



**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KKTC'DEKİ ÇİFTLİK HAYVANLARINDA ENDEMİK OLARAK
SEYREDEN BRUSELLOZ'UN ETİYOLOJİSİNİN BAKTERİYOLOJİK
ve MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Mehmet DEMİRPENÇE

Lefkoşa

Haziran 2022

**YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KKTC'DEKİ ÇİFTLİK HAYVANLARINDA ENDEMİK OLARAK
SEYREDEN BRUSELLOZ'UN ETİYOLOJİSİNİN BAKTERİYOLOJİK
ve MOLEKÜLER YÖNTEMLER ile ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Mehmet DEMİRPENÇE

Prof. Dr. ÖMER MEMDUH ESENDAL

Lefkoşa

Haziran, 2022

Onay

Mehmet DEMİRPENÇE tarafından hazırlanan **“KKTC’deki Çiftlik Hayvanlarında Endemik Olarak Seyreden Bruselloz’un Etiyolojisinin Bakteriyolojik ve Moleküler Yöntemler ile Araştırılması”** başlıklı tez, kapsam ve nitelik açısından kalite standartlarına uygunluğu ile ilgili Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak 10.06.2022 tarihinde kabul edilmiştir. Tez savunması online (çevrim içi) yapılmıştır. Jüri üyeleri, onaylarını sözlü olarak vermişlerdir. Tüm süreç kaydedilmiştir.

Jüri Üyeleri	Adı – Soyadı	İmza
Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU	
Danışman:	Prof. Dr. Ömer MEMDUH ESENDAL	
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. İsfendiyar DARBAZ	
Jüri Üyesi:	Yrd. Doç. Dr. Hüban GÖÇMEN	
Jüri Üyesi:	Yrd. Doç. Dr. Halit ŞÜKÜR	

Anabilim Dalı Başkanı Onayı

10/06/2022

Yrd. Doç. Dr. Halit ŞÜKÜR
Anabilim Dalı Başkanı

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

...../...../ 20...

Prof. Dr. Kemal Hüsnü Can Başer

Enstitü Müdürü

Etik İlkelerle Uygunluk Beyanı

Bu tezin içinde sunduğum verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kurallar gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Mehmet DEMİRPENÇE

...../...../.....

Gün/Ay/Yıl

Teşekkür

Doktora eğitim sürecinde ve tez çalışmasında bilgisini, emeğini ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer Memduh ESANDAL'a,

Real-Time PCR tekniklerin uygulanması için teknik destek ve kendi tasarladığı primerleri cömertçe paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU'na,

Bruselloz etkenlerinin bakteriyolojik metotlar ile türz ve biyotip düzeyinde tanımlanması için yapılan çalışmalara destek sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Sevil ERDENLİĞ ERBULAK, Doç. Dr. A. Murat SAYTEKİN ve Veteriner Hekim Ayhan BAKLAN'a,

Bakteriyel teşhis metotlarının duyarlılığının artırılması ve CITA besiyerinin kullanımı ile ilgili destek sağlayan ve Bruselloz eradikasyonu konusunda yol gösteren Dr. J. M. BLASCO'ya,

Kültür çalışmalarında büyük emeği ve desteği çalışma arkadaşlarım Vet. Hek. Gülnur ÖZGEN ve Sn. Meriç İNALÖZ'e

Tez yazımında ve akademik konularında bilgi ve deneyimlerini paylaşan Mikrobiyoloji ABD öğretim üyesi Yr. Doç. Dr. Hüban GÖÇMEN, Yr. Doç. Dr. Halit ŞÜKÜR ve Dr. Hazel TAMAK'a

Doktora eğitim süreci boyunca akademik anlamda desteklerini veren ve motivasyon sağlayan Doç. Dr. İsfendiyar DARBAZ ve Doç. Dr. Osman ERGENE'ye,

Bu çalışmalarını yaparken desteğini esirgemeyen sevgili eşim Sibel TAÇAY DEMİRPENÇE ve vakilerinden aldığım canım çocuklarım Çınar ve Özgür'e sonsuz sevgi ve sayılarımı sunar, teşekkür ederim.

Mehmet DEMİRPENÇE

Özet

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'ndeki çiftlik hayvanlarında endemik olarak seyreden Bruselloz'un etiyolojisinin bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle ile araştırılması.

Mehmet Demirpençe

Prof. Dr. Ömer Menduh Esenal

Doktora, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu doktora tez çalışması, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti genelindeki sığır, koyun ve keçi popülasyonlarındaki, Bruselloz hastalığının etiyolojisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çiftlik hayvanlarından toplanan klinik materyalden, Bruselloza neden olan etkenler (*B. abortus* ve *B. melitensis*) OIE Terrestrial Manuel ve bilimsel yayınlarda belirtilen bakteriyel ve moleküler teşhis metotları kullanılarak araştırılmıştır.

Tez çalışmasında, Brusella enfeksiyonu tespit edilen sığır, koyun ve keçi sürülerinden, süt, vajinal sekret, svab, ve atık fetus gibi materyaller toplanarak, CITA ve Farrels sıvı ve katı besiyerleri kullanılarak etken izolasyonu yapılmıştır. Yapılan serolojik testlerde seropozitif laktasyondaki çiftlik hayvanlarında (190 sığır, 74 koyun ve 55 keçi) alınan toplam 319 çiğ süt numunesi ve 32 abort fetal numuneden (5 sığır, 18 koyun ve 9 keçi) elde edilen karaciğer, dalak ve abomazal içerikli doku örnekleri analiz edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda 319 süt numunesinin 90'ından (%28.2) ve 32 fetal numunesinin 19'undan (%59.4) geleneksel bakteriyolojik yöntemlerle *B. melitensis* izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Kültüre edilen 109 izolatın tamamı, cins ve türe özgü primerler ile Real-Time PCR kullanılarak doğrulandı. Ön tanımlamanın ardından, çeşitli bölge ve sürüleri temsil eden seçilen 27 izolat, geleneksel yöntemlerle biyotiplendirme işlemine tabi tutuldu. Biyotiplendirme çalışmaları neticesinde, 20 (%74.1) adet izolat *B. melitensis* biyotip 1 ve 7 (%25.9) adet izolat *B. melitensis* biyotip 3. olarak tanımlandı. Bruce-ladder multiplex PCR testi, tüm izolatların saha suşları olduğunu ortaya çıkardı. Bu çalışmanın sonuçları, KKTC'deki sığır popülasyonu da dahil

olmak üzere çiftlik hayvanlarında *B. melitensis*'in varlığını doğrulamıştır. Örneklerin çoğu seropozitif sığırlardan toplanmış olmasına rağmen, çalışmada *Brucella abortus* izole edilmedi. Çalışma sonuçları insan sağlığını korumak için hayvan popülasyonlarında hastalığa karşı sıkı kontrol ve eradikasyon stratejilerinin uygulanması ihtiyacını vurgulayarak, hayvanlarda brusellozun potansiyel halk sağlığı riskini ortaya çıkardı.

Etkenlerin izole edildikleri türler, sürüler ve bölgeler dikkate alınarak; K.K.T.C'deki Bruselloz'un etiyolojisi hakkında ayrıntılı veriler toplanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Brucella* spp., Bruce-ladder multipleks-pcr, biyotiplendirme, sığır, koyun-keçi

ABSTRACT

Investigation of the etiology of Brucellosis, which is endemic in farm animals in the Turkish Republic of Northern Cyprus, by using bacteriological and molecular methods.

Mehmet Demirpençe

Prof. Dr. Ömer Menduh Esendal

Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

The aim of this PhD thesis is investigation of the species level identification and biotyping of the agent that causes brucellosis in bovine, ovine and caprine populations in Turkish Republic of Northern Cyprus using bacterial and molecular methods described in OIE Manual and according last scientific developments. During the studies samples such as milk, vaginal secretion, swab and abort fetus tissues were collected from brucellosis infected bovine herds, ovine and caprine flocks and bacteria were isolated using FM and CITA culture medias.

A total of 319 raw milk samples obtained from seropositive dairy livestock (190 cattle, 74 sheep and 55 goats) and tissue samples including liver, spleen and abomasal contents obtained from 32 aborted foetal samples (5 cattle, 18 sheep and 9 goats) were analysed for the presence and characterisation of the agent. *B. melitensis* was isolated and identified from 90 (28.2%) out of 319 milk and 19 (59.4%) out of 32 foetal samples by conventional bacteriological methods. Identification of all 109 isolates was confirmed by using Real-Time PCR with genus and species specific primers. Following preliminary identification, 27 selected isolates representing various counties and herds were further analysed by conventional methods. Twenty (74.1%) isolates were identified as *B. melitensis* biyotip 1 and 7 (25.9%) as *B. melitensis* biyotip 3. Bruce-ladder multiplex PCR assay revealed that all isolates were field strains. Results of the present study confirmed the presence of *B. melitensis* in livestock including cattle population in North Cyprus. Even though majority of samples coming from seropositive cattle, *Brucella abortus* was not isolated in the study. The results also revealed the potential public health risk of

brucellosis in livestock emphasizing the need of implementing strict control and eradication strategies against the disease in animal populations in order to protect human health.

Detailed information about the spreading of the disease between herds and species were gained by considering the species, herds and region that agents are isolated.

***Brucella* spp., Bruce-ladder Multiplex-PCR, Biotyping, cattle, ovine-caprine**

İÇİNDEKİLER

İçindekiler

Onay.....	I
Etik İlkelere Uygunluk Beyanı	II
Teşekkür.....	III
Özet.....	IV
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar LİSTESİ	XI
Giriş.....	1
Genel Bilgi	3
Bruselloz.....	3
Bruselloz Etiyolojisi	3
Kıbrıs'ta Bruselloz'un Varlığı.....	6
K.K.T.C.'deki Brusellozun Güncel Yaygınlığı	8
K.K.T.C.'deki Brusellozun İnsanlardaki Durumu.....	12
Yöntem.....	13
Numunelerin Toplanması.....	13
Dokular.....	13
Süt	13
Toplanan numune sayısı.....	14
Etken İzolasyonu	15
Bakteri Morfolojisinin ve Boyanma Özellikleri.....	15
Klasik Bakteriyolojik Kültür Çalışmaları.....	16
<i>Brucella</i> Genus Seviyesinde İdentifikasyon	23
Bakteri Morfolojisi.....	24
Şekil 4 Gram Negatif Kokobasil <i>Brucella</i> spp. Mikroskopik Görüntüsü	24
Gram Negatif Kokobasil <i>Brucella</i> spp. Mikroskopik Görüntüsü	24
Koloni Morfolojisi	24
<i>Brucella</i> Anti-A+M Poliserumu ile Lam Aglutinasyon Testi	25
Oksidaz Testi	25
Üreaz Testi	26
Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	27

Tür ve Biyotip Tanısı	27
Smooth ve Rough Kolonilerin Ayırımı:.....	27
Tbilisi Fajı ve R/C Fajı ile Lizis:.....	28
Karbondioksit (CO ₂) Gereksinimi ve Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi.....	28
Tiyonin ve Bazik Fuksin Varlığında Üreme	28
A ve M Monospesifik Anti-serumlar ile Aglutinasyon:.....	29
Safranin O içeren Besiyerinde Üreme:	29
Biyotiplendirme çalışmaları.....	29
Real-Time PCR Çalışmaları.....	30
DNA Ekstraksiyonu:	30
Real-Time PCR’da Kullanılan Materyal ve Kitler	30
Real-Time PCR Amplifikasyon Koşulları (Mehmet, & diğ., 2012)	32
Real-Time PCR Optimizasyonu	33
Bruce Ladder multipleks PCR çalışmaları.....	38
DNA ekstraksiyonu.....	38
Bruce-ladder PCR karışımı (her bir reaksiyon için toplam son hacim 25 µl)	38
Bruce Ladder PCR ile amplifikasyonu:	39
Kullanılan Oligonüklotidler	40
Bulgular	41
Kültür Sonuçları	41
Süt Numunelerinin Kültür Sonuçları	41
Fetüs Numunelerinin Kültür Sonuçları	42
Brusella Genus Seviyesinde Yapılan İdentifikasyon Sonuçları	42
Real-Time PCR Sonuçları	43
Takara Real-Time PCR Kit spesifik PCR bulguları	44
Takara Real-Time PCR kit B. melitensis spesifik PCR bulguları.....	46
OneStep RT-PCR kit B. melitensis Spesifik PCR Bulguları	47
Biotiplendirme Sonuçları.....	48
Bruce-Ladder Multipleks PCR Sonuçları	49
Türlere ve Biyotiplere Göre belirlenen sonuçların dağılımı	50
Sürülere Ait Biyotip Dağılımı	50
Tartışma ve Sonuç	51
Sonuç ve Öneriler	58
KAYNAKLAR.....	60

Kaynaklar Listesi	60
Ekler	67
Ek 1. Veteriner Dairesi Bünyesinde Sürdürülen Laboratuvar �alışmlarından Elde Edilen Verilerin Kullanım İzin Kararı	67
Ek 2. İntihal Raporu	68
Ek 3.....	76
�zge�miş	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo1 K.K.T.C Bruselloz Yaygınlığı 2017 verileri.....	8
Tablo 2 K.K.T.C Bruselloz Yaygınlığı 2019 verileri.....	9
Tablo 3 Toplanan Numuneler	15
Tablo 4 FM katı besiyeri formülasyonu.....	19
Tablo 5 FM Sıvı Besiyeri Formülasyonu.....	19
Tablo 6 CITA Antibiyotik Suplement Formülasyonu	20
Tablo 7 CITA Katı Besiyeri Formülasyonu.....	21
Tablo 8 CITA sıvı besiyeri formülasyonu	21
Tablo 9 Brucella Genusuna Ait Türlerin Ayırıcı Karakteristik Özellikleri (OIE, 2018)	23
Tablo 10 Üre sıvı besiyeriformülasyonu.....	26
Tablo 11 Brucella melitensis İzolatlarının Fenotipik Karakteristiği.....	29
Tablo 12 Brusella Genus ve B. melitensis Spesifik Primer Dizilimleri.....	31
Tablo 13 TaKaRa Ex Taq™ PCR karışımı.....	31
Tablo 14 OneStep Real-Time PCR karışımı.....	32
Tablo 15 RT-PCR Amplikasyon Koşulları	32
Tablo 16 Bruce-ladder PCR karışımı.....	38
Tablo 17 Bruce Ladder Multiplex PCR amplifikasyon koşulları	39
Tablo 18 Bruce-ladder multiplex PCR tekniğinde kullanılan Oligonükleotidler	40
Tablo 19 Süt Numunelesi Kültür Sonuçları	41
Tablo 20 Fetüs numuneleri kültür sonuçları	42
Tablo 21 Brusella genus seviyesi identifikasyon sonuçları	43
Tablo 22 Real-Time PCR sonuçları	44
Tablo 23 Biyotiplendirme Sonuçları.....	48

Şekiller

Şekil 1 Koyun Keçi Populasyonundak Yıllara Göre Sürü Prevalansı Değişimi.....	10
Şekil 2 Koyun Keçi Populasyonundaki Yıllara Göre Sürü Prevalansının Değişimi .	11
Şekil 3 Süt Numunlerinden Ön Zenginleştirme Kültür Çalışmaları	22
Şekil 4 Gram Negatif Kokobasil Brucella spp. Mikroskopik Görüntüsü	24
Şekil 5 Brucella spp. Tipik Koloni Görüntüsü.....	24
Şekil 6 <i>Lam aglutinasyon test pozitif örnek görüntüsü</i>	25
Şekil 7 Oksidaz Pozitif Örnek Görüntüsü	25
Şekil 8 Üre Pozitif Örnek Görüntüsü	26
Şekil 9 Takara Kit ile Yapılan Genus Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü.....	34
Şekil 10 Takara Kit ile Yapılan B. melitensis Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü.....	35
Şekil 11 Onestep RT-PCR Kit ile Yapılan Brusella Genus Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü	36
Şekil 12 Onestep RT-PCR Kit ile Yapılan B. melitensis Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü	37
Şekil 13 Takara Kit ile Yapılan Genus Spesifik Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü	44
Şekil 14 Onestep Kit ile Yapılan Genus Spesifik Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü.....	45
Şekil 15 Takara Kit ile Yapılan B. melitensis Spesifik Bir Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü	46
Şekil 16 Onestep Kit ile Yapılan B. melitensis Spesifik Bir Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü.....	47
Şekil 17 Bruce-ladder multiplex PCR Sonuçları Jel Görüntüsü	49
Şekil 18 Sürülere Ait Biyotip Dağılım Haritası	50

KISALTMALAR

DSM..... Dymethyl Sulfoxide

FAO..... Dünya Tarım Örgütü

FM..... Farrels Medium

K.K.T.C..... Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

OIE..... Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü

PBS..... Phosphate Duffered Saline

SDA..... Serum Dekstroz Agar

BÖLÜM I

Giriş

Bruselloz hem KKTC’de, hem de diğer birçok ülkede, hayvanlarda farklı sağlık problemleri ve verim kaybı, insanlarda ise ciddi sağlık problemleri yaratan zoonoz bir hastalıktır.

Bruselloz, başta çiftlik hayvanları olmak üzere çeşitli hayvan türlerini ve dünya çapında insanları etkileyen, bildirimi zorunlu önemli bir bakteriyel zoonotik hastalıktır. Hastalığa *Brucella* genusuna ait bakteriler neden olur. Şimdiye kadar, cins içinde hem genetik ve immünolojik özelliklerine göre tanımlanan 12 adet tür bulunmaktadır. (Caine, & diğ., 2017; Cvetnic & diğ., 2015; De Massis & diğ., 2019).

Bununla birlikte, bu türlerin her biri bireysel konak tercihleri, patojenite ve epidemiyolojik özelliklerine göre, altı klasik *Brucella* türü ve son yirmi yılda daha yakın zamanda tanımlanmış türler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Altı klasik *Brucella* türleri arasında, *Brucella abortus* (7 biyovarlı) esas olarak sığırları enfekte eder; *B. melitensis* (3 biyovarlı) koyun ve keçileri etkiler; *B. suis* (5 biyovarlı) domuzları enfekte eder; *B. canis* köpekleri etkiler; *B. ovis* özellikle koçları etkiler ve *B. neotomae* çöl ağaç faresini enfekte eder. Öte yandan, daha yakın zamanda tanımlanan *Brucella* türleri arasında, tarla faresinden (*Microtus arvalis*) izole edilen *B. microti*; deniz memelilerinden ve foklardan izole edilen *B. ceti*; *B. pinnipedialis*; İnsan meme implantı enfeksiyonundan izole edilen *B. inopinata*; Babunlardan izole edilen *B. papionis* (*Papio* spp.); ve kızıl tilkiden izole edilen *B. vulpis* (*Vulpes vulpes*) bulunmaktadır. (De Massis, & diğ., 2019; Ferro, & diğ., 2020; OIE, 2018).

Başlıca *B. abortus* ve *B. melitensis*'in neden olduğu Bruselloz hayvancılıkta, süt veriminin azalması yanı sıra düşük, kısırılık ve diğer ilgili üreme bozukluklarının bir sonucu olarak büyük ekonomik kayıplara neden olur (Caine, & diğ., 2017; Khan & Zahoor, 2018; Shalaby & diğ., 2019). Enfekte hayvanlar, ekonomik etkilere yol açmanın yanı sıra, pastörize edilmemiş süt, et ve enfekte hayvanların yan ürünleri yoluyla ajanların insanlar tarafından alınması sonuçlanan önemli bir halk sağlığı sorunu olan insan brusellozunun en yaygın kaynağı olarak kabul edilmektedir (Caine, & diğ., 2017; Cvetnić, & diğ., 2015; Khan & Zahoor 2018).

B. abortus ve/veya *B. melitensis*'in neden olduğu bruselloz, Kuzey ve Orta Avrupa'daki bazı ülkeler ile Kanada, Japonya, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi hastalığın eradike edildiği belirli bölgeler dışında, hayvancılıkta küresel olarak yaygın bir dağılım göstermektedir (OIE 2018). Hem esas olarak *B. abortus*'un neden olduğu sığır brusellozu hem de *B. melitensis*'in neden olduğu küçükbaş ve keçi brusellozu endemik olma eğilimindedir ve Akdeniz havzasındaki en önemli zoonotik enfeksiyonlardan biri olarak kabul edilir (De Massis, & diğ., 2019; Khan & Zahoor, 2018; OIE 2018).

Ülkemizde, 65.000 adet sığır ve 350.000 adet küçükbaş hayvan bulunmaktadır. Yürütölen Bruselloz eradikasyon programları ve uygulanan serolojik prevalans çalışmaları ile hastalığın varlığı ve yaygınlığı hakkında birçok çalışma yapılmış ve birçok veri elde edilmiştir. Fakat hastalığın etiyolojisi, tür ve biyotip dağılımı hakkında çok sınırlı veri bulunmamaktadır.

Sığır ve Koyun-keçi Brusellozu ile ilgili sınırlı sayıda etken izolasyonu yapılmış ve *B. melitensis* varlığı tespit edilmiştir.

BÖLÜM II

Genel Bilgi

Bruselloz

Bruselloz aynı zamanda Dalgalı Ateş (Undulant Fever), Akdeniz Ateşi (Mediterranean fever), Malta Humması (Malta Fever) olarak bilinen, direkt ve indirekt olarak hayvan ve hayvansal orijinli gıdalardan insanlara bulaşan zoonoz bir hastalıktır (MJ. Corbel, 2006).

Bruselloz dünya genelinde sağlık, hayvansal orijinli gıda, veteriner halk sağlığı ve ekonomik etkileri olan en yaygın bakteriyel zoonotik hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde hastalık geniş bilgi birikimine sahip olunması ve hastalığın kontrolünde ilerlemeler sağlanmasına rağmen, Bruselloz halen Latin Amerika, Akdeniz ve Orta Doğu ülkelerinde endemik olarak seyretmektedir. Bruselloz Orta Doğu Ülkeleri ve Türkiye için ciddi bir problem olarak durmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından her yıl yarıl milyon yeni insan Brusellozu vakası bildirilmektedir (MJ Vorbel, 2006; Süheyla ve ark, 2009; Z Yumruk & David O'Callaghan, 2011).

Klasik Bruselloz türleri arasında, özellikle küçükbaş hayvanları ve sığırları etkileyen, *B. melitensis* ve *B. abortus* dünya genelinde önemli zoonozlardır. Dünya genelinde en yaygın insan brusellozu sebebi olarak *B. melitensis* gösterilmektedir. Çiflik hayvanlarındaki bruselloz düşük gelir seviyesindeki, hassas ekonomiye sahip özellikle Orta Doğu ülkelerinde ciddi sosyoekonomik etkilere sahiptir. İnsan Brusellozunun endemik olduğu Suriye, Irak, Suudi Arabistan, Türkiye ve İran gibi Orta Doğu ülkeleri dünyanın en yüksek hastalık insidens oranına sahiptir (Ramin Bagheri Nejad & diğ., 2020).

Bruselloz Etiyolojisi

Bruselloz, insanlara da bulaşabilen zoonotik karakterde, yüksek morbidite ile seyreden ve ömür boyu kısırlığa neden olabilen en yaygın bulaşkan hastalıklardan biridir. Hastalık *Brusella* genusuna ait Gram negatif, aerob ve fakültatif hücre içi bulunana kokobasil bakteriler tarafından meydana gelmektedir (Zahoor Khan, 2018).

Hastalık ilk kez Bruce tarafından 1887 yılında tanımlanmıştır ve *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. canis* insanları ve çiftlik hayvanlarını etkileyen temel türlerdir (Matthew P. Rubach, & diğ., 2013).

Brusella küçük, hareketsiz, Gram negatif, kokobasil, 0,5-0,7µm genişliğinde, 0,6-1,5 µm uzunluğunda, kapsülsüz, sporsuz ve flegallasız bakterilere verilen genel isimdir. Bakteriler genelde tekli, daha az sıklıkta ikili, kısa zincirler ve kümeler halinde gözlenirler. Brusella genusuna ait bakteriler aerobiktir fakat bazı türlere ait süşların özellikle ilk üremelerinde %5-10 CO₂ ortamda kültüre edilmeleri üremelerini destekler. Üremeleri için multiple amino asitler, tiamin, nikotinamid, biotin ve magnezyum içeren kompleks besinlere ihtiyaçları vardır. Bazı süşlarının üremesi için serum ve hemin (X faktör) ve nikotinamid-adenin (V faktör) gibi büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar (Joint FAO, 1986¹).

Brusellaya benzeyen bakteriler Roman döneminden kalma karbonlaşmış peynir içerisinde tespit edilmiştir. Hastalık Akdeniz bölgesinde askeri kamplar ile ilişkilendirilmiş ve Sir David Bruce, Hughes ve Zammit tarafından ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Klasik olarak Brusella taksonomik olarak α -proteobacteria sınıfa ait altı adet tür (*Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae*) ve alt biyotipleri olarak sınıflandırılır. (Zahoor Khan, 2018; Christopher, 2010).

Farklı tür hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda yeni Brusella genusuna ait yeni türler belirlenmiştir. Deniz memelilerinden 1990 yıllardan itibaren Brusellaya benzeyen bakteriler izole edilmektedir. Yürütülen taksonomi çalışmaları ile balina, yunus ve musurgiller (liman yunusgiller) familyalarına ait deniz memelilerinde izole edilen bakteriler; *Brucella ceti* sp. nov. ve fok türlerinden izole edilen bakteriler; *Brucella pinnipedialis* sp. nov. olarak tanımlanmıştır (Foster, & diğ., 2007).

Çek Cumhuriyeti'nde 2001 yılında, tarla farelerinden (*Microtus arvalis*) izole edilen iki adet bakteri suşu yapıla filogenetik çalışmalar ile Brusella genusu ile ilişkilendirilmiş ve *B. microti* sp. nov. olarak isimlendirilmiştir (Holger, 2008).

¹ Joint FAO/Who Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report, World Health Organization, Geneva 1986.

Bir kadına ait meme implantından izole edilen bakteri *Brucella inopinata* sp. nov. (Scholz, 2010) ve bir banbundan izole edilen suş *Brucella papionis* sp. nov isimlendirilerek, Brusella genusuna ait yeni türler olarak tanımlanmıştır (Adrian, 2014).

Sosyo-ekonomik bir noktadan çıkışla, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, ve *B. ovis* genellikle keçi, sığır, koyun ve domuzları enfekte eden ve hayvanların veriminde azalmaya sebep olmasına ek olarak, ilk üç tür insanlarda Brusellozdan sorumlu olan ana türlerdir. (Miguel, & diğ.,, 2011)

Keçi-koyun Brusellozu'nun esas etkeni, *B. melitensis* (biyotip 1, 2 veya 3)'dir. Koyun ve keçilerde, nadir de olsa, doğal enfeksiyon olarak, *B. abortus*'un neden olduğu sporadik vakalar da gözlenmiştir. *B. melitensis*, Akdeniz bölgesinde endemik olmasına rağmen, enfeksiyon tüm dünyaya yayılmıştır. Kuzey Amerika (Meksika dışında), Kuzey ve Orta Avrupa, Güney Doğu Asya, Avusturalya ve Yeni Zelanda'nın etkenlerden ari olduğu bildirilmektedir. (OIE, 2018)

Sığır Bruselloz'u genellikle *B. abortus*, daha az sıklıkla *B. melitensis* ve bazen *B. suis* tarafından kaynaklanmaktadır. Enfeksiyon dünyaya yayılmıştır. Kuzey ve Orta Avrupa, Kanada, Japonya, Avusturalya ve Yeni Zellanda gibi bazı ülkelerin, etkenden ari olduğunu bildirilmiştir (OIE, 2018).

Klinik olarak hastalık, düşük (abort), sonun atılmaması, orşitis, epididimitis, ve nadir olarak artritis gibi semptomların bir veya birden fazlasının görülmesi ve etkenlerin süt ve uterus akıntılarıyla saçılması ile karakterizedir. Teşhis, Brusella etkenlerinin abort fetal materyallerinden, meme dokusu sekretlerinden ve otopsi sonrası alınan dokulardan izolasyonu ile gerçekleştirilir. Brusella enfeksiyonunun muhtemel tanısı, spesifik hücresel yanıt veya Brusella antijenlerinin, serolojik yanıtıyla yapılabilir (OIE, 2108).

B. melitensis, Malta ateşine sebep olan ve insanlar için yüksek oranda patojenik, dünyadaki en ciddi zoonoz hastalıklardan biridir. Bu nedenle, tüm enfekte dokular, kültürler ve potansiyel olarak kirlenmiş malzemeler, uygun güvenlik önlemleri alınarak elimine edilmelidir (OIE, 2018).

Kıbrıs'ta Bruselloz'un Varlığı

Arşiv kayıtlarına göre Bruselloz (*B. abortus*) adaya ilk kez İngiltere'den ithal edilen sütçü inekler ile birlikte gelmiştir. Alınan tüm karantina önlemlerine rağmen hastalık Atalasa devlet sürüsünden, yerel sürülere bulaşmıştır. Serum aglutinasyon testi temelli yürütülen eradikasyon çalışmaları neticesinde, adaya gelen *B. abortus* kaynaklı Sığır Brusellozu 1932 yılında eradike edilmiştir (Annual Report, 1980²; Yılık, 1985³).

Adaya *B. melitensis*'in ilk kez gelişi, 1930 yılında Malta'dan ithal edilen keçilerle olmuştur ve hastalık yerel sürülere bulaşmadan eradike edilmiştir. Belirlenen son taşıyıcı 1932 yılında tespit edilmiştir ve başka vaka tespit edilmemiştir ve hastalığın yerel sürülere bulaştığına dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır ve hastalığın eradike edildiği kabul edilmiştir (Annual Report, 1980⁴; Yılık, 1985⁵).

Yaklaşık 30 yıl boyunca Bruselloz tespit edilmemiştir ve adanın hastalıktan ari olduğu düşünülmektedir. 1960 yılında abort yapan bir sığırın kan ve süt örneklerinde Bruselloz antikorları tespit edilmiş fakat bakteriyel çalışmalarla bakteri izolasyonu ve teşhis yapılamamıştır. Yapılan çalışmalarda 1966 yılında düşük yapan bir keçi'den *Brusella* genusuna ait bakteriler izole edilmiş fakat 1970 yılına kadar teşhis edilememiştir. Aynı bölgede bulunan iki koyundan 1970 yılında izole edilen bakteriler *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Hastalığın 1960 yıllarda Suriye'den ithal edilen Damasco ırkı keçiler ile getirildiği düşünülmektedir. Pilot olarak 1970 yılında yapılan sörvey çalışmasında yerel sürülerin %1'den azında Bruselloz (*B. melitensis*) tespit edilmiştir (Annual Report, 1980⁴).

Yetmişli yıllarda sığırlarda yapılan serolojik testlerde Bruselloz varlığı ortaya konmuştur ve 1969 yılında bir sığır plasentasından izole edilen suş *B. abortus* biyotip 5 olarak tanımlanmıştır. Fakat yapılan ileri çalışmalarda bölgedeki diğer sığır sürülerinden elde edilen izolatlar *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlanmıştır.

² Republic of Cyprus Ministry of Agriculture and Natural Resources Annual Report of the Department of Veterinary Services for the Year 1980.

³ K.K.T.C Tarım ve Orman Bakanlığı, Veteriner Dairesi, 1985 Yılı.

Adadaki sığırlarda enfeksiyon yapan türün *B. melitensis* olduğu kabul edilmiştir (Annual Report, 1980⁴).

Adada yaşanan politik problemler ışığında 20 Temmuz 1974'te ada iki bölgeye ayrılmıştır ve bu tarihten itibaren adadaki çiftlik hayvanları da iki ayrı popülasyon olarak konumlanmıştır. İki popülasyon arasında çok az yasal olmayan canlı hayvan hareketi dışında herhangi bir temas bulunmamaktadır.

Uygulanan uzun soluklu eradikasyon projeleri ile adanın güneyinde bulunan Kıbrıs Cumhuriyeti 2013 yılında brusellozdan ari olduğunu deklere etmiştir (Brucellosis Programs in Cyprus-2012, 2013⁵).

Kıbrıs Cumhuriyeti, Avrupa Birliği Komisyon'u 2015/129 nolu karar (Official Journal of the European Union, 26 Ocak 2015, 2015/129) ile koyun keçi Brusellozu ve 2017/1910 nolu karar (Official Journal of the European Union, 17 Ekim 2017, 2017/1910) ile Sığır Brusellozu yönünden ülkesel ari sağlık statüsü kazanmıştır.

K.K.T.C.'deki sığır koyun ve keçi popülasyonu üzerinde 1970 yılından bu yana Brusellozun etiyolojisi hakkında çok az çalışma yapılmıştır. Sığır atık numunelerinden 1981 yılında izole edilen bir brusella izolatu Pendik Veteriner Araştırma Laboratuvarında test edilerek *B. melitensis* tip I olarak tanımlanmıştır (Yılık 1985⁶). Veteriner Dairesi Bakteriyoloji Laboratuvar 2011 yılından itibaren Brusellozun etken izolasyon ve identifikasyon çalışmalarına tekrar başlamış ve elde edilen veriler bu tez ile yayınlanmıştır.

⁴ Republic of Cyprus Ministry of Agriculture and Natural Resources Annual Report of the Department of Veterinary Services for the Year 1980.

⁵ Brucellosis Programs in Cyprus-2012, SCOFCAH May 2013, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/reg-com_ahw_20130507_pres_brucellosis_cyprus.pdf, Erişim tarihi: 20.11.2020).

⁶ K.K.T.C Tarım ve Orman Bakanlığı, Veteriner Dairesi, 1985 Yılı.

K.K.T.C.'deki Brusellozun Güncel Yaygınlığı

K.K.T.C.'de endemik olarak seyreden Brusellozun eradikasyonu için yıllardır mücadele ve eradikasyon programları uygulanmaktadır. Avrupa Birliği mali ve teknik desteği ile 2015 yılından itibaren sürdürülen Hayvan Hastalıkları Eradikasyonu kapsamında; 2016-2017 yılları arasında uygulanan K.K.T.C. Sığır Brusellozis İzleme ve Kontrol Programı⁷ ve K.K.T.C. Koyun ve Keçi Eradikasyon Brusellosiz İzleme ve Kontrol Programları⁸ uygulanmıştır. Bireylerden alınan kan serumları Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) ve ELISA testlerine tabi tutulmuş ve pozitif birey ve sürüler belirlenmiştir.

K.K.T.C.'deki koyun-keçi popülasyonundan 3 699 adet sürüden (sürü kapsamı %95,16) toplanan 266 581 (bireysel kapsam % 97) test edilmesi ile sürü prevalansı %10,2 ve bireysel prevalans ise % 1,5 olarak belirlenmiştir (14). Sığır sürülerinin 768 adetinden (sürü kapsamı %77,26) toplanan 38 926 (bireysel kapsam %84,10) test edilmesi ile sürü prevalansı %10,2 ve bireysel prevalans ise % 1,5 olarak belirlenmiştir (Sığır Brusellozis İzleme ve Kontrol Programı⁸, K.K.T.C. Koyun ve Keçi Eradikasyon Brusellosiz İzleme ve Kontrol Programları⁹).

Tablo1

K.K.T.C. Bruselloz Yaygınlığı 2017 Verileri

Hayvan Nevi	Sürü Sayısı	Birey Sayısı	Test Edilen Sürü	Pozitif Sürü	Test Edilen Birey	Pozitif Birey	Sürü Prevalansı	Bireysel Prevalans
Sığır	994	46 284	768	78	38 926	491	%10,2	%1,5
Koyun Keçi	3887	274 260	3699	377	266 581	4 039	%10,2	%1,5

⁷ K.K.T.C Sığır Brusellozis İzleme ve Kontrol Programı (<http://veteriner.gov.ct.tr/Portals/95/VDM%20HASB%20KP%202%20SIGIR%20BRUSELLOSIZ%20KONTROL%20PROGRAMI%20-.pdf?ver=2018-04-05-143730-990>, Erişim tarihi: 20.11.2020)

⁸ K.K.T.C Koyun ve Keçi Eradikasyon Brusellosiz İzleme ve Kontrol Programı (<http://veteriner.gov.ct.tr/Portals/95/VDM%20HASB%20KP%203%20KOYUN%20VE%20KE%C3%87%C4%B0%20BRUSELLOS%C4%B0Z%20KONTROL%20PROGRAMI.pdf?ver=2018-04-09-114304-850>, Erişim tarihi: 20.11.2020)

Enfekte s  slerde serolojik olarak pozitif belirlenen hayvanların kesimi ile eradikasyon çalışmaları sürdürülmüştür. Hayvan Hastalıkları Eradikasyon Programı çerçevesinde uygulanan 2. Tur   alışmaları (2018-2019) sonucunda Sı  ırlardaki brusellozun sürü prevalansının %8,29 ve bireysel prevalansın % 1,34 olarak belirlenmiştir. Koyun ke  ilerdeki sürü prevalansının % 6,17 ve bireysel prevalansı % 1,17 düştüğü tespit edilmiştir (KKTC'de Brusellozun Ortadan Kaldırılmasına Yönelik Kaydedilen İlerlemeler⁹)

Tablo 2

K.K.T.C Bruselloz Yaygınlığı 2019 Verileri

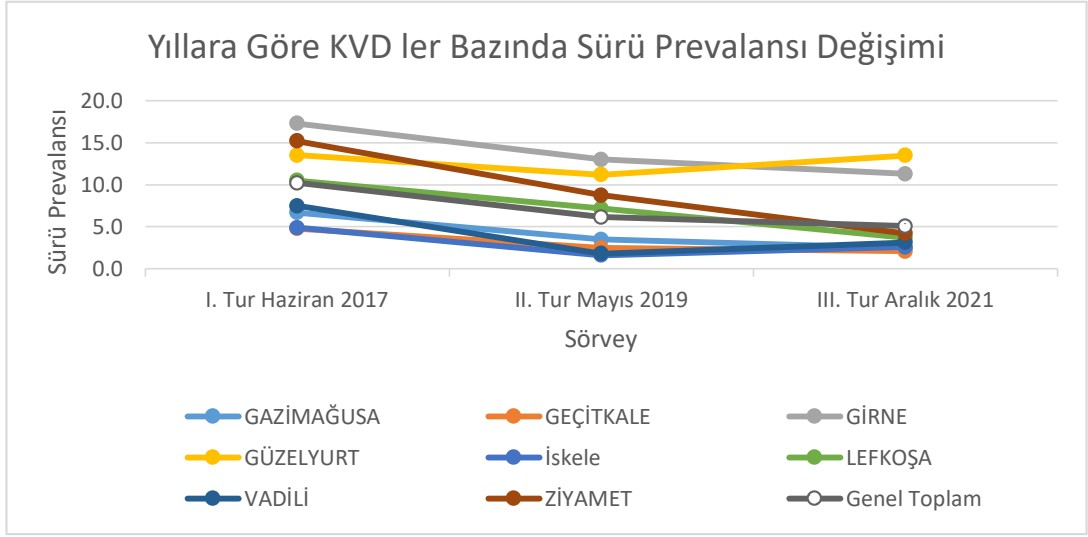
Hayvan Nevi	Sürü Sayısı	Birey Sayısı	Test Edilen Sürü	Pozitif Sürü	Test Edilen Birey	Pozitif Birey	Sürü Preva- lansı	Bireysel Preva- lans
Sığır	764	39377	712	59	38876	520	%8,29	%1,34
Koyun	3772	259503	3744	231	258099	3014	%6,17	%1,17
Keçi								

Devam eden Bruselloz eradikasyon çalışmaları sonucu 3. Tur s  rvey uygulaması Aralık 2020'de tamamlanmıştır. Bu   alışma neticeisnde sığırlardaki sürü prevalansının % 5.82 ve koyun keçi populasyonundaki sürü prevaşansının % 5.09 düştüğü kaydedilmiştir. Yıllara göre sürü koyun keçi ve sığır populasyonundaki sürü prevalansındaki değişimi şekil X ve şekil Y 2de veriliştir.

⁹ KKTC'de Brusellozun Ortadan Kaldırılmasına Yönelik Kaydedilen İlerlemeler, [http://veteriner.gov.ct.tr/Portals/95/Brusellozun%20ortadan%20kaldırılmasına%20yonelik%20kaydedilen%20ilerlemeler%20\(2016-2019%20donemi\)%2028_02_2020_1.pdf?ver=2020-11-20-104600-897](http://veteriner.gov.ct.tr/Portals/95/Brusellozun%20ortadan%20kaldırılmasına%20yonelik%20kaydedilen%20ilerlemeler%20(2016-2019%20donemi)%2028_02_2020_1.pdf?ver=2020-11-20-104600-897), Erişim tarihi: 20.11.2020)

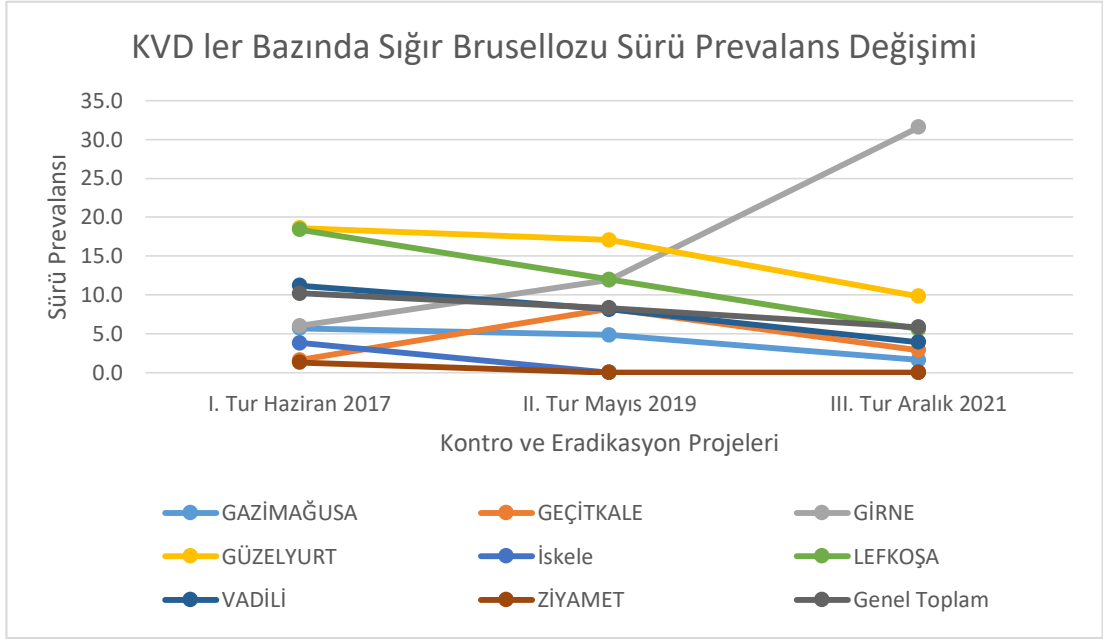
Şekil 1

Koyun Keçi Populasyonundakı Yıllara Göre Sürü Prevalansı Değişimi¹⁰



Şekil 2

Koyun Keçi Populasyonundaki Yıllara Göre Sürü Prevalansının Değişimi¹¹



K.K.T.C.’deki Brusellozun İnsanlardaki Durumu

KKTC’deki çiftlik hayvanlarında Bruselloz endemik olarak seyretmesine rağmen insanlardaki Bruselloz’un seyri konusunda çok sınırlı bilimsel bilgi yayımlanmıştır. İnsan Brusellozuna ilişkin Ozdogaç vd. (2018) tarafından farklı serolojik testler kullanılarak, veteriner hekimler, kasaplar ve hayvan yetiştiricilerinin de dahil olduğu bilimsel çalışmada sero-pozitif oranı % 3.1, % 6.5 olarak belirlenmiştir.

KKTC Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan bildirimi zorunlu hastalık istatistiklerine göre, yılda sadece birkaç insan bruselloz vakası (2014 yılında 3 vaka; 2015'te 6; 2017'de 5; 2019'da 4) bildirilmiştir. Son genel nüfus sayımına göre, KKTC nüfusu 286.257 kişi olarak tahmin edilmiştir¹².

¹² <https://saglik.gov.ct.tr/ONLINE-H%C4%B0ZMETLER/%C4%B0STAT%C4%B0ST%C4%B0K%C4%B0-B%C4%B0LG%C4%B0LER/%C4%B0HBARI-ZORUNLU-HASTALIKLAR-%C4%B0STAT%C4%B0ST%C4%B0KLER/%C4%B0> (Erişim: 05.03.22)

BÖLÜM III

Yöntem

Numunelerin Toplanması

Brusellozun bakteriyolojik teşhisi için tercih edilen en değerli klinik örnekler atık yavru organ ve dokularıdır. Aynı şekilde atık yapmış hayvandan alınacak süt ve vajinal svablar önemli klinik materyallerdir (OIE, 2018). Veteriner Dairesi Bakteriyoloji laboratuvarına üreticiler tarafından getirilen abort numunelerinin karaciğer, dalak ve fötal mide içeriği numune olarak kullanıldı. Yine bruselloz yönünden pozitif olarak tespit edilen sağmal sığır, koyun ve keçilerden aseptik koşullarda süt numuneleri toplandı. Yeni abort yapmış hayvanlardan vajinal svab numuneleri toplandı.

Numuneler toplanırken temel hijyen kuralları, kişisel bulaşmayı önleyecek bireysel biyogüvenlik önlemleri ve çiftlikler arası bulaşmayı önleyecek gerekli biyogüvenlik tedbirleri alındı.

Her numune, alım tarihi, köy, sürü, çiftlik konumu, işletmem sahibi, hayvan ve numune türüne ait ayrıntılı bilgilerin içerdiği şekilde bireysel olarak etiketlendirildi. Numunelere ilişkin ayrıntılı kayıtlar tutuldu.

Dokular

Numuneler, aseptik olarak, steril aletlerle çıkarıldı. Doku numuneleri, katı besiyeri üzerine inokule edilmeden önce, yağ gibi dış materyaller uzaklaştırılarak hazırlanır, küçük parçalara bölündü (OIE, 2018). Karaciğer ve dalak gibi katı dokular pastör pipet yardımı ile aseptik olarak numuneler alınarak katı besiyerlerine pasajlandı. Fötal mide içeriği veya karın içi sıvılar ise steril svab kullanılarak katı besiyerlerine aktarıldı.

Süt

Süt numuneleri, tüm memenin yıkanıp, kurutulması ve meme başlarının dezenfekte edilmesinden sonra dikkatlice toplandı. Süt numunelerinin her meme lobundan süt örneği içerecek şekilde ve her meme lobundan 10-20 ml süt alındı. İlk süt sağılıp, atıldıktan sonra, süt direkt olarak, steril şişeler içerisine sağıldı. Sütün

sağımıcı elleriyle temas etmesinden kaçınıldı. Süt, aerosol yolla personeli kontamine etmesinden kaçınarak santrifüj edilmeli ve tortu ve krema katı besiyerine, ayrı ayrı veya karıştırılarak inokule edildi. Eğer Brusella toplu süt örneklerinde saptanmış ise, bunlarda Brusella etken sayısı genellikle az olduğundan, bu tür numunelerden izolasyon şansı çok az olmaktadır (OIE, 2018).

Serolojik olarak Brusellozdan pozitif olarak belirlenen laktosyondaki sığır, koyun ve keçilerden yukarıda belirtilenlere uygun olarak süt numuneleri toplandı. Numuneler soğuk zincir koşullarını koruyarak en kısa sürede laboratuvar ulaştırıldı. Numunelerin bir kısmı direkt olarak çalışılmış bir kısmı ise -18 °C derecede dondurularak ekim yapılana kadar muhafaza edildi.

Süt numuneleri Farrels ve CITA formulasyonunda hazırlanan sıvı besi yerlerine inkübe edildi. Zenginleştirile besiyerinde örnekler % 5-10 CO₂ içeren etüvde, 37 °C derecede altı haftaya kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresince katı selektif besiyerine haftalık alt pasajlar yapıldı. Altı hafta boyunca üreme görülmeyen örnekler negatif olarak değerlendirildi.

Toplanan numune sayısı

Veteriner Dairesi tarafından yürütülen Hayvan Hastalıkları Eradikasyon Projesi kapsamında bruselloz yönünden pozitif olarak belirlenen; 11 sığır, 7 koyun ve 5 keçi sürüsünden; 180 bireye ait, 319 adet süt numunesi ve 5 adet vajinal svab numunesi toplandı. Veteriner Dairesi Bakteriyoloji Laboratuvarına analiz için getirilen 20 adet sürüden, 27 adet bireye ait, 32 adet fetüs numunesi Bruselloz yönünden kültür çalışmalarında kullanıldı. Araştırma süresi boyunca toplanan numene sayıları Tablo 3.'te özetlenmiştir.

Labortuvardaki iş yoğunluğuna ve toplanan örnek sayısına bağlı olarak numunelerin bir kısmı alındığı anda kültür çalışmalarına tabi tutuldu. Bir kısmı ise -18°C'de dondurularak kültür çalışmaları yapılana kadar muhafaza edildi.

Tablo 3

Toplanan Numuneler

Nevi	Süt Numunesi			Fetüs Numunesi		
	Sürü	Birey	Numune	Sürü	Birey	Fetüs
Sığır	11	104	190	5	5	5
Koyun	7	47	74	10	15	18
Keçi	5	29	55	5	7	9
Toplam	23	180	319	20	27	32

Etken İzolasyonu**Bakteri Morfolojisinin ve Boyanma Özellikleri**

Brusella etkenleri, kokobasil veya kısa çomak şeklinde ve 0.6-1.5 µm uzunluk ve 0.5-0.7 µm kalınlık boyutlarındadırlar. Etkenler genellikle tekli, daha az sıklıkta çiftler halinde veya küçük gruplar halinde bulunurlar. Eskimiş kültürler dışında, Brusella etkenlerinin morfolojileri oldukça sabittir. Eski kültürlerde polimorfik olarak gözlenebilirler. Gram negatif ve genellikle bipolorite göstermeden boyanan Brusella etkenleri, hareketsiz, sporsuz, flagellasız ve pilusuzdur; kapsül oluşturmazlar. (OIE, 2018; FAO 1986)

Brusella etkenleri, tam olarak asid-fast değildirler fakat zayıf asitlerle dekolarizasyona dayanıklıdırlar ve Ziehl–Neelsen boya yöntemini modifikasyonu olan Stamp metoduyla kırmızı olarak boyanırlar. Organlardan veya biyolojik sıvılardan hazırlanan preparatların muayenesinde genellikle uygulanan bu yöntemde, öncelikle ısı veya etanol ile sabitleme (fiksasyon) yapılır. Bu yöntemle Brusella etkenleri, mavi zemin üzerinde kırmızı olarak boyanır. (OIE, 2018; FAO 1986)

Brusella etkenlerinin morfolojisine sahip, hücre içi, zayıf asit-fast veya immuno-spesifik boyanan organizmalar, Brusellosis olası tanısı için kanıttır. Ancak

bu metotlar, Brusella etkenlerinin az sayıda olduğu ve değerlendirmeye yağ damlacıkların varlığının mani olduğu süt ve süt ürünleri gibi, örneklerde düşük duyarlılığa sahiptir. Stamp boyama yönteminde pozitif sonuçları değerlendirirken, dikkatli olunmalıdır. Çünkü bu yöntemle, aborta sebep olan diğer organizmaların [(örneğin; *Chlamydomphila abortus* (eskiden *Chlamydia psittaci*) veya *Coxiella burnetii*)] Brusella etkenlerinden ayrımı zordur. Bu nedenle; hem pozitif, hem de negatif sonuçlar, kültür yapılarak doğrulanmalıdır. (OIE, 2018; FAO, 1986)

Klasik Bakteriyolojik Kültür Çalışmaları

Temel Besiyeleri

Brusella etkenlerinin direk izolasyonu ve kültürü için katı besi yerleri kullanılmaktadır. Geniş bir yelpazede, ticari temel besiyerleri mevcuttur. Ör: ‘Brucella medium base’, ‘tryptose (or trypticase)–soy agar (TSA)’ gibi. *B. abortus* biyotip 2 gibi bazı suşların gelişimi için, %2-5 oranında, sığır veya at serumu eklenmesi gereklidir. Birçok laboratuvar, sistematik olarak, temel besi yerlerine, ‘blood agar base’ (Oxoid) veya ‘Columbia agar’ (BioMérieux) serum eklemekte ve iyi sonuçlar almaktadırlar. Serum-dekstroz agar (SDA) veya gliserol dekstroz agar (GDA) gibi besi yerleri, başarıyla kullanılır. GDA genellikle, koloni morfolojisinin gözlenmesi için kullanılır (OIE, 2018).

Selektif Besiyerleri

Yukarıda belirtilen tüm temel besi yerleri, selektif besi yeri hazırlanmasında kullanılabilir. Brusella etkenleri dışındaki organizmaların üremesini baskılamak için uygun antibiyotikler eklenir. En yaygın kullanılan selektif besi yeri, “Farrell’s medium”dur. Farrell’s medium, temel besiyerine, altı antibiyotik katılması ile hazırlanan bir besiyeridir. Bir litre agara belirtilen miktarlarda bu antibiyotikler eklenir; polymyxin B sulphate (5000 units = 5 mg); bacitracin (25,000 units = 25 mg); natamycin (50 mg); nalidixic acid (5 mg); nystatin (100,000 units); vancomycin (20 mg). Ticari olarak toz halde bu saplement mevcuttur (Oxoid SR0083A) (OIE, 2018).

Fakat ‘Farrell’s medium’da kullanılan ‘nalidilixic asit’ ve ‘bacitracin’ konsantrasyonları bazı *B. abortus* ve *B. melitensis* suşları üzerinde inhibe edici etkiye sahiptir. Bu nedenle, ‘Farrel’s medium’ ve modifiye edilmiş ‘Thayer-Martin medium’un birlikte kullanımı, kültür duyarlılığını önemli ölçüde artırır. Özetle, modifiye edilmiş ‘Thayer-Martin medium’ belirtilen şekilde hazırlanabilir; ‘GC medium base’ (38 g/litre; Biolife Laboratories, Milan, İtalya) haemoglobin (10 g/litre; Difco ilave edilerek) ve colistin methanesulphonate (7.5 mg/litre), vancomycin (3 mg/litre), nitrofurantoin (10 mg/litre), nystatin (100,000 International Units [IU]/litre = 17.7 mg) ve amphotericin B (2.5 mg/litre) (tüm ürünler; Sigma Chemical, St Louis, United States of America [USA]). *B. melitensis*’in aksine, birkaç *B. abortus* suşunun üremesi, %5-10 CO₂ atmosferik ortamına bağlıdır (OIE, 2018).

Brucella etkenlerinin izolasyonunda CITA isimli yeni bir besiyeri formulasyonu belirlendi. Besiyeri kanlı agar üzerine %5 steril buzağı serumu ve vancomycin (20 mg/litre), colistin methanesulfonate (7.5 mg/litre), nitrofurantoin (10 mg/litre), nystatin (100,000 International Units [IU]/litre), and amphotericin B (4 mg/litre) eklenerek hazırlandı (De Miguel, & diğ., 2011).

CITA besiyeri antibiyotik karışımı belirtildiği gibi hazırlandı. Yukarıda belirtilen miktarlarda; vancomycin, colistin ve nystatin 50 ml steril bir kap içerisine konur ve 10 ml 1:1 oranında saf metanol ve steril su solüsyonu içinde çözüldü. Nitrofurantoin steril bir tüp içene konur ve 1 ml of 0.1 M NaOH solüsyonu içerisinde çözdürüldü. Kullanmadan önce 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edildi. Son olarak 10 mg amphotericin B, 1 ml dimethyl sulphoxide içerisinde çözülür ve üzerine 9 ml steril phosphate-buffered saline (PBS) (pH=7.2 ± 0.2). Amphotericin B final konsantrasyonu 1 mg/ml olduğundan 1 lt besiyeri için 4 ml solüsyon kullanıldı. Hazırlanan amphotericin B 5°C ± 3°C birkaç gün muhafaza edilerek tekrar kullanıldı (OIE, 2018).

CITA besiyeri numuneler üzerinde bulunan kontaminant bakterileri inhibe ederken, tüm Brucella türlerinin mTM ve Farrell’s besiyerlerine göre daha iyi üremelerini sağlar. Saha numunelerinde Brucella türlerinin izolasyonu için FM ve CITA besiyerlerinin birlikte kullanılması maksimum teşhis duyarlılığı sağlamaktadır (De Miguel ve ark. 2011).

Etken sayısının, abort materyallerinden daha düşük olduğu süt, kolostrum ve bazı doku gibi örnekler için zenginleştirme tavsiye edilir. Süt söz konusu olduğunda, santrifüj yapılarak hem krema hem de tortudan kültür yapılması başarıyı artırır. Bu durumda, aerosol bulaşmadan kaçınmak için sıkı güvenlik önlemlerinin uygulanması gerekmektedir. Pratik olarak süt kültürlerinde teşhis duyarlılığını artırmak için, her meme lobundan alınan 0,5 ml süt numunesinin FM ve CITA besi yerlerine birlikte kültürü ile sağlanabilir (OIE, 2018).

Zenginleştirme sıvı besiyerleri, ‘serum-dextrose broth’, ‘tryptose broth (veya trypticase)–soy broth (TSA)’ veya ‘Brucella broth’ en azından ‘amphotericin B (1 µg/ml)’, ve ‘vancomycin (20 µg/ml)’ (final konsantrasyonda), katılarak hazırlanabilir. Zenginleştirme besi yerleri, 37°C’de, %5-10 (v-v) CO₂ içeren ortamlarda, altı haftaya kadar inkübe edilmeli ve her hafta selektif katı bir besiyerine subkültür yapılmalıdır (OIE, 2018).

Uygun bir katı besiyeri üzerinde, 2-3 gün inkübasyon periyotundan sonra, Brusella kolonileri görünür. Dört günlük inkübasyon sonrası, Brusella kolonileri, yuvarlak, 1-2 mm çapında ve düzgün kenarlı olur. Koloniler, gün ışığı altındaki saydam besiyeri üzerinde, yarı saydam ve soluk bal renginde görünür. Üstten bakıldığı zaman, koloniler, konveks ve inci beyazı renginde görünür. Sonra, koloniler daha büyük ve biraz daha koyu renk alırlar. Smooth (S) Brusella kültürleri, büyümeleri esnasında bozulma eğilimi gösterirler. Özellikle subkültür sonrası rough (R) forma dönüşürler (OIE, 2009).

Kullanılan Selektif Besi Yerleri

Çalışma botunca teşhis duyarlılığını artırmak için FM ve CITA besi yeri birlikte kullanılmıştır. Doku numuneleri ve vajinal svab numuneleri direkt olarak katı FM ve CITA besiyerlerine kültüre edilmiştir. Süt numuneleri ise FM ve CITA formülasyonlarında hazırlanan sıvı besiyerlerinde ön zenginleştirme yapıp katı besiyerlerine kültüre edilmiştir.

FM besiyeri Brucella Agar Base (Oxoid, CM0169), Brucella Selective Supplement (Oxoid, SR0083A) ve Horse Serum (Oxoid, SR0035C) kullanılarak firmanın talimatlarına uygun olarak aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 4

FM Katı Besiyeri Formülasyonu

Kullanılan Kimyasal veya İşlem	İşlem
Brusella Agar Temel Besiyeri (Otoklav)	
Brucella Agar Base CM0169	22.5 gr
Steril Distile Su	500 ml
pH (uygulanabilirse)	Gerekmez
Suplement	
Brucella Selective Supplement (SR0083A)	1 Ampül
Metanol	5 ml
Steril Distile Su	5 ml
Sterilizasyon İşlemi (Otoklav 121 °C 15 dak)	
Suplement Ekleme ve Porsiyonlama	
Brusella Agar Süspansiyonu (50 °C)	500 ml
Brucella Selective Supplement (SR0083A)	10 ml
Horse Serum (SR0035C) (56 °C)	25 ml
Steril Dextrose Solution	10 ml
Petri	Aktarma

Süt numunelerini ön zenginleştirmesinde kullanılan FM sıvı besiyeri Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129), Brucella Selective Supplement (Oxoid, SR0083A), Horse Serum (Oxoid, SR0035C) firmanın talimatlarına uygun olarak aşağıdaki tablodaki oranlarda hazırlandı.

Tablo 5

FM Sıvı Besiyeri Formülasyonu

Kullanılan Kimyasal veya İşlem	İşlem
Tryptone Soya Broth T. Besiyeri (Otoklav)	
Tryptone Soya Broth	15 gr
Steril Distile Su	500 ml
pH (uygulanabilirse)	Gerekmez
Suplement	
Brucella Selective Supplement (SR0083A)	1 Ampül
Metanol	5 ml
Steril Distile Su	5 ml
Sterilizasyon İşlemi (Otoklav 121 °C 15 dak)	

Tablo 5 (Devamı)

Suplement Ekleme ve Porsiyonlama	
Tryptone Soya Broth Süspansiyonu (50 °C)	500 ml
Brucella Selective Supplement (SR0083A)	10 ml
Horse Serum (SR0035C) (56 °C)	50 ml
Steril Dextrose Solution	10 ml
20 ml Plastik Tüp (Kırmızı Kapak)	10 ml Aktarma

CITA besiyeri için gereken antibiyotik supplement karışımı; Vancomycin (Sigma V-2002), Colistine (Sigma C-1511), Nystatin (Sigma N-3503), Nitrofurantoin (Sigma N-7878), Amphotericin B (Sigma A-4888), Metanol (Merk, 1719107 348), DSM (Dymethyl sulfoxide) (Merk, K43987812 308) ve steril distile su (poliferma) kullanılarak aşağıdaki tabloda belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 6

CITA Antibiyotik Supplement Formülasyonu

Kullanılan Kimyasal veya İşlem	İşlem
Vancomycin (Sigma V-2002)	20 mg
Colistine (Sigma C-1511)	7,5 mg
Nystatin (Sigma N-3503)	17,7 mg
Steril Distile su	5 ml
Methanol (Merk)	5 ml
Nitrofurantoin (Sigma N-7878)	10 mg
0,1 Molar NaOH	1 ml
Filtrasyon	0,22 µl
Amphotericin B (Sigma A-4888)	4 mg
DSM (Dymethyl sulfoxide)	1 ml
Phosphate Buffered Saline (PBS 7,2)	9 ml
1 lt besiyeri için 4 ml kullanılır	
Sterilizasyon İşlemi (Filtrasyon 0,22 µl)	

Antibiyotik karışımı yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış ve besiyerlerine katılmıştır. CITA katı besiyeri Blood Agar Base (Oxoid, CM0055) ; Horse Serum (Oxoid, SR0035C), kullanılarak firmanın talimatlarına uygun olarak aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 7

CITA Katı Besiyeri Formülasyonu

Brusella CITA Temel Besiyeri (Otoklav)	
Blood Agar Base CM0055	20 gr
Steril Distile Su	500 ml
pH (uygulanabilirse)	Gerekmez
Suplement	
CITA supplement	
Sterilizasyon İşlemi (Otoklav 121 °C 15 dak)	
Otoklav Bandı	
Suplement Ekleme ve Porsiyonlama	
Blood Agar Base Süspansiyonu (50 °C)	500 ml
CITA supplement	
Horse Serum (SR0035C) (56 °C)	25 ml
Steril Dextrose Solution	10 ml
Petri	Aktarma

CITA sıvı besiyeri ise sıvı besiyeri Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129), Horse Serum (Oxoid, SR0035C) kullanılarak aşağıdaki tablodaki oranlarda hazırlandı.

Tablo 8

CITA Sıvı Besiyeri Formülasyonu

Kullanılan Kimyasal veya İşlem	İşlem
Tryptone Soya Broth T. Besiyeri (Otoklav)	
Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129)	15 gr
Steril Distile Su	500 ml
pH (uygulanabilirse)	Gerekmez
Suplement (CITA)	
Sterilizasyon İşlemi (Otoklav 121 °C 15 dak)	
Otoklav Bandı	
Suplement Ekleme ve Porsiyonlama	
Tryptone Soya Broth Süspansiyonu (50 °C)	500 ml
Horse Serum (SR0035C) (56 °C)	50 ml
Steril Dextrose Solution	10 ml
20 ml Plastik Tüp (Kırmızı Kapak)	10 ml Aktarma

Besiyerleri firma talimatlarına uygun olarak hazırlanmış ve 121 °C 15 dakika otoklavda sterilize edildi. Besiyerlerine katılacak supplementler asepsi koşullarına uygun olarak besiyerlerinin uygun sıcaklığa gelmesinden sonra katıldı. Besiyerlerine katılan at serumu 0,22 µl çaplı filtreden geçirilerek steril hale getirildi ve 56 °C sıcaklıktaki besiyerlerine eklendi. Hazırlanan her parti besiyerinin sterilite kontrolü için bir adet petri ekim yapılmadan 48 saat inkübe edildi. Besiyerlerinin kalitesi ve çalışıp çalışmadığı uygun pozitif kontrol şuşları kültüre edilerek kontrol edildi.

Zenginleştirme besiyerleri, 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamlarda, altı haftaya kadar inkübe edildi ve her hafta selektif katı bir besi yerine subkültür yapıldı. Katı besiyerleri ,37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamlarda en az iki hafta inkübe edildi. Çalışmada inkübasyon için “Thermo Scientific Heracell 150i CO₂ Inkubator” etüv kullanıldı.

Uygulanan Biyogüvenlik Önlemleri

Brucella bakterisi hem sağlıklı deri hem de hava yolu ile bulaşabileceğinden tüm kültür çalışmaları biyogüvenlik II seviyesindeki çalışma kabinleri içerisinde gerçekleştirildi. Çalışanları ve çevreyi korumak adına numuneler ve kültürler sadece kabin içerisinde çalışıldı, kullanılan alet, malzeme ve sarf malzemeler otoklavlandı veya direkt olarak yakma fırında yakıldı.

Şekil 3

Süt Numunlerinden Ön Zenginleştirme Kültür Çalışmaları



Brucella Genus Seviyesinde İdentifikasyon

Brucella bakterilerinin tanımlanması, bakteri morfolojisi, Gram boyanma özelliği, koloni morfolojisi, büyüme karakteristiği, üreaz ve oksidaz aktivitesi ve polivanal brucella antiserum ile lam aglutinasyon testi ile yapılmaktadır (OIE, 2018).

Tablo 9 *Brucella Genusuna Ait Türlerin Ayırıcı Karakteristik Özellikleri (OIE, 2018)*
Brucella Genusuna Ait Türlerin Ayırıcı Karakteristik Özellikleri (OIE, 2018)

Tür	Koloni Morfolojisi ^b	Serum Gereksimi	Fajlar ile lizis					Oksidaz	Ureaz Aktivitesi	Konak
			Tb	Wb	Iz ₁	R/C				
<i>B. abortus</i>	S	- ^d	+	+	+	+	-	(+) ^e	(+) ^f	Sığır cinsi hayvan
<i>B. melitensis</i>	S		-	-	(-) ^g	+	-	+	+ ^h	Koyun ve keçi
										Bv.1 domuz
										Bv2. Domuz, tavşan
<i>B. suis</i>	S	-	-	+	(+) ⁱ	(+) ⁱ	-	+	+ ^j	Bv.3 Domuz
										Bv.4 Rengeyiği
										Bv 5. Rodentler
<i>B. neotomae</i>	S	-	- ^k	+	+	+	-	-	+ ^j	Çöl ağaç faresi
<i>B. ovis</i>	R	+	-	-	-	-	+	-	-	Koyun
<i>B. canis</i>	R	-	-	-	-	-	+	+	+ ^j	Köpek
<i>B. ceti</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+	Deniz memelileri
<i>B. pinnipedalis</i>	S	ND	(-)		(+)	(+)	-	(+)	+ ^h	Foklar
<i>B. microcoti</i>	S	-	-	-	+	+	ND	+	+ ^h	Tarla faresi
<i>B. inopinata</i>	S	ND	-	PL ^m	ND	ND	ND	ND	+ ^j	Bilinmiyor
<i>B. papionis</i>	S		PL ^m	PL ^m	+	ND	-	-	+ ^j	Bilinmiyor

(Alton et al. (1988), Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (1986), Whatmore (2009), ve Whatmore et al. (2014) alınmıştır.)

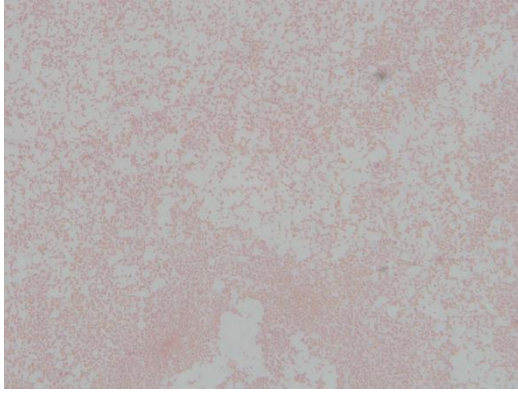
(+)(-) çoğu izolat pozitif/negatif; **a** faj: Tbilisi (**Tb**), Weybridge (**Wb**), İzmit (**Iz1**) and **R/C**; **b** normal faz: **S**: smooth, **R**: rough; **c** RTD: rutin test dilisyonu **d** *B. abortus* bv. 2 genellikle ilk üremede serum ihtiyaç duyar; **e** Bazı *B. abortus* bv. 3 izolatları negatif; **f** orta oran, 544 suşu dışında ve bazı saha suşları negatif; **g** bazı suşlar W bile lize olur; **h** yavaş oran, bazı saha suşları dışında; **i** bazı *B. suis* bv. 2 suşları değil veya sadece kısmi olarak Wb veya Iz1 ile lize olur; **j** hızla oran; **k** dakika plakalı; **l** Neotoma lepida; **m** kısmi lizis; **ND** belirli değil.

Bakteri Morfolojisi

Brusella selektif besiyerlerinde inkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda üreyen mikroorganizmaların morfolojilerini değerlendirmek amacı ile Gram boyama yapıldı. Boyamada Gram negatif kokobasiller dikkate alındı. Araştırmada ticari Biomerieux SA gram boya seti kullanıldı ve aşağıdaki resimde görüldüğü gibi Gram negeatif kokobasiller brusella yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

Şekil 4

Gram Negatif Kokobasil Brucella spp. Mikroskopik Görüntüsü

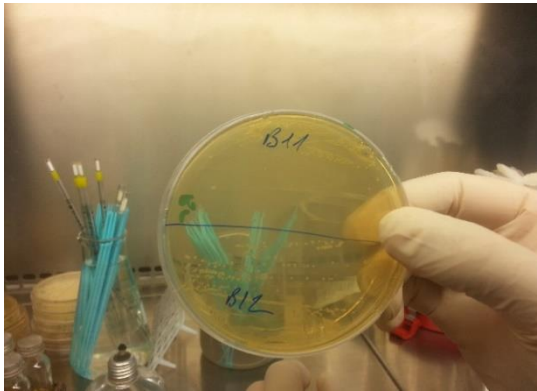


Koloni Morfolojisi

Üreyen mikroorganizmaların oluşturduğu *Brucella* cinsine özgü kolonilerin yapısı (1-2 mm çapında, yuvarlak, saydam, smooth, bal rengi koloniler) araştırıldı. Reyen koloniler incelendi ve Brusella tipik koloniler değerlendirildi.

Şekil 5

Brucella spp. tipik koloni görüntüsü

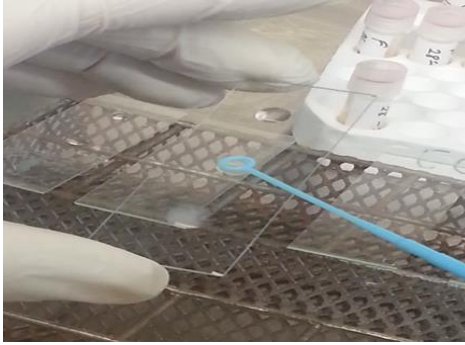


Brucella Anti-A+M Poliserumu ile Lam Aglutinasyon Testi

Şüpheli kolonilerden bir öze dolusu kültür ile smooth Brucellalara karşı hazırlanmış adsorbe olmamış poliserumdan bir öze dolusu alınarak karıştırıldı ve aglutinasyonun varlığı araştırıldı. Aglutinasyonun görülmesi, *Brucella* spp.'ye özgü bakteri ve koloni morfolojilerinin gözlenmesi, izolatin *Brucella* genusuna ait bir mikroorganizma olabileceğini gösterdi. Araştırmada Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü tarafından üretilen, Brucella A+M Pozitif Kontrol Serumı kullanılarak lam aglutinasyon testleri gerçekleştirildi.

Şekil 6 Lam aglutinasyon test pozitif örnek görüntüsü

Lam aglutinasyon test pozitif örnek görüntüsü



Oksidaz Testi

Taze bakteri kültüründen steril platin öze veya cam çubuk ile alınan bir parça kültür ticari olarak alınan oksidaz çubuğunun ucundaki işaretli bölgeye sürüldü. Kültürün sürüldüğü yerde 10 saniye içinde koyu mor bir rengin görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. Ticari oksidaz test (Oxoid, MB02666A) kullanıldı.

Şekil 7

Oksidaz Pozitif Örnek Görüntüsü



Üreaz Testi

Bir öze dolusu taze kültür, içinde üre besiyeri olan yatık tüplere ekildi. Tüpler oda ısısında 5 saatlik aralarla ve 24 saat sonra tüplerdeki renk değişimi açısından kontrol edildi. Rengin sarıdan pembeye dönüşümü üreaz aktivitesini gösterdi. Bu rengin değişim zamanı belirlenerek ilgili izolatın üreyi hangi hızla parçaladığı belirlendi (hızlı, orta ve yavaş). Çalışmada sıvı üre besiyerleri kullanıldı. Sıvı üre besiyerleri aşağıdaki tabloda belirtilen miktar ve kimyasallar kullanılarak hazırlandı.

Tablo 10

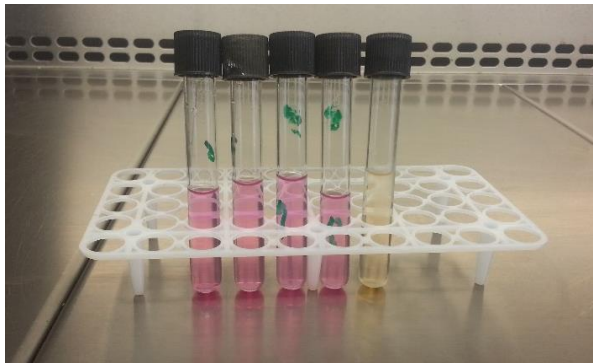
Üre sıvı besiyeriformulasyonu

Kullanılan Kimyasal veya İşlem	İşlem
Triptofan	0,3 gr
KH ₂ PO ₄	0,1 gr
K ₂ HPO ₄	0,1 gr
NaCl	0,5 gr
Üre	0,2 gr
Pheno-red (%0,2)	0,125 ml
Ethanol (%96)	0,1 ml
Distile Su	100 ml
PH	6,7
Sterilizasyon (0.45 µm çaplı filtre)	
Filtrasyon (0.45 µm çaplı filtre)	Filtrasyon
Suplement Ekleme ve Porsiyonlama	
Üre Broth süspansiyonu	100 ml
2,5 ml, küçük 10 ml cam siyah kapaklı tüpe aktarılacak.	Aktarma

İnkübasyondan sonra besiyeri rengi pembeye dönen örnekler üreaz pozitif olarak değerlendirildi.

Şekil 8

Üre Pozitif Örnek Görüntüsü



Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışma boyunca kültürü yapılan tüm örnekler yukarıda belirtilen bakteriyolojik testlere tabi tutuldu. Kültür sonucunda tipik koloni formunda ve uygulanan testler sonunda Gram negatif, ürez, oksidaz ve lam aglutinasyon testinden pozitif sonuç olarak belirlenen suşlar *Brucella* spp. olarak değerlendirildi (OIE, 2018; Saavedra, & diğ., 2019; Shalaby, & diğ., 2019). Tüm izolatlar ileriki testler ve kültür bankası oluşturmak için %10 gliserin eklenen Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM0129) sıvı besiyeri içerisinde -18°C de dondurularak muhafaza edildi.

Tür ve Biyotip Tanısı

Smooth ve Rough Kolonilerin Ayırımı:

Brucella spp.'in tip tayinlerinde kültürün koloni morfolojisi önemli olduğundan, koloniler 45°C'lik oblik ışıktaki stereoskopik mikroskopla incelendi ve ardından aynı amaçla akriflavin solüsyonu ile kolonilerin aglutinasyon özellikleri incelendi. Bunun için bir lam üzerine taze olarak hazırlanarak akriflavinden bir damla kondu ve bir öze yardımı ile birkaç koloni alınarak bu damla içinde süspanse edildi. Rough koloniler akriflavin solüsyonu ile hemen aglütine oldukları halde smooth koloniler homojen bir suspansiyon gösterdi. Mukoid kolonilerde ise ipliğimsi bir uzama oluştu. Her test için *B. ovis* 63/290 suşu rough koloni yapısının tanısı için kontrol olarak kullanıldı. Rough ve smooth kolonilerin ayırımında ayrıca kristal viyole solüsyonu kullanıldı. Stok boya solüsyonu 1:40 oranında sulandırıldıktan sonra petrinin yüzeyi tamamen kaplanacak şekilde petrilere döküldü ve 15-20 saniye beklendi. Bu sürenin sonunsa petrinin yüzeyinde kalan sıvı bir pastör pipetinin yardımı ile içinde dezenfektan bulunan bir kaba dikkatlice boşaltıldı ve hemen ardından koloniler stereoskopik mikroskopta incelendi. Smooth koloniler boya almazken, rough koloniler kırmızı ve morun değişik nüansları ile boyandı ve kolonilerin yüzeyinde radial çatlaklar görüldü.

Tbilisi Fajı ve R/C Fajı ile Lizis:

Yatık serum dekstroza agar (SDA) tüplerine referans suşlar ve testi yapılacak izolatların kültürlerinden ekilip 37 °C’de, 24 saat inkubasyona bırakılır ve bu sürenin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanır ve Mac Farland no: 4’e göre ml’inde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanır. Her bir bakteri suspansiyonuna daldırılan steril bir svapla agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde ekim yapılır. Şeritlerin sol tarafına Tbilisi fajının RTD’undan, ortasına 10 000 x RTD’undan ve sağına R/C fajından 20 µl damlatılır. Petriler kuruduktan sonra % 5-10 CO₂ içeren ortamda, 37 °C’de, 24 saat inkübe edilir. Sonuçlar lizis durumuna göre değerlendirilir.

Karbondiyoksit (CO₂) Gereksinimi ve Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda selektif Brucella besiyerlerinde üreyen her bir *Brucella* izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak ikişer adet yatık SDA tüplerine pasajları yapılır. Kurşun asetatlı kağıt şerit, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirilir. Birinci tüpler % 5-10 CO₂ içeren etüvde, diğerleri ise aerob koşullarda 37°C’de, 4 gün süreyle inkübe edilirler. Kurşun asetatlı kağıtlar inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirilir. İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda oluşan renk değişikliğine göre değerlendirilir.

Tiyonin ve Bazik Fuksin Varlığında Üreme

İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda selektif Brucella besiyerlerinde üreyen her bir *Brucella* izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak bir adet yatık SDA tüpüne pasajları yapılır. Tüm *Brucella* suşları CO₂’li ortamda üreyebileceklerinden tüm referans suşlar ve test izolatları CO₂’li etüvde 37 °C’de, 24 saatlik inkubasyona bırakılır ve inkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplanır ve Mac Farland no: 4’e göre ml’inde yaklaşık 1×10^9 bakteri bulunacak şekilde suspansiyon hazırlanır. Her bir bakteri suspansiyonuna daldırılan steril bir svapla test ve kontrol suşlarının tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA’lara ekimleri yapılır. Ekimler agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde yapılır. Petriler kuruduktan sonra % 5-10 CO₂ içeren ortamda, 37 °C’de, 4-5 gün inkübe edilirler.

A ve M Monospesifik Anti-serumlar ile Aglutinasyon:

Testi yapılacak her bir izolatın bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25 ml fizyolojik tuzlu su içinde suspanse edilir. Bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlardan birer damla konulur ve üzerlerine yine birer damla incelenecek izolatın suspansiyonundan eklenerek ağaç bir kürdanla karıştırılır. Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglutinasyon durumuna göre okunarak kaydedilir.

Safranin O içeren Besiyerinde Üreme:

SDA'a 100 µg/ml (1/10 000) konsantrasyonunda katılarak hazırlanan safranin O'lu besiyerinde *B. suis* ve *B. abortus* biyotip 2 suşları üreyememektedirler. Bu amaçla, diğer boyalı besiyerlerine ekimlerde belirtilen yöntemle tüm test izolatlarının safranin O'lu besiyerine ekimleri yapılır ve 3-4 günlük inkubasyon sonrasında sonuçlar, izolatların üreme durumlarına göre değerlendirilir.

Biyotiplendirme çalışmaları

Biyotiplendirme çalışmaları İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brucella Aşıları Üretim Laboratuvarı altında olan Brusella Tiplendirme Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla araştırmada numune alınan her bir çiftliği temsilen 27 adet *Brucella* spp. izolatı biyotiplendirme laboratuvarına gönderilmiş ve yukarıda belirtilen testler uygulanarak klasik yöntem kullanılarak biyotiplendirilmiştir.

Tablo 11

Brucella melitensis İzolatlarının Fenotipik Karakteristiği (Quinss, &., 1994)

İzolat	CO ₂	H ₂ S	Üreaze	Boya Varlığında Üreme		RTD	Tbilisi Faz ile Lizis 10 ⁴ x RTD	Monospesifik Serum			Sonuç
				Thionin 20µg/ml	Fuchsin 20µg/ml			A	M	R	
20	-	-	>20h	+	+	-	-	+	-	-	Biyotip 1
7	-	-	>20h	+	+	-	-	+	+	-	Biyotip 3

Real-Time PCR Çalışmaları

Kültür çalışmalarında *Brucella* spp. olarak tanımlanan tüm izolatlar hem *Brucella* genus spesifik hem de *B. melitensis* spesifik RT PCR ile test edilmiştir. Kaynatma yöntemi ile bakterilerin DNA'ları ekstrakte edilip aşağıda belirtilen şekilde test çalışmaları yapılmıştır.

DNA Ekstraksiyonu:

Brucella izolatlarından DNA ekstraksiyonu için, steril öze yardımıyla bir koloniden alınan bakteriler 200 µl saline içerisine aktarıldı. Hazırlanan süspansiyon 10 dakika kaynatma işlemine tabi tutuldu ve 12,000 g devirde 20 saniye süre ile santrifüj edildi. PCR amplifikasyonlarında, kaynatma yöntemi ile elde edilen süspansiyonun süpernatant kısmından, 2 µl sıvı DNA templateyi (0.1 - 0.05 µg/µl DNA, yaklaşık olarak) olarak kullanıldı (OIE, 2009).

DNA ekstraksiyon çalışmalarında çapraz kontaminasyon kontrolü için hem laboratuvarında tanımlan *E. coli* şuşları hem de su negatif kontrol olarak kullanıldı.

Real-Time PCR'da Kullanılan Materyal ve Kitler

Real Time-PCR uygulamaları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan, Tubitak TOVAG 104O237¹³ Nolu projede Prof. Dr. Barış SAREYYÜPOĞLU tarafından tasarlanan *Brucella* cins spesifik (Bru3F/Bru3R) ve *Brucella melitensis* spesifik (BrumelF/BrumelR) primerleri kullanılarak yapıldı (Tablo 12) (Sareyyupoglu, & diğ., 2008). Real Time-PCR uygulamaları, "TaKaRa Ex Taq™ R-PCR Custom"; "Qiagen OneStep RT-PCR, cat: 210212 ticari PCR kiti; "Biotium Eva Green Dy, cat:3100 ve "Qiagen Rotor-Gene Q" Real-Time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

Çalışmada pozitif kontrol olarak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan sağlanan *B. abortus* ve *B. melitensis* şuşlarından hazırlanan DNA lizadları; negatif kontrol olarak ise laboratuvarımızda izole edilen *E. coli* şuşlarından hazırlana DNA lizadları kullanıldı.

¹³ Sareyyüpoğlu B, Diker KS, Güngördü S (2007). Koyunlarda abortif bakteriyel infeksiyonların tanısında multiplex-PCR tekniklerinin geliştirilmesi. Tubitak TOVAG 104O237 Nolu 1001 Araştırma Projesi.

Tablo 12

Brusella ve B. melitensis Spesifik Primer Dizilimleri (Sareyyupoglu, & Diğ., 2008)

Primer Adı	Primer Dizisi	Uzunluk (bp)	Hedef Büyüklüğü	Hedef Gen
BrumelF	TAGCTTACCCGCCAATCTTC	20	170 bp	IS711
BrumelR	GCGCTATGATCTGGTTACGTTG	22		
Bru3F	TAACCCCGGATATGAATCTGAAC	23	245 bp	IS711
Bru3R	TGGATATTACTGCTCTACCTTCTGTG	26		

TaKaRa Ex TaqTM Real-Time PCR karışımı (Mehmet, & diğ., 2012)

Real-Time PCR karışımı, final hacim 25µl olacak şekilde aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 13 TaKaRa Ex TaqTM PCR karışımı

TaKaRa Ex TaqTM PCR karışımı

	Reaktif	Hacim
1	TaKaRa Ex Taq HS (5 units/µ)	0.25 µl
2	5xReal Time PCR Buffer (2.1)	5 µl
3	Mg ⁺² 50 mM	1.25 µl
4	dNTP Mixture (10 mM)	0.75µl
5	Eva Green	1.25µl
6	Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
7	Reverse Primer (10 µM).	0.5 µl
8	Steril su	14.5µl
9	DNA template	2 µl

OneStep Real-Time PCR karışımı

Real-Time PCR karışımı, final hacim 20 µl olacak şekilde aşağıdaki tablo 14'te belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 14

OneStep Real-Time PCR karışımı

	Reaktif	Hacim
1	2 X reaction mix	10 µl
2	PCR water	6 µl
3	Eva Green	1 µl
4	Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
5	Reverse Primer (10 µM).	0.5 µl
6	DNA template	2 µl

Real-Time PCR Amplifikasyon Koşulları (Mehmet, & diğ., 2012)

Real-Time PCR uygulamalarında aşağıdaki tablo 15'te belirtilen koşullar uygulandı.

Tablo 15 RT-PCR Amplikasyon Koşulları

RT-PCR Amplikasyon Koşulları

	İşlem	Sıcaklık ve Süre
1	Hot Start Enzim Aktivasyonu	95 °C 10 sn.
2	Denaturasyon	95 °C'de 5 sn.
3	Primer bağlanması	55 °C'de 20 sn.
4	Polimerizasyon	72 °C'de 15 sn.
5	Melting	60 - 90 °C
	Siklus başına 0.2 °C sıcaklık artışı ve veri toplama	

Real-Time PCR Optimizasyonu

Hem *Brucella* genus spesifik hem de *B. melitensis* spesifik Real-Time PCR optimizasyonunda Takara ve OneStep RT-PCR kitleri kullanıldı. Optimizasyon çalışmaları, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden temin edilen *B. abortus* ve *B. melitensis* spesifik DNA lizadları kullanılarak gerçekleştirildi.

Her iki lizad PCR kalitesinde su ile on (10) katlı olarak altı (6) kez sulandırıldı. *Brucella* genus spesifik RT-PCR için her iki lizada ait sulandırma kullanıldı. *B. melitensis* spesifik RT-PCR çalışmalarında sadece *B. melitensis* spesifik DNA lizad sulandırması kullanılırken, *B. abortus* lizadları negatif kontrol olarak kullanıldı. Optimizasyon çalışmaların tümünde negatif kontrol olarak; *E. coli* suşlarından hazırlanan DNA lizadları, saf su ve sadece PCR karışımını içeren negatif kontroller kullanıldı.

Çalışmalar sonucunda her iki kit için de tespit edilebilen en düşük sulandırma (deteksiyon limiti; limit of detection, LOD) pozitif kontrol olarak belirlendi ve numunelerin Real-Time PCR çalışmalarında kullanıldı.

Takara kit Genus spesifik Real-Time-PCR Optimizasyon

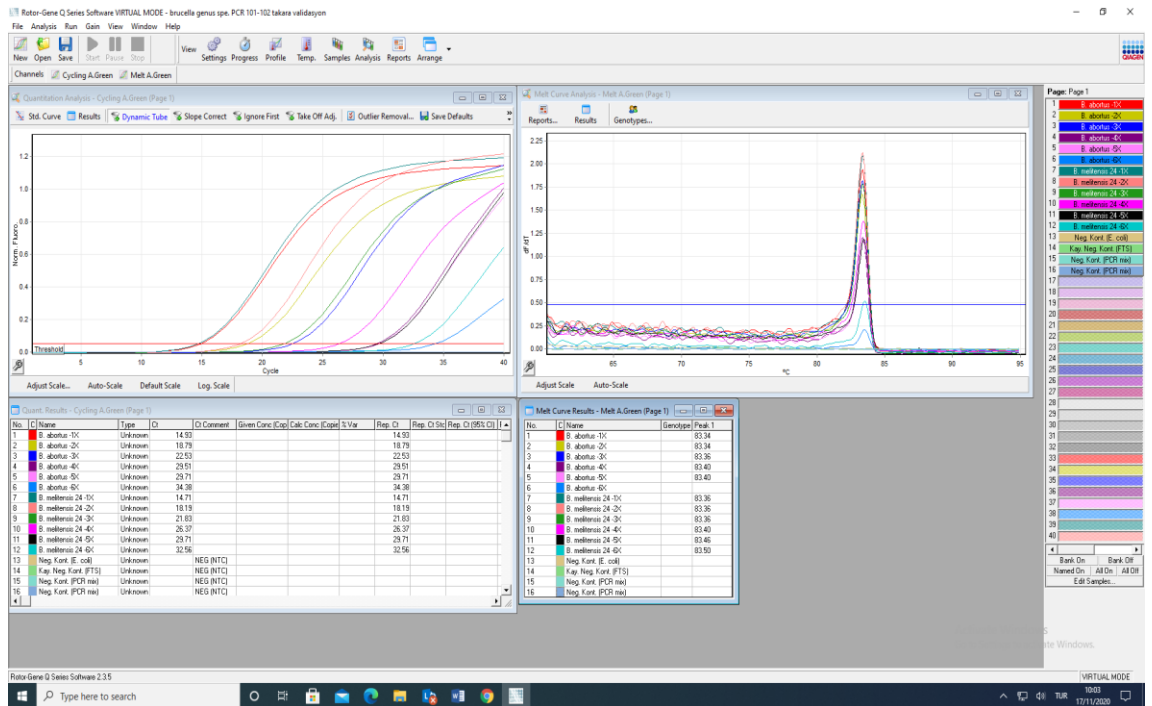
Genus spesifik primerler kullanılarak *B. abortus* ve *B. melitensis* spesifik DNA izolatlarının on (10) katlı sulandırılması kullanılarak yapılan RT-PCR çalışması sonucunda aşağıdaki resimde görüldüğü gibi her iki lizad sulandırmaları azalarak reaksiyon verdi.

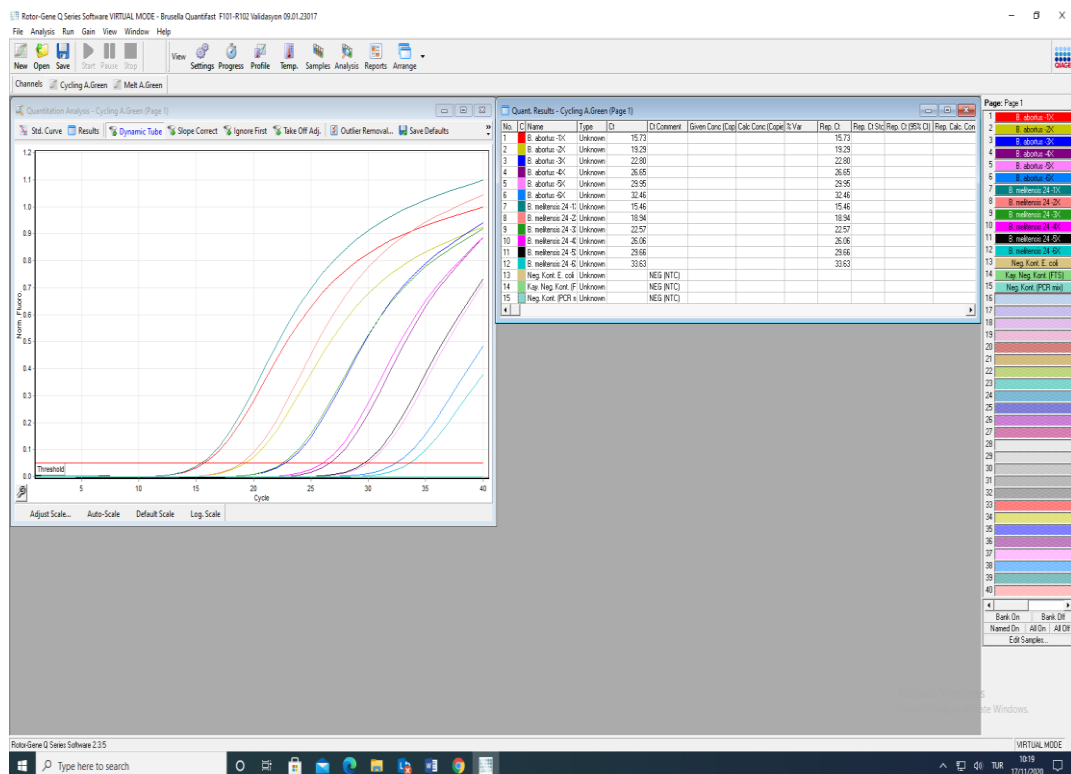
Optimizasyon için hazırlanan tüm sulandırmalar belirtilen koşullarda Real-Time PRC analizine tabi tutuldu. En yoğun sulandırma lizadları olan -1x sulandırmalar 14 ct değeri verirken; -6x sulandırma ct değerleri 32 ve 34 olarak belirlenmiştir. Her iki lizad içinde -5x sulandırma lizad pozitif kontrol olarak kullanılmasına karar verildi. *B. abortus* sulandırmalar 83.34-83.40 °C’de, *B. melitensis* sulandırmaları ise 83.36-83.50 °C’de erime eğrisi (Melting Murve) oluşturdu.

Tüm negatif kontrollerde herhangi bir amplifikasyon eğrisi görülmemiş ve negatif sonuç gözlemlendi.

Şekil 9

Takara Kit ile Yapılan Genus Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü



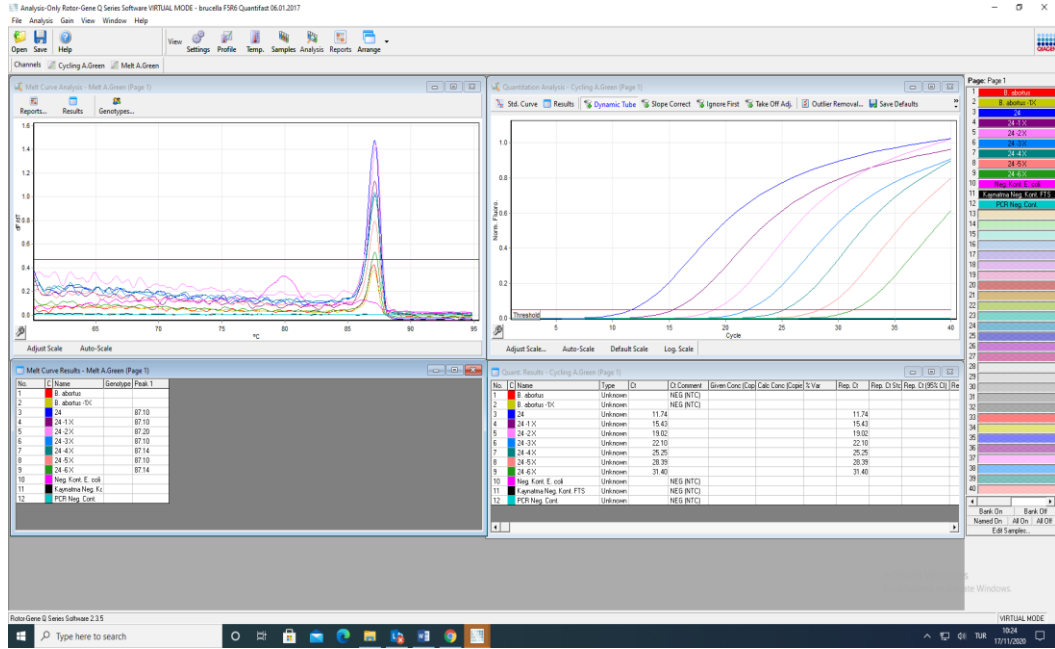


OneStep RT-PCR kit ile *B. melitensis* Spesifik RT-PCR Optimizasyonu

B. melitensis spesifik DNA lizadının on (10) katlı sulandırılması ve *B. abortus* lizadının stok ve -1X sulandırma solüsyonu kullanılarak yapılan RT-PCR çalışması sonucunda aşağıdaki resimde görüldüğü gibi *B. melitensis* lizad sulandırmaları azalarak pozitif reaksiyon (ct: 11.74 - 31.40) verdi. *B. abortus* lizadları ise negatif olarak gözlemlendi. Tüm negatif kontroller negatif olarak belirlendi ve -5x on katlı sulandırma pozitif kontrol olarak belirlendi. Tüm örnekler 87.10 °C’de Melting Curve oluşturdu.

Şekil 12

Onestep RT-PCR Kit ile Yapılan *B. melitensis* Spesifik Real-Time PCR Optimizasyon Çalışması Ekran Görüntüsü



Bruce Ladder multipleks PCR çalışmaları

Bruce Ladder multipleks PCR çalışmaları İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brucella Aşıları Üretim Laboratuvarı altında olan Brusella Tiplendirme Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu amaçla araştırmada numune alınan her bir çiftliği temsilen 27 adet *Brucella* spp. izolatu ve 22 adet RPCR çalışmalarında *B. melitensis* olarak belirlenen DNA lizatı, biyotiplendirme laboratuvarına gönderildi ve aşağıda belirtilen şekilde PCR çalışmaları yapıldı.

DNA ekstraksiyonu

Petrilerdeki bakteri kolonilerinden hazırlama: Steril öze yardımıyla bir koloniden alınan bakteriler 200 µl saline içerisine aktarıldı. DNA ekstraksiyonu için 10 dakika kaynatma işlemi yapılarak, santrifüj (12,000 g devirde 20 saniye) edildi. PCR amplifikasyonu (0.1 - 0.05 µg/µl DNA, yaklaşık olarak) için 1.0 µl süpernatant (üst faz) DNA kalıbı olarak eklendi (OIE, 2007).

Bruce-ladder PCR karışımı (her bir reaksiyon için toplam son hacim 25 µl)

Tablo 16

Bruce-ladder PCR karışımı

<u>Reaktif</u>	<u>Final yoğunluk</u>	<u>Hacim</u>
PCR buffer 10×	1×	2.5 µl
dNTPs (2 mM)	400 µM her biri için	5.0 µl
Mg ²⁺ (50 mM)	3.0 mM	1.5 µl
Bruce-ladder sekiz çift primer cocktail (12.5 µM)	6.25 pmol her biri için	7.6 µl
H ₂ O (PCR-grade)	—	7.1 µl
<u>DNA polimeraz*</u>	<u>1.5 U</u>	<u>0.3 µl</u>

*Bu test aynı tüp içerisinde 8 çift primer ile uygulanan bir multiplex PCR olduğundan en iyi sonuçlar yüksek kalitede DNA polimeraz (örneğin, Immolase DNA polimeraz [Bioline], Titanium Taq DNA polimeraz [Clontech], veya PFU DNA polimeraz [Biotools B&M Labs.]) kullanılması ile elde edilmektedir. NOT: Her zaman negatif kontrol için DNA'sız ve pozitif kontrol için *B. suis* DNA'sı eklenmelidir.

Her PCR çalışması için 1 µl kalıp DNA eklenir.

Bruce Ladder PCR ile amplifikasyonu:

PCR amplifikasyonu aşağıdaki tabloda belirtilen sıcaklık ve sürelerde, 25 siklus olarak uygulandı.

Tablo 17

Bruce Ladder Multiplex PCR amplifikasyon koşulları

	İşlem	Sıcaklık / Süre
1	İlk denatürasyon	95°C’de, (7 dakika)
2	Template (kalıp) denatürasyon	95°C’de 35 saniye
3	Primer bağlanma	64°C’de 45 saniye
4	Primer ekstansiyon	72°C’de 3 dakika
5	Son ekstansiyon	72°C’de 6 dakika

Kullanılan Oligonükleotidler

PCR çalışmalarında OIE manuel’de belirtilen aşağıdaki tabloda ayrıntıları belirtilen oligonükleotid çiftleri kullanıldı (Lopez-Goni ve ark., 2008).

Tablo 18

Bruce-ladder Multiplex PCR Tekniğinde Kullanılan Oligonükleotid Listesi

Primer ^a	Sequence (5’–3’)	Amplicon size (bp)	DNA targets	Source of genetic differences
BMEI0998f	ATC-CTA-TTG-CCC-CGA-TAA-GG	1682	Glycosyltransferase, gene <i>wboA</i>	IS711 insertion in BMEI0998 in <i>B. abortus</i> RB51, and deletion of 15,079 bp in BMEI0993- BMEI1012 in <i>B. ovis</i>
BMEI0997r	GCT-TCG-CAT-TTT-CAC-TGT-AGC			
BMEI0535f	GCG-CAT-TCT-TCG-GTT-ATG-AA	450 (1320b)	Immunodominant antigen, gene <i>bp26</i>	IS711 insertion in BMEI0535-BMEI0536 in <i>Brucella</i> strains isolated from marine mammals
BMEI0536r	CGC-AGG-CGA-AAA-CAG-CTA-TAA			
BMEII0843f	TTT-ACA-CAG-GCA-ATC-CAG-CA	1071	Outer membrane protein, gene <i>omp31</i>	deletion of 25,061 bp in BMEII826- BMEII0850 in <i>B. abortus</i>
BMEII0844r	GCG-TCC-AGT-TGT-TGT-TGA-TG			
BMEI1436	ACG-CAG-ACG-ACC-TTC-GGT-AT	794	Polysaccharide deacetylase	deletion of 976 bp in BMEI1435 in <i>B. canis</i>
BMEI1435	TTT-ATC-CAT-CGC-CCT-GTC-AC			
BMEII0428f	GCC-GCT-ATT-ATG-TGG-ACT-GG	587	Erythritol catabolism, gene <i>eryC</i> (Derythulose-1- phosphate dehydrogenase)	deletion of 702 bp in BMEII0427- BMEII0428 in <i>B. abortus</i> S19
BMEII0428r	AAT-GAC-TTC-ACG-GTC-GTT-CG			
BR0953f	GGA-ACA-CTA-CGC-CAC-CTT-GT	272	ABC transporter binding protein	deletion of 2653 bp in BR0951-BR0955 in <i>B. melitensis</i> and <i>B. abortus</i>
BR0953r	GAT-GGA-GCA-AAC-GCT-GAA-G			
BMEI0752f	CAG-GCA-AAC-CCT-CAG-AAG-C	218	Ribosomal protein S12, gene <i>rpsL</i>	point mutation in BMEI0752 in <i>B. melitensis</i> Rev.1
BMEI0752r	GAT-GTG-GTA-ACG-CAC-ACC-AA			
BMEII0987f	CGC-AGA-CAG-TGA-CCA-TCA-AA	152	Transcriptional regulator, CRP family	deletion of 2,203 bp in BMEII0986- BMEII0988 in <i>B. neotomae</i>
BMEII0987r	GTA-TTC-AGC-CCC-CGT-TAC-CT			

BÖLÜM IV

Bulgular

Yürütülen bakteriyel kültür, tür ve cins düzeyinde identifikasyon ve moleküler çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aşağıda belirtilmiştir.

Kültür Sonuçları

Brusella pozitif sürülerden toplanan süt ve vajinal svab numuneleri ve abort problemi yaşayan sürülerden Veteriner Dairesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen fatüs numunelerine uygulanan bakteriyel kültür çalışmaları sonucu, 90 adet süt numunesi ve 19 adet fetüs numunesinden *Brucella* spp. izole edildi. Çalışılan 5 adet vajinal svab numunesinden herhangi bir *Brucella* üretilmedi. Yapılan kültür çalışma sonuçları aşağıda özetlenmiştir.

Süt Numunelerinin Kültür Sonuçları

Serolojik testlerle Brusella pozitif olarak belirlenen 23 adet sürüden toplanan süt örneklerinden 21 adet sürüden *Brucella* spp. izole edildi. Kültür çalışmalarında iki adet sığır sürüsünden *Brucella* spp. izole edilemedi. Örnek alınan sürülerin %91,3'den *Brucella* spp. başarılı bir şekilde izole edildi.

Süt numunelerinin 5 tanesinde farklı bakteriler izole edildi. Numune alınan 180 bireye ait 180 adet süt numunesinden, 61 adet bireye ait 90 adet numunede *Brucella* spp. izole edildi. Sürü, tür, birey ve numunelere ait kültür sonuçları Tablo 18.'de özetlenmiştir.

Tablo 19

Süt Numunelesi Kültür Sonuçları

Hayvan	Örnek (Süt)			Kültür Pozitif			Yüzde (%)		
Nevi	Sürü	Birey	Num.	Sürü	Birey	Num.	Sürü	Birey	Num.
Keçi	5	29	55	5	5	5	100,0	17,2	9,1
Koyun	7	47	74	7	17	17	100,0	36,2	23,0
Sığır	11	104	190	9	39	68	81,8	37,5	35,8
Toplam	23	180	319	21	61	90	91,3	33,9	28,2

Fetüs Numunelerinin Kültür Sonuçları

Abort problemi yaşayan 20 adet (keçi:5; koyun:10; sığır:5) sürüden 27 adet bireye ait 32 adet fetüse nekropsi gerçekleştirildi ve karaciğer, dalak, fetal mide içeriği gibi dokuları kültüre edildi. Kültür çalışmaları sonucu 11 (keçi:2; koyun:5, sığır:4) farklı sürüden gelen, 13 (keçi:2; koyun:7, sığır:4) bireye ait, 19 (keçi:3; koyun:12, sığır:4) fetüs numunesinin farklı dokularından *Brucella* spp. izole edildi. Kültür çalışmaları sonucu eldilen bilgilerin ayrıntılı özeti tablo 19.'da verilmiştir.

Tablo 20

Fetüs numuneleri kültür sonuçları

Hayvan	Örnek (Süt)			Kültür Pozitif			Yüzde (%)		
Nevi	Sürü	Birey	Fetüs	Sürü	Birey	Fetüs	Sürü	Birey	Fetüs
Keçi	5	5	5	2	2	3	40	40.0	60.0
Koyun	10	15	18	5	7	12	50	46.7	66.7
Sığır	5	7	9	4	4	4	80	57.1	44.4
Toplam	20	27	32	11	13	19	55	48.1	59.4

Brusella Genus Seviyesinde Yapılan İdentifikasyon Sonuçları

Kültür sonucu brusella spesifik FM besiyeri ve CITA yeri üzerinde brucella tipik bal renkli koloniler identifikasyon amacıyla bakteriyolojik testlere tabi tutuldu. Koloni morfolojisi tipik, Gram negatif kokobacil bakteri morfolojisine sahip, oksidaz, üreaz ve brucella anti A+M antiserum ile yapılan lamaglitunasyon testinde pozitif olarak belirlenen izolatlar *Brucella* spp. olarak değerlendirildi. Besiyerlerinde tipik olmayan koloni oluşturan yine aynı testlere tabi tutularak *Brucella* spp. negatif olarak değerlendirildi.

Yapılan identifikasyon testlerinde tablo 20'de ayrıntıları verilen 90 adet süt numunesinden ve 19 adet fetüs numunesinden izole edilen izolat *Brucella* spp. olarak tanımlandı. Tüm izolatlar moleküler testler ve kültür bank oluşturmak üzere dondurularak muhafaza edildi.

Tablo 21

Brucella genus seviyesi identifikasyon sonuçları

Hayvan	Süt Kültür Pozitif			Fetüs Kültür Pozitif			Sonuç
Nevi	Sürü	Birey	Num.	Sürü	Birey	Fetüs	
Keçi	5	5	5	2	2	3	<i>Brucella</i> spp.
Koyun	7	17	17	5	7	12	<i>Brucella</i> spp.
Sığır	9	39	68	4	4	4	<i>Brucella</i> spp.
Toplam	21	61	90	11	13	19	<i>Brucella</i> spp.

Real-Time PCR Sonuçları

Genus düzeyinde *Brucella* spp. olarak tanımlanan 109 adet izolattan kaynatma yöntemi ile DNA lizadları hazırlandı. Tüm lizatlar önce *Brucella* genus spesifik primerler kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile test edildi. Daha sonra tüm izolatlar *B. melitensis* spesifik Real-Time PCR yöntemi ile tekrar test edildi.

RT-PCR testleri uygulanan 109 lizat tamamı hem *Brucella* genus spesifik hem de *B. melitensis* spesifik primerler ile uygulanan RT-PCR testlerinde pozitif olarak tespit edildi. Real-Time PCR uygulanan 109 (Keçi:8, koyun:29, sığır: 72) adet izolat *B. melitensis* olarak tanımlandı. İzolatların sürü, birey ve numune bazında ayrıntılı sonuçlar ve elde edilen bulgular Tablo 22.'de belirtilmiştir.

Real-Time PCR çalışmalarında kullanılan farklı kitler, pozitif ve negatif kontroller ve örnek çalışmalar ve optimizasyon bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir.

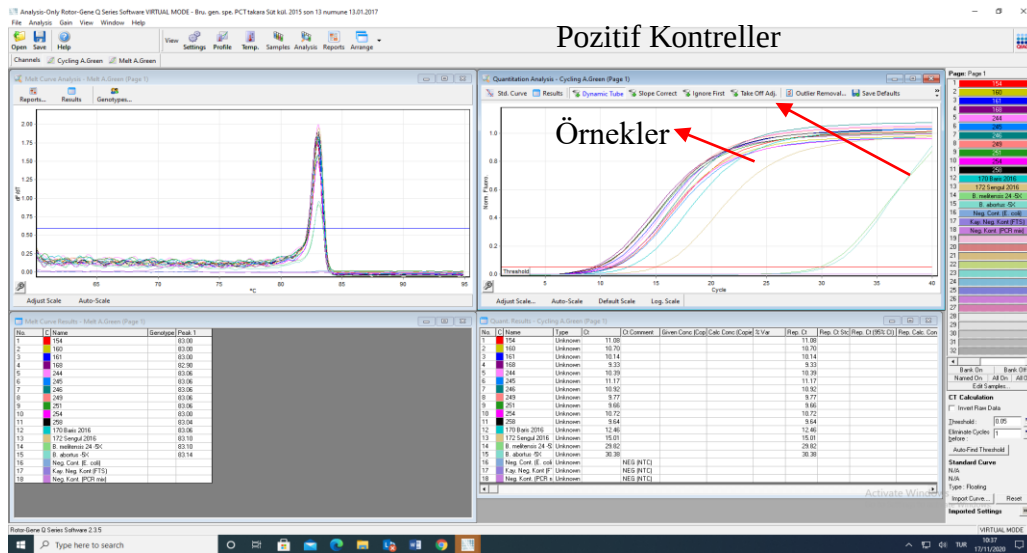
Tablo 22

Real-Time PCR Sonuçları

Hayvan Nevi	Süt Kültür Pozitif			Fetüs Kültür Pozitif			Sonuç
	Sürü	Birey	Num.	Sürü	Birey	Fetüs	
Keçi	5	5	5	2	2	3	<i>B. melitensis</i>
Koyun	7	17	17	5	7	12	<i>B. melitensis</i>
Sığır	9	39	68	4	4	4	<i>B. melitensis</i>
Toplam	21	61	90	11	13	19	<i>B. melitensis</i>

Takara Real-Time PCR Kit spesifik PCR bulgularları

Aşağıdaki resimde Takara Real-Time PCR kit ve *Brucella* genus spesifik primerler kullanılarak 13 adet numune için uygulanan Real-Time PCR testi ekran görüntüsü görülmektedir. Örneklerin tamamının ct değeri 9,33 ve 15 arası değerler olarak gözlemlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* -5x sulandırma lizadı (ct 29.82) ve *B. abortus* -5x sulandırma lizadı (ct 30.30) pozitif olarak belirlendi. Tüm negatif kontroller negatif olarak tespit edildi. Örneklerin tamamı ve pozitif kontrollerin tamamı 83,10 °C civarında melt curve gösterdi. Yapılan Real-Time PCR testi sonucu tüm örneklerin *Brucella* genusuna ait olduğu değerlendirildi.

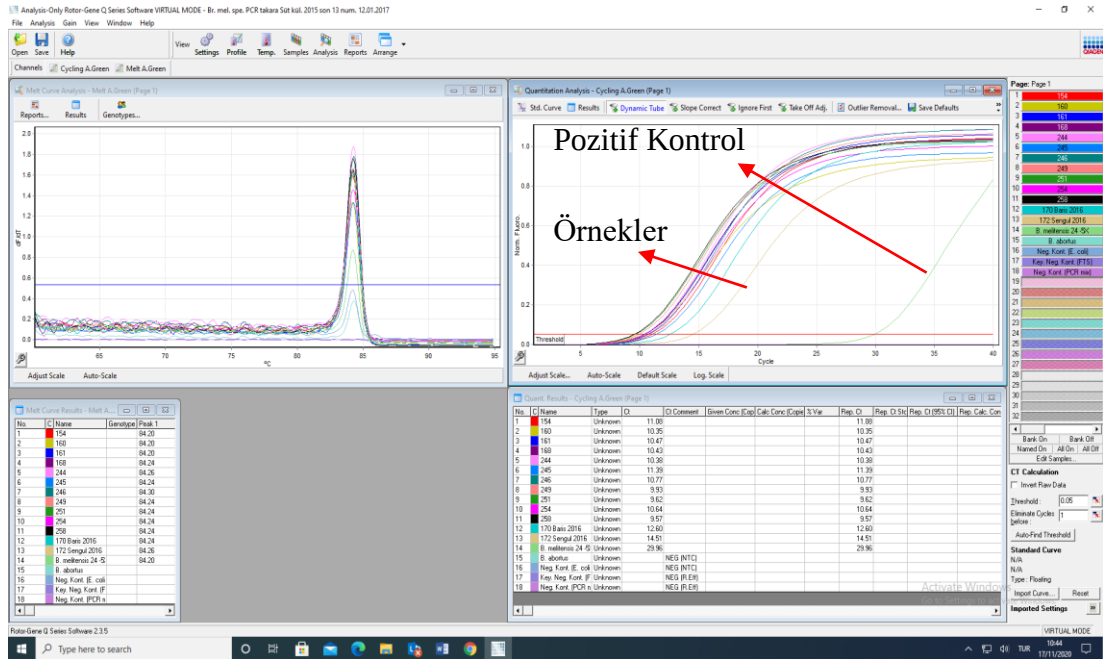
Şekil 13**Takara Kit ile Yapılan Genus Spesifik Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü**

Takara Real-Time PCR kit *B. melitensis* spesifik PCR bulguları

Aşağıdaki resimde Takara Real-Time PCR kit ve *B. melitensis* spesifik primerler kullanılarak 13 adet numune için uygulanan Real-Time PCR çalışmasının ekran görüntüsü görülmektedir. Örneklerin tamamının ct değeri 9,57 ve 14.5 arası değerler olarak gözlendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* -5x sulandırma lizadı (ct 29.96) pozitif olarak belirlendi. *B. abortus* lizadı ve tüm diğer negatif kontroller negatif olarak tespit edildi. Örneklerin tamamı ve pozitif kontrollerin tamamı 84,20 °C civarında melt curve gösterdi. Yapılan Real-Time PCR çalışması sonucu tüm örneklerin *B. melitensis* olduğu değerlendirildi.

Şekil 15 Takara Kit ile Yapılan *B. melitensis* Spesifik Bir Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü

Takara Kit ile Yapılan *B. melitensis* Spesifik Bir Real-Time PCR Çalışması Ekran Görüntüsü



Biotiplendirme Sonuçları

Biyotiplendirme çalışmaları için kültür ve RT-PCR çalışmalarında *B. melitensis* olarak tanımlanan 30 adet -18°C’de dondurulmuş izolat Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü, Brusella Biyotiplendirme Laboratuvarı’na gönderilmiştir. İzolatların yeniden kültür çalışmalarında 2 adet izolat üremedi ve bir adet izolatın kontamine olduğu belirlendi. Gönderilen 27 adet izolat yeniden üretilerek biyotiplendirme çalışmaları yapıldı. Biyotiplendirme çalışmaları bölüm 5.4.’de belirtilen uygulamalar ile yapıldı.

Biyotiplendirme çalışmaları sonucunda 27 adet izolatın 20 tanesi *B. melitensis* biyotip 1, 7 tanesi de *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Keçiden izole edilen 4 adet suşun; 3 tanesi *B. melitensis* Biyotip 1, 1 adedi ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı. Koyunlardan izole edilen; 10 adet izolatın; 9 tanesi *B. melitensis* Biyotip 1, 1 tanesi *B. melitensis* biyotip 3 olarak ve sığırlardan izole edilen 13 suşun 8 tanesi *B. melitensis* Biyotip 1; 5 tanesi ise *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı.

Biyotiplendirme çalışmalarında *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanan 2 adet izolatın ve *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlanan 1 adet izolatın atipik olarak Penisiline dirençli olduğu belirlendi. Biyotiplendirme çalışmalarının ayrıntıları Tablo 23’te belirtilmiştir.

Tablo 23

Biyotiplendirme Sonuçları

Hayvan Nevi	İzolat	Biyotip 1	Biyotip 3	% Biyotip 1	% Biyotip 3
Keçi	4	3	1	75,0	25,0
Koyun	10	9	1	90,0	10,0
Sığır	13	8	5	61,5	38,5
Toplam	27	20	7	74,1	25,9

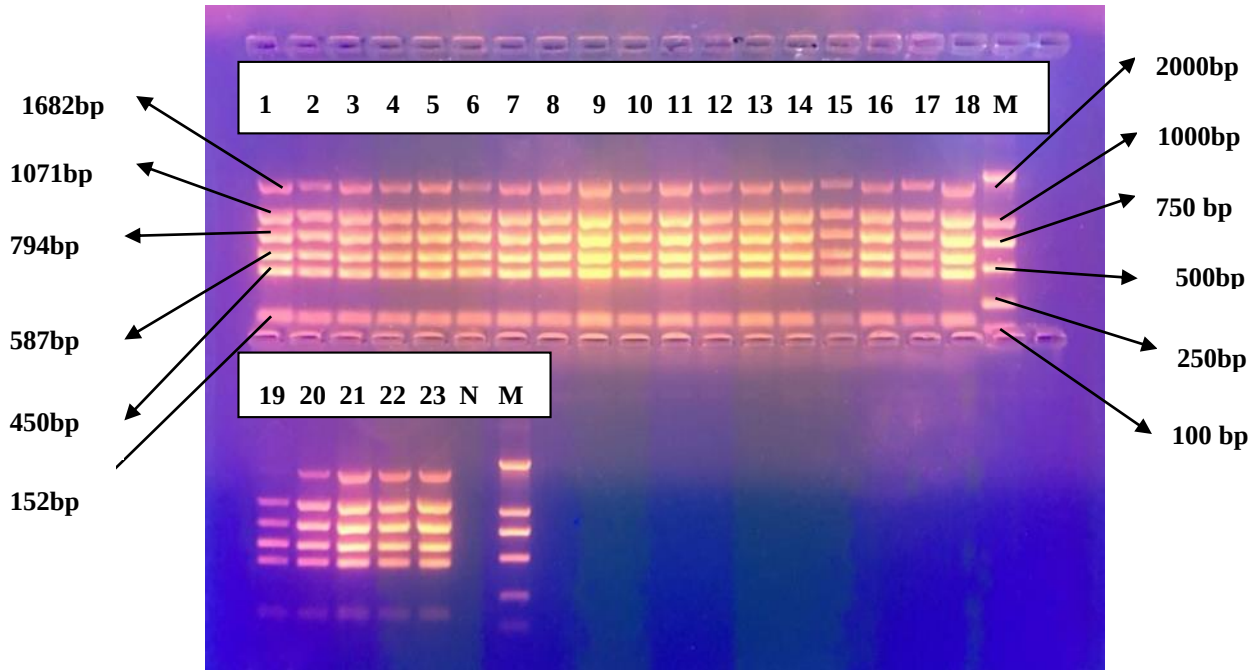
Bruce-Ladder Multipleks PCR Sonuçları

Bruce Ladder Multiplex PCR çalışmaları Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünde gerçekleştirildi. Bu amaçla kültür çalışmaları ve RT-PCR çalışmaları ile *B. melitensis* olarak tanımlanan 27 adet izolat ve RT-PCR çalışmaları ile *B. melitensis* olarak tanımlanan 22 adet DNA lizadı biyotiplendirme laboratuvarı tarafından test edildi.

Tüm isolatlar *B. melitensis* saha şuşu olarak tanımlandı. DNA lizadı olarak gönderelen 22 adet örnekte aynı sonuçları verdi. RT-PCR sonuçları ve Bruce Ladder PCR sonuçları aynı olarak belirlendi. Aşağıdaki resimde PCR sonuçları belirtilmiştir. Bruce Ladder Multiplex PCR çalışmaları sonucunda elde edilen jel görüntüsü Şekil 12.'de verilmiştir.

Şekil 17 Bruce-ladder multiplex PCR Sonuçları Jel Görüntüsü

Bruce-ladder multiplex PCR Sonuçları Jel Görüntüsü



Lane 1: Pozitif kontrol (*B. melitensis* Ether referans suş, ATCC 23458)

Lanes 2-23: Saha izolatları

Lane M: Marker (2000 bp)

Lane N: Negative Kontrol

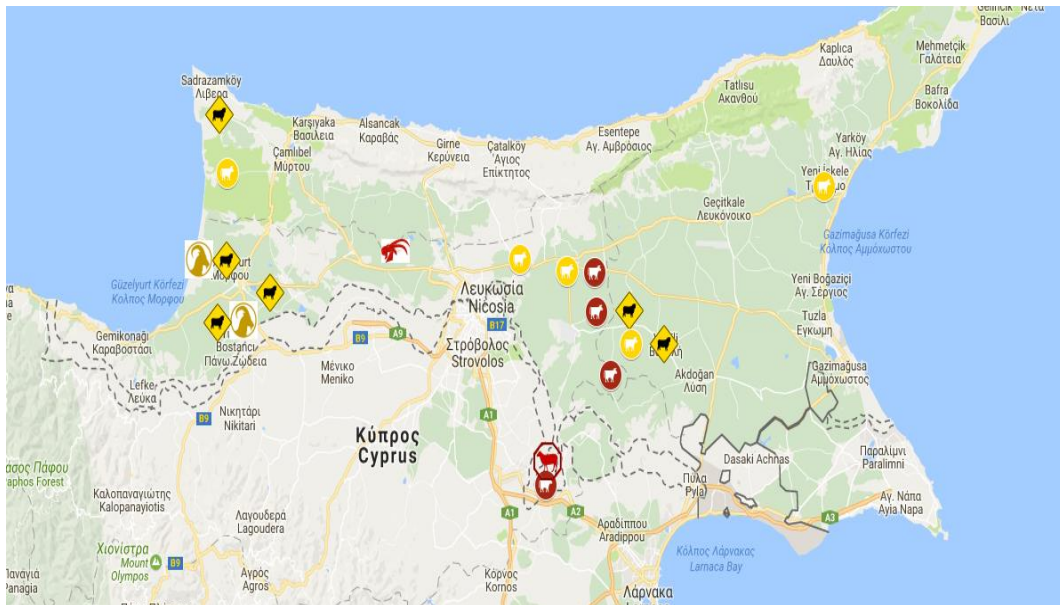
Türlere ve Biyotiplere Göre belirlenen sonuçların dağılımı

Sürülere Ait Biyotip Dağılımı

Aşağıdaki haritada izolasyon gerçekleştirilen ve tanımlanan izolatların elde edildiği sürülerin lokalizasyonları belirtilmiştir. Kırmızı noktalar *B. melitensis* Biyotip 3 ve sarı şekiller ise *B. melitensis* Biyotip 1 izolatlarını temsil etmektedir. Yuvarlak işaret ile belirtilen işaretler sığır örneklerini; dikdörtgen ile belirtilen şekiller keçi örneklerini göstermektedir.

Şekil 18

Sürülere Ait Biyotip Dağılım Haritası



BÖLÜM V

Tartışma ve Sonuç

Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ekonomisinde hayvancılık sektörü temel gelir kaynaklarından birisidir. Veteriner Dairesi 2020 yıllık raporuna göre; 828 büyükbaş işletmesinde 66,997 sığır ve 4,103 küçükbaş işletmede 263,494 koyun ve 93,849 adet keçi bulunmaktadır. Bruselloz KKTC’de endemik seyreden bildirimi zorunlu bir hastalıktır ve hastalığın seyri Veteriner Dairesi tarafından rutin olarak yapılan serosurveylemlerle takip edilmektedir. Şimdiye kadar KKTC’deki çiftlik hayvanlardaki Brusellozun prevalansını izlemek ve eradikasyonunu sağlamak amacı ile serojik testlere dayanan birçok kontrol ve eradikasyon çalışma yapılmasına rağmen, hastalığa neden olan etkenlerin varlığını ortaya koyacak kapsamlı bakteriyolojik çalışmalar yapılmamıştır.

Çiftlik hayvanlardaki Brusellozun kontrol ve eradikasyonuna yönelik, test ve pozitif hayvanların kesim stratejisine dayanan Ulusal Bruselloz Kontrol ve Eradikasyon Programı uygulanmaktadır. KKTC’de Bruselloz hastalığına karşı aşılama yasaktır ve 1980 yılından itibaren aşı uygulanmamaktadır. Sığır, koyun ve keçi popülasyonundaki, Bruselloz sürü prevalansı, 2015 yılından itibaren uygulanan ulusal program sayesinde ciddi olarak gerilemesine rağmen tüm ülke çapında eradikasyon henüz sağlanamamıştır.

İnsanlar pastörize edilmemiş süt veya süt ürünleri tüketerek veya enfekte sığırlarla veya atık materyelerine temas yolu ile Bruselloz enfeksiyonuna yakalanabilirler. Mukoza ve/veya yaraların enfekte sığırların abort fetüs sıvıları veya dokuları ile teması, insan Bruselloz için önemli bir hastalık kaynağı olabilir. Sığır veya sığır ürünleriyle ilgili meslekler, insan brusellozu için en büyük risktir. Mezbaha, çiftlik, laboratuvar çalışanları ve veteriner hekimler, *Brucella* enfeksiyonu için bilinen risk gruplarıdır. *B. melitensis* biyotip 1, sığır çiftliklerinde sağımçı olarak çalışan çiftlik işçilerinin kanından izole edilmiştir (Osman, & diğ., 2015).

KKTC Sağlık Bakanlığı tarafından yayınlanan bildirimi zorunlu hastalık istatistiklerine göre, yılda sadece birkaç insan bruselloz vakası (2014 yılında 3 vaka; 2015'te 6; 2017'de 5; 2019'da 4) bildirilmiştir. Son genel nüfus sayımına göre, KKTC nüfusu 286.257 kişi olarak tahmin edilmiştir. Yıllardır Bruselloz çiftlik

hayvanlarında endemik olmasına rağmen, insan vakalarının oranı düşük olarak değerlendirilmektedir. Ülkede çiğ ve/veya pastörize edilmemiş süt ve süt ürünü kullanımı ve çiğ et ve et ürünü tüketimi yaygın olmaması, Bruselloz'un insanlara bulaşması potansiyel azaltmaktadır.

Çiftlik hayvanlarda, sürülerin bruselloz ile tanımlaması genellikle abort gibi tipik klinik belirtiler, seroloji ve etkenin izolasyonununa dayanır. Bir veya daha fazla enfekte hayvanda bruselloz tanısının yapılması, bir popülasyondaki enfeksiyonun olduğu kabul edilir. Bu nedenle, çiftlik hayvanı işletmelerinde enfeksiyonun kontrolü ve eradikasyonunda brusellozun hızlı ve doğru teşhisi son derece önemlidir (Saavedra, & diğ., 2019). *Brucella* organizmalarının kesin olarak tanımlanmasını sağlayan tek bir test olmadığı için, doğru bir tanımlama için serolojik, bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerin kombinasyonu kullanılmalıdır (OIE, 2018). Bazı zorluklara rağmen, organizmanın uygun patolojik örneklerden izolasyonu, özgünlüğü ve izolatin biyotiplendirilmesine uygunluğu nedeniyle brusellozun laboratuvar teşhisi için altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Öte yandan moleküler yöntemler, özellikle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli yöntemler, enfeksiyon tanısında giderek daha başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. (Geresu & Kassa, 2016; Yu & Nielsen 2010).

Bu çalışmada *Brucella* organizmalarının örneklerden izolasyon duyarlılığını artırmak için, daha önce belirtildiği gibi hem Farrell's Medium (FM) hem de CITA besiyeri paralel olarak kullanıldı (De Miguel, & diğ., 2011; De Nardi Júnior. & diğ., 2015; Kolo, & diğ., 2019). Çalışmada test edilen 32 adet aborte fetüs ve 319 süt örneğinden oluşan toplam 351 numuden; fetüs örneklerinden 19 suş (%59.4) ve süt örneklerinden 90 suş (%28.2) olmak üzere toplam 109 adet *Brucella* suşu (%31.1) izole edildi. İzolasyon sayılarına göre aborte fetüslerden elde edilen izolatların büyük çoğunluğu örneklem büyüklüğüne paralel olarak koyun orijinli (12/19; %63,2) iken, izolasyon oranı açısından büyük çoğunluğu sığır kökenlidir (4/5; %80). Öte yandan, hem izolasyon sayıları hem de oranları açısından süt örneklerinden elde edilen izolatların çoğunluğu sığır kökenlidir (sırasıyla 68/90; %75.6 ve 68/190; %35,8) (Tablo 19 ve 20). İzole edilen tüm suşlar, daha önce açıklanan kriterlere göre *B. melitensis* olarak tanımlandı (OIE, 2018; Saavedra, & diğ., 2019; Shalaby, & diğ., 2019). Tanımlanan izolatlar moleküler yöntemler kullanılarak doğrulandı. Yüz dokuz

izolatın tümü, *Brucella* cins ve *B. melitensis* tür özgü primerler ile Real-Time PCR kullanılarak analiz edildi. Bu çalışma ile KKTC'deki çiftlik hayvanlarında *B. melitensis* izolasyonu belgelenmiştir.

Elde edilen sonuçları, daha önce yapılan çalışma sonuçlarına uyumlu olarak, hastalığın endemik olduğu Akdeniz Havzasında *Brucella* türlerinin izolasyonunu göstermektedir. İtkaya (De Massis, & diğ., 2019), Mısır (Khan, & diğ., 2019; Shalaby, & diğ., 2019), Hırvatistan (Špičić, & diğ., 2010; Cvetnić, & diğ., 2015), Arnavutluk (Fero, & diğ., 2020) ve Türkiye (Sidamonidze, & diğ., 2017).

Ön tanımlamanın ardından, seçilen 27 izolat, daha önce açıklandığı gibi konvansiyonel biyotiplendirme yöntemlerle analiz edildi (OIE, 2018; Saavedra, & diğ., 2019; Shalaby, & diğ., 2019). Çalışmada, 20 (%74.1) izolat *B. melitensis* biyotip 1 olarak ve 7 (%25.9) izolat *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlandı (Tablo 23). Çalışma boyunca başka hiçbir *Brucella* türü ve/veya biyovar tespit edilmedi. Tanımlanan 20 *B. melitensis* biyotip 1 izolatının, üçü (%15.0) keçi, dokuzu (%45.0) koyun ve sekizi (%40.0) sığır kökenliydi. Benzer şekilde, 7 *B. melitensis* biyotip 3 izolatın, biri (%14.3) keçi, biri (%14.3) koyun ve beşi (%71.4) sığır kökenliydi. Hayvan türleri açısından, 4 keçi süşunun üçü (%75.0) *B. melitensis* biyotip 1 ve biri (%25.0) *B. melitensis* biyotip 3 olarak; 10 koyun süşun dokuzu (%90.0) *B. melitensis* biyotip 1 olarak ve biri (%10.0) *B. melitensis* biyotip 3 olarak ve 13 sığır süşunun sekizi (%61,5) *B. melitensis* biyotip 1 ve beş (%38,5) *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır (Tablo 23).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *B. melitensis*'in varlığını gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. İtalyan Ulusal Bruselloz Referans Laboratuvarı'na 2007-2015 yılları arasında sığırlardan izole edilen süşların tiplendirilmesi için gönderilen toplam 2.981 süştan *Brucella* saha süşlerinin analizini içeren bir çalışmada, *B. abortus* biyotip 1, 3 ve 6 varlığı %90.1 sıklıkta ve *B. melitensis* biyotip 3 varlığı %9.9 sıklıkta bildirilmiştir. Öte yandan aynı çalışmada, koyun ve keçilerden izole edilen 2.279 süşün analizinde, *B. abortus* biyotip 1 ve 3 %4,3 sıklıkta, *B. melitensis* biyotip 1 ve 3 %95.3'lük sıklıkta ve *B. ovis* % 0.4'lük sıklıkta olduğu ortaya konmuştur (De Massis, & diğ., 2019). De Massis vd (2019) çalışmasından farklı olarak, bu çalışmada ne *B. abortus* ne de başka bir *Brucella* türü izole edilmemiştir.

Öte yandan, *B. melitensis* biyotip 1 ve 3 izolasyon oranları sığır ve koyunlardan elde edilen, küçük farklılıklarla benzerlik göstermiştir.

Brucella türlerinin tanımlanması için farklı primer kombinasyonları kullanan birkaç multipleks PCR protokolü tanımlanmıştır (Sumathi, & diğ., 2019). Bricker ve Halling (1994) tarafından 1994 yılında, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* ve *B. suis*'i tür düzeyinde tanımlamak için, beş primer kullanarak AMOS PCR adı verilen bir multipleks PCR protokolü oluşturulmuştur. Daha yakın zamanlarda, altı karasal tür ve deniz türleri ile *B. abortus* S19, RB51 ve *B. melitensis* Rev. 1 aşısı suşlarını dahil olmak üzere, tüm *Brucella* türlerini cins düzeyinde tanımlayabilen 8 primer kullanarak, Bruce-ladder multiplex PCR test protokolu tanımlanmıştır (López-Goñi, & diğ., 2008). Mayer-Scholl vd. (2010) tarafından Bruce-ladder multiplex PCR geliştirilmiş ve *B. microti*, *B. inopinata*, *B. ceti* ve *B. pinnipedialis* dahil olmak üzere tüm tanınan *Brucella* türlerini ayırt edebilen bir multipleks PCR daha da geliştirilmiştir.

Bu çalışmada *B. melitensis* olarak biyotiplendirilen seçilmiş 27 izolat bakteriyolojik ve serolojik yöntemlerle biyotip 1 ve biyotip 3 olarak tanımlanmış ve aynı izolatlar Bruce-ladder multiplex PCR analizine tabi tutularak doğrulanmıştır. Uygulanan Bruce-ladder PCR analizinde; 4 keçi, 10 koyun ve 13 sığır orijinli olmak üzere test edilen tüm izolatlar, 1682, 1071, 794, 587, 450 ve 152 bp ampikon boyutlarına göre *B. melitensis* saha suşları olarak belirlenmiştir. *B. melitensis* Ether suşu ve test edilen tüm şüpheli izolatlarda 1071 bp'lik ampikon tespit edilmesi, tüm izolatların saha alan suşları olduğunu göstermiştir. Ek olarak, sırasıyla 587 bp fragmanlarının mevcudiyeti ve 218 bp tespit edilmemesi nedeniyle, tets edilen hiçbir izolatın *B. abortus* S19 veya *B. melitensis* Rev 1 aşısı suşları olmadığı belirlenmiştir (Dadar, & diğ., 2019; Sumathi Dadar, & diğ., 2019; Tekle, & diğ., 2019).

Bu sonuçlar 336 sığır, koyun ve keçi örneğinden; yedisi koyundan, altısı keçiden ve bir tanesi sığırdan olmak üzere aynı ampikon boyutlarına sahip 14 *B. melitensis* izolatının tespit edildiği çalışma bulgularıyla tam bir uyum içindedir (Cvetnić, & diğ., 2015). Špičić vd. (2010) tarafından, Hırvatistan'da sığırlarda ilk kez *B. melitensis* biyotip 3 tespit edilmiştir. Sumathi vd. (2019) tarafından yapılan Bruce-ladder multiplex PCR'de çalışmada beklenen boyutları 1682, 1072, 794, 587, 450

ve 152 bp amplifikasyon ürünleri tespit edilmiş ve etkilenen koyun ve keçi çiftliklerinden elde edilen beş izolat *B. melitensis* saha şüsü olarak tanımlanmış ve doğrulanmıştır.

Tekle vd. (2019) tarafından sekiz izolat araştırılmasında; *B. melitensis* suşlarının çoğunluğu tarafından yaygın olarak çoğaltılan 1682 bp'lik bant boyutu fragmanı tespit edilmemesine rağmen yazarlar, izolatların mikrobiyolojik ve biyokimyasal özellikleriyle birlikte diğer beş düzenli fragmanın amplifikasyonu ile Bruce-ladder multiplex PCR testinin sonuçlarına dayanarak tüm suşların *B. melitensis* olarak tanımlanmışlardır. Bu çalışmada, 1682 bp fragmanı sadece bir izolat tarafından amplifiye edilmemiş olsa da (resim, line19), bu izolatta Tekle ve. (2019) belirtilen kriterler ışığında *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Dadar vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada aborte koyun fetüslerinden Bruce-ladder multiplex PCR testi ile belirlenen *B. melitensis* Rev 1 aşısı suşunun varlığını belirlenmiştir. Yürütülen çalışmada, Dadar vd. (2019), aksine hiçbir aşısı suşu tespit edilmedi. KKTC de çiftlik hayvanlarında bruselloza karşı aşılama uygulanmadığı için aşısı suşlarının tanımlanmaması beklenen bir sonuçtur.

Brucella türlerinin genellikle konakçıya özgü olduğu değerlendirilse de, aynı ahırları, meraları ve tesisleri paylaşma, enfekte hayvanların kontrolsüz hareketi veya çiftliklerin yakınlığı gibi belirli koşullar altında hayvanlarda türler arası enfeksiyonların ortaya çıkması çok nadir değildir (Kolo vd. 2019; Morales-Estrada vd. 2012; 2016). Kolo vd. (2019), seropozitif olarak kesilen sığırlardan yedi suşu izole ederek ilk kez Güney Afrika'daki sığırlarda *B. melitensis*'in varlığını bildirmiştir. Bu yedi suştan beşi *B. abortus* biyotip 1, 2 izolat *B. melitensis* biyotip 2 ve *B. melitensis* biyovar 3 olarak biyotiplendirildi

Meksika'nın brusellozun endemik olduğu bölgesinde Morales-Estrada vd. (2016) sero pozitif inek ve keçilerde *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* ile çapraz enfeksiyonları tespit edilmiştir. Çalışmada 3 adet *B. abortus* biyotip 1 izolatı inek ve keçi gübresinden; 3 adet *B. melitensis* biyotip 1 inek gübresinden ve 1 adet *B. suis* biyotip 1 izolat inek gübresinden izole edilerek tanımlanmıştır. Špičić ve ark. (2010) tarafından Hırvatistan'da, ilk kez ineklerde *B. melitensis* biyotip 3 bildirilmiştir. Daha sonra Cvetnić vd. (2015) tarafından, 2009-2013 yılları arasında 336 sığır, koyun ve keçi örneğinde mikrobiyolojik analizler yapmış ve yedisi koyundan, altısı keçiden bir

tanisi sığırdan olmak üzere 14 (%4.2) örnekte *B. melitensis* izole edilmiştir. Shalaby vd. (2019) tarafından sığır uterus ve/veya lenf düğümleri gibi doku örneklerinden *B. melitensis* biyotip 3 izolasyonunu bildirmiştir. Khan vd. (2019) enfekte sığırların lenf düğümlerinden, süt ve fetal abomazal içeriklerinden 17 adet *B. melitensis* biyotip 3 suşu tanımlanmıştır.

Sığırlar, enfekte domuzlar, keçiler veya koyunlarla birlikte otladıklarında, *B. suis* ve *B. melitensis* ile enfekte olabilmektedir. Karışık hayvancılık alanlarında türler arası geçiş bir sorun olabilmektedir. *B. abortus* koyunlar da dahil olmak üzere sığır dışındaki türlerden izole edilmiştir ve sığırlarda *B. melitensis* bulunması sığırların bu *Brucella* türüne duyarlılığını göstermektedir. Sığır süt ve vajinal sekretlerden *B. melitensis*'in izolasyonu, etkenin enfekte sığırlardan da bulaşabileceğini göstermektedir. Ancak sığırlarda *B. melitensis* prevalansı ve bu patojenin bulaşmasında sığırların önemi çok detaylı olarak çalışılmamıştır. Ayrıca sığırlarda *B. melitensis* enfeksiyonlarına karşı aşılamanın etkinliği araştırılmamıştır. Sığırların Rev. 1 aşısı ile aşılama içerdği bazı riskler nedeni ile tavsiye edilmemesine rağmen, bu aşının sığırlarda kullanımı *B. melitensis* karşı etkili olabilir. Aşılama başlamadan önce enfekte olmuş karma sürülerde bulunan *Brucella* türlerinin bilinmesi zorunludur (Smits, 2013).

Mısır'da yapılan bir çalışmada, hiçbir zaman küçükbaş hayvanlar ile birlikte yetiştirilmemiş abort yapan ineklerden izole edilen *B. melitensis*'in inekten ineğe muhtemel bulaşma yolu olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca “multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)” sonrasında aynı hayvandan farklı *B. melitensis* genotiplerinin izole edilebileceği tespit edilmiştir (Hegazy, & diğ., 2022).

Kültür pozitif/seronegatif düşük yapan ineklerin uterus akıntısı ile brucella saçılımı, enfeksiyonun korunmasına ve daha fazla yayılmasına neden olan ciddi bir sorun olduğu düşünülmektedir. *B. melitensis* biyotip 3, 5 süt ineğinden 2'sinde abort sonrası tespit edilmiştir (El-Diasty, & diğ., 2018). MLVA-15 tekniği kullanılarak Mısır'da yapılan bir çalışmada, ruminantlardan elde edilen *Brucella* izolatlarının büyük bir kısmının (13/17) *B. melitensis* olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ineklerden alınan farklı otopsi materyallerinden (lenf düğümleri, fetüs, dalak) biyotip 3 izole edilmiştir (Menshawy, & diğ., 2014). Bu çalışmada, *B. abortus* herhangi bir

sığır örneğinden izole edilmezken, yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumlu olarak sekiz *B. melitensis* biyotip 1 ve beş *B. melitensis* biyotip 3 suşları sırasıyla %61.5 ve %38.5 sıklıkta izole edilmiştir. Bu durum, KKTC'deki farklı hayvan türlerinin bir arada yaşadığı geleneksel hayvancılık yapısı ve ülkede bruselloz eradikasyon çalışmalarındaki kesintiler ile açıklanabilir.

Bu çalışmada sığırlarda *B. melitensis*'in bulaşmasında ve yayılmasında rol oynayan risk faktörlerinin belirlenmesine yönelik herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle KKTC'de sığırlarda *B. melitensis*'in yaygın olmasının nedenleri konusunda sadece yorum yapılabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, etkene yönelik infeksiyonların güçlü bir nedeni 1960 yılında Suriye'den ithal edilen Şam keçileri ile *B. melitensis*'in en son yayılması olabilir. O zamandan beri, katı ticaret kısıtlamaları ve çiftçiliğin doğası nedeniyle *B. melitensis* endemik hale gelmiş ve sığırlar dahil tüm çiftlik hayvanlarına bulaşmıştır.

BÖLÜM VI

Sonuç ve Öneriler

Bu çalışmanın sonuçları sığır, koyun ve keçilerde *B. melitensis* Biyotip 1 ve 3 yaygın olarak bulunan genotipler olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, hayvan sahiplerinin brusellozun ekonomik ve zoonotik etkileri konusunda bilinçlendirilmesinin artırılması, etkin kontrol stratejilerinin ve uygun önleyici tedbirlerin uygulanmasının ve kesintisiz olarak devam edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın soncunda amaçlandığı gibi KKTC'deki çiftlik hayvanlarında endemik olarak seyreden Bruselloz hastalığının etiyolojisi ile ilgili ayrıntılı veriler elde edilmiştir. Sığır, koyun ve keçi örneklerinden izosyon edilen tüm izolatlar hem moleküler hemde klasik yöntemler ile *B. melitensis* olarak tanımlanmıştır. Brusella türleri arasında insanlar için en patojen tür olarak belirtilen *B. melitensis* yaygın olması ciddi bir halk sağlığı tehdidi ortaya koymaktadır. Bu nedenle özellikle risk grubu meslek gurbuna dahil veteriner hekimler, laboratuvar çalışanları, hayvan yetiştiricileri ve diğer hayvanlar ile teması olan kişilerin bu risk temelinde gerekli hijyen ve biyogüvenlik önlemleri almaları önerilmektedir.

Yine sığırlarda sadece *B. melitensis* türü saptanması ve *B. abortus* etkenlerinin tespit edilmemesi bilimsel olarak ilginç bir durumu ortaya koymaktadır. Tartışma bölümünde ayrıntılı olarak bunun nedenleri ortaya konmuştur ve tartışılmıştır. Türler arası bulaşmaya neden olan işletmelerde farklı türlerin birlikte barındırılması, işletmelerin yakınlığı ve organize hayvancılık bölgesi uygulamalarının bunun bir nedeni olarak görülmekte ve bu uygulamalarda hem işletme sahiplerinin, hem de resmi makamların önlem alması türler arası bulaşmanın ve aynı zamanda hastalığın yayılımını azaltacağı kanaatini oluşturmaktadır. Sığırlarda *B. melitensis*'in yaygın olarak bulunma nedeni ile etkenin sığırlardaki saçılımının ve yayılımının daha ayrıntılı olarak araştırılması yararlı olacaktır.

KKTC'de şimdiye kadar eradikasyon metodu olarak test ve enfekte hayvanların eliminasyonu yöntemi uygulanmaktadır. Fakat Bruselloza karşı aşılama

uygulaması eğer planlanırsa sığırlar da kullanılacak aşı şusunun iyi değerlendirilmesi ve etkinliğinin ne olacağı üzerinde iyice durulmalıdır.

Bitotip düzeyinde yapılan çalışmalar da koyun, keçi ve sığırlarda *B. melitensis* Biyotip 1 ve *B. melitensis* Biyotip 3 varlığını ortaya koymuştur. Bu da bu iki biyotipin çiftlik hayvanlarında sirküle olduğunu göstermektedir. İleride yapılacak biyotiplendirme çalışmaları ile mevcut bilgiler karşılaştırılarak eradikasyon sonuçlarının değerlendirilmesi ve yayılımın izlenmesi sağlanabilecektir.

İzolatların MLVA, MLST ve tüm genom dizilimi gibi daha karmaşık moleküler araçlarla moleküler karakterizasyonu yoluyla KKTC'deki çiftlik hayvanlarında enfeksiyonun epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Kaynaklar Listesi

- Brucellosis in human and animals (2006). Principal author: M.J. Corbel , Brucellosis in humans and animals, Produced by the World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health, World Health Organization 2006.
- Caine, L.A., Nwodo, U.U., Okoh, A.I., Green, E (2017). Molecular characterization of *Brucella* species in cattle, sheep and goats obtained from selected municipalities in the Eastern Cape, South Africa. Asian Pac J Trop Dis, 7(5):293-8.
- Christopher, S., Umapathy, B.L., Ravikumar, K.L (2010). Brucellosis Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnosis. Journal of Laboratory Physicians, Jul-Dec 2010 / Vol-2 / Issue-2. DOI: 10.4103/0974-2727.72149.
- Cvetni, Ž., Zdelar-Tuk, M., Duvnjak, S., Račić, I., Škrivanko, M., Špičić, S. (2015). Multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of isolates of *Brucella melitensis* isolated in the Republic of Croatia. Vet. Arhiv, 85:481-92.
- Dadar M, Alamian S, Behrozikhah AM, Yazdani F, Kalantari A, Etemadi A, Whatmore AM. Molecular identification of *Brucella* species and biotypes associated with animal and human infection in Iran. Vet Res Forum. 2019;10(4):315-21.
- Demirpençe M, Özgen G, Sareyyüpoğlu B. K.K.T.C’de Ruminant Orijinli Brusella İzolatlarının Real Time Pcr İle Tür Düzeyinde İdentifikasyonu. X. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 24-27 Eylül 20112. Kuşadası Aydın.
- De Massis F, Zilli K, Di Donato G, Nuvoloni R, Pelini S, Sacchini L, D’Alterio N, Di Giannatale E. Distribution of *Brucella* field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. PLoS One. 2019;14(3):e0213689.

- De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM.
Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. J Clin Microbiol. 2011;49(4):1458-63.
- De Nardi Júnior G, Megid J, Vicente AF, Listoni PFJ, Monteiro FM, Lara GHB, Motta RG, Chacur MGM, Ribeiro MG (2015). Comparison of *Brucella* agar, CITA and Farrell media for selective isolation of *Brucella abortus* from semen of bovine bulls. Afr J Microbiol Res. 2015;9(9):617-20.
- El-Diasty M, Wareth G, Melzer F, Mustafa S, Sprague LD, Neubauer H (2018). Isolation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from seronegative cows is a serious impediment in Brucellosis control. Vet Sci. 2018;5: 28, vetsci5010028.
- Fero E, Juma A, Koni A, Boci J, Kirandjiski T, Connor R, Wareth G, Koleci X (2020). The seroprevalence of brucellosis and molecular characterization of *Brucella* species circulating in the beef cattle herds in Albania. PLoS ONE. 2020;15(3):e0229741.
- Geresu MA and Kassa GM (2016). A review on diagnostic methods of brucellosis. J Veterinar Sci Techno. 2016;7(3):1-8.
- Hegazy YM, Abdel-Hamid NH, Eldehieh M, Oreiby AF, Algabbary MH, Hamdy MER, Beleta EI, Martinez I, Shahein MA, Garcia N, Eltholth M (2022). Trans-species transmission of *Brucella* among ruminants hampering brucellosis control efforts in Egypt. J Appl Microbiol. 2022;132:90-100.
- Foster G, Osterman BS., Godfroid J, Jacques I and Cloeckert A (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2007), 57, 2688–2693 DOI 10.1099/ij.s.0.65269-0.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (1986). Sixth Report, World Health Organization Technical Report Series 740. World Health Organization, Genova, 1986). ISBN 92 4 1207440 X. (Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis.

- Khan MZ, Zahoor M (2018). An Overview of Brucellosis in Cattle and Humans, and its Serological and Molecular Diagnosis in Control Strategies. *Trop. Med. Dis.* 2018, 3, 65; doi:10.3390/tropicalmed3020065.
- Khan AU, Melzer F, El-Soally SAGE, Elschner MC, Mohamed SA, Ahmed MAS, Roesler U, Neubauer H, El-Adawy H (2019). Serological and molecular identification of *Brucella* sp. in pigs from Cairo and Giza Governorates, Egypt. *Pathogens.* a;8:248-54.
- Khan AU, Shell WS, Melzer F, Sayour AE, Ramadan ES, Elschner MC, Moawad AA, Roesler U, Neubauer H, El-Adawy H (2019). Identification, genotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Brucella* sp. isolated from livestock in Egypt. *Microorganisms.* b;7(12):603-21.
- Kolo FB, Adesiyun AA, Fasina FO, Katsande CT, Dogonyaro BB, Potts A, Matle I, Gelaw AK, van Heerden H (2019). Seroprevalence and characterization of *Brucella* species in cattle slaughtered at Gauteng abattoirs, South Africa. *Vet Med Sci.* 5:545-55.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marín CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Corrêa de Sá MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B (2008). Evaluation of multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol.* 46(10):3484-7.
- López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C. M., Miguel M. J. de, Muñoz P. M., Blasco J. M., Jacques I., Grayon M., Cloeckert A., Ferreira A. C., Cardoso R., Corrêa de Sá M. I., Walravens K., Albert D. and Garin-Bastuji B (2008). *J. Clin. Microbiol.* 46(10):3484. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
- Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D, Marin CM., Miguel MJ. de, Barquero-Calvo E, Guzman-Verri C, David Albert, Garin-Bastuji B (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biotyp typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology* 154 (2011) 152-155).

- Mayer-Scholl A, Draeger A, Göllner C, Scholz HC, Nöckler K (2010). Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbial Meth.* 8(1):112-4.
- Menshawy AMS, Perez-Sancho M, Garcia-Seco T, Hosein HI, Garcia N, Martinez I, Sayour AE, Goyache J, Azzam RAA, Dominguez L, Alvarez J (2014). Assessment of genetic diversity of zoonotic *Brucella* spp. recovered from livestock in Egypt using multiple locus VNTR analysis. *BioMed Res Int.* 353876.
- Miguel M. J. De., Marín C. M., Muñoz P. M., Dieste L., Grillo M. J. and Blasco J. M (2011). Development of a Selective Culture Medium for Primary Isolation of the Main *Brucella* Species. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2011, p. 1458–1463 Vol. 49, No. 4, American Society for Microbiology.
- Morales-Estrada AI, Castillo-Salto J, López-Merino A, Morales-García MR, Valle-Valdez JG, Contreras-Rodríguez A. Characterization of *Brucella* species in Mexico by Bruce-Ladder polymerase chain reaction (PCR). *African J Microbiol Res.* 2012;6(1):2793-6.
- Morales-Estrada AI, Hernández-Castro R, López-Merino A, Singh-Bedi J, Contreras-Rodríguez A (2016). Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility of *Brucella* sp. cultured from cows and goats manure in Mexico. *Arch Med Vet.*, 48:231-5.
- Nejad RB, Krecek RC., Khalaf OH., Hailat N, Arenas-Gamboa A.M. (2020), Review, Brucellosis in the Middle East: Current situation and a pathway forward *PLOS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008071> May 21,
- OIE Terrestrial Manual (2018); Chapter 3.1.4 Brucellosis (*Brucella Abortus*, *B. Melitensis* and *B. Suis*). 8th Edition, 2018. ISBN 978-92-95108-18-9 Ref: A 237.
- OIE Terrestrial Manual (2009). Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines. Third Edition, Office International of Epizooties, Paris, France. Bovine Brucellosis chapter (2.4.3).

- Osman AEF, Hassan AN, Ali AE, Abdoel TH, Smits HL (2015). *Brucella melitensis* biyotip 1 and *Brucella abortus* S19 vaccine strain infections in milkers working at cattle farms in the Khartoum Area, Sudan. PLOS ONE, 0123374.
- Ozdogac M, Güvenir M, Güler E, Aykaç A, Sayan M, Şanlıdağ T, Süer K (2018). Prevalence of Brucellosis in the Turkish Republic of Northern Cyprus. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*, 7:21-4.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Brucella* species. In: Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, editors (1194). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, p. 261-7.
- Rubacha MP., Hallidayb JE.B., Cleavelandb S, and Crumpa JA (2013), Brucellosis in low-income and middle-income countries NIH Public Access, Author Manuscript.curr Opin Infect Dis. 2013 October ; 26(5): 404–412. doi:10.1097/QCO.0b013e3283638104. (Matthew P. Rubach MP. Ve ark, 2013)
- Shalaby Y, Mousa W, Elbaz HT, Sherif HR, Nayel M, Elsify A, Zaghawa A, Salama A, Elmenshaway A, Hadad GA, Shaker A, Eldosoky I, Heavin H (2019). Serological and molecular diagnosis of bovine brucellosis in Menoufia province. *J Curr Vet Res*, 1:115-26.
- Saavedra MJ, Fernandes C, Queiroga C (2019). Laboratory diagnosis of brucellosis. In: Simões JCC, Saavedra MJ, Hunter PA, editors. *Brucellosis in Goats and Sheep: An Epidemic and Re-Emerging Old Zoonosis in the 21st Century*. Chapter 8. Nova Science Publishers, Inc., p. 151-80.
- Sareyyupoglu B, Diker KS, Gungordu S, Cantekin Z, Jahed R (2008). Development of multiplex-PCR techniques for detection of abortive bacterial infections of sheep. *Proceedings of the XXV Jubilee World Buiatrics Congress (WBC 2008)*; 2008 July 6-11; Budapest, Hungary, 2008. p. 83.
- Smits HL (2013). Brucellosis in pastoral and confined livestock: prevention and vaccination. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 32:219-28.

- Špičić S, Zdelar-Tuk M, Račić I, Duvnjak S, Cvetnić Ž (2010). Serological, bacteriological and molecular diagnosis of brucellosis in domestic animals in Croatia. *Croat Md J*, 51:320-6.
- Sumathi BR, Veeregowda BM, Byregowda SM, Rathnamma D, Isloor S, Shome R, Narayanaswamy HD (2019). Molecular characterization of *Brucella melitensis* field isolates by Bruce-Ladder multiplex PCR. *Int J Curr Microbiol App Sci*, (1):585-90.
- Scholz HC., Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Dahouk SA, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS., Whatmore AM., Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ and Karsten Nöckler K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 375–382 DOI 10.1099/ijs.0.65356-0.
- 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 (2009). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection, *Apr*;60(Pt 4):801-8. doi: 10.1099/ijs.0.011148-0. *Epub* 2009 Aug 6.
- Surucuoğlu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutepe S, Taskiran P ve Yurtsever SG (2009). Evaluation of Real-Time PCR Method for Rapid Diagnosis of Brucellosis with Different Clinical Manifestations. *Polish Journal of Microbiology*, Vol. 58, No 1, 15-19.
- Tekle M, Legesse M, Edao BM, Ameni G, Mamo G (2019). Isolation and identification of *Brucella melitensis* using bacteriological and molecular tools from aborted goats in the Afar region of north-eastern Ethiopia. *BMC Microbiol.*;19(1):108-13.
- Whatmore AM., Davison N, Cloeckaert A, Dahouk SA, Zygmunt MS., Brew SD., Perrett LL., Koylass MS., Vergnaud G., Quance C, Scholz HC., Dick EJ., Jr, Hubbard G and Schlabritz-Loutsevitch NE (2014). *Brucella papionis* sp. nov.,

isolated from baboons (*Papio* spp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 4120–4128 DOI 10.1099/ijs.0.065482-0

Yumuk Z, O’Callaghan D. Review (2012). Brucellosis in Turkey — an overview. International Journal of Infectious Diseases. 16 (2012) e228-e235.
doi:10.1016/j.ijid.2011.12.011.

Yu WL, Nielsen K (2010). Review of detection of *Brucella* sp. by Polymerase Chain Reaction. Croat Med J. ;51:306-13.

Ekler

Ek 1. Veteriner Dairesi Bünyesinde Sürdürülen Laboratuvar Çalışmalarından Elde Edilen Verilerin Kullanım İzin Kararı



KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ TARIM VE DOĞAL KAYNAKLAR BAKANLIĞI

Sayı : TDB.0.00-253/04-20/E.1103

10 Kasım 2020

Konu : Mehmet Demirpençe'nin Doktora Tezi
Kapsamında Brusella Hakkındaki
Verilerin Bilimsel Yayın Olarak
Yayınlanması

Sayın Mehmet DEMİRPEŇE

İlgi : Veteriner Dairesi Müdürlüğünün 4 Kasım 2020 tarihli ve VTD.0.00-253/04-20/E.170 sayılı yazısı.

İlgide kayıtlı yazıya atfen, Yakın Doğu Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde sürdürdüğünüz doktora programı çerçevesinde hazırlayacağınız tez çalışması için, yayımlanacak bilgilerde hiçbir koşulda numunelerin alındığı işletmeler ile ilgili kişisel bilgilerin kullanılmaması kaydı ile; 2011 yılından itibaren brusella izolasyonu ve identifikasyonu kapsamında yürütülen bakteriyel ve moleküler çalışmalarda elde edilen verileri kullanmanızda Bakanlığımızca herhangi bir sakınca görülmemiştir.

Gereği için bilgilerinize saygılarımla rica ederim.



e-imzalıdır

Emirali DEVECİ
Müsteşar

Not: 93/2007 sayılı Elektronik İmza Yasası'nın 6.maddesi gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

ŞEH. MEHMET VURAL AHMET SOK. NO. 11 YENİŞEHİR, Lefkoşa
2283735
2286945

Bilgi için: Serkan ÇIRAKOĞLU
İ.D. 2.Sınıf İdare Memuru

Ek 2. İntihal Raporu

Tez

ORJİNALLİK RAPORU

% 15	% 15	% 9	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	www.ulusaltezmerkezi.net İnternet Kaynağı	% 1
3	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	% 1
4	marysfamilymedicine.org İnternet Kaynağı	% 1
5	web.harran.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
6	mafiadoc.com İnternet Kaynağı	% 1
7	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
8	neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.woah.org İnternet Kaynağı	<% 1

10	www.floradergisi.org İnternet Kaynağı	<% 1
11	www.readbag.com İnternet Kaynağı	<% 1
12	acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
13	journals.plos.org İnternet Kaynağı	<% 1
14	li.mit.edu İnternet Kaynağı	<% 1
15	Bruno Garin-Bastuji, José-Maria Blasco. "Pathogens in Milk – Brucella spp.", Elsevier BV, 2016 Yayın	<% 1
16	acikarsiv.aydin.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
17	search.lib.auth.gr İnternet Kaynağı	<% 1
18	www.caybdergi.com İnternet Kaynağı	<% 1
19	veteriner.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
20	Itumeleng Matle, Betty Ledwaba, Karabelo Madiba, Lavhelesani Makhado, Kudakwashe	<% 1

Jambwa, Nombasa Ntushelo. "Characterisation of species and biovars in South Africa between 2008 and 2018 using laboratory diagnostic data ", Veterinary Medicine and Science, 2021
Yayın

21	elib.tiho-hannover.de İnternet Kaynağı	<% 1
22	www.oie.int İnternet Kaynağı	<% 1
23	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
24	krishikosh.egranth.ac.in İnternet Kaynağı	<% 1
25	BERBER, Engin and SÖZDUTMAZ, İbrahim. "Elazığ, Malatya ve Tunceli illerinde koyunlarda görülen abort vakalarında pestivirusların rolünün araştırılması", Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri, 2013. Yayın	<% 1
26	jcm.asm.org İnternet Kaynağı	<% 1
27	efsa.onlinelibrary.wiley.com İnternet Kaynağı	<% 1
28	www.bhl-europe.eu İnternet Kaynağı	<% 1

- | | | |
|-------|---|------|
| 29 | www.research-collection.ethz.ch
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 30 | cyberleninka.org
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 31 | www.kwaliteitskoepel.nl
İnternet Kaynağı | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 32 | BOLCA, Zuhale, GÜNDEŞ, Sibel, ERDENLİĞ, Sevil, ÖZTÜRK, Recep, SÜMERKAN, Bülent, AKATA, Filiz and VAHABOĞLU, Haluk. "İnsan kaynaklı Brusella türü mikroorganizmaların tiplendirilmesi amacı ile uygulanan metotların karşılaştırılması ve biyotipleri ile faj tipleri arasındaki ilişkinin irdelenmesi", Bilimsel Tıp Yayınevi, 2002.
Yayın | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 33 | METİN ONARAN. "Renal brucelloma: A rare infection of the kidney", International Journal of Urology, 12/2005
Yayın | <% 1 |
| <hr/> | | |
| 34 | Qi Xuefeng, Yang Xiaoyan, Cheng Anchun, Wang Mingshu, Zhu Dekang, Jia Renyong. "The pathogenesis of duck virus enteritis in experimentally infected ducks: a quantitative time-course study using TaqMan polymerase chain reaction", Avian Pathology, 2009
Yayın | <% 1 |

35	İnternet Kaynağı	<% 1
36	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
37	ŞAHİNER, Fatih, ŞENER, Kenan, GÜMRAL, Ramazan, YAPAR, Mehmet, DEDE, Murat, YİĞİT, Nuri and KUBAR, Ayhan. "Üç Farklı Real-Time PCR Testinin Karşılaştırmalı Sonuçları: MY09/11 Primerleri Çoklu Enfeksiyonları Kaçırıyor", Gülhane Askeri Tıp Akademisi, 2014. Yayın	<% 1
38	abakus.inonu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
39	2fwww.redalyc.org İnternet Kaynağı	<% 1
40	Riccardo De Santis, Massimo Ancora, Fabrizio De Massis, Andrea Ciammaruconi et al. "Molecular Strain Typing of Brucella abortus Isolates from Italy by Two VNTR Allele Sizing Technologies", Molecular Biotechnology, 2013 Yayın	<% 1
41	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
42	prh.hec.gov.pk İnternet Kaynağı	<% 1

43	"Alpha-1 Antitrypsin Deficiency", Springer Science and Business Media LLC, 2017 Yayın	<% 1
44	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
45	etd.aau.edu.et İnternet Kaynağı	<% 1
46	i-rep.emu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
47	takara.co.kr İnternet Kaynağı	<% 1
48	www.maedys.com İnternet Kaynağı	<% 1
49	www.science.gov İnternet Kaynağı	<% 1
50	Dahouk, Sascha, Heinrich Neubauer, and Herbert Tomaso. "Brucella", Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens, 2011. Yayın	<% 1
51	Hai Jiang. "MLVA genotyping of Chinese human Brucella melitensis biovar 1, 2 and 3 isolates", BMC Microbiology, 2011 Yayın	<% 1

52	TUTAR, Esen, KÖKSALAN, Elif and AKYOL, İsmail. "Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda ", Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 2015. Yayın	<% 1
53	agricoop.nic.in İnternet Kaynağı	<% 1
54	catalog.takara-bio.co.jp İnternet Kaynağı	<% 1
55	docplayer.gr İnternet Kaynağı	<% 1
56	ijcmas.com İnternet Kaynağı	<% 1
57	medical-dictionary.thefreedictionary.com İnternet Kaynağı	<% 1
58	nmbu.brage.unit.no İnternet Kaynağı	<% 1
59	sigpos.ufms.br İnternet Kaynağı	<% 1
60	slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
61	www.tandfonline.com İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntılar çıkart
Bibliyografyayı Çıkart

Kapat
Üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Ek 3.

Özgeçmiş

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	: Mehmet Demirpençe
Doğum Tarihi	: 22.09.1980
Doğum Yeri	: Lefkoşa
Ünvanı	: Resmi Veteriner Hekim
Adresi	: Tavşanlı Sokak No:4 Gönyeli
E-mail	: mdemirpence1@gmail.com
Çalıştığı Kurum	: KKTC Veteriner Dairesi
Eğitim	
• Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi (1997-2002) • Yakındouğu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Eğitimi (2010-Devam)	
Profesyonel İş Deneyimi	
• Veteriner Dairesi Hayvan Sağlığı Birim Sorumlusu (2018- Devam) • Veteriner Dairesi Hayvan Bakteriyoloji Laboratuvarı (2010- Devam) • MADAG (Madison Dairy Advisory Group) Eğitim Projesi Eğitmen (2007-2009) • Veteriner Dairesi Hayvan Mezbaha Resmi Veteriner Hekimi (2005-2010)	

Bilimsel Yayınları

* **Demirpençe M., & diğ.,** Esendall Isolation and characterisation of *Brucella melitensis* by bacteriological and molecular methods from livestock in North Cyprus. Veterinary Medicina, 2022.

* **Demirpençe M., & diğ.,** G. Identification of the Brucellosis Ethology in Northern Part of Cyprus Using Bacteriological and Molecular Methods. Research Project; Veterinary Department, Nicosia, 2017.

* **Demirpençe M., & diğ.,** Preliminary Control and Eradication Measures for Lumpy Skin Disease in Northern Part of Cyprus. ISVEE 2015, Merida, Yucatan, Mexico.

** **Demirpençe M., & diğ.,** (2012). Identification of *Brucella* Isolates Originated from Ruminants in Species Level in Northern Part of Cyprus by Real Time PCR (Poster). X. Veterinary Microbiology Congress, Turkey.