İnsan Kaynaklı Brusella Türü Mikroorganizmaların Tiplendirilmesi Amacı ile Uygulanan Metodların Karşılaştırılması ve Biyotipleri ile Faj Tipleri Arasındaki İlişkinin İrdelenmesi

Zuhal BOLCA*, Sibel GÜNDEŞ*, Sevil ERDENLİĞ, Recep ÖZTÜRK***, Bülent SÜMERKAN****, Filiz AKATA*****, Haluk VAHABOĞLU***

* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, KOCAELİ
** Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü,
*** İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İSTANBUL
**** Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Mikrobiyoloji ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ
***** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Bakteriyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, EDİRNE

ÖZET

Bu çalışma, üç farklı ilde bruselloz kliniğine sahip olan 29 hastanın kan, kemik iliği veya diz ponksiyon sıvısı kültürlerinden izole edilerek gönderilen brusella izolatlarının tür, biyotip ve faj tipi düzeyinde identifikasyonlarının yapılması amacı ile planlandı. Standart metodlara göre tür ve biyotiplendirmeleri yapılan 29 adet brusella izolatının 3 (%10.34)'ü "rough" koloni morfolojisi gösterdi. Yirmiiki (%75.86)'sinin *Brucella melitensis* biyotip 3 ve 4 (%13.79)'ünün *B. melitensis* biyotip 1 olduğu saptandı. İncelenen izolatların hiçbirinin aşı suşu olan *B. melitensis* Rev 1 karakteri göstermediği tespit edildi. Sonuçta, *B. melitensis* biyotip 3'ün çalışmaya alınan suşlar arasında en yaygın izole edilen biyotip olduğuna, bunu biyotip 1'in izlediğine ve canlı aşı suşu *B. melitensis* Rev 1'in büyük bir olasılıkla ülkemizde insan brusellozundan sorumlu olmadığı görüşüne varıldı. Boyalı disk yöntemi ile kullanılan tüm standart suşlardan beklenen reaksiyonlar alındı ve tüm izolatlar ile alınan sonuçlar, konvansiyonel yöntemle alınan sonuçlar ile paralellik gösterdi. Bu yöntem standart metod ile karşılaştırıldığında, disk metodunun tiplendirme işlemini kolaylaştırdığı, emek ve zaman kaybını önlediği ve kolay yorumlanabilir sonuçlar verdiği görüşüne varıldı. İzolatların biyotipleri ile faj tipleri arasında bir ilişkinin olup olmadığını saptamak amacıyla, 26 adet *B. melitensis* izolatının "Weybridge", "Berkeley" ve "Izatnagar" fajları ile faj tiplendirmeleri yapıldı. Onbeşinin C, 11'inin B faj tipine ait olduğu belirlendi. Sonuç olarak, aynı tür ve biyotipe ait izolatların farklı faj tiplerine sahip olmasının önemli bir ayırt edici özellik olduğu görüldü. Dolayısıyla faj tiplendirmesinin epidemiyolojik yönden belli bir kökenin kaynağının ve yayılma yollarının saptanması açısından çok önemli olduğu kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Brucella melitensis,* Biyotiplendirme, Faj tiplendirme

SUMMARY

Comparison of Different Methods Used in Typing of *Brucella* Species That Cause Disease in Humans and Investigation of a Possible Relationship Between Biotypes and Phage Types of These Species

This study was planned to identify the species, biotype and phage type of *Brucella* spp. isolated gram blood, bone marrow and knee punction fluid of 29 patients from three different cities of Turkey. First isolation were done with standart methods and 3 of 29 (10.34%) isolates were found to be "rough" as colony morphology and excluded from the study. Twenty-two (75.86%) isolates were found to be *Brucella melitensis* biotype 3 and 4 (13.79%) were *B. melitensis* biotype 1. None of the investigated isolates were *B. melitensis* Rev 1 which is also known as an isolate used for animal vaccination. As a result, *B. melitensis* biotype 3 was found to be the most prevalent biotype and followed by *B. melitensis* biotype 1. We found that *B. melitensis* Rev 1 biotype was not responsible from human brucellosis in our country. All of the results we got by the dye disc and conventional methods were found parallel. Dye disc method when compared with standart isolation method, were found to be easy to read and fast. Phage biotyping of all isolates were done to search a possible relation between the biotypes and phage types. Weybridge, Berkeley and Izatnagar were the phages that we used and fifteen of the isolates were found to belong to phage type C, whereas eleven of them were belong to phage type B. As a result, phage biotyping were found to be a good discrimination parameter between the same biotypes. We though that phage biotyping is an important method for epidemiologic studies and to understand the origin of a known isolate in an epidemic.

Key Words: *Brucella melitensis,* Biotyping, Phage typing

Ülkemizde ilk kez 1. Dünya Savaşı sırasında Abdülkadir Noyan tarafından tarif edilen bruselloz, koyun, keçi, inek gibi hayvanların süt ve süt ürünleriyle insanlara bulaşan bir zoonozdur[1]. İnsanlar üç klasik brusella türü ile infekte olabilirlerse de dünya genelinde vakaların çoğunda en invaziv ve patojenik tür olan *Brucella melitensis* sorumludur[2]. Teşhis ve tedavi alanında büyük ilerlemelere rağmen bu hastalık insan ve hayvanlar için önemli infeksiyon hastalığı olma özelliğini hala korumaktadır. Bruselloz, tüm dünyada morbiditenin önemli bir nedeni olup; her yıl tahminen yarım milyon yeni olgu ortaya çıkmaktadır[3]. Veteriner hekimlik ve tıp alanında verilen mücadelelerin, süt ve süt ürünleri endüstrisindeki kontrolsüz büyümeyi denetlemeye yetmemesi sonucu, süt ve süt ürünleri ile infekte gıdaların tüketimi yaygınlaşmaktadır. Etkenin izolasyonu ve identifikasyonunun yanısıra tiplendirilmesi epidemiyolojik çalışmalarda ve eradikasyon programlarında atılacak en önemli adımlardan birisidir. Epidemiyolojik çalışmaları serotiplendirme, biyotiplendirme ve faj tiplendirmesi metodları ile yapmak mümkündür. Ülkemizde insan brusellozunun tür ve biyotiplendirilmesine dair yeterli çalışmalar bulunmamaktadır. Bu tür tiplendirme çalışmaları brusellozun ülke düzeyinde epidemiyolojik durumunun değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu çalışmada, İstanbul, Edirne ve Kayseri illerinden bruselloz tanısı almış hastaların kan, kemik iliği ve diz ponksiyon sıvısı kültürlerinden elde edilmiş brusella cinsi 29 mikroorganizmanın identifikasyonları, tür ve biyotip tanıları ile birlikte faj tiplerinin saptanması planlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca, bazik fuksin ve tiyonin varlığında yapılan üreme testlerinde; bu boyalara emdirilmiş kağıt disklerin kullanımının, konvansiyonel boyalı besiyeri kullanımına bir alternatif teşkil edip etmeyeceğinin belirlenmesi de amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Örnekler

Çalışmaya, bruselloz kliniği gösteren hasta kültürlerinden 27 adet kan, 1 adet diz ponksiyon sıvısı ve 1 adet kemik iliği kültürü olmak üzere toplam 29 adet brusella suşu dahil edildi. Örnekler, İstanbul (Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 4 adet), Edirne (Trakya Üniversitesi, 17 adet) ve Kayseri (Erciyes Üniversitesi, 8 adet)'den alındı. Tür ve biyotiplendirilme tayini yapılan brusella izolatlarının illere ve materyal orjinlerine göre dağılımı Tablo 1'te görülmektedir.

Kullanılan Standart Suşlar

Brucella abortus biyotip 1 544 (NCTC 10093), *B. abortus* biyotip 2 86/8/59 (NCTC 10501), *B. melitensis* biyotip 1 16 M (NCTC 10094), *B. melitensis* biyotip 2 63/9 (NCTC.10508), *B. melitensis* biyotip 3 Ether (NCTC 10505), *Brucella suis* biyotip 1 1330 (NCTC 10316), *Brucella* ovis 63/290 (NCTC 10512), "Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires (CNEVA)",

Tablo 1. Tür ve biyotiplendirilme tayini yapılan brusella izolatlarının illere ve materyal orjinlerine göre dağılımı

İzolat no	Suşun coğrafik orjini	Materyal orjini
1-99F-7-77	Edirne	Kan
2-99B568	Edirne	Kan
3-98D681	Edirne	Kan
4-99E1164	Edirne	Kan
5-99B559	Edirne	Diz ponksiyon sıvısı
6-98B219	Edirne	Kemik İliği
7-5723	Edirne	Kan
8-99C619	Edirne	Kan
9-99B442	Edirne	Kan
10-99C621	Edirne	Kan
11-97E617	Edirne	Kan
12-98A1562P	Edirne	Kan
13-99B566	Edirne	Kan
14-99C622	Edirne	Kan
15-SEL8/4CER	İstanbul	Kan
16-2873/84CC	İstanbul	Kan
17-2618 8/4 SC	İstanbul	Kan
18-9813364 EDİRNE	Edirne	Kan
19-SEL.CER	İstanbul	Kan
20-99A380 EDİRNE	Edirne	Kan
21-97D527 EDİRNE	Edirne	Kan
22-68	Kayseri	Kan
23-6	Kayseri	Kan
24-44	Kayseri	Kan
25-15X	Kayseri	Kan
26-15	Kayseri	Kan
27-23	Kayseri	Kan
28-111	Kayseri	Kan
29-80	Kayseri	Kan

Fransa'dan temin edildi. *B. melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* S19 suşları ile brusella antiserumları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Brusella Laboratuvarı'ndan sağlandı.

Brusella Fajları

"Tbilisi", "Weybridge", "Berkeley" ve "Izatnagar" fajları CNEVA Enstitüsü, Fransa'dan temin edildi.

Biyotiplendirme amacıyla gönderilen brusella izolatları içerisinde "skim milk" bulunan ependorflara alınarak -20°C'de saklandı. Daha sonra steril şartlarda açılarak brusella selektif agara ekildi. Tüm örnekler 2'şer besiyerine ekildi ve ekimi yapılan petrilerin yarısı aerop koşullarda, diğer yarısı %5-10 CO_2 içeren ortamlarda, 37°C'de, en az 4 gün süreyle inkübe edildi. Tür ve biyotip tanısında, kontrol amaçlı kullanılan standart suşların ekimleri Serum Dextrose Agar (SDS) aynı şekilde yapıldı[4]. İnkübasyon süresi (4-5 gün) sonunda petri kutularında üreyen mikroorganizmaların morfolojilerini değerlendirmek amacıy-

la Gram boyama yapıldı. Boyamada gram-negatif kokobasiller dikkate alındı. Üreyen mikroorganizmaların oluşturduğu kolonilerin yapısı incelendi ve şüpheli koloniler için brusella A + M antiserumu ile lam aglütinasyon testi yapıldı. Yirmidokuz izolattan 26'sı kısa süre içinde aglütinasyon verdi. Brusella türlerinin tip tayininde, önemli bulunan kolonilerin 45°C'lik oblik ışıkta stereoskopik mikroskopla incelenmesi ve akriflavin solüsyonunda aglütinasyon özellikleri incelendi. Bu amaçla taze olarak hazırlanmış akriflavinden bir damla bir lam üzerine konuldu 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 süspansiyon gösterirler. *B. ovis* 63/290 suşu "rough" koloni yapısının tanısı için kontrol olarak kullanıldı[5]. Brusella türlerinin biyotiplerinin ayırıcı karakterleri Tablo 2 ve Tablo 3'te görülmektedir.

Fajların Rutin Test Dilüsyonlarının (RTD) Saptanması

Çalışmada kullanılan fajların RTD'lerinin saptanması amacıyla bu fajların konakçı suşlarının yatık SDA tüplerine ekimleri yapıldı. "Tbilis" fajı için *B. abortus* 544, "Weybridge" fajı için *B. suis* 1330, "Berkeley" fajı için *B. melitensis* 16M ve "Izatnagar" fajı için *B. abortus* S19 konakçı suşlar olarak seçildi. Yatık SDA tüplerinde, 37°C'de, 24 saatlik inkübasyon sonunda oluşan koloniler pepton-salin ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve Mac Farland no 4'e göre mL'sinde yaklaşık 10^9 bakteri bulunacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Bakteri süspansiyonlarına daldırılan steril bir silgiç yardımı ile SDA petrilerinin yüzeyine homojen ekim yapıldı. Petrilerin yüzeylerinin kuruması beklenirken, bu arada fajların pepton salinde 10^{-1}'den 10^{-8}'e kadar on katlı dilüsyonları yapıldı. Her bir dilüsyon için ayrı pipet kullanıldı. Yüzeyleri kuruyan SDA petrilerinin alt yüzeylerine bir cam kalemi ile fajların dilüsyonları yazıldı. Fajların her bir dilüsyonundan SDA petrilerindeki ilgili bölüme steril ve ayrı pipet uçları kullanılarak 20'şer µL damlatıldı. *B. abortus* 544'ün konakçı suşu olarak ekildiği petri %5-10 CO_2 içeren etüvde inkübe edildi. Petrilerin yüzeyi kuruduktan sonra 37°C'de, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek faj dilüsyonu ilgili fajın RTD'si olarak saptandı.

Tür ve Biyotip Tanısında Kullanılan Yöntemler

Çalışmada kullanılan brusella izolatlarının tür ve biyotip tanılarında aşağıda belirtilen standart yöntemler kullanıldı.

Karbondioksit (CO_2) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H_2S) üretimi: İnkübasyon süresi sonunda SDA petrilerinde üreyen her bir brusella izolatından iğne uçlu bir öze ile tek bir koloni alınarak 2'şer adet yatık SDA tüplerine pasajları yapıldı. Kurşun asetatlı kağıt şerit, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Birinci tüpler %5-10 CO_2 içeren etüvde, diğerleri ise aerop koşullarda 37°C'de 4 gün süreyle inkübe edildi. Kurşun asetatlı kağıtlar inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirildi. İnkübasyon süresi sonunda sonuçlar, üreme durumlarına ve kurşun asetatlı kağıtlarda H_2S üretimi için pozitif olan siyahlaşma durumuna göre değerlendirildi.Testlerde kontrol suşları olarak, CO_2'e gerek duyan ve H_2S pozitif olan *B. abortus* 544 ile her iki karakter yönünden negatif olan *B. melitensis* 16M kullanıldı.

Tablo 2. *Brucella* türlerinin ayırıcı özellikleri*

Tür	Koloni morfolojisi	Serum ihtiyacı	Fajlarla lizis			Oksidaz	Üreaz
			Tb		R/C		
			RTD	10^4 x RTD	RTD		
• *B. melitensis*	"Smooth"	-	-	-	-	+	+
• *B. abortus*	"Smooth"	-[a]	+	+	-	+	+
• *B. suis*	"Smooth"	-	-	+	-	+	+
• *B. neotomae*	"Smooth"	-	-	+	-	-	+
• *B. ovis*	"Rough"	+	-	-	+	-	-
• *B. canis*	"Rough"	-	-	-	+	+	+

[a] *B. abortus* biyotip 2 genellikle üreme için seruma ihtiyaç gösterir.
* Üç numaralı kaynaktan yararlanılmıştır.

Tablo 3. Brusella türlerinin biyotiplerinin ayırıcı karakterleri

				Boyalarda üreme[a]		Monospesifik antiserumlarla aglütinasyon		
Tür	Biyotip	CO_2 ihtiyacı	H_2S üretimi	Tiyonin	Bazik fuksin	A	M	R
• *B. melitensis*	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
• *B. abortus*	1	+	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
• 0	4	+	+	-	+[c]	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
	9	- , +	+	+	+	-	+	-
• *B. suis*	1	-	+	+	-[d]	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	-[e]	+	+	-
	5	-	-	+	-	-	+	-
• *B. neotomae*		-	+	-[b]	-	+	-	-
• *B. ovis*		+	-	+	-[e]	-	-	+
• *B. canis*		-	-	+	-[e]	-	-	+

[a]: Boya konsantrasyonu 20 µg/mL (1/50.000), [b]: 1/100.000 boya konsantrasyonunda üreme olmaktadır, [c]: Kanada, İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nden izole edilen bazı suşlar negatiftir, [d]: Güney Amerika ve Asya'dan izole edilen bazı suşlar pozitiftir, [e]: Çoğu suşlar negatiftir.

Tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme ve Tbilisi faj tiplendirmesi:

a. Standart yöntem: İncelenecek her izolatın tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 konsantrasyonunu içeren SDA'lara ekimleri yapıldı. Tüm brusella suşları CO_2'li ortamda üreyebileceklerinden tüm referans suşları ve test izolatları CO_2'li etüvde inkübe edildi. Ekim için referans suşların ve testi yapılacak izolatların kültürlerinden bir öze dolusu alındı ve 0.5 mL pepton salinli suda süspansiyonları yapıldı. Tüm kültürlerin süspansiyonlarının birbirlerine eşit yoğunlukta olmasına dikkat edildi. Her bir bakteri süspansiyonuna daldırılan steril bir silgiçle agar yüzeyine birbirine paralel olarak 5 şerit halinde ekim yapıldı. Böylece her bir petride 5 izolatın muayenesi yapılabildi. Şeritlerin sol tarafına "Tbilisi" fajının RTD'sinden ve sağ tarafına 10.000 x RTD'sinden 20 µL damlatıldı. Petriler kuruduktan sonra %5-10 CO_2 içeren ortamda, 37°C'de 4-5 gün inkübe edildi. Testte kontrol olarak tiyoninli ve bazik fuksinli SDA petrilerden her birine *B. melitensis* Rev 1 (biyotip 1), *B. melitensis* 16M (biyotip 1), *B. abortus* 544 (biyotip 1), *B. abortus* 86/8/59 (biyotip 2) ve *B. suis* 1330 (biyotip 1) referans suşlarının ekimi yapıldı. Referans suşların ekimlerinde test kültürlerinden farklı olarak şeritlerin sol tarafına "Tbilisi" fajının RTD'den ve sağ tarafına "Berkeley" fajının RTD'den 20'şer µL damlatıldı. Sonuçlar, inkübasyon periyodunun sonunda üreme ve lizis durumlarına göre değerlendirildi.

b. Boyalı disk yöntemi: Boyalı besiyeri yöntemine alternatif olarak Riberio ve arkadaşlarının bildirdiği boyalı disk yöntemi kullanıldı[6]. Bu amaçla, 120 g/m^2'lik filtre kağıdı bazik fuksinin 0.37, 0.75, ve 1.5 mg/mL'lik ve tiyoninin 0.25, 0.50 ve 1 mg/mL'lik boya solüsyonlarına emdirilerek 2 dakika tutuldu ve 37°C'de kurumaya bırakıldı. Kuruyan filtre kağıtlarından 5.5 mm'lik diskler hazırlandı ve bu diskler cam şişelere alınarak 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edildi. Test edilecek brusella refe-

rans suşları ve izolatların kültürlerinden pepton salin solüsyonunda Mac Farland no 10'a göre yaklaşık 5 x 10^9 bakteri/mL olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonların her birinden 2 adet SDA petrisine 100 µL damlatıldı ve cam baget ile yayılarak kuruması beklendi. Tiyonin ve bazik fuksinin farklı konsantrasyonlarını içeren diskler agar üzerine eşit aralıklarla yerleştirildi ve petriler %5-10 CO_2 içeren ortamda, 37°C'de 4-5 gün süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda disk etrafında 3 mm veya daha geniş çaplı bir inhibisyon zonunun görülmesi boyalara duyarlılık açısından pozitif olarak kabul edildi.

A ve M monospesifik antiserumlar ile aglütinasyon: Testi yapılacak her bir izolatın bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25 mL fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edildi. Bir lam üzerine A ve M monospesifik antiserumlardan birer damla konuldu ve üzerlerine yine birer damla incelenecek izolatın süspansiyonundan eklendi, ağaç bir kürdanla karıştırıldı. Reaksiyon sonuçları 1 dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak kaydedildi. Testte kontrol olarak, sadece M antiserumu ile aglütine olan *B. melitensis* 16M (biyotip 1), sadece A antiserumu ile aglütine olan *B. melitensis* 63/9 (biyotip 2), her iki antiserumla aglütine olan *B. melitensis* Ether (biyotip 3) ve hiçbiri ile aglütine olmayan "rough" *B. ovis* 63/290 standart suşları kullanıldı.

Safranin O içeren besiyerinde üreme: SDA'ya 100 µg/mL (1/10.000) konsantrasyonunda katılarak hazırlanan safranin O'lu besiyerinde *B. suis* ve *B. abortus* biyotip 2 suşları üreyememektedirler[7,8]. Bu amaçla, diğer boyalı besiyerlerine ekimlerde belirtilen yöntemle tüm test izolatlarının safranin O'lu besiyerine ekimleri yapıldı ve 3-4 günlük inkübasyon sonrasında sonuçlar, izolatların üreme durumlarına göre değerlendirildi. Testte kontrol olarak safranin O'lu besiyerinde üremeyen *B. suis* 1330 ve *B. abortus* 86/8/59 suşları kullanıldı.

Streptomisinli besiyerinde üreme: 2.5 µg/mL streptomisin içeren besiyerlerinde *B. melitensis* suşları üremezken, aşı suşu olan mutant *B. melitensis* Rev 1 suşu üremektedir[8]. Çalışmada kullanılan insan orjinli brusella izolatlarının olası bir *B. melitensis* Rev 1 suşundan ayrımı için tüm test izolatları streptomisinli besiyerine ekildi. Sonuçlar, 5-6 günlük inkübasyon süresinin sonunda üreme durumuna göre değerlendirildi. Testte kontrol olarak streptomisinli besiyerinde üreyen *B. melitensis* Rev. 1 suşu kullanıldı.

"Weybridge", "Izatnagar" ve "Berkeley" fajları ile test izolatlarının faj tiplerinin belirlenmesi: İncelenecek izolatların ve standart kontrol suşlarının (*B. melitensis* 16 M, *B. suis* 1330 ve *B. abortus* S19) kültürlerinden bir öze dolusu alınarak 0.5 mL pepton salin solüsyonunda süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyonlara daldırılan steril silgiçler ile SDA'nın yüzeyine her bir kültür için şerit halinde ekimler yapıldı ve petriler kurumaya bırakıldı. Şeritlerin soluna "Weybridge", ortasına "Izatnagar" ve sağına "Berkeley" fajlarının RTD'lerinden 20'şer µL damlatıldı. Agarın yüzeyi kuruduktan sonra petriler 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildi. Sonuçlar lizis durumlarına göre değerlendirildi.

BULGULAR

İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları Sonuçları

Yirmidokuz adet brusella izolatının 26'sının "smooth", 3'ünün "rough" koloni yapısında olduğu görüldü ve "rough" koloni gösterenlerin biyotiplendirmesi yapılamadı. Tiplendirmeye 26 adet "smooth" koloni ile devam edildi.

Brusella Fajlarının Rutin Test Dilüsyon Sonuçları

Çalışmada kullanılan "Tbilis", "Weybridge", "Izatnagar" ve "Berkeley" fajlarının RTD sonuçları sırasıyla 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-4}, 10^{-5} olarak saptandı.

Tür ve Biyotip Tanı Sonuçları

"Smooth" koloni yapısına sahip olan toplam 26 adet brusella izolatının tür ve biyotiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan testlerde aşağıda bildirilen sonuçlar alınmış ve bu sonuçlar Tablo 4'te sunulmuştur.

CO_2 Gereksinimi ve H_2S Üretimi Sonuçları

Gerek aerobik ve gerekse %5-10 CO_2'li ortamda yatık SDA tüplerine ekimi yapılan test izolatlarının 4 günlük inkübasyonlarının ardından yatık SDA tüplerinin tümünde üreme görüldü ve tüplere yerleştirilip inkübasyon süresi boyunca her gün değiştirilen kurşun asetatlı kağıtlarda hiçbir siyahlaşma görülmedi. Sonuçta, izolatların üreme için CO_2'e gereksinim göstermediği ve H_2S üretmediği saptandı.

Tiyonin ve Bazik Fuksin Varlığında Üreme ve "Tbilisi" Faj Tiplendirmesi Sonuçları

Tiyonin ve bazik fuksinin 1/50.000 konsantrasyonlarını içeren boyalı besiyerlerine ekimi yapılan 26 izolatın tümünün her iki boyanın da varlığında ürediği gözlendi. İzolatlar "Tbilisi" fajının RTD ve 10.000 x RTD'sinde lizis göstermediler. Referans

Tablo 4. Brusella standart suşlarının ve test izolatlarının tür ve biyotiplendirme testlerinde gösterdikleri reaksiyonlar

Standart suş ve izolat no	CO_2 ihtiyacı	H_2S üretim	Bazik fuksin ve tiyoninde üreme		A ve M anti-serumlar aglütinasyon		"Tbilisi" faj lizis		Safranin O'da üreme	Streptomisinde üreme
			BF	T	A	M	RTD	RTD x 10^4		
• *B. abortus 544*	+	+	+	-			+			
• *B. abortus 86/8/59*			-	-					-	
• *B. melitensis 16M*	-	-	+	+	-	+	-	-		
• *B. melitensis 63/9*					+	-				
• *B. melitensis Ether*					+	+				
• *B. suis 1330*			-	+			-		-	
• *B. melitensis Rev. 1*			-	-						+
• *B. ovis 63/290*					-	-				
1-99F-7-77	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
2-99B568	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
3-98D681	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
4-99E1164	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
5-99B559	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
6-98B219	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
7-5723	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
8-99C619	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
9-99B442	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
10-99C621	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
11-97E617	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
12-98A1562P	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
13-99B566	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
14-99C622	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
15-SEL8/4CER	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
16-2873/84CC	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
17-2618 8/4SC	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
18-9813364	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
EDİRNE										
19-SEL.CER	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
20-99A380	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
EDİRNE										

Tablo 4. Brusella standart suşlarının ve test izolatlarının tür ve biyotiplendirme testlerinde gösterdikleri reaksiyonlar (devamı)

Standart suş ve izolat no	CO_2 ihtiyacı	H_2S üretim	Bazik fuksin ve tiyoninde üreme		A ve M anti-serumlar aglütinasyon		"Tbilisi" faj lizis		Safranin O'da üreme	Streptomisinde üreme
			BF	T	A	M	RTD	RTD x 10^4		
21-97D527	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
EDİRNE										
22-68#										
23-6	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-
24-44	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
25-15X	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
26-15#										
27-23	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
28-111	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
29-80#										

#: "rough" koloni olduğundan biyotiplendirme yapılamadı.

suşların tiyoninli besiyerine olan ekimlerinde *B. melitensis* Rev 1, *B. abortus* 544 ve *B. abortus* 86/8/59 üreme göstermedi. Üreme gösteren *B. melitensis* 16 M ve *B. suis* 1330 referans suşları "Tbilis" fajı ile lize olmazken, "Berkeley" fajı ile lizis gösterdiler. Bazik fuksinli besiyerinde *B. melitensis* Rev 1, *B. abortus* 86/8/59 ve *B. suis* 1330 referans suşları üreme göstermediler. Üreme gösteren *B. melitensis* 16M sadece "Berkeley" fajı ile lize olurken, *B. abortus* 544 hem "Tbilisi" hem de "Berkeley" fajı ile lizis gösterdi.

Tiyonin ve Bazik Fuksin Solüsyonlarına Emdirilmiş Disk Yöntemi Sonuçları

Oluşan zonların çapı ile boya konsantrasyonları arasında doğru orantı saptandı. Yirmialtı adet brusella izolatı her iki boyanın üç değişik konsantrasyonunda 3 mm'nin altında zonlar oluşturarak bazik fuksin ve tiyonine dirençlilik gösterdi. Testin uygulanmasında kontrol olarak kullanılan referans suşlardan *B. melitensis* Rev 1 ve *B. abortus* 86/8/59, her iki boyanın diskleri etrafında 3 mm'den çok geniş zonlar göstererek tiyonin ve bazik fuksine duyarlılık gösterdiler. *B. melitensis* 16M her iki boyanın diskleri etrafında 3 mm'nin altında zonlar oluşturarak tiyonin ve bazik fuksine direnç gösterdi. *B. abortus* 544 tiyonin diskleri etrafında ve *B. suis* 1330 bazik fuksin diskleri etrafında 3 mm'den geniş zonlar oluşturarak sözkonusu boyalara duyarlılık gösterdiler (Tablo 5).

A ve M Monospesifik Antiserumlar ile Aglütinasyon Testi Sonuçları

Monospesifik serumlar homolog kültürleri ile karşılaştırıldığında bir dakika içinde belirgin bir aglütinasyon verdiler. Test izolatlarından 22'si hem A hem de M antiserumu ile aglütinasyon verirken, izolatların 4'ü sadece M antiserumu ile aglütinasyon gösterdi (Tablo 4).

Safranin O'lu Besiyerinde Üreme Sonuçları

Safranin O'nun 1/10.000 konsantrasyonunu içeren besiyerinde 3-4 günlük inkübasyon süresinin ardından izolatlarının tümünün üreme gösterdiği saptandı (Tablo 4).

Streptomisinli Besiyerinde Üreme Sonuçları

Streptomisinin 2.5 µg/mL konsantrasyonunu içeren besiyerinde test izolatlarının hiçbiri üreme göstermedi (Tablo 4). Elde edilen "smooth" koloni özelliği gösteren 26 adet brusella izolatından 22'sinin *B. melitensis* biyotip 3 ve 4'ünün *B. melitensis* biyotip 1 karakteri taşıdığı saptandı.

"Weybridge", "Izatnagar" ve "Berkeley" Fajları ile *B. melitensis* İzolatlarının Faj Tiplendirilmesi Sonuçları

İzole edilen toplam 26 adet *B. melitensis* izolatının 15'inin C, 11'inin B faj tipine ait olduğu belirlendi. *B. melitensis* izolatlarının coğrafik orjini, biyotipi ve faj tipi Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 5. Bazik fuksin ve tiyonin emdirilmiş disk yöntemi ile brusella standart suş ve test izolatlarının üreme sonuçları

Brusella standart suş ve test izolatları	Tiyonin 0.25*	0.5*	1*	Bazik fuksin 0.37*	0.75*	1.5*
• *B. abortus* 544	-[a]	-	-	+[b]	+	+
• *B. abortus* 86/8/59	-	-	-	-	-	-
• *B. melitensis* 16M	+	+	+	+	+	+
• *B. melitensis* Rev 1	-	-	-	-	-	-
• *B. suis* 1330	+	+	+	-	-	-
• Yirmialtı adet test izolatı	+	+	+	+	+	+

-[a]: duyarlı, +[b]: dirençli, * mg/mL konsantrasyonunda.

TARTIŞMA

Bruselloz, sığır, koyun, keçi gibi birçok evcil hayvanda neden olduğu yavru atma, döl ve süt veriminde azalma ve mortalite ile ülke ekonomisine verdiği büyük kayıpların yanısıra insanlarda da çok ciddi seyreden ve bazı durumlarda ölümle sonuçlanan infeksiyonlara yol açabilen önemli bir zoonozdur. Dünyadaki 175 ülkenin yarısında hayvanlarda ve dolayısı ile insanlarda bruselloz görülmektedir[10,11]. Epidemiyolojik çalışmalarda ve eradikasyon programlarında önemli bir adım atmak ancak etkenin doğru tanımlanabilmesi ile mümkündür. Bu amaçla, kliniğimiz tarafından, ülkemizde daha önce insan izolatları ile yapılmadığını düşündüğümüz bu çalışma prospektif olarak planlanarak hazırlanmıştır.

Çalışma süresince temel besiyeri olarak, içerisine %5-10 serum ve %1 dekstroz solüsyonu ilave edilen ve tüm brusella türlerinin üremesi için ideal besiyeri olarak kabul edilen SDA kullanılmıştır. Sonuçta çalışmada kullanılan 29 brusella izolatının 3'ünün "rough" karakter taşıdığı, 26'sının "smooth" karakter taşıdığı saptanmış, "rough" karakter taşıyan 3 izolatın lam aglütinasyon testinde antiserumlarla aglütinasyon vermediği gözlenmiştir. Brusella türlerinin, tür düzeyindeki tanılarında "Tbilisi" fajı kullanılmıştır. "Tbilisi" fajı RTD'de sadece *B. abortus*'u lize ederken, 10.000 x RTD'de *B. abortus*'tan başka *B. suis* ve *B. neotomae*'yı "lysis from without" denilen bir fenomenle lize etmektedir. *B. melitensis* "Tbilisi" fajının her iki dilüsyonu ile de lize olmamaktadır[12-14]. Çalışmada, incelenen izolatların "Tbilisi" fajının bu iki dilüsyonu ile de lize olmadıkları gözlenmiştir. Çalışmamızda, izolatların safranin O'lu besiyerinde üremesi, izolatların tümünün *B. melitensis* olduğunu ortaya koymuştur. *B. melitensis*'in birincil konakçıları koyun ve keçilerdir, bu hayvanların *B. abortus*'la sporadik olarak infekte olmalarına rağmen klinik hastalığın çok nadir olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir[2]. Çalışmada incelenen insan orjinli 29 adet brusella izolatının 26'sının *B. melitensis* olarak identifiye edilmesi, ülkemizde çalışılan bölgelerdeki insan brusellozunda *B. abortus, B. ovis* ve *B. suis* türlerinin önemli bir rol oynamadığını göstermektedir.

Çalışmada incelenen 26 adet izolat *B. melitensis* olarak identifiye edildiğinden, bu iki özellik yönünden negatif olan *B. melitensis* için, beklenen sonuçlar alındı. Bazen CO_2'e olan ihtiyacın ve H_2S üretiminden sorumlu olan genlerin mutasyona uğramaları ile bu iki özellik yönünden atipik olarak değerlendirilen brusella izolatları ile karşılaşılmaktadır [15-17]. Çalışmada alınan sonuçlar, izolatların bu iki karakter yönünden mutasyona uğramadıklarını dolayısıyla atipik izolatlar olmadıklarını göstermesi açısından önemli bulundu. Bazik fuksin ve tiyonin içeren temel besiyerlerinde brusella cinsi mikroorganizmaların üreme kabiliyetlerinin belirlenmesi, biyotiplendirme testlerinde kullanılan 4 ana testten biridir[10]. Ancak boyalı besiyerinin hazırlanması ve sonuçların yorumlanmasında bazı problemlerle karşılaşılmaktadır. Besiyerinin pH'sının her zaman doğru ayarlanması, boyaların temel besiyerine katılmadan önce tamamen erimelerinin sağlanması gerekmektedir. Bu amaçla, bu çalışmada bazik fuksin ve tiyonin solüsyonlarına emdirilmiş kağıt disklerin konvansiyonel teste pratik bir alternatif olabilirliğinin saptanması da hedeflenmiştir. Çalışmada alınan sonuçlara göre disk yöntemi konvansiyonel metodla %100 paralel sonuçlar verdi. Yirmialtı adet izolat konvansiyonel yöntemle tiyonin ve bazik fuksine dirençlilik gösterdi ve aynı sonuçlar disk yöntemi ile de elde edildi. Gerek bazik fuksin gerekse tiyoninin her üç konsantrasyonu ile aynı sonuçlar alındı. Çalışmada elde edilen sonuçlar, Riberio ve arkadaşlarının *B. melitensis*

Tablo 6. *B. melitensis* izolatlarının faj tiplendirilmesi sonuçları

İzolat no	Suşun coğrafik orjini	Tür ve biyotip	Wb	Iz	Bk	Faj tipi
1-99F-7-77	Edirne	*B. melitensis* biyotip 1	-	+	+	C
2-99B568	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
3-98D681	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
4-99E1164	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
5-99B559	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
6-98B219	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
7-5723	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
8-99C619	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
9-99B442	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
10-99C621	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
11-97E617	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
12-98A1562P	Edirne	*B. melitensis* biyotip 1	-	+	+	C
13-99B566	Edirne	*B. melitensis* biyotip 1	-	+	+	C
14-99C622	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
15-SEL8/4CER	İstanbul	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
16-2873/84CC	İstanbul	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
17-2618 8/4 SC	İstanbul	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
18-9813364 EDİRNE	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
19-SEL.CER	İstanbul	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
20-99A380 EDİRNE	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
21-97D527 EDİRNE	Edirne	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
22-68#	Kayseri	Biyotiplendirme yapılamadı	"rough"			
23-6	Kayseri	*B. melitensis* biyotip 1	+	+	+	B
24-44	Kayseri	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
25-15X	Kayseri	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
26-15#	Kayseri	Biyotiplendirme yapılamadı	"rough"			
27-23	Kayseri	*B. melitensis* biyotip 3	-	+	+	C
28-111	Kayseri	*B. melitensis* biyotip 3	+	+	+	B
29-80#	Kayseri	Biyotiplendirme yapılamadı	"rough"			

Rev 1 suşu hariç diğer referans suşlarla aldıkları sonuçlarla paralellik göstermektedir[6]. Ancak araştırıcılar *B. melitensis* Rev 1 suşunun aerobik inkübasyonda tiyonin asetatın 0.25 mg/mL, bazik fuksinin 0.75 mg/mL'lik konsantrasyonlarında ürediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, *B. melitensis* Rev 1 suşu her iki boyanın üç farklı konsantrasyonunda da üreme göstermemiştir. Bunun sebebi boyaların farklı kaynaklardan gelmeleri ile açıklanabilir. Esendal ve arkadaşları, tiyoninin 40, 20 ve 10 µg/mL, bazik fuksinin 20 ve 10 µg/mL gibi son derece düşük konsantrasyonundaki solüsyonlarına emdirilmiş kağıt diskleri biyotiplendirmede konvansiyonel teste alternatif olarak kullanmışlar ve bu metodun bu boyaların bakteriyostatik etkilerinin incelenmesinde güvenilir bir metod olduğu görüşüne varmışlardır[18]. Sonuç olarak, boyalara emdirilmiş disklerin konvansiyonel yönteme alternatif olarak kullanımının, uygulanan işlemi kolaylaştıracak, dolayısı ile emek ve zaman kaybını önleyecek, masrafı azaltacak ve daha

güvenilir ve kolay yorumlanabilir sonuçlar verecek bir yöntem olduğuna karar verildi. Riberio ve arkadaşları disklerin etrafında gelişen inhibisyon zonlarının koyu bir zeminde daha kolay görünebilir olduğunu düşünerek SDA yerine %10 at kanlı tryptose agar (BTA) kullanmışlar ise de, bu çalışmada aynı amaçla SDA besiyeri kullanıldı ve zonlar net olarak gözlendi[6]. Tüm "smooth" brusella suşları A veya M monospesifik antiserumlarla ya da her iki antiserum ile aglütine olurlar[6]. Bu iki yüzey epitopu türlere ve biyotiplere göre farklı orandadırlar. *B. abortus* biyotip 1, 2, 3 ve 6; *B. suis* biyotip 1, 2 ve 3; *B. melitensis* biyotip 2 ve *B. neotomae*'de A antijeni dominant iken, *B. abortus* biyotip 4, 5 ve 9; *B. suis* biyotip 5 ve *B. melitensis* biyotip 1'de M antijeni dominanttır. *B. melitensis* biyotip 3 ve *B. suis* biyotip 4 A ve M antijenlerini eşit miktarlarda taşırlar[10,13,19]. Ancak sözkonusu *B. melitensis* olduğunda bu türün biyotipleri yerine serotiplerinden bahsetmek daha yerinde olacaktır. Çünkü mevcut 3 biyotip birbirlerinden sadece A ve M monospesifik antiserumlarla olan reaksiyonlarına göre ayrılmaktadır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre 26 adet izolattan 22'si hem A hem de M, 4'ü sadece M monospesifik antiserumla reaksiyon verdi. Dolayısıyla izolatların 22'si *B. melitensis* biyotip 3 ve 4'ü *B. melitensis* biyotip 1 olarak değerlendirildi. Ewalt ve Forbes, biyotiplendirmede kullanılan testler ile *B. abortus* biyotip 2 olarak identifiye ettikleri iki izolatın A antijeni yerine M antijeni yönünden pozitif olduğunu ve bu iki izolatın atipik ya da *B. abortus* biyotip 10'un ilk temsilcileri olduğunu belirtmişlerdir[20]. Bu durumda, A ve M antijeni bakımından atipik özellikler gösteren *B. melitensis* biyotiplerini belirlemede mevcut klasifikasyon sisteminin yetersiz kalacağı açıktır. *B. melitensis*'in mevcut 3 biyotipinden, biyotip 2 en fazla İtalya ve Yunanistan'da yaygındır. Hastalığın en yaygın olarak görüldüğü Akdeniz ülkelerinde, *B. melitensis* biyotip 3 ve 1'in en yaygın biyotipler olduğu vurgulanmaktadır[5,21]. Dünyanın çeşitli bölgelerindeki araştırıcılar ülkelerindeki mevcut brusella tür ve biyotiplerini saptamak amacıyla çalışmalar yapmıştır. Aldomy ve arkadaşları, 31 adet *B. melitensis* izolatından 27'sinin biyotip 3 ve 4'ünün biyotip 1 olduğunu bildirmiştir[22]. Tolari ve arkadaşları, 7 yıl süre ile İtalya'nın 14 bölgesinden gelen brusella izolatlarının biyotiplendirilmesi sonucunda ülkede en yaygın olarak *B. melitensis* biyotip 2'nin görüldüğünü belirtmişlerdir[2]. Mustafa ve arkadaşları, Suriye'de her üç biyotipin de varolabileceğini bildirmişlerdir[23]. Çalışmamızda kullanılan ve biyotiplendirmesi yapılan 26 adet izolatın Tablo 4'de belirtilen kriterlere göre değerlendirilmesi sonucunda 22'sinin *B. melitensis* biyotip 3 ve 4'ünün *B. melitensis* biyotip 1 karakteri taşıdığı belirlendi. Dolayısıyla bu çalışma sonucunda, Güney Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi Türkiye'de de *B. melitensis* biyotip 3 ve biyotip 1, en yaygın görülen biyotipler olarak saptandı.

B. melitensis Rev 1 aşısının gebe koyun ve keçilerde uygulandığında atıklara neden olabileceği, laktasyon dönemindeki hayvanlara uygulandığında sütle atılımın gerçekleşebileceği bildirilmektedir[24]. Biz insan izolatları ile yaptığımız bu çalışmada, Türkiye'de de aşı suşu olarak kullanılan ve sütle atılımının gerçekleşebileceğini düşündüğümüz *B. melitensis* Rev 1 aşı suşunun olası bir insan brusellozuna neden olup olmadığını araştırdık. Aldomy ve arkadaşları izole ettikleri 4 adet *B. melitensis* biyotip 1 izolatından 1'inin aşı suşu olan Rev 1 olduğunu bildirmişlerdir[22]. Bizim çalışmamızda incelenen izolatların hiçbirinin 2.5 µg/mL streptomisin içeren besiyerlerinde üremediği olması, *B. melitensis* Rev 1 aşı suşunun ülkemizde insan brusellozundan sorumlu olmadığını ortaya koyması bakımından önemli bulunmuştur.

Brusella türleri arasında bugün için geçerli olan biyotiplendirme şemasına uymayan atipik suşların varlığı çeşitli araştırıcılar tarafından bildirilmekte ve bu suşlar klasifikasyonda birtakım güçlüklere neden olmaktadır. Diğer yandan bu suşların hastalığın orjini ve epidemiyolojisi ile yakın ilişkisi olduğu belirtilmektedir[25-28]. Corbel, 1980-1986 yılları arasında dünyanın çeşitli bölgelerinden gelen toplam 500 adet *B. melitensis* izolatından 29'unun bazik fuksin ve safraninde ürerken, tiyoninde inhibe olan atipik suşlar olduğunu ve bunların üç biyotipten birine ait olup, B ve C faj tipini taşıdıklarını bildirmiştir[25]. Sonuçta araştırıcı, biyotiplendirmede kullanılan kriterlerin tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini ileri sürmüştür. Banai ve arkadaşları, İsrail'de 2 yıl boyunca toplanan *B. melitensis* izolatlarından birkaçının bazik fuksin, tiyonin ve penisiline duyarlı olan *B. melitensis* biyotip 1'in atipik varyantları olduğunu bildirmişlerdir[29]. Araştırıcılar konvansiyonel şemaya uymayan bu atipik suşların yeni bir taksonomik grup oluşturmadıklarını ancak bu atipik suşların varlığının, brusella cinsinin henüz evrimlerinin son aşamasında olmadıklarının bir göstergesi olduğunu vurgulamaktadırlar. Erdenliğ ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, *B. melitensis* karakteri taşıyan ve safranin O içeren besiyerinde üreyen 78 izolattan 3 adet suş gerek bazik fuksin gerekse tiyonine duyarlı olmaları ne-

deni ile atipik suşlar olarak değerlendirilmiştir[30]. Çalışmamızda biyotiplendirmesi yapılan 26 suştan hiçbirisi atipik olarak değerlendirilmemiştir. Bazı brusella izolatları, boyalara duyarlılık, penisilin duyarlılığı ya da fajlara duyarlılık yönünden atipik özellikler gösterebilirler. Bu özellikler epidemiyolojik olarak son derece önemli olabilir. Ancak bu atipik suşlara yeni bir tür ya da biyotip statüsü verilmeden önce, bu izolatların dünyanın çeşitli yerlerinden tekrarlanan izolasyonlarının yapılması ve bunların ortak bir bilimsel komite tarafından incelendikten sonra yeni bir biyotip statüsü verilmesinin gerektiği açıktır. Bu amaçla farklı amplifikasyon yöntemleri de araştırılmaktadır[31]. İspanya'da Romero ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile brusella DNA'sını tanımlamışlar ve *B. abortus*'un 16s rRNA'sından primer elde ederek, 23 farklı brusella izolatından DNA analizi yapmışlardır[32]. Bu çalışmada, 905 bp'lik fragmanlar elde edilmiş ve 36 farklı klinik izolatta brusellanın haricinde brusella türleriyle serolojik olarak "cross" reaksiyon gösteren 5 farklı gram-negatif bakteri tanımlanmıştır. Brusella ile bu bakteriler arasında kapalı bir ilişki olduğu düşünülmüş, brusella teşhisinde PCR'nin spesifik ve yüksek sensitiv bir tanı aracı olduğu kabul edilmiştir. Brusella türlerinde, tiyoninin penetrasyonunda başlıca rolü OMP2 porin kanallarının oynadığı ileri sürülmektedir. Tiyonin varlığında üreme kabiliyetinin olmayışının OMP2a geninden 108 bp'lik bir segmentin delesyonu ile ilgisi olduğu bildirilmektedir[17,33,34]. Bu konuda kesin bir bilgiye ulaşmak için, atipik suşların OMP'lerinin, standart suşların OMP'leri ile karşılaştırmalı olarak SDS-PAGE analizlerinin yapılmasına ayrıca, OMP2a geninin yine karşılaştırmalı olarak genetik analizinin yapılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Türkiye'de standart yöntemlere göre insan brusella izolatlarının tür ve biyotip düzeyindeki identifikasyonlarına ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu da tür düzeyinde ve sığır izolatlarına yönelik çalışmalardır. Türkiye'de standart metodlara göre brusella cinsi mikroorganizmaların identifikasyonu konusunda ilk araştırma 1961 yılında Doğuer ve arkadaşları tarafından yapılmıştır[35]. Bu çalışmada, 33 yerli brusella suşundan 16'sının *B. abortus,* 4'ünün intermedier karakterde ve 13'ünün atipik suşlar olduğu bildirilmiştir. Araştırıcılar *B. suis* ve *B. ovis* türlerine Türkiye'de rastlanmadığını belirtmişlerdir. Sarısayın ve arkadaşları yaptıkları bir araştırmada, 116 adet sığır izolatından 2 adet *B. melitensis* biyotip 2 ile 9 adet koyun izolatından 7 adet *B. melitensis* biyotip 2 ve 2 adet *B. melitensis* biyotip 1 saptamışlardır[36]. Erdoğan ve arkadaşları, Trakya bölgesinden atık koyun ve keçi fetuslarından izole ettikleri 29 adet *Brucella* spp. etkeninden 25'inin B. *melitensis* biyotip 1 ve 3'ünün *B. melitensis* biyotip 2 ve 1'inin *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu bildirmişlerdir[37]. Erdenliğ ve arkadaşları, koyunlardan elde edilen 78 adet *B. melitensis* izolatından 69'unun biyotip 3 ve 9'unun biyotip 1 karakteri taşıdığını saptamışlar[30]. Bu çalışmada elde edilen bulgular, son yıllarda yurdumuzda çalışılan bölgelerde insan brusellozunda en yaygın olarak *B. melitensis* biyotip 3'ün daha az olarak *B. melitensis* biyotip 1'in izole edildiğini ve büyük bir olasılıkla *B. melitensis* biyotip 2'nin yurdumuzda daha az bir oranda bulunabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada elde edilen bulgular bu açıdan, Erdenliğ ve arkadaşları, Sarısayın ve arkadaşları ve Erdoğan ve arkadaşlarının bulguları ile farklılık göstermektedir[31,35,36]. Ancak sonuçlardaki farklılık çalışmaların yapıldığı yılların, coğrafi bölgelerin izolatların kökeninin farklı oluşu ile açıklanabilir. Ayrıca, her zaman için bazı biyotiplerin eradike olması ya da bazı varyant veya atipik suşların ortaya çıkması sözkonusu olabilir. Belirtilen bu nedenler ile ülkemizde brusselloza neden olan brusella tür ve biyotiplerinin periyodik olarak saptanması büyük önem taşımaktadır. *B. abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev 1 gibi canlı aşıların uygulandığı yerlerde patolojik maddelerden ve sütten izole edilen brusella cinsi mikroorganizmaların bu gibi aşı suşlarından ayrımı özellikle epidemiyolojik açıdan son derece önemlidir.

Çalışmamızda biyotiplendirilen 26 adet *B. melitensis* izolatının biyotipleri ve faj tipleri arasında bir ilişkinin var olup olmadığını saptamak için tüm izolatların faj tipleri saptandı ve faj tipi ile biyotip arasında herhangi bir ilişki bulunamadı. Tablo 6'da ayrıntılı olarak gösterildiği gibi böyle bir ilişki izolatların gönderildiği coğrafi bölgelere bağlı olarak gözlenmedi. Dünyada en yaygın olarak görülen faj tiplerinin sırası ile C, B, A olduğu belirtilmektedir[14]. Bu çalışmada da *B. melitensis* faj tipleri diğer çalışmalara benzer sonuçlar verdi. Ülkemizde çalıştığımız bölgelerde aynı sıra ile C ve B en yaygın faj tipi olarak görülmesine karşın; A faj tipi saptanmadı. Elde edilen bu veriye göre; faj tiplendirmesi epidemiyolojik yönden belli bir kökenin kaynağının ve yayılma yollarının saptanması açısından önemlidir.

Brusellozun eradikasyonunda başarıya ulaşmak için öncelikle brusella tür ve biyotiplerinin saptanmasına gereksinim vardır. Brusella tür ve biyotiplerinin

prevalansına ilişkin bilgiler, bir ülkede epidemiyolojik olarak yeni tiplerin ve aşı suşlarının varlığını izlemek açısından önemlidir. Böyle bilgiler, ayrıca infeksiyonun serolojik tanısı için üretilebilecek antijenler için optimal suşların seçimine de olanak sağlayacaktır. Elde edilen brusella izolatlarının tip tayinlerine ilişkin çalışmaların devamı, ülkemizde eskiden beri varolan ve bugün için de yaygın bir durumda olan brusellozun türü ve ülke düzeyinde epidemiyolojik durumunun değerlendirilmesine olanak sağlayacak ve belli bir ölçüde tedavi ve profilaksisinde etkin olacaktır.

Sonuç olarak, ülkemizde çalışılan bölgelerde insan brusellozunda *B. melitensis* dışındaki brusella türlerinin önemli bir rol oynamadığı ve en yaygın *B. melitensis* biyotiplerinin sırası ile biyotip 3 ve biyotip 1 olduğu görüşüne varıldı. Canlı brusella aşılarının yoğun olarak yapıldığı ülkemizde *B. melitensis* Rev 1 aşı suşunun incelenen brusella izolatlarının hiçbirinden identifiye edilmemesi belli bir ölçüde de olsa Rev 1'in çalışılan bölgelerde insan brusellozunda önemli bir rol oynamadığını düşündürdü. Çalışmamızda saptanan biyotip ve faj tiplerinin epidemiyolojik olarak önemli bir veri kaynağı oluşturması, benzer çalışmaların devamlılığını gerektirmektedir. Bu çalışmalar, ülkemizde eskiden beri varolan bugün için de yaygın olarak görülen brusellozun gerek hayvanlarda gerekse insanlarda ülke düzeyindeki durumunun değerlendirilmesine ve ülke genelinde bir biyotip haritasının çıkarılmasına, epidemiyolojik olarak büyük bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sözen TH. Bruselloz. Willke TA, Söyletir G, Doğanay M (editörler). İnfeksiyon Hastalıkları. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996:486-91.
2. Nicoletti PL. Relationship between animal and human disease. In: Young EJ, Corbel MJ (eds). Brusellosis: Clinical and Laboratory Aspects. Florida: CRC Press Inc, 1989:41-9.
3. Edward JY. Brusella species. In: Mandell GL, Douglass RG, Bennett JE (eds). Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone A Haurcourt Health Sciences Company, 2000:2386-93.
4. Mann CM, Jimenez De Bagues MP, Barberan M, Blasco JM. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. Vet Rec 1996;138:409-11.
5. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT. Brucella. In: Williams ST (ed). Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994:137-8.
6. Ribeiro LM, Herr S. The use of filter paper impragnated with thionin acetate, basic fuchsin and thionine blue in the identification of brucella species. J Vet Res 1990; 57:197-9.
7. Corbel MJ, Cocrem S, Brewer RA. Differentiation of "smooth" and "rough" brucella strains by lectins. Vet Rec 1983;113:261-2.
8. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory Techniques in Brusellosis. 2nd ed. WHO Monograph Series No:55: Geneva 1975;11-59.
9. Raad I, Rand K, Gaskins D. Buffered charcoal-yeast extract medium for the isolation of brucella. J Clin Microbiol 1990;28:1671-2.
10. Aydın N, Minbay A, İzgür M, Yardımcı H. Brucellosis in sheep and goats. Relation to Epidemiology and Human Infection. Publication of the Turkish Microbiological Society No.16. İzmir: Ege University Press, 1991:51-65.
11. Bruselloz Kontrolü ve Araştırması Üzerine WHO Çalışma Grup Toplantıları Raporu No 992, Who/Cds/Vph/92,109.
12. Brinley Morgan WJ. Comparison of various media for the growth and isolation of brucella. Res Vet Sci 1960;1:47-52.
13. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayon M. Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int J Syst Bacteriol 1985;35:292-5.
14. Corbel MJ, Thomas EL. The brucella-phages; their properties characterisation and applications. Central Veterinary Laboratory Booklet 2266, Weybridge Surrey 1983;153.
15. Raybould PJ. Antigens of diagnostic significance in *Brucella abortus*. Can J Microbiol 1982;28:557-66.
16. Hennager SG, Harris SK, Ewalt DR, Jarnagin JL. Rapid identification of dominant brucella antigens, using a microagglutination test. Am J Vet Res 1983;44:2418-9.
17. Fıcht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden SW. Species-specific sequences at the OMP2 locus of brucella type strains. Int J Syst Bacteriol 1996;46:329-31.
18. Esendal ÖM, Yardımcı H, Yıldırım M, İlhan Z, Altay G, İzgür M. Brucella türlerinin identifikasyonunda boya emdirilmiş disklerin kullanılması. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi. Kongre Kitapçığı 1991:71.
19. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M. DNA polymorphism in strains of the genus brucella. J Bacteriol 1988;170:4603-7.
20. Smith LD, Ficht TA. Pathogenesis of brucella. Crit Rev Microbiol 1990;17:209-30.
21. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney MAJ, Meikle PJ, Perry MB, Peters T. Definition of brucella A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Infect Immun 1989;57:2829-36.
22. Aldomy FM, Jahans KL, Altarazi YH. Isolation of *Brucella melitensis* from aborting ruminants in Jordan. J Comp Path 1992;107:239-42.
23. Mustafa AA, Roberts RM, Corbel MJ. Isolation of *Brucella melitensis* from sheep in Syria. Vet Rec 1985;17:277.
24. Alton GG. Vaccination of goats with reduced doses of Rev 1 *B. melitensis* vaccine. Res Vet Sci 1970;11:54-9.
25. Corbel MJ. Identification of dye-sensitive strains of *Brucella melitensis.* J Clin Microbiol 1991;29:1066-8.
26. Corbel MJ, Thomas EL, Garcia-Carillo C. Taxonomic studies on some atypical strains of *Brucella suis.* Br Vet J 1984;140:34-43.

27. Martin NL, Hancock REW. Function and structure of the major components of the outer membrane of gram-negative bacteria. In: Adams LG (ed). Advances in Brusellosis Research. 1st ed. Texas: A & M University Press 1990;55-5.
28. Ewalt DR, Forbes LB. Atypical isolates of *Brucella abortus* from Canada and the United States characterized as dye sensitive with M antigen dominant. J Clin Microbiol 1987;25:698-701.
29. Banai M, Mayer I, Cohen A. Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* Biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. J Clin Microbiol 1990;28:1057-9.
30. Erdenliğ S, Şen A. Koyun atıklarından brusella cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. Pendik Vet Mikrobiyol Derg 2000;31:31-42.
31. Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Diaz R. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Infect Immun 1989;57:1419-26.
32. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of brucella DNA by PCR. J Clin Microbiols 1995 Mar;33:615-7.
33. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez LO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995 Dec;33:3087-90.
34. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez-Goni I. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. J Clin Microbiol 1995; 33:3198-200.
35. Doğuer M. Türkiye'de izole edilen brusella suşlarının identifikasyonları. Etlik Vet Bakt Enst Derg 1961;1:155-88.
36. Sarısayın F. Koyun brusellozu alanındaki son gelişmeler semineri. TÜBİTAK V.H.A.G., No:2, Ankara, 1969.
37. Erdoğan İ, Gürel A, Tekin C, Uyanık F, Bitgel A. Trakya bölgesinde koyun, keçi ve sığırlarda bakteriyel abortların tesbiti ve dağılımı. Pendik Vet Mikrobiyol Derg 1993;24:23-35.

Yazışma Adresi:
Dr. Zuhal BOLCA
Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Bakteriyoloji ve
İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı
KOCAELİ

Makalenin Geliş Tarihi: 18.04.2002 Kabul Tarihi: 19.08.2002

3. ULUSAL MANTAR HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKOLOJİ KONGRESİ

27 - 30 Mayıs 2003

Sea-Garden Hapimag Resort, BODRUM

Bilimsel Sekreterya

Doç. Dr. Zayre ERTURAN
İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
34390 Çapa, İSTANBUL
Tel: 0212 534 00 50 / 2375-2603
Faks: 0212 635 11 86
e-mail: mikoloji2003@yahoo.com