nedeniyle M-RT-PCR yöntemi, bakteri yükünün az olduğu klinik örneklerde de etkenin hızlı olarak saptanması ve tür ayırımının yapılmasında yararlı bir araç olabilir. Sonuçlarımız, bu bölgelerde insan brusellozunda en önemli etkenin *B.melitensis* biyovar 3 olduğunu ve M-RT-PCR yönteminin *Brucella* tiplendirilmesinde önemli bir uygulama alanı bulabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Bruselloz; *Brucella* spp.; biyotiplendirme; multipleks RT-PCR; Türkiye.

ABSTRACT

Brucellosis which is a worldwide zoonotic disease, still constitutes a major public health problem in rural areas of Turkey. The aim of the present study was to evaluate the species and biovar distribution of 187 presumptive *Brucella* strains isolated from patients inhabiting at the provinces in Eastern, South Eastern and Mediterranean regions over a 7-years period (from 2001 to 2007) and to compare multiplex real-time-polymerase chain reaction (M-RT-PCR) and conventional biotyping for the differentiation of three *Brucella* species. The isolates were identified at genus level by conventional microbiological methods and classified using the classical *Brucella* species biotyping scheme based on CO₂ requirement for growth, urease activity, H₂S production, sensitivity to basic fuchsin and thionin (20 and 40 µg/ml), lysis by Tbilisi and Berkeley phages, and agglutination with monospecific antisera for A and M antigens. All *Brucella* isolates were identified as *Brucella melitensis* biovar 3. M-RT-PCR assay targeted *bcs31* gene and the specific integration of IS711 elements within the genome of the respective *Brucella* species. For the identification of *Brucella* spp. the primers and probes which targeted the *bcs31* gene were used. The *Brucella abortus* primers and probe set targeted the specific insertion of an IS711 element downstream of the *alkB* gene, whereas the *B.melitensis* primers and probe set targeted the insertion of an IS711 element downstream of BME1162. M-RT-PCR results were found to be 100% compatible with the reference conventional typing methods. Due to its high sensitivity, the M-RT-PCR assay could be a valuable tool for the rapid detection and differentiation of *Brucella* species in clinical samples which usually have very low bacterial load. These findings indicated that *B.melitensis* biovar 3 was by far the most frequent species for human brucellosis in these specific regions of Turkey and multiplex-RT-PCR seemed to be promising in the detection and differentiation of *Brucella* species.

Key words: Brucellosis; *Brucella* spp.; biotyping; multiplex RT-PCR; Turkey.

GİRİŞ

Bruselloz, birçok organ ve dokuyu etkileyen sistemik bir enfeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre bruselloz dünyada en sık rastlanan bakteriyel zoonozdur ve her yıl yaklaşık 500.000 yeni olgu bildirilmektedir^{1,2}. Ülkemizde bruselloz, endemik bir enfeksiyon olup Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1970 yılında 37 olarak bildirilen olgu

sayısı (0.1/100.000) giderek artış göstermiş ve 2004 yılında 18.563 (25.6/100.000) olgu saptanmıştır. Son yıllarda, hayvanların yoğun olarak aşılınması, enfekte hayvanların izolasyon ve eliminasyonu, hayvan hareketlerinin kontrolü ve toplumun eğitimi sonucu bildirilen olgu sayısında belirgin bir azalma (2009 yılında 10.224 olgu; insidans 13.5/100.000) gözlenmektedir³.

Brucella cinsi; belirgin konak özellikleri gösteren *Brucella abortus* (sığır), *Brucella melitensis* (koyun ve keçi), *Brucella ovis* (koç), *Brucella canis* (köpek), *Brucella suis* (domuz), *Brucella neotomae* (çöl faresi), *Brucella ceti* ve *Brucella pinnipedialis* (deniz memelileri), *Brucella microti* (kırmızı tilki, tarla faresi) ile *Brucella inopinata* (meme implantından izole edilmiş) olarak adlandırılan 10 tür içermektedir^{1,4-8}. *Brucella* türleri fenotipik ve antijenik özelliklerine göre biyovar (bv)/biyotiplere ayrılmaktadır. *B.melitensis*'in üç, *B.abortus*'un yedi, *B.suis*'in beş biyovarı bulunurken diğer türlerin ise birer biyovarı bulunmaktadır. *Brucella* türlerinde konak özgüllüğü kesin olmayıp, çapraz enfeksiyonlar (örn. sığırlarda *B.melitensis* ve *B.suis* enfeksiyonu gibi) görülebilir^{1,4,9}. İnsanlarda görülen bruselloz olgularının çoğundan *B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis* türleri sorumlu olup, insan için en patojen tür olan *B.melitensis*, daha şiddetli klinik tablolara ve komplikasyonlara neden olmaktadır ve daha çok gıda kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkilidir^{1,3,10-12}.

Brusellozda kesin tanı, etkenin klinik örneklerden izolasyonu ile konulmaktadır. Ancak bakterinin yavaş üremesine bağlı olarak sonuçların geç alınması, özellikle kronik olgular- da etkenin çoğunlukla izole edilememesi ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon gelişme ris- ki nedeniyle, tanıda serolojik testler en yaygın olarak kullanılan yöntemdir^{1,3,9,12}. Son yıl- larda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), konvansiyonel yöntemlere göre daha erken ve güvenilir sonuçlar vermesi ve etkenle direkt teması azaltarak laboratuvar kaynaklı enfek- siyonları engellemesi nedeniyle günümüzde konvansiyonel yöntemlerin yerini almaya başlamıştır^{13,14}.

Epidemiyolojik ve klinik olarak bruselloz ile uyumlu olguların kültür veya serolojik test- ler ile doğrulanması brusellozda tedaviye başlamak için yeterlidir. Buna karşın, enfeksi- yon zincirinde rol alan hayvanların saptanması, kontrol önlemlerinin alınabilmesi, eradi- kasyon programlarının hazırlanması ve uygulanması için hakim olan *Brucella* tür ve biyo- varlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır^{1,15,16}. Bu çalışmada, *Brucella* suşlarının tür tayininde son dönemde kullanılmaya başlanan; daha kısa sürede, daha güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçların alındığı, klinik örneklerden etkenin direkt tanımlanabildiği mul- tipleks gerçek zamanlı PCR (M-RT-PCR) yöntemi ile klasik biyotiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Brucella Suşları

Çalışmaya, 2001-2007 yılları arasında Malatya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi (102 izolat), Erzurum Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi (43 izolat), Başkent Üni- versitesi Adana Bölge Hastanesi (16 izolat) ve Diyarbakır Çocuk Hastalıkları Hastanesi (26 izolat)'nde bruselloz ön tanılı olgulardan (97'si erkek, 90'ı kadın) izole edilerek kurumu- muza tür/biyovar tayini için gönderilen toplam 187 *Brucella* suşu alındı.

Tür ve Biyotip Tanısında Kullanılan Yöntemler

Klinik izolatların cins düzeyinde tanımlanması amacıyla, konvansiyonel yöntemler [koloni morfolojisi, Gram boyama, üreme özellikleri, akriflavin (Sigma-A 8126, 1/1000'lik solüsyon) testi, oksidaz, katalaz, hareket, indol, MR, Voges-Proskauer testi, sitrat, nitrat redüksiyonu, jelatin hidrolizi gibi biyokimyasal reaksiyonlar], anti-*Brucella* poliklonal serum ile lam aglütinasyonu ve 31 kDa *B.abortus* proteinini hedef alan B4/B5 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemi uygulandı¹⁷. *Brucella* spp. olarak tanımlanan izolatlar; CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, Christensen's üre agar ve Rustagian-Stuart üre buyyondaki üre-az aktivitesi, 20 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonda bazik fuksin (Sigma-B 0904, ABD) ve tiyonin (Merck, Almanya) içeren besiyerinde üreme (boya duyarlılık testi), Tbilisi (Tb) ve Berkeley (Bk) faji ile lizis ve monovalan A ve M antiserumlarıyla aglütinasyon testleri-ni içeren klasik biyotiplendirme şeması kullanılarak tiplendirildi¹⁶.

B.melitensis (bv 1: 16M, ATCC 23456; bv 2: 63/9, NCTC 10508; bv 3: Ether, NCTC 10505), *B.abortus* (bv 1: 544, ATCC 23448; bv 2: 86/8/59 (NCTC 10501); bv 3: Tulya, ATCC 23448), *B.suis* 1330 bv 1 (NCTC 10316) ve *B.melitensis* Rev-1 referans suşları tür ve biyotip tayininde kontrol suşları olarak kullanıldı.

M-RT-PCR Yöntemi

Suşların cins ve tür düzeyinde moleküler tanımlamasında; *Brucella* spp., *B.melitensis* ve *B.abortus*'u aynı anda tek bir tüpte tanımlayabilen M-RT-PCR yöntemi modifiye edilerek uygulandı¹⁷.

Çalışmaya alınan tüm suşlar serum-dekstrozu-agar (SDA) besiyerine ekilerek 48 saat %5 CO₂'li ortamda 35°C'de inkübe edildi. Bakteriye ait DNA, Heliosis DNA ekstraksiyon modülü (Metis Biyoteknoloji, Ankara) kullanılarak elde edildi. Elde edilen DNA'lardan, *Brucella* spp.'nin tanımlanması için *bcs31* gen (GenBank, NM20404) bölgesi, *B.melitensis* için IS711 elementi BMEI1162 (GenBank, NC003317) ve *B.abortus* için ise *alkB* genine özgün IS711 (GenBank, AF148682) yönelik primer dizileri ve TaqMan problemleri (TaqMan, Palo Alto, ABD) kullanıldı. Bu çalışmada kullanılan *B.melitensis* ve *B.abortus*'un ters primerleri aynı iken (IS711), ileri primerleri farklı olarak tasarlandı. Ülkemizde bugüne kadar *B.abortus* ve *B.melitensis* türleri tanımlandığı için sadece bu türlere yönelik primer dizileri seçildi.

PCR amplifikasyonu Probert ve arkadaşları¹⁷ tarafından tarif edilen protokol üzerinde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. M-RT-PCR LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Almanya), 1.5 mM MgCl₂ (Roche Diagnostics, Almanya), ileri primer (3 nM) (Sigma-Genosys, ABD), ters primer (100 nM), her bir probtan 100 nM içeren 16 µl multipleks PCR reaksiyon karışımına 4 µl template eklenerek LightCycler 480 PCR cihazında (Roche Diagnostics, Almanya) amplifiye edildi. Amplifikasyon basamakları; 95°C'de 10 dakika denatürasyonu takiben, 95°C'de 15 saniye, 60°C bir dakikadan oluşan 45 döngü şeklinde uygulandı. Sonuçlar LightCycler 480 analiz programında her prob için uygun olan dalga boyunda logaritmik floresan sinyal artışının varlığı veya yokluğuna göre analiz edildi. Her çalışmaya en az bir pozitif kontrol ve DNA içermeyen negatif kontrol eklendi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 187 *Brucella* suşu, kan (n= 170), kemik iliği (n= 11), beyin-omurilik sıvısı (BOS) (n= 3) ve plevral sıvı (n= 3) kültürlerinden izole edilmiştir. Bruselloz ön tanılı olguların, Doğu Anadolu (127 izolat), Güneydoğu Anadolu (48 izolat) ve Akdeniz (12 izolat) bölgesinde yer alan 20 ilde yaşadıkları saptanmıştır.

İzolatların kanlı agar ve SDA'ya yapılan pasajlarındaki koloni morfolojileri, akriflavin so-lüsyonu ile aglütinasyon özelliklerine bakılarak değerlendirilmiş ve hepsinin S tipi koloni olduğu gözlenmiştir. SDA yatık besiyerlerine ekilen bakterilerin hem aerobik hem de %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübasyon sonunda üreme (koloni sayısı) açısından bir farklılık göstermemesi, suşların üreme için CO₂'e gereksinim duymadığını ortaya koymuştur. SDA yatık tüp besiyerlerine yerleştirilen ve her gün değiştirilen kurşun asetatlı kağıt şerit-lerde ilk 24 saat sonunda siyah renk oluşumu gözlenmezken, suşların bir kısmında ikin-ci günden sonra çok az miktarda siyah renk değişikliği gözlenmiştir. Christensen's üre agara ve Rustagian-Stuart üre buyyona ekilen tüm suşlarda en erken 90. dakikada ol-makla beraber çoğunluğunda iki ile dördüncü saatten sonra magenta (fuşya) renk olu-şumu saptanmıştır.

Çalışmaya alınan tüm suşların, tiyoin ve bazik fuksinin 20 µg/ml (1/50.000) ve 40 µg/ml (1/25.000) konsantrasyonlarında hazırlanan boyalı besiyerlerinde üremesi nede-niyle her iki boyaya karşı dirençli oldukları saptanmıştır. Çalışmada kullanılan Tb ve Bk fajlarının rutin test dilüsyonları (RTD) 10⁻⁴ olarak bulunmuştur. İzolatların hiçbirisi Tb fa-jının RTD ile lizise uğramamış; ancak Bk fajının RTD'de suşların litik patern gösterdikleri saptanmıştır. Bu sonuçlara göre suşların hepsi sadece Berkeley faji ile lize olan *B.meliten-sis* olarak değerlendirilmiştir. Üreme için CO₂'li ortama gereksinim duymaması, ilk 24 sa-atte H₂S üretmemesi, ikinci saatten sonra pozitifleşen üreaz aktivitesi, boyalı besiyerlerin-de üreyebilmesi, Tb faji ile lize olmaması nedeniyle tüm izolatlar *B.melitensis* olarak ta-nımlanmıştır. İzolatların tümü A ve M antiserumlarının her ikisiyle de bir dakika içerisinde aglütinasyon reaksiyonu vermiş ve bu sonuçlara göre suşların tümü *B.melitensis* biyo-var 3 olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda uygulanan M-RT-PCR sonuçlarının değerlendirmesi sonunda, tüm izo-latlar *B.melitensis* olarak saptanmıştır.

TARTIŞMA

Primer olarak koyun ve keçilerde enfeksiyona neden olan *B.melitensis*, Akdeniz ülkele-ri, Orta Doğu, Afrika, Orta ve Güney Amerika ve Hindistan'da brusellozun en sık etkeni-dir^{1,2,10,11}. Sığırlarda ve diğer büyük baş hayvanlarda enfeksiyon oluşturan *B.abortus* ise dünya genelinde özel bir coğrafi dağılım göstermemektedir. Ülkemizde yapılan çalışma-larda; çeşitli bölgelerden insan izolatları arasında predominant olan türün *B.melitensis* (344/357; %96) olduğu, *B.abortus*'a nadiren rastlandığı (7/357; %2), *B.melitensis* suşla-rının %90.5'inin biyovar 3 ve %9.5'inin biyovar 1 olduğu ve insanlarda *B.melitensis* bi-yovar 2'ye hiç rastlanmadığı bildirilmektedir¹⁸⁻²⁷. Bizim çalışmamızda, Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerindeki illerde yaşayan brusellozlu olgulardan

izole edilen 187 *Brucella* suşunun tamamı konvansiyonel yöntemlerle *B.melitensis* biyovar 3 olarak tiplendirilmiş, M-RT-PCR ile de tüm izolatlar *B.melitensis* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler ülkemizde yapılan diğer biyotiplendirme çalışmalarının sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Ülkemizde hem insan hem de koyun atıklarında en sık *B.melitensis* biyovar 3 ve daha az oranda *B.melitensis* biyovar 1 saptanması, koyun-keçi brusellozunun insan enfeksiyonu için ana kaynak olduğunu göstermektedir^{27,28}. İnsanlarda *B.abortus*'a bağlı enfeksiyonların daha az görülmesi ise, ülkemizde büyük baş hayvanlardaki brusellozun tazminat ödemeyi gerektiren bir hastalık olması nedeniyle bu hayvanların eliminasyonu ve dolayısıyla *B.abortus* enfeksiyonunun az olmasına bağlı olabilir²⁸.

Brucella türlerinin tanımlanması ve biyotiplendirilmesi, kontrol ve eradikasyon programlarının hazırlanması, bölge veya ülke düzeyinde hakim olan tür/biyotiplerin belirlenmesi, yeni biyotiplerin saptanması ve aşı suşlarının takibi açısından önemlidir^{1,15,16,25,29}. Klasik biyotiplendirme işlemlerinin yalnızca referans merkezlerde uygulanabilmesi, deneyimli elemana ihtiyaç göstermesi, zaman alıcı olması, bazı suşların standart şemalara uymaması ve laboratuvar kaynaklı enfeksiyon riski nedeniyle, son yıllarda *Brucella* suşlarının tür/biyovar tayini amacıyla moleküler yöntemler kullanılmaya başlamıştır^{13,14,17,30}. Bu amaçla RFLP analizi ve AMOS-PCR (*abortus melitensis ovis suis*) gibi çeşitli teknikler denenmiş, ancak karşılaşılan sorunlar nedeniyle çok fazla kullanım alanı bulamamıştır³¹⁻³³. Buna karşın, gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) yönteminin kullanıldığı tiplendirme çalışmalarında daha başarılı sonuçlar alınmış ve konvansiyonel tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında RT-PCR yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur^{32,34,35}. Ancak yine de RT-PCR yönteminin multipleks formatında olmaması, en az üç aşama gerektirmesi nedeniyle zaman alıcı ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması, yöntemin dezavantajı olarak belirtilmiştir. 2004 yılında Probert ve arkadaşları¹⁷ *Brucella* spp., *B.melitensis* ve *B.abortus*'u aynı anda tek bir testte tespit edebilen M-RT-PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemin, *Brucella* spp., *B.melitensis* ve *B.abortus* izolatlarının tanımlanmasındaki duyarlılıkları sırasıyla %100, %92 ve %100; özgüllükleri ise %100, %100 ve %97.9 olarak saptanmıştır¹⁷. Bizim çalışmamızda da, *Brucella* izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasında bu araştırmacıların tarif ettiği yöntem modifiye edilerek kullanılmış ve M-RT-PCR ile alınan sonuçlar, referans olarak kabul edilen konvansiyonel yöntemlerin sonuçları ile %100 uyumlu bulunmuştur. Ek olarak M-RT-PCR yönteminin, sonuç alınması için en az altı gün gerektiren konvansiyonel testlere göre çok daha hızlı olması da en önemli avantajı olarak değerlendirilmiştir.

Brucella türlerinin ve biyotiplerinin tayini amacıyla uygulanan klasik tanımlama şemasında; üreme özellikleri (CO₂ gereksinimi), biyokimyasal testler (H₂S üretimi, üreaz aktivitesi), tiyonin ve bazik fuksin boyaları ve faj duyarlılığı ile S tipi *Brucella* suşlarının lipopolisakkarid (LPS) yapıdaki hücre yüzey antijenleri olan A ve M antijenlerinin monovalan antiserumlarla saptanması (serovar tayini) yer almaktadır. Monospesifik antiserumlar ile aglütinasyon dışındaki parametreler ile *B.abortus* (Bv3 dışındaki tüm biyovarlar) ve *B.suis*'in tüm biyovarları saptanabilirken, *B.melitensis* ancak tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. *B.melitensis* biyovarlarının ayırımı sadece S-LPS'deki O-yan zinciri-

rinde eksprese edilen A ve M antijenlerinin varlığına ve dağılımındaki farklılıklara dayanmaktadır. Bu nedenle *B.melitensis* için biyovar yerine serovarların tespiti söz konusudur^{1,4,12,16,30}. Ülkemiz gibi *B.melitensis*'in brusellozun ana etkeni olduğu bölgelerde, M-RT-PCR yöntemiyle kısa sürede (2-3 saat) tür ayırımının yapılması ve *B.melitensis* olarak saptanan suşlarda monospesifik antiserumlar kullanılarak yapılan aglütinasyon testi ile *B.melitensis* biyovar/serovarların saptanması daha uygun bir yöntem olarak görülmektedir.

Brusellozun endemik olarak görüldüğü ülkemizde tiplendirme çalışmalarının yapılması, Ulusal Halk Sağlığı Enstitüsü olarak çalışmakta olan Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı referans merkezinin görev tanımı içinde yer almakta olup, bu amaçla kullanılacak yöntemlerin insan gücü, test maliyeti ve doğruluğu açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada elde ettiğimiz ilk sonuçlar, standardize edilmiş bir M-RT-PCR yönteminin etken DNA'sının kısa sürede saptanması, laboratuvar çalışanlarında bulaş riskinin diğer yöntemlere göre az olması, testin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle *Brucella* tür tayininde önemli bir uygulama alanı bulacağını düşündürmektedir. M-RT-PCR yönteminin direkt olarak klinik örneklerde uygulanabilme potansiyeline karşın, sonuçların izolatlardan elde edilen sonuçlarla aynı olmayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Dolayısıyla M-RT-PCR yönteminin klinik örneklerde değerlendirilmesi için ek çalışmalara gereksinim vardır.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan suşların sağlanmasında emeği geçen Başkent Üniversitesi Adana Bölge Hastanesinde çalışan Doç. Dr. Hikmet Alışkan'a ve RT-PCR çalışmalarının yürütülmesinde verdikleri teknik destekten dolayı Uzm. Dr. Serdar Tuncer ile Bio Tülin Beşer'e (Metis Biyoteknoloji, Ankara) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organization for Animal Health, and World Health Organization. Brucellosis in human and animals. 2006, World Health Organization, Geneva. WHO/CDS/EPR/2006.7.
2. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N. The new global map of human brucellosis. Lancet Infect Dis 2006; 6(2): 91-9.
3. T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. Bruselloz verileri. <http://www.saglik.gov.tr/TR/istatistik/2006/tablo31.htm>, <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/Zoonotik%20Hastalıklar%20Katilimci%20Kitabi.pdf>
4. Lindquist D, Chu MC, Probert WS. *Francisella* and *Brucella*, pp: 815-23. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. Washington, DC.
5. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov., and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57(Pt 11): 2688-93.
6. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, et al. *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst Evol Microbiol 2008; 58(2): 375-82.
7. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, et al. *Brucella inopinata* sp. nov. isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol 2010; 60(4): 801-8.

8. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan AP, Staunton NJ. Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec* 1999; 144(17): 483.
9. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352(22): 2325-36.
10. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75(4): 195-211.
11. Godfroid J, Cloeckart A, Liautard JP, et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 2005; 36(1): 13-25.
12. Young EJ. *Brucella* species, pp: 2669-74. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, New York.
13. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4(1): 115-23.
14. Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4): 435-46.
15. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(2): 213-21.
16. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory, pp: 28-36. 1988. Institut National de la recherche Agronomique (INRA), Paris.
17. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus* and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1290-3.
18. Özkurt Z, Kaya A, Taşyaran MA, Yılmaz Ş. Bruselloz tanısında standart tüp aglütinasyon test, kan ve kemik iliği kültürlerinin tanı değerlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2000; 14(4): 463-8.
19. Bolca Z, Gündeş S, Erdenliş S ve ark. İnsan kaynaklı *Brucella* türü mikroorganizmaların tiplendirilmesi amacıyla uygulanan metodların karşılaştırılması ve biyotipleri ile faj tipleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi. *FLORA* 2002; 7(3): 157-70.
20. Baykam N, Esener H, Kılıç S ve ark. *Brucella* suşlarının tiplendirilmesi ve demografik özellikler ile klinik tabloya etkisinin değerlendirilmesi. XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 30 Eylül - 05 Ekim 2002, Antalya. Kongre Özet Kitabı, P01-83.
21. Bodur H, Balaban N, Aksaray S, et al. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand J Infect Dis* 2003; 35(5): 337-8.
22. Kuloglu F, Erdenliş S, Akata F, Tansel O, Gürçan S, Tugrul HM. Species and biovar distribution of *Brucella* isolates in Trakya University Hospital between 1999-2002. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38(3): 187-91.
23. Şimşek H, Erdenliş S, Oral B, Tülek N. İnsan kaynaklı *Brucella* izolatlarının tip-biyotip tayini ve epidemiyolojik olarak irdelenmesi. *Klinik Dergisi* 2004; 17(2): 103-6.
24. Köse S, Kilic S, Ozbel Y. Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *J Basic Microbiol* 2005; 45(4): 323-7.
25. Yüce A, Alp-Çavuş S. Türkiye'de bruselloz: Genel bakış. *Klinik Dergisi* 2006; 19(3): 87-97.
26. Ayaşlıoğlu E, Kilic S, Aydın K, Kilic D, Kaygusuz S, Agalar C. Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* isolated from blood samples. *Türk J Med Sci* 2008; 38(3): 257-62.
27. Erdenliş-Ceren S, Baklan EA, Aksoy HY. Enstitümüze biyotiplendirme amaçlı gönderilen insan ve hayvan kaynaklı *Brucella* izolatlarının çeşitli faj duyarlılıklarının belirlenmesi. VIII. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. 07-09 Ekim 2008, Van.
28. Arda M. Türkiye'de hayvan brusellozunun genel durumu ve bruselloz mücadele projesi. 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. 20-23 Nisan 1987, İzmir. Kongre Kitabı, s: 166-76.
29. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 2002; 90(1-4): 81-110.
30. Corbel MJ. Identification of dye-sensitive strains for *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol* 1991; 29(5): 1066-8.
31. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1,2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32(11): 2660-6.

32. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory based diagnosis of brucellosis: a review of the literature. Part I: Techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. Clin Lab 2003; 49(9-10): 487-505.
33. Al Dahouk S, Tomaso H, Prenger-Berninghoff E, et al. Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Crit Rev Microbiol 2005; 31(4): 191-6.
34. Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Mol Cell Probes 2001; 15(1): 43-52.
35. Vrioni G, Priavali E, Pappas G, Gartzonika C, Levidiotou S. Application of hybridisation probe-based real-time PCR assay to monitor the *Brucella* DNA load in patients with brucellosis throughout different stages of the disease. 17th ECCMID. 31 Mar-04 Apr. 2007, Munich, Germany. Abstract number: 1733-955.