



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MB-YL-2008-0002

**SIĞIRLARDA BRUCELLA VE LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN  
MULTİPLEX POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR)  
İLE TANIMLANMASI**

**Araş. Gör. Uğur PARIN**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

**AYDIN-2008**

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MB-YL-2008-0002**

**SIĞIRLARDA BRUCELLA VE LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN  
MULTİPLEX POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (mPCR)  
İLE TANIMLANMASI**

**Araş. Gör. Uğur PARIN**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN**

**AYDIN - 2008**

## ÖNSÖZ

Sığırlarda *Brucella* ve *Leptospira* enfeksiyonları dünyanın büyük bir bölümünde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enfeksiyon etkenleri, sadece ekonomik kayıp oluşturmak ve hayvan sağlığını zarara uğratmakla kalmayıp insan sağlığını da tehdit etmektedir.

Her iki hastalıkta da serumdaki spesifik antikorların belirlenmesi metodu ile tanıya ulaşılabilmektedir. Fakat bu yöntemde çoğu zaman yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca serum antikorlarının belirlenmesi ile elde edilen tanının rutine aktarılması zor, zaman alıcı, pahalı ve aynı zamanda çalışan personel için tehlikeli olabilmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun geliştirilmesiyle birlikte *Brucella* türlerinin teşhisinde daha güvenilir ve daha spesifik olan bu metod rutin teşhis laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda *Brucella* ve *Leptospira* türlerinin varlığının ikisinin birden hassas ve hızlı bir teknik olan multiplex PCR yöntemi ile ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

Böylece sahada önemli yavru atma etkenlerinden olan sorunlarından olan, aynı zamanda halk sağlığını da tehdit eden Brucellozis ve Leptospirozis hastalıklarında rutin tanı prosedürü için önemli bir aşama kaydedilmiş olunacaktır.

Bu çalışma “Sığırlarda *Brucella* ve *Leptospira* Türlerinin Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) ile Tanımlanması” isimli ve *VTF-08008* kodlu proje olarak **Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri** tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
1.1 Brucellozis	2
1.1.1 Etiyoloji	4
1.1.2 Epidemiyoloji	7
1.1.3 Patogenezis	9
1.1.4. Klinik Belirtiler	10
1.1.5. Klinik Tanı	12
1.1.6 Laboratuvar Muayeneleri	13
1.2 Leptospirozis	26
1.2.1 Etiyoloji	27
1.2.2 Patogenezis	28
1.2.3 Teşhis	31
1.2.4 Sağaltım	35
1.2.5 Leptospira Türlerinin Moleküler Karakterleri	36
2. GEREÇ ve YÖNTEM	38
2.1. Gereç	38
2.1.1 Materyal	38
2.1.2 DNA Ekstraksiyon Kiti	38
2.1.3 DNA Ekstraksiyon Kiti	38
2.1.4 dNTP mix	39
2.1.5 Oligonukleotid Primerler	39
2.1.6 Standart Suşlar	39
2.1.7 Agarose	39

2.1.8 Solusyonlar	40
2.1.9 Kullanılan Cihazlar ve Aletler	40
2.2. Yöntem	40
2.2.1 DNA ekstraksiyonu	40
2.2.2 DNA amplifikasyonu	41
2.2.3 PCR	42
2.2.4 PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	42
2.2.5 mPCR İşleminin Spesifite ve Sensitivitesi	43
3. BULGULAR	44
4. TARTIŞMA	46
5. SONUÇ	49
ÖZET	50
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57
TEŞEKKÜR	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa No
Çizelge 1.1.1	Brucella Genusu Türlerinin ve Biyotiplerinin Ayırıcı Karakterleri	7
Çizelge 1.1.6.4.1.1	Çabuk Aglutinasyonda değerlendirme	17
Çizelge 1.1.6.4.1.2	Aglutinasyon testinde tüplerde berraklaşma oranı	18

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1	44
Şekil 3.2	45

# 1. GİRİŞ

Sığırlarda *Brucella* ve *Leptospira* enfeksiyonları dünya genelinde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enfeksiyon etkenleri, sadece ekonomik kayıp oluşturmak ve hayvan sağlığını zarara uğratmakla kalmayıp insan sağlığını da tehdit eden zoonoz karakterli enfeksiyonlardır.

Hayvanlarda *Brucella* ve *Leptospira* enfeksiyonları yavru atma, süt veriminde azalma, damızlık değerinin kaybolması nedeniyle, hem yetiştirici hem de ülke ekonomisi açısından ciddi kayıplara yol açmaktadırlar. Bu olumsuzluklar dikkate alındığında Brusellozis ve Leptospirozis evcil hayvanların en önemli hastalıkları arasında kabul edilir. Çabuk yayılması, kontrol ve mücadelenin güçlüğü, tedavinin uzun süre alması ve masraflı olması hastalıkların önemini artırmaktadır. Hayvansal protein kaynaklarına olan olumsuz etkisi, hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine engel teşkil etmesi ve çoğunluğu kırsal kesimde bulunan kısıtlı imkanlara sahip hayvan yetiştiricilerinin sosyo-ekonomik gelişmesini engellemesi gibi zararlarının olmaları bir başka faktördür.

Söz konusu olan her iki hastalıkta da serumdaki spesifik antikorların belirlenmesi metodu ile tanıya ulaşılabilmektedir. Fakat bu yöntemde çoğu zaman yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca serum antikorlarının belirlenmesi ile elde edilen tanının yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar nedeniyle rutine aktarılması zor ve aynı zamanda çalışan personel için tehlikeli olabilmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu metodunun geliştirilmesiyle birlikte *Brucella* türlerinin teşhisinde bu metod kullanılmaya başlanmıştır (Fekete ve ark. 1990; Herman ve Ridder, 1992; Romero ve ark. 1995a,b). Daha sonra Leptospirozis çalışmalarında da PCR kullanılmaya başlanmıştır (Van Eys ve ark. 1989; Woodward ve ark. 1991; Me'rien ve ark. 1992; Woodward ve Redstone, 1993; Savio ve ark. 1994; Romero ve ark. 1998; Heinemann ve ark. 2000). Yeni geliştirilen bir prosedür olan Multiplex PCR metodu da birden fazla hedef DNA sekansını tek reaksiyonda belirlemesi açısından daha avantajlı olmaktadır. Bu direkt metodlar genellikle bakterinin konakçıdan izolasyonunda uygulanmaktadır (Dieffenbach ve Dveksler, 1995).



Bu çalışmada da sığırlarda abortusa yol açan *Brucella* ve *Leptospira* türlerinin moleküler bazda mPCR yöntemi ile tanısının konabilmesi hedeflenmektedir. Böylece epidemiyolojik açıdan abortuslara sebep olan iki önemli bakteriyel etkenin etkili ve güvenli bir yöntemle hızlı bir şekilde ortaya konması ve bu zoonoz hastalıklara bağlı kayıpların erkenden önlenmesi, koruma ve kontrol çalışmalarının etkinliği sürecini de hızlandıracaktır.

### 1.1 Brusellozis

*Brucella* cinsinde 6 tür bulunmaktadır: *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*. *Brucella* cinsi mikroorganizmalardan *Brucella melitensis*, *Brucella abortus* ve *Brucella suis* halk sağlığı yönünden büyük önem taşımaktadırlar (Nicoletti 1980).

*B. melitensis* başlıca koyun ve keçileri etkilemekle birlikte sığır ve köpekleri de enfekte edebilir. Kırsal kesimde insanların bu hayvanlarla yakın teması ve koyun-keçi sütünün geleneksel tüketim şekli nedeniyle koyun-keçi brusellozisi (*B.melitensis*) ülkemizde insan sağlığına olumsuz etkisi bakımından büyük öneme sahiptir. *B. melitensis*'in 3 biyotipi bulunmaktadır: *B. melitensis* biyotip 1, *B. melitensis* biyotip 2, *B. melitensis* biyotip 3 (Nicoletti 1980).

*B. abortus*, sığırlarda enfeksiyon oluşturmaktadır, ayrıca manda, deve, geyik, at, koyun, köpek, domuz ve insanlara da bulaşabilmektedir. İnsanlar için patojenitesi bakımından *B. suis*'ten sonra gelir. *B. abortus*'un 9 biyotipi bulunmaktadır: *B. abortus* biyotip 1, *B. abortus* biyotip 2, *B. abortus* biyotip 3, *B. abortus* biyotip 4, *B. abortus* biyotip 5, *B. abortus* biyotip 6, *B. abortus* biyotip 7, *B. abortus* biyotip 8, *B. abortus* biyotip 9 (Nicoletti 1980).

*B. suis*, başlıca domuzlarda enfeksiyon oluşturur, ancak ren geyikleri, sığır, manda ve diğer bazı yabani hayvanlarda enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. *B. melitensis*'ten sonra insan için en patojenik türdür. *B. suis*'in 4 biyotipi bulunmaktadır: *B. suis* biyotip 1, *B. suis* biyotip 2, *B. suis* biyotip 3, *B. suis* biyotip 4 (Nicoletti 1980).

*B. canis*, erkek ve dişi köpeklerde genital organ enfeksiyonları ve dişilerde yavru atmaya neden olur. Diğer 3 tür kadar halk sağlığı açısından önem taşımasa da insanlara bulaşabilir. İnsan dışında diğer hayvanlara bulaştığı bildirilmemiştir. Rutinde kullanılan testler *Brucella canis*'e karşı oluşan antikorları saptayamamaktadır. Bu nedenle bruselloz şüphesi olan ancak testlerin negatif çıkan olgularda *Brucella canis* akla getirilmelidir (Nicoletti 1980).

*B. ovis*, koçlarda enfeksiyon oluşturur. İnsan ve diğer hayvanları infekte etmemektedir (Nicoletti 1980).

*B. neotomae*, doğal şartlarda sadece çöl ratlarını infekte ettiği bilinmektedir. Son yıllarda İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri'nde deniz memelilerinde enfeksiyona neden olan farklı bir *Brucella* türü izole edilmiştir (Arda 1997). Laboratuvar çalışanlarında enfeksiyon oluşturması bu türün de insanlar için patojen olduğunu ve *Brucella* grubu mikroorganizmaların ve onların potansiyel bir zoonoz olarak ekolojik yaygınlığını göstermektedir (Arda 1997).

Brusellozis, duyarlı hayvanlara genellikle enfekte hayvanlarla doğrudan temas yoluyla veya enfekte hayvanların akıntılarıyla bulaşık çevreden geçmektedir. Atık yavrular, yavru zarları ve sıvıları, yavru atmış veya doğum yapmış infekte bir hayvanın vaginal akıntıları fazla sayıda etkeni içermektedir. Hayvanlar bu materyalleri yalayarak veya brusella etkeni ile bulaşık su ve gıdaları tüketerek infekte olurlar. Süt, idrar, dışkı ve eklem sıvıları da Brusella etkenlerinin kaynağıdır. İnfekte boğa ve koçların semenlerinde de etken bulunur ve çiftleşme ile bulaşma olur. Ayrıca infekte annelerden yavrularına anne karnında veya doğum sonrası infekte ağız sütü yada infekte diğer hayvanların sütü ile beslenme sonucu bulaşma görülebilir (Arda 1997).

Genel kural olarak brusellozis, bir sürüden diğer bir sürüye infekte veya infeksiyöz etkene maruz kalmış hayvanların sürüye sokulmaları ile bulaşır. Hastalık aynı zamanda brusellozis görülmeyen bir sürünün hastalıklı sürü ile aynı merada otlatılması ile de bulaşır. Ayrıca köpek ve kediler, kuşlar, yabani hayvanlar atık yavru ve yavru zarlarını bir meradan diğerine taşıyarak dolaylı olarak bulaşmada rol oynayabilirler (Vergler ve ark. 1985).

### 1.1.1. Etiyoloji

Brusella cinsi bakteriler 0.6-1.5µm boyunda küçük, Gram negatif kokobasil olup sporsuz ve hareketsizdir. Kapsül ve flagella bulunmaz. Etkenin brownian hareketi oldukça belirgindir. Hastalık olgularından yeni izole edilen ve S karakterdeki suşlarda kapsül tespit edilmiştir. Kültürlerde tek tek rastlanmasına karşılık dokulardan veya eksudatlardan yapılan frotilerde kümeler halinde görülürler (Vergler ve ark. 1985).

Etken ilk izolasyonda % 10 karbondioksitli ortamda daha iyi ürer. Bu nedenle mikroaerofilik bir özelliğe sahiptir. Besiyerlerine glukoz, ascites, karaciğer ekstresi, kan, serum veya protein katılması üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Mikroorganizmaların çoğalmasını uyarıcı bir faktör olarak eritrol de kullanılabilir. *B. ovis* ve *B. abortus* biyotip-II'nin üremeleri için % 5 serumla zenginleştirilmiş besiyerlerine gereksinim duyulmaktadır (Vergler ve ark. 1985).

20 °C ve 40 °C arasında üreyebilir, fakat en iyi üreme aerobik şartlarda ve 37 °C' dedir. En uygun pH 6.6-7.4 arasındadır. İlk izolasyonda 3-5 günlük inkubasyonda koloniler görülmeyebilir. Koloniler genellikle 10-14 gün arasında gözlemlenir, fakat bazı durumlarda bu süre 21 güne kadar uzayabilir (Smith ve Ficht, 1990). *B. abortus*'un katı besiyerlerindeki üremesi ancak ikinci günden sonra fark edilir ve gelişmesi 5-7 günde tamamlanır. 2-3 günlük koloniler; yuvarlak, konveks, kenarları düzgün ve 0.5 mm çapındadırlar. Yansıyan ışıkta hafif mavimsi-yeşil refle verir. R koloni formundakiler yassı, daha büyük çapta, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Bunlardan başka

intermedier (I) ve mukoid (M) özellik gösteren koloni varyasyonlarına da rastlanabilir (Verger ve ark. 1985).

Sıvı besi yerlerinde yavaş ürerler. Homojen bir bulanıklık ve dipte de yumurta akı benzeri tortu yaparlar. R koloni formundakiler tüp çalkalandığında granüler şekilde bir üreme gösterirler (Nicoletti 1980).

Bütün brucella türleri pastörizasyon ısısında 10-15 dakikada ölürlür. Dezenfektan ve antibiyotiklere duyarlıdırlar. Kokuşma sonu kısa zamanda ölürlür. Karanlık yerlerde, doku, süt veya uterus akıntıları içerisinde uzun zaman canlı kalabilirler (Nicoletti 1980).

Güneş görmeyen toprakta 70, suda 35 gün canlılıklarını korurlar. Kültürler buzlukta 3-6 ay canlı kalabilirler. Etkenler % 0.1 süblime'de birkaç dakikada, % 2 formalin ve % 1 lizol içinde 15 dakikada ölürlür. Sütte birkaç gün, dondurmada 1 ay canlı kalabilir. Bazı kimyasal maddelere (thionin, bazik fuksin, metil violet, pironin, actidion, Polimiksin-B ve eskulin) karşı duyarlılıkları üremeleri ve tip tayini için kullanılır (Verger ve ark. 1985).

Brucella grubu mikroorganizmalar, genellikle, indol, jelatin, metil red ve VP reaksiyonları yönünden negatif reaksiyon göstermelerine karşılık nitrat ve katalaz pozitifdir. Şekerli besiyerlerinde gözle görülebilecek bir asit oluşumu sağlayamazlar. Suşların çoğunluğu oksidaz pozitif olup, üreaz testi hepsinde pozitifdir. Sitratlı besiyerinde üreme göstermezler (Verger ve ark. 1985).

Brucella etkenlerini birbirinden ayırmak için bazı testler yapılmaktadır. Bu amaçla en çok başvurulan teknikler arasında; üreaz testi, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi, thionin ve bazik fuksinin bakteriyostatik etkilerinin incelenmesi yer alır.

Ayrıca, bu etkenlerin bakteriyofaj duyarlılıklarında tiplendirmede önemli kriterdir. Günümüzde 5 tip fajdan yararlanır. Bunlar Tibilisi, Weybridge, Berkeley, Firenze ve Izatnagar fajlarıdır (Verger ve ark. 1985). Bu güne kadar yapılan çalışmalarda *B. melitensis*' in 3, *B. abortus*' un 9, *B. ovis*' in 4 biyotipi olduğu ortaya konmuştur (Verger ve ark. 1985).

Brucella türleri antijenik olarak ortak komponentlere sahiptirler. Brucella kökenlerinde A ve M olmak üzere iki yüzey antijenleri vardır. Ancak bu yüzeysel yerleşen iki antijenin oranının birbirinden farklı olduğu bildirilmiştir. Bu oran, *B. abortus* ve *B. suis*'de A/M=20/1 olmasına karşılık, *B. melitensis*'te A/M=1/20'dir. Bu duruma göre *B. melitensis* serolojik olarak *B. abortus* ve *B. suis*'ten ayırt edilebilirse de, *B. abortus*'u *B. suis*'ten ayırt etmek mümkün değildir (Verger ve ark. 1985) (Çizelge 1.1.1.).

### 1.1.2. Epidemiyoloji

Brucella infeksiyonuna süt hayvanı yetiştirilen her ülkede sıkça rastlanmaktadır. Hastalık yavru atmaya, infertiliteye, genital organ infeksiyonlarına ve süt veriminin azalmasına neden olduğundan ağır ekonomik kayıplara da yol açmaktadır (Verger ve ark. 1985).

Hastalık etkeni en çok gebe hayvanların uterus içeriği, fötüs ve fötal membranlarda bulunur. Buşlaşma, başlıca sindirim sistemi, sağlam veya portantreli deri, konjunktiva, çiftleşme ve sağım sırasında memelerin kontaminasyonu ile meydana gelir (Verger ve ark. 1985).

İnfekte gebe hayvanlar yavru atarken veya yavru doğururken, özellikle fötüs, fötüse ait sıvılar, amnion ve plasenta aracılığı ile hastalık etkeninin çevreye bulaştırılmasına neden olurlar. İnfekte uterus akıntıları ve idrarla bulaşık olan kuyruk, diğer hayvanların deri ve konjiktivalarına etkeni bulaştırabilir (Nicoletti 1980).

Testisleri iltihaplı olan infekte boğalarda hastalığın bulaşmasına neden olabilirler. Boğalar infeksiyonu mekanik olarak nakletmelerinin yanı sıra kendilerinin de infekte olmaları sonucu , infekte sperma aracılığı ile sağlam dişileri bulaştırabilirler (Verger ve ark. 1985).

Çizelge 1.1.1.: Brucella Cinsine ait Türlerin ve Biyotiplerin Ayırıcı Karakterleri

BIYOTİP			Boyalı Vasatta üreme (x)		Agglutinasyon		Oksidatif olarak metabolize edilen substratlar														
			CO <sub>2</sub> ihtiyacı	H <sub>2</sub> S	B. fuchsin (b)	Thionin	Mono spesifik serum	R. koloni anti ser.	T <sub>6</sub> , RTD (XX)	faj duyarlılık	L. alanin	L. aspar.	L. glut. asit	L. arab.	D. galak.	D. riboz	D. glukoz	L. eritrit	D. ksiloz	L. arginini (xxx)	L. lizin
			a.	b.	A.	M.															
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
	2	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-		
	3	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-		
<i>B. abortus</i>	1	d	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	2	d	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	3	d	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	4	d	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	6	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	7	-	d	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	8	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	9	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
	4	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	
<i>B. neotomae</i>	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-		
<i>B. ovis</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>B. canis</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	d	-	+		

(x): Garantili boyalar (National Aniline Division, Allied Chemical and Dye Co., New York) a=1: 25000; b= 1:50000

XX RDT: Rutin Test Dilusyonu

XXX DL- citruline ve DL- ornithine ile aynı reaksiyonları verir.

Brusellozis'li ineklerin çoğu yavru attıktan sonra haftalarca ve hatta aylarca etkeni sütleri ile çıkarırlar. Yavru atıldıktan veya doğduktan sonra akıntılar içinde çok fazla mikroorganizma bulunur. Fakat miktarı 1-2 hafta içinde azalmasına karşılık 6 ay veya daha uzun süre devam edebilir (Nicoletti 1980).

Ayrıca hastalığın naklinde sinek, sivri sinek, tahta kurusu, kene, pire gibi artropotlarla yabani tavşan, sıçan, fare gibi kemiricilerin rolü olduğu bildirilmiştir. Serçe, karga, kerkenez gibi kuşların da portör olabilecekleri ve bazen geyik, dağ keçisi ve ceylanlarda da infeksiyon görüldüğünden hastalığın yayılmasında bunların rol oynayaabilecekleri bildirilmektedir (Smith ve Ficht, 1990).

Hayvanlardan insanlara geçen en önemli zoonozlardan biri olan Brusellozis, özellikle infekte ellerin göz ve ağza sürülmesi ile bulaşır. Mikroorganizma içeren çiğ sütle yapılmış tereyeği, kaymak, taze peynir ve ekşitilmiş sütü yiyenlere hastalık kolayca geçer. Yavru atımı sırasında, güç doğumlarda ve son düşerken yardımcı olan veteriner hekimler de infekte olabildikleri için hayvan Brusellozis'i bir meslek hastalığı olarak da ayrı bir önem taşır.

Hastalığa karşı vücudun duyarlılığı hayvanın yaşı ilerledikçe artar. Cinsel olgunluğa erişen hayvanlarda hastalık yerleşerek uzun yıllar kalabilir. Aynı hayvanda birinci yavru atımından sonra ikinci abortus olayları çok ender olarak görülür (Verger ve ark. 1985).

### **1.1.3. Patogenezis**

Brusellozis'in en önemli özelliği bir retikuloendotelial sistem hastalığı olması ve belli organ ve dokulara yerleşmesidir. Brusella bakterileri vücuda girdikten sonra bölgesel lenf yumrularına ve buradan da birkaç gün içinde kan dolaşımına ulaşırlar. Kanda 2-3 hafta kaldıktan ve bakteriyemi sonucu kan yolu ile organlara yayıldıktan sonra kandan yavaş yavaş çekilir ve organlarda lezyonlar görülmeye başlar. Hastalık etkeni zamanla organlardan da çekilmeye başlayarak lenf yumrularına ve dalak, meme, iliacal lenf yumruları gibi lenfoid dokulara yerleşir ve buralarda uzun bir süre canlı kalırlar. Etken özellikle memelerde, gebe uterusu, lenf düğümlerinde, testislerde ve seyrek olarak da eklem, tendo kılıfları ve bursalara yerleşir. Bu organ ve dokulara gelip yerleşen etken makrofajların, özellikle, epitelooid hücrelerin bu bölgelere infiltrasyonuna neden olur ve böylece etkenin bulunduğu yerlerde daha başlangıçtan itibaren makrofaj yığınaklarını

şekillendirir. Gebe hayvanlarda infeksiyonun lokalizasyonu genellikle uterus, meme, lenfoid organlar ve fetal zarlardır (Vergler ve ark. 1985).

Etkenin fetal dokularına, maternal ve fetal membranlara karşı da özel affinitesi vardır. Kotiledonlar yüksek konsantrasyonda eritritol içerdiklerinden bakteriler( özellikle *B. abortus*) burada yoğun üreme gösterirler. Kotiledonlarda gelişen bakteriler burada yangısal ve nekrotik değişikliklere neden olur ve sonuç olarak fetal beslenmesini ve gelişimini engelleyerek ölümüne yol açar. Bu durumda yavru mumifiye olur ve etrafı kalın, yapışkan bir eksudatla çevrilir. Bu arada , mikroorganizmalar korion ile allantois zarları arasındaki bağ dokuyu ayrıca göbek kordonunu da istila ederler. Mikroorganizmalar, ana karnındayken yutulmak, kan dolaşımına geçmek suretiyle yavrunun vücuduna girerler ve fetal midesinde, ince barsakları ile parankimatöz organlarda yangısal reaksiyonlara neden olurlar. Eğer infeksiyon gebeliğin son döneminde olursa fetus doğabilir. Fakat yavru, septisemi ve konstitusyonel bozukluklar sonu ölür. Yavru yaşayabilirse hastalığa karşı bir bağışıklığı olmadığından cinsel olgunluğa erişince, tıpkı infekte olmayan anadan doğma yavrular gibi infeksiyona karşı duyarlıdır (Vergler ve ark. 1985).

Brucella'lar, aynı zamanda, erkek hayvanların testis, epididimis ve seminal veziküllerinde de yangısal değişikliklere yol açarlar. Seminal veziküllerde önceleri akut olan yangısal reaksiyonlar, sonraları fibrozis nedeniyle sertleşmeler meydana gelir. Orşitis oluşunca testislerde büyüme görülür ve spermada histopatolojik değişimler şekillenir (Vergler ve ark. 1985).

#### **1.1.4. Klinik Belirtiler**

Dişi hayvanlarda başlıca belirti yavru atmadır. Yavru atma genellikle gebeliğin 5-7 nci aylarında görülür. Gebelik süresini tamamlayarak doğan yavrularda da doğum sonrası hemen ölüm görülebilir. Yavru zarlarının atılmaması ve uterus iltihaplanması sonucu tekrar gebe kalma süresi uzar veya kalıcı kısırlık oluşabilir. Yavru atma ve tekrar gebe kalma aralığının uzaması nedeniyle laktasyon süresindeki değişiklikler sonucu süt verimi azalabilir. Tamamen duyarlı sürülerde atık oranı % 30-80 arasında olabilir. Bütün infekte



hayvanlar yavru atmazlar ve bazı vakalarda atık oranı çok düşük olup hastalık sinsi seyredir. Bazı hayvanlarda bacak eklemlerinde yangı ve şişlikler görülebilir. Erkek hayvanlarda da üreme organları etkilenir. İnfekte inekler genellikle bir kez yavru atarlar (bu nedenle infeksiyonun ilk defa girdiği sürülerde atık oranı yüksektir). Ancak bazı hayvanlar daha sonraki gebelikleri süresince de atık yapabilir ve daha sonraki gebeliklerden doğan yavrular zayıf ve sağlıklı olabilir (Nicoletti 1980).

İnfekte hayvanların buzağuları sağlıklı görünseler dahi, infekte inekler infeksiyöz mikroorganizmaları vücutlarında bulundurup saçmaya devam ederler ve hastalığın tehlikeli kaynakları olarak dikkate alınmalıdırlar. Ayrıca düşük oranda da olsa infekte analardan doğan buzağular infeksiyonu gizli olarak taşıyabilirler. Bu buzağular ilk gebeliklerine kadar herhangi bir belirti göstermez ve serolojik testlerde negatif olarak bulunurlar. Bu hayvanlar sürüde hastalığın devamını sağlayan bir infeksiyon kaynağı olarak rol oynarlar. Bu nedenle infekte bir anadan doğan buzağular aşılsalar dahi gizli enfeksiyon devam edebileceğinden damızlıkta kullanılmamalıdır. İneklerde meme ve meme lenf yumrularında kalıcı infeksiyon nedeniyle infekte hayvanlar yaşamları boyunca sütle zaman zaman bakteriyi çıkarır ve insanlar için risk oluştururlar. Atık veya doğumu takiben etkenler uterus akıntılıyla 15 gün süreyle yoğun olarak atılır. Akıntılar azaldıkça bakterinin atımı da hızla düşmesine rağmen 2-3 ay sonra temizlenir (Vergler ve ark. 1985).

Genellikle uzun seyirli kronik bir hastalıktır. İçerdiği katalaz ve süperoksit dizmutaz enzimleri sayesinde vücudun savunma mekanizmalarına karşı koyarlar. Bu sayede fagosite edildiklerinde fagositler içinde yaşamaya devam ederler ve hücre içi bir yaşam gösterirler. Hücre içi yaşayabilmeleri antibiyotiklerin etkimesini zorlaştırdığından uzun süren bir antibiyotik tedavisine gereksinim vardır (Rachel ve ark. 1997).

**Subklinik bruselloz:** Asemptomatik Meslek Hastalığı olarak görülür. Ancak serolojik olarak belirlenebilir. Çocuklarda bir kısım vaka asemptomatiktir. Subklinik, klinik brucella oranı 1/1 ve 12/1 arasında değişir (Vergler ve ark. 1985).

**Akut ve Subakut bruselloz:** Akut brusellozda semptomlar 2-8 hafta (5-30 gün) içinde ortaya çıkar. Hastalık hafif, geçici veya *B. melitensis*'te olduğu gibi birden bire ortaya çıkabilir ve toksik olabilir. % 50 vakada ani başlangıç, % 50 vakada ise haftalar içinde yavaş gelişim olabilir ve bunun tanınması güçtür. Semptomlar nonspesifiktir. % 90

vakada ateş, üşüme, terleme, iştahsızlık, halsizlik, başağrısı, titreme, kilo kaybı vardır. % 25 vakada monoartiküler olabilen artralji veya kuru öksürük olur. Testiküler ağrı, disüri, oküler ağrı, görme bulanıklığı nadirdir. % 95 vakada ateş görülür. *B. melitensis* infeksiyonunda intermittant ve remittan klasik öndülan ateş görülebilir. Ateş 7-10 günde yavaş yavaş düşer ve 3-5 gün normal kaldıktan sonra tekrar aynı ateş periyodu görülür. Çocuklarda öndülan ateş genellikle görülmez. % 20-30 vakada splenomegali, % 10-20 vakada lenfadenopati saptanır. Hepatomegali % 20-60 vakada bildirilmiştir. Hastaların % 10-30'unda kan kültürü pozitifdir. *B. melitensis*'te ise bu oran % 85'dir. Akut hastalık belirgin antikor yüksekliği ile birlikte. Relatif lenfomonositoz ve hafif anemi ile birlikte lökopeni görülür. Vakaların çoğunluğu sekelsiz iyileşir (Rachel ve ark. 1997).

**Persistent bruselloz:** Hastalığın ister tedavi ile ister tedavisiz iyileşdikten sonra yeniden akut bir şekilde başlamasıdır. Genellikle hastalıktan 3-6 ay sonra olur. Vakaların % 5'inden fazlasında relaps görülür. Genellikle viral bir hastalık veya travma sonrası ortaya çıkar. Relapsın sebebi bakterilerin fagositler içinde, granülomlarda ve süpüratif odaklarda bulunmasıdır. Yüksek ateş ve daha şiddetli semptomlarla seyredebilir ve reinfeksiyondan ayrılması güçtür (Rachel ve ark. 1997).

**Kronik bruselloz:** Bir yıldan fazla süren vakalar kronik olarak kabul edilir. Dört şekilde görülebilir;

- 1- Sinsi başlangıç,
- 2- Akut hastalığı takip eden relapslar,
- 3- Lokalize hastalık,
- 4- Tedaviye cevap vermeyen kalıcı hastalık.

Vakaların % 85'i aseptomatiktir. Semptomlar genellikle nonspesifiktir. Baş ağrısı, güçsüzlük, nöropsikiyatrik semptomlar (% 70 depresyon) , uykusuzluk, emosyonel labilite olur. % 25-50 ateş görülür. % 50 splenomegali, % 15 eklem tutulumu olur. Aglutinin titreleri, yüksek, düşük, veya negatif olabilir. Negatif titreler düşük IgM, blokan antikorlar, monovalan aglutinin IgG ve IgA nedeniyle olabilir (Rachel ve ark. 1997).

#### **1.1.5. Klinik Tanı**

Hasta ineklerin klinik teşhisi mümkün değildir. Abortus olayı normal geçmiş ve plasenta içeride kalmamışsa hayvan çabuk iyileşir ve tekrar gebe kalabilir. Bu gebelik

normal doğumla bitebileceği gibi bazen yavru atımı ile de son bulabilir. Eğer plasenta içeride kalır ve putrefikasyona uğrarsa septisemi sonu ölümler olur. Hastalık kronikleşirse steriliteye yol açar. Yavru atmadan başka herhangi bir klinik bulguya rastlanılmaz (Arda 1997).

### **1.1.6. Laboratuvar Muayeneleri**

Hastalığın kesin tanısı, yeni atılmış fötuslardan alınan marazi maddeler, kan, serum, süt, plasenta, sperma, vaginal sıvı, idrar ve organlardan tekniğine göre uygun olarak alınan materyallerle laboratuvarda yapılacak bakteriyolojik ve serolojik muayeneler sonucu konur (Arda 1997).

#### **1.1.6.1. Bakteriyoskopi**

Fötüsün midesinden, plasenta, kotiledonlar, uterus akıntıları, cerahat, eksudatlar, organlar v.b. otopsi materyallerinden frotiler yapılarak modifiye Erlich Ziehl-Neelsen ve Köster yöntemleriyle boyanarak muayene edilir. Boyamada brusella'lar mavi zemin üzerinde kırmızı renkte görülürler. Ayrıca Gram boyamadan da yararlanılır (Arda 1997).

#### **1.1.6.2 Kültür**

Brucella etkenlerinin kültürü için, genellikle katı besiyerleri kullanılır. Çünkü katı besiyerleri koloni oluşumunu sağladığı gibi dissosiasyonu da sağlar.

Brusella'ların gelişmesi için besiyerinde serum veya Tween-80 bulunması gerektiğinden ilk izolasyonda serum-dekstroz veya Tween-dekstroz agar ve kontaminasyon şüpheli materyalin kültüründe ise antibiyotik katılmış besiyerleri kullanılır. Kanlı agar diğer bakterilerin varlığını anlamak için kullanılması gereken bir besiyeridir. Brucella

mikroorganizmalarının izolasyonu için kullanılan çeşitli besiyerlerinin esasını nutrien agar teşkil eder. Bununla birlikte patates infuzyon, karaciğer ifuzyon agar ile trypticase soy agar, tryptose agar, Brucella albimi agar, Brucella agar gibi hazır ticari besiyerleri de temel besiyerleri olarak kullanılmaktadır (Nicoletti 1980).

Besiyerlerine ekimden sonra etkenin üremesi için petri kutuları %10 CO<sub>2</sub>'li etüve yerleştirilirler ve bir hafta süreyle üremeye bırakılırlar. Bu sürenin sonunda üreyen koloniler morfolojik, kültürel, biyokimyasal, boya testleri, hayvan inokulasyonu ve serolojik yönlerden muayene edilerek etkenin kesin identifikasyonu yapılır (Arda 1997).

### **1.1.6.3. Hayvan Deneyi**

Elde edilen kültürler ve kontaminasyon ihtimali olmayan marazi maddeler, intraperitoneal olarak, kontamine olan materyaller ise (süt, idrar v.s.) subkutan veya kas içi yolla enjekte edilirler. Her örnek için en az iki adet kobay kullanılır. Süt, idrar santrifüje edildikten sonra dip tortu fizyolojik su ile sulandırılıp, 0.5cc sperma bir misli fizyolojik tuzlu su ile sulandırılıp, 0.2 cc miktarında verilir. Amniyon sıvısı, synovial sıvılarıyla, göğüs ve karın boşluğu sıvıları da bir misli fizyolojik tuzlu su ile sulandırılıp 0.5 cc miktarda verilir. Organlardan yapılan emülsiyonda da 0.5-1.0 cc miktarda inokulasyon yapılır. Peynir süspansiyonundan 0.5 cc enjekte edilir (Arda 1997).

İnokulasyon yapılan kobaylardan birisi 3 diğeri ise 6 hafta sonra öldürülür. Kobay öldürülmeden önce serolojik testler için kalpten kan alınır. Otopside; lenf yumrularında büyüme, karaciğerde nekrotik alanlar, dalağın büyümesi, epididimitis, testislerde apse ve eklemlerin şişmesi gibi lezyonlar tespit edildiğinde; karaciğer, dalak, böbrek, uterus ve kemik iliği gibi lezyonlu organlardan uygun besiyerlerine ekim yapılarak etken izolasyonuna gidilir. Alınan kan serumları ile aglütinasyon yapılarak da sonuca varılabilir (Arda 1997).

#### 1.1.6.4 Serolojik Testler

Etken izolasyonu ve identifikasyonu ile Brusellozis'in tam teşhisi konulabilmesine rağmen, çok sayıda hayvan söz konusu olduğu zaman kültürel metodların uygulanması pratik olmaktan çıkar. Ayrıca birçok nedenden dolayı enfekte hayvanlardan her zaman için etken izole edilmeyebilir. Bu sebeplerle Brusellozis'in kontrol ve eradikasyon programlarının çoğu sistematik, serolojik testlerle reaktör hayvanların belirlenmesi ve ayıklanması esasına dayanır. Brusellozis'in indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testlerden yararlanılmaktadır.

##### 1.1.6.4.1. Aglutinasyon Testleri

Uygun bir sıvı ortamda, partiküler formdaki antijenler ile antikorların bağlandıktan sonra kompleksler oluşturarak lattis halinde bir arada kümelenmesidir. İmmunglobulin sınıflarının aglutinasyon oluşturma kapasiteleri değişiktir. Aglutinasyon reaksiyonunda IgM sınıfı antikorlar, IgA ve IgG sınıflarından daha etkilidir. Aglutinasyon testleri pratikte çoğunlukla antikorların saptanması için kullanılır (Diker 1998).

**Plate Test (PT):** Plate testte antijen olarak kristal violet ve brillant gren ile boyanmış fenolle inaktive edilmiş *Br. abortus 1119-3* suşu kullanılır (Altan ve ark. 1975). İlk olarak Huddleson tarafından ileri sürülen bu metod kan serumunun giderek azalan miktarları (0.08, 0.04, 0.02, 0.01) üzerine konsantre ve boyalı antijenden bir damla (0.03 ml) konulması ve karıştırılması suretiyle yapılır (Morgan 1967). Bu testin spesifitesi ve duyarlılığı tüp aglutinasyon testine benzer ve diğer testlerden çoğunlukla daha üstündür (6,61). Ancak çabuk ve basit olarak yapılması, bir fikir vermesi ve inkomple antikorların varlığından daha az etkilenmesi gibi avantajlara sahiptir (Morgan 1967).

Sulandırmalar 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 oranında olur. Reaksiyon 8-10 dk. İçinde okunur. Sonuçlar aşağıdaki tabloda olduğu gibi değerlendirilir.

Rose Bengal Plate test antijeni ilk olarak ABD’de kullanılmaya başlanmış ve *B. abortus* 1119-3 suşu ile hazırlanmıştır. Dr. Pretz tarafından geliştirilen antijen Rose Bengal boyasıyla boyalı olup pH 3.65’te tamponlanmıştır (Altan 1975, Morgan ve ark. 1967, Svetlana ve ark. 2002). Buffer’lanmış Brucella antijen test, Kard testi olarak da modifikasyonları bulunan Rose Bengal Plate testi hem laboratuvarında ve hem de tarama testi olarak sahada kullanılabilir (Bandjevic ve ark 1981, Davies 1971, Morgan ve ark. 1967). Tek sulandırılmalı bir serum aglutinasyon testi olan Rose Bengal Plate test, antijenin asidik (pH 3.65) olması nedeniyle serumdaki IgM aktivitesini engelleyerek IgG’lerin (özellikle IgG<sub>1</sub>) reaksiyona katılmasına yardımcı olduğu gibi nonspesifik aglütininlerin de etkinliğine engel olur (Anon 1986, Bandjevic ve ark 1981). Rose Bengal Plate testinin diğer serolojik testlere göre daha az yanlış negatif reaksiyon verdiği bildirilmiştir (Davies 1971, Nicoletti 1980). Bunun yanında özellikle aşılı hayvanlarda yanlış pozitif reaksiyonlara da rastlanmıştır (Sutherland 1980) ve bu reaksiyonların nedeni olarak aşı sonucu meydana gelen IgM’lerin kros reaksiyon vermesi gösterilmiştir (Sutherland 1980). Kronik vakaları pratik ve çabuk olarak ortaya koyması Rose Bengal Plate testinin, özellikle serum aglutinasyon ve komplement fiksasyon testi ile paralel kullanılmasına neden olmuştur. RBPT sonuçlarının CFT ve antiglobulin testi sonuçlarına yakın olduğu da belirtilmiştir (Altan 1975, Ünel 1972) (Çizelge 1.1.6.4.1.1.).

Çizelge 1.1.6.4.1.1. Çabuk aglutinasyonda değerlendirme

Serum Miktarları				Sığırlarda		Koyunlarda
0.08	0.04	0.02	0.01	Aşılı	Aşısız	
(1/25)	(1/50)	(1/100)	(1/200)			

-	-	-	-	Negatif	Negatif	Negatif
+, -	-	-	-	Negatif	Negatif	Negatif
+	-	-	-	Negatif	Negatif	Şüpheli
+	+, -	-	-	Negatif	Negatif	Şüpheli
+	+	-	-	Negatif	Negatif	Pozitif
+	+	+, -	-	Negatif	Şüpheli	Pozitif
+	+	+	-	Pozitif	Şüpheli	Pozitif
+	+	+	+, -	Pozitif	Şüpheli	Pozitif
+	+	+	+	Pozitif	Pozitif	Pozitif

Lam üzerinde uygulanan çabuk lam aglutinasyonu aynı şekilde rose bengal boyalı tamponlu antijenle de yapılmaktadır (Arda 1997).

**Serum Aglutinasyon Testi (SAT):** Serum aglutinasyon testi, geçmişte ve bugün de Brusellozis'in serolojik teşhisinde kullanılan temel testlerin başında yer almıştır. Bu teste, şüpheli serum tüpler içinde fizyolojik tuzlu su ile 1/5, 1/10,....., 1/640'a kadar çift katlı sulandırılır. Birinci tüpe 0.8 ml, diğerlerine 0.5 ml miktarında tuzlu su konulur, sonra birinci tüpe 0.2 ml serum konulup bundan diğer tüplere 0.5 ml aktararak serum sulandırması yapılır. Sonra her serum dilusyonu üzerine standart antijenden 0.5 ml miktarında konulur ve tüpler karıştırılıp 24 saat 37°C'lik etüvde bırakılır. Sonuç, aglutinasyon durumuna göre 4+, 3+, 2+, + ve – olarak değerlendirilir. Genellikle, 1/40 ve yukarı dilusyonlarda aglutinasyon varsa pozitif, sadece 1/40'a kadarsa şüpheli ve 1/40'ın altında reaksiyon varsa negatif olarak değerlendirilir. Bu sonuçlar aşısız bir sığır için geçerlidir. Aşılı hayvanlarda bu değerler bir titre daha yüksek tutulur (Arda 1997).

Son yıllarda Brusella pozitif serum standardize edilerek internasyonel antibrucella olarak adlandırılmıştır. Bu serumun 1 ml'sinde 1000 internasyonel antikor ünitesi(1000 IU/ml) bulunmaktadır. Aynı zamanda bu serumun 1/500 sulandırılması 2+'lık reaksiyon veren antijen süspansiyonu da standart antijen olarak dikkate alınmıştır. Standart antijenle yapılan aglutinasyon testlerinde, hayvan ırklarına göre bazı kurallar ortaya konulmuştur.

Sığırlar için 100 IU/ml'den düşük titreler negatif olarak değerlendirilmektedir. Danalık aşılması(S19 ile) yapılmış hayvanlarda bu titreler iki misli olarak alınmaktadır(200IU/ml pozitif, 200-100 IU/ml şüpheli, 100IU/ml'den aşağı titreler negatif ). Koyun ve keçiler için 50 IU/ml reaksiyon verenler pozitif ve bu titrenin altı şüpheli olarak değerlendirilmektedir (Arda 1997). Domuzlar için 100 IU/ml pozitif kabul edilmektedir. İnsanlardaki değerlendirme sığırlardaki gibidir.

Diğer taraftan gerek aglutinasyon sonucu ve gerekse aşılama sonrası oluşan antijenler arasındaki ayrıcalığı belirtmek için çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalara göre; aşılama sonrası ilk oluşan antikorlar immunglobulin M (19S)'ler olup infeksiyon sonucu ise immunglobulin G (7S)'ler meydana gelmektedir. Bu bakımdan aşı ve aşızsız hayvanların serolojik olarak ayırt edilmesinde immunglobulin-M'lerin elimine edilmesi esasına dayanan Mercaptoethanol ile inaktivasyon, Rivanol ile çöktürme, Blocking testi ve ısı ile muamele gibi yöntemlere başvurulmaktadır.

Aglutinasyon testinde tüplerde berraklaşma oranları hakkında kolayca karar verebilmek için çeşitli aglutinasyon oranlarını gösteren standart Çizelge 1.1.6.4.1.2.'de belirtilen şekilde yapılmaktadır: ( Arda 1997)

Çizelge 1.1.6.4.1.2. Aglutinasyon testinde tüplerde berraklaşma oranları

Tüp Sırası	Aglutinasyon oranı	Değerlendirme	Antijen Miktarı	Tuzlu Su Miktarı
Tüp 1	%00 Aglutinasyon	(-)	1 ml	-
Tüp 2	%25 Aglutinasyon	(+)	0.75 ml	0.25 ml
Tüp 3	%50 Aglutinasyon	(++)	0.50 ml	0.50 ml
Tüp 4	%75 Aglutinasyon	(+++)	0.25 ml	0.75 ml
Tüp 5	%100 Aglutinasyon	(++++)	-	1 ml

**Süt Serumu ile Aglutinasyon:** Taze sütle lam üzerinde çabuk aglutinasyon testi yapılabilir. Fakat değerlendirmesini yapmak oldukça güçtür.

Süt önce peynir mayası ile kestirilerek kazein çöktürülür ve serum kısmı ayrılır. Bu serumla hem lam üzerinde çabuk aglutinasyon ve hem de tüpte yavaş aglutinasyon yapılabilir. Çabuk aglutinasyon, kan serumu ile yapıldığı gibi uygulanır ve değerlendirilir.



Yavaş aglutinasyon, kan serumuna oranla daha az sulandırmaya tabi tutulur. Şayet 1/20 sulandırmada 2+ veya daha yukarı sulandırmalarda reaksiyon varsa pozitif olarak kabul edilir. Kolostrum ve ekşimiş sütler muayenelerde kullanılmamalıdır (Arda 1997).

**Vaginal Mukusla Aglutinasyon:** Serolojik muayenelerde vaginadan gelen mukus klarifiye edilerek tüpte aglutinasyon testine tabi tutulur (Arda 1997).

**Seminal Plazma ile Aglutinasyon:** Sperma santrifüj edildikten sonra elde edilen seminal plazma ile tüp aglutinasyon testi yapılır (Arda 1997).

#### **1.1.6.4.2. Süt Ring Testi**

Bu test için hematoxylene ve Triphenyl tetrazolium'la boyanmış iki çeşit antijen kullanılır. Türkiyede tetrazoliumla boyanmış kırmızı renkteki antijen kullanılmaktadır. Test için 5-10 hayvanın süt karışımını içeren örnekten 1 ml kadar bir deney tüpüne konur. Bunun üzerine 0.03 ml antijen damlatılarak iyice karıştırılır. Sütler 37°C etüvde 1-1.5 saat inkubasyona bırakılır ve sonuç okunur. Süt kısmı ile krema arasında kırmızı renkte bir halkanın oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir (Verger ve ark. 1980).

Koyun ve keçilerde de sütle yapılan ring test muayenelerinde esas aynıdır. Fakat koyun ve keçi sütlerinde pozitif reaksiyonda, yüzeyde halka oluşumundan ziyade boyalı antijen aglutine olarak tüpün dibine çöker (Arda 1997).

#### **1.1.6.4.3. Coombs (antiglobulin) Test**

Bu yöntem tek reseptöre sahip incomplete antikolların antiglobulin serum aracılığı ile,antijenle birleşip flakonlar teşkil ederek çökmesi esasına dayanır (aglutinasyon

fenomeni). Testin uygulanışı, şüpheli serum ve antijenden başka her hayvan türü için özel olan antiglobulin gerektiğinden güçtür (Arda 1997).

Bazı durumlarda serumda, antijene spesifik antikorlar bulunsa da aglutinasyon reaksiyonu oluşturmayabilir. Bunun nedeni, serumda fonksiyonel olarak monovalan antikorların veya inkomple antikorların bulunmasıdır. Antiglobulin testi, inkomple antikorları saptamak için direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde uygulanır. Direkt testte bakteri veya eritrositler gibi partiküler antijenlere bağlanmış inkomple antikorlar saptanır. Bunun için, aglutinasyon görülmeyen test ortamına antiglobulin ilave edilir. Eğer inkomple antikorlar varsa, anti Ig bunlara bağlanarak aglutinasyon oluşturur. Serumdaki inkomple antikorları saptamak için ise indirekt antiglobulin testi kullanılır. Test için, şüpheli serum antijen partikülleri ile inkübe edilir ve inkomple antikorlar varsa partiküllerin üzerine adsorbe olur. Bu partiküller antiglobulin ile muamele edilirse aglutinasyon oluşur (Diker 1998).

#### **1.1.6.4.4. Komplement Fiksasyon Testi**

Komplement fiksasyon testinin esası, antijen antikor kompleksine bağlanan komplementin eritrositleri lize etmesidir. Testte kullanılacak antijen, amboseptör ve komplementin daha önceden titre edilmiş olması gerekir. Test iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada antijen ve şüpheli serum karıştırılır. Üzerine komplement kaynağı olarak kobay serumu katılır( kobay komplementinin hemolitik aktivitesi çok yüksektir). Eğer şüpheli serumda antikor varsa bu aşamada antijen antikor ile birleşir ve komplement bunlara bağlanır. Eğer serumda antikor yoksa komplement serbest kalır. Komplementin serbest kalıp kalmadığını, dolayısıyla antikorun olup olmadığını anlamak için ikinci aşamada teste hemolitik sistem katılır. Hemolitik sistem, koyun eritrositleri ve buna karşı tavşanda oluşturulan antikorlardan ibarettir. Eğer birinci aşamada antijen-antikor bağlanması olmuş ve komplement bunlara bağlanmışsa, ikinci aşamada katılan hemolitik sistemi lize edecek komplement kalmaz ve eritrositler parçalanmaz. Eğer serumda antikor yoksa komplement serbest olarak kalır ve hemolitik sistemi lize eder. Böylece, testte

eritrositlerin parçalanmadan dibe nokta şeklinde çökmesi pozitif, parçalanarak test ortamının rengini kırmızı yapması negatif sonuç olarak değerlendirilir (Diker 1998).

#### **1.1.6.5. Enzyme Liked İmmunosorbent Assay (ELISA)**

**İndirekt ELISA:**Antikor aramada kullanılan indirekt ELISA testinde, ilk önce hazırlanan antijen polisteren yüzeylerde veya membran filtrede bekletilerek bunlara adsorbsiyonu sağlanır. Yapışmayan antijenler yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra şüpheli serum katılır. Eğer serumda spesifik antikorlar varsa bunlar antijene bağlanır. Bu durumu tespit etmek için ortama enzim (örn: alkalın fosfataz) ile işaretli belli miktarda anti-immunglobulinler katılır (reaksiyona katılan anti-Ig hangi sınıfa spesifikse, serumda sadece o sınıf antikorlar saptanabilir). Her aşamadan sonra reaksiyona girmeyen maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Son olarak da enzim substratı katılarak oluşan reaksiyonun renk değişikliği ile okunması sağlanır. Renk değişikliği gözle veya spektrofotometre ile okunur. Oluşan rengin koyuluğu serumdaki antikor miktarı ile ilişkilidir (Diker 1998).

Albert (1995), 150 sığır ve 45 koyun ile yaptığı çalışmada indirekt ELISA tekniğini, CFT ve SAT ile karşılaştırmıştır. Sonuç olarak tüp aglutinasyon ve CFT'lerin arasında genel bir uyum görülmesi yanında ELISA'nın daha fazla duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Albert 1995). Huang (1987), 221 koyun kan serumu örneğini ELISA ile incelemiş ve ayrıca konvansiyonel testlerden tüp aglutinasyon, CFT ve RBPT'lerini de kullanmıştır. ELISA, tüp aglutinasyon testi, CFT ve RBPT'nin antikorları saptama duyarlılığı sırasıyla, %82.5(52/63), %48.8(20/41), %41.5(17/41), %39(16/41) olarak bulunmuştur.

**Kompetatif ELISA :** Antikor aramak için kullanılan ELISA tekniklerinden birisidir. Katı faza özgül antijen yapıştırılır. Üzerine antikor aranacak materyal ile birlikte enzimle işaretlenmiş antikor beraber eklenir. Materyalde antijene özgül antikor varsa daha aktif olduğundan antijenle bağlanır. Daha sonra yıkama ile enzimle işaretli antikorlar bağlanamadığından yıkama ile uzaklaştırılır. Üzerine substrat eklenir, eğer hasta pozitifse renk oluşmaz çünkü işaretli antikor bağlanamaz ve yıkamayla uzaklaştırılır (Huang 1987).

#### **1.1.6.6. Moleküler İdentifikasyon**

1987'den beri Brusellaya karşı çeşitli PCR tabanlı testler geliştirilmekte ve yayınlanmaktadır. En eski teknik brusellada yüksek miktarda bulunan basit, tek bir genetik lokusa göre dizayn edilmiştir(16S RNA genleri veya BCST31). Bu tip yöntemlerin avantajı duyarlı olması ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Bu tip testler görüntüleme açısından türler veya alt türlerin belirlenmesinin kritik olmadığı durumlarda kullanışlıdır (Bricker 2002).

PCR teknikleri brusella türleri veya alt türlerinin ayrımı için geliştirilmiştir. Bu yöntemler türler/ alt türler arasında değişken özellik gösteren genetik lokuslara yönlendirilmiştir. Bu hedefler brusellaların hepsinde yaygın değildir, brusella cinsi homojendir ve tek bir tür gibi düşünülebilir (Verger ve ark. 1987). Bununla birlikte türler ve alt türlerin kendi içinde büyük çapta silinmeler veya yeniden düzenlenmeler bildirilmektedir (Bricker ve ark. 2000; Cloeckert ve ark. 2000; Ficht ve ark. 1996; Jumas ve ark. 1998). Birçok genetik farklılıklar basit nükleotid polimorfizminden kaynaklanmaktadır. Diferensiyal PCR tabanlı yöntemler epidemiyolojik çalışmalar amacıyla veya tür spesifik eradikasyon programları için kullanılmaktadır. Bununla birlikte ayırım yapabilme yeteneği genellikle daha komplike yöntemlere ilave olarak çeşitli işlem basamakları gerektirir.

Bugüne kadar elde edilen birçok bilgi, kültürü yapılmış bakterinin incelenmesi sayesinde elde edilmişken, birçok laboratuvar, doku, semen, süt ve kan gibi klinik örneklerin direk analizleri için metodlar geliştirmektedirler. Bu yöntemler sonuçları bir an önce belirlenmesi gibi bir avantaja sahiptir. Dezavantajı sıklıkla PCR inhibisyon komponentlerini uzaklaştırmak için yoğun örnek hazırlanmasına ihtiyaç duymaktadır.

#### **Brucella'nın Tür Spesifik İdentifikasyonu**

Brusella için ilk geliştirilen PCR tabanlı yöntem identifikasyon için tür spesifik bölgeye odaklanmıştır. Zamanla birlikte tanımlanan ve kullanılabilir brucella hedef bölgesi sayısı çok azdır. Yayınlanan ilk PCR tabanlı yöntem Fekete tarafından bildirilmiştir (Fekete ve ark. 1990). Bu yöntem *Brucella abortus* S19 suşunun dış membran proteininin 43 kDa gen diziliminden 635- bp ayırımına dayanmaktadır. Yöntemin brucellaya spesifik olduğunu, tüm türlere ve alt türlere uyarlanabildiğini ve oldukça duyarlı olduğunu (yüz bakteriden daha az) yayınlamışlardır. Bununla birlikte primerler ve hedef zincir özel nedenlerden dolayı yayında yer almamıştır, böylece bu ilk yöntem diğer laboratuvarlar tarafından uygulanamamıştır. Ancak başarıları PCR teknolojisinin uygulanabilmesi için daha ileri araştırmalara cesaret vermiştir.

Bir sonraki keşfedilen hedef brucella geni 16S ribosomal RNA genidir (Herman ve ark. 1992). *B. abortus* 16S zinciri Dorsch ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (Dorsch ve ark. 1989). Yazarlar *Brucella abortus* 16S zincirine yönelik primerleri seçmişler ki bunlar diğer birçok bakteride, bu bakteriler arasında *Agrobacterium tumefaciens* de bulunur ve benzerlik gösterir. *Brucella abortus* ve diğer brucella türlerinden saptanan 800 bp ampliconun başarılı amplifikasyonu zincirin iyi korunduğunu ve testin tüm türü kapsayan bir şekilde yapılabileceğini göstermektedir. Spesifiteyi tespit edebilmek için yöntem 17 farklı bakteriye uygulanmıştır. Brusellaya bilinen en yakın aile olan *Ochrhobactrum anthropi* dışındaki brucella türü olmayan herhangi bir bakteriden hiçbir ürün amplifiye edilmemiştir. rRNA operonu brucella spesifik testler geliştirmek amacıyla diğer laboratuvarlar tarafından yaygın olarak kullanılmıştır. Romero ve arkadaşları (1995) 9 farklı primer kombinasyonlarını yöntem geliştirmek amacıyla analiz etmiştir. Sonuçları Herman ve De Ridder'in (1992) sonuçlarına benzerlik göstermektedir. Araştırılan brucellaların tüm türleri yöntem tarafından ortaya konmuştur, *Ochrhobactrum anthropi* dışındaki bakteri türleri negatif sonuç vermiştir.

1992'de BCSP31 gen tabanlı yeni bir PCR yöntemi Baily ve arkadaşları (1992) tarafından yayınlanmıştır. Bu gen klonlanan ve zinciri çıkarılan ilk yayınlanan brucella lokustur. Bu gen fonksiyonu bilinmeyen bir antijenik, periplazmik proteini kodlar. Brusellanın araştırılan tüm türlerinde ve alt türlerinde bulunmaktadır ancak *Brucella ovis*'te ortaya konamamıştır (Bricker ve ark 1988). Baily ve arkadaşları (1992) tarafından geliştirilen PCR yöntemi bir 223 bp ürününü amplifiye etmek için dizayn edilen

oligonukleit primerlerin bir basit parçasını içerir. Yazarlar yöntemin güvenilir, duyarlı ve *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis* için spesifik olduğunu ortaya koymuşlardır. Prosedürün değerlendirilmesi amacıyla kullanılan bakteri panelinde başka bir brusella türüne karşı reaksiyon göstermediği gibi *Ochrhobactrum anthropi*'ye karşı da reaksiyon vermemiştir. Bununla birlikte daha ileri bir araştırma Dacosta ve arkadaşları (1996) tarafından rapor edilmektedir. Bu çalışmada tüm Brusella tür ve alt türleri test edilmiştir. Dacosta ve arkadaşları ayrıca 98 non-Brusella bakterilerini de araştırmışlar ve *Ochrhobactrum anthropi* suşlarından biri dışında tüm suşların amplifikasyonunun negatif olduğunu ortaya koymuşlardır. Yöntem diğer laboratuvarlar tarafından güvenli ve yüksek duyarlılığa sahip olduğu kabul edilmektedir.

### **Brucella Türleri ve Alt Türlerinin PCR ile Ayrımı**

Bazı durumlarda, brusella bakterilerinin tür düzeyinde identifikasyonu çok acil olarak gerekli değildir (ör: insan brusellozunun tanısı veya gıda kontaminasyonu). Bu gibi olgularda cins spesifik PCR yöntemi gereklidir. Bununla birlikte brusella türlerinin bulunduğu ve uygun müdahalenin başlatılması gerekebilecek daha birçok durum mevcuttur. Örneğin brusella eradikasyon programları tip olarak tür spesifiktir ve ilişkili düzenleyici müdahaleler türe bağımlıdır. Yine ayırıcı teknikler enfeksiyon kaynağına bağlı epidemiyolojik araştırmalarda kısmen yararlıdır. Bu amaçla tek biyotip geniş coğrafik alanlarda baskın hale geçmediği müddetçe klasik prosedürler sınırlı kalmaktadır (Bricker 2002).

### **Saha Örneklerinden PCR İle Brucella İdentifikasyonu**

Tekniğin gelişimindeki başlangıç aşamasında test örnekleri genellikle kültüre edilmiş mikroorganizmalardan purifiye DNA'nın elde edilmesi temeline dayanmaktaydı. Bununla birlikte uygulama koşullarında mikroorganizmanın büyümesini beklemeden klinik örnekten direkt olarak mikroorganizmanın identifikasyonu daha uygun olmaktadır. Biyolojik savaş ve diğer acil durumlarda sahada direkt olarak analizin yapılması önemli bir durumdur. İlave olarak infekte veya kontamine materyalin direkt olarak analiz edilebilmesi için metodların geliştirilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir. Bu kaynaklar PCR

inhibitörleri açısından zengin olduklarından dolayı örnek hazırlaması başarının anahtarıdır. Başlangıç örneğinin konsantrasyonu küçük miktarların analiz edilebilmesinden dolayı kabul edilebilir belirleme limitlerine gereksinim duymaktadır.

Veteriner hekimlikte tanısal araç olarak PCR, dokulara (esasen atık fetüs ve ilişkili maternal dokular), kan, süt, nazal sekresyonlar ve semene yönelik olarak düzenlenmiştir. Klinik örneğin her bir tipinden yeterli örnek hazırlanmasında zorluklar vardır. Birçok prosedür bakteriyel DNA salınımı için hücrel lizis gerektirir. DNA'nın yıkanma işlemi genellikle fenol ekstraksiyonu ile DNA'nın alkol presipitasyonu ile gerçekleştirilmekte veya ticari kitlere ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın zorluk DNA ile birlikte PCR inhibitörlerinin ve canlıların DNA'sının materyale karışmasıdır. Böyle problemler ortaya çıktığı durumlarda değişik teknikler uygun bir şekilde yapılmalı ve direkt kültürle duyarlılık teyit edilmelidir (Bricker 2002).

PCR teknolojisi gıda ürünlerine brusella kontaminasyonunun belirlenmesi amacıyla da düzenlenmiştir. İnsan brusellozunun temel kaynağı pastörize edilmemiş yumuşak peynirlerin tüketilmesidir. Buna yönelik olarak birkaç laboratuvar peynir ve diğer süt ürünlerine yönelik PCR tabanlı protokoller geliştirilmektedir. Gıda ürünlerinde herhangi bir brusella türünün varlığı kabul edilemez olduğundan dolayı peynir örneklerinde geliştirilmiş olan protokoller türe spesifiktir. Gıda ürünlerinde brusellanın belirlenmesi için daha fazla ilgiye gerek vardır.

Endemik alanlarda insan brusellozu özellikle *B. melitensis* tarafından kaynaklanıyorsa önemli bir sağlık sorunudur. Tanısal tıbbi test gereksinimi et amaçlı beslenen hayvanlardaki test gereksiniminden farklı olmalıdır. Günümüze kadar insan brusellozundaki tanı araçlarının hedefi örneklerin periferik kanlarıdır (Bricker 2002).

## **1.2 Leptospirozis**

Leptospiralar, 0,1 -0,2x6-20 J.t.m. boyutlarında, gövde kıvrımları çok sık ve düzgün olan sarmal biçimde mikroorganizmalardır. Vücutları bükülebilir yapıda olup bir veya iki ucu çengel tarzında kıvrılmıştır. Bu kıvrımlar etkene çengel, olta, C, S ve L gibi şekiller veririr. Bazılarında bu kıvrık uclar pasajlar sonu kaybolmaktadır. Anilin boyalarıyla kolay ve iyi boyanamayan Leptospiralar Giemsa ve daha iyi olarak da gümüşleme (*Levaditi, Fontana*) yöntemleriyle boyanırlar ve görülebilirler. Leptospiralar Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik mikroorganizmalardır. Flagellaları olmamasına karşın aktif harekete sahiptirler. Bu hareket başlıca 3 tarzda görülür.

- 1-Uzun eksen etrafında dönerek oluşturulan hareket,
- 2-Aksial filamentin kasılarak-genişliyerek meydana getirdiği hareket,
- 3- Kayma hareketidir.

Leptospiraların uçlarının kıvrık durumu, aksial filamentin kasılması sonucu meydana gelir. Uçları kıvrık mikroplar, uzun eksen etrafında dönerse, mikroskop altında daire, tenis raketi, T-harfi ve 8- rakamı gibi görülürler. Leptospiralar ve bunların hareketi en iyi karanlık saha mikroskobu ile incelenebilir. Faz kontrast ve normal ışık; mikroskoplarıyla iyi görülemezler. Karanlık alanda, Leptospiraların gövde kıvrımları, nokta gibi görülür. Elektron mikroskopla çok iyi incelenebilen leptospiraların ortalarında genellikle iki fibrilden oluşmuş bir *aksial filament* bulunur ve gövde bunun etrafında sarılmıştır. Vücut ve aksial filament bir kılıfla dış tabaka muhafaza altına alınmıştır. Hücre duvarı, sitoplazmik membran, nükleer materyal ve sitoplazmik granüller kolayca görülürler. Bazı araştırmacılar, fibrillerden birinin üst-alt, diğerinde alt-üst yönde ve orta bölgede iki uca doğru uzandığını bildirmişlerdir. (Leblebicioğlu H., Sünbül M., 2003)

Aerobik bir üreme karakterine sahip olan Leptospiraların optimal üreme sıcaklıkları genellikle 28-32 °C arasındadır. Ancak, bazı serotiplerin, ilk izolasyonunda inkubasyon sıcaklığının 37 °C olması üreme üzerine olumlu etki yapar. Sonraki pasajlar için tekrar 28-32 °C arası inkubasyon sıcaklığı kullanılır. Leptospiralar kısa eksen boyunca ortadan ikiye bölünerek ürerler ve sıvı ortamlarda üreme durumu gözle çok güç fark edilir. İlk izolasyonda kültürler 4-5 hafta inkubasyonda tutulmalıdırlar.

Leptospiroz, belirtisiz seyreden bir klinik tablodan ölüme kadar değişkenlik gösterebilen, birçok evcil ve vahşi hayvan türünü etkileyebilen, yaygın bir zoonotik



hastalıktır. Leptospiralar için optimum şartlar ılık, nemli, nötral veya hafif alkali sularla kaplı ortamlardır. Mevsimler ve meslekler bulaşmayı kolaylaştıran faktörlerin başında gelir. Yağışlı iklimlerde daha yaygındır (Leblebicioğlu H., Sünbül M., 2003).

### 1.2.1. Etiyoloji

Leptospiroz epidemiyolojisinde rezervuar hayvanların fazla sayıda ve toplu halde bulunmalarının önemi fazladır. Örneğin pirinç üretiminde çalışanlarda da infeksiyonun daha çok farelerin çoğaldığı mevsimlerde görüldüğü bildirilmektedir. Rat, kedi, köpek, keçi, sığır, domuz, geyik, tavşan gibi hayvanlar hatta kuşlar bile etkeni taşıyabilirler. Hayvanlar Leptospiraların son rezervuarıdır. Leptospira rezervuar hayvanlarda genel olarak hastalık tablosu oluşturmaz, kemiricilerde leptospiralar böbreğe yerleşirler ve yıllarca idrarla atılırlar. Dış ortama atılan bakteriler başlıca ciltteki çatlaklar olmak üzere çeşitli yollarla insanlara bulaşabilmektedir. Direk bulaşma sonucu hastalık geliştiğini bildiren raporlar vardır (Bharti ve ark., 2003).

Sığırlardaki Leptospiroz genellikle *L.grippotyphosa*, *L. hebdomatis*, *L.icterohemorrhagiae*, *L. pomona* ve diğer serotipler neden olurlar. Çevreye bu kadar yayılma ve bulaşma olasılığı bulunan Leptospiralar vücuda da çeşitli yollarla girerek infeksiyon oluşturabilirler. Bunlarda özetle aşağıdaki gibidir.

A- İntrauterin bulaşma: Yavru ana karnında iken mikropla infekte olabilmektedir. Gebeliğin ileri döneminde alınan infeksiyon etkenlerinin plasenta aracılığı ile yavruya geçmesi ve infekte etmesi hallerinde yavru ölür ve atılır veya infekte olarak canlı doğar ve sonradan ölür.

B- Postuterin bulaşma: Yavru doğduktan sonra çeşitli yollarla infeksiyonu alması bir kaç tarzda meydana gelebilir.

1- Direk bulaşma

a) Çiftleşme ile: Dişilere infeksiyon doğal ve yapay tohumlama yolu ile bulaşabilir. Bu tarz infeksiyonda, mikrop taşıyan boğalar ve spermaları önemli rol oynarlar.

b) İnhalasyonla: Leptospiuria döneminde idrarla çok sayıda çıkan etken, idrarın zemine değmesi sonu havaya damlacıklar (aerosol) halinde karışması ile yakında veya civarında bulunan hayvanlar soluk havası ile mikropları alabilir ve infekte olabilirler.

c) Mikroplu mataryalle direk temas: Mikrop içeren idrar, süt, uterus akıntıları, yavrular, organ, et, vs. mikroplu maddelerin deri, mukoza, konjuktiva ile direk temas sonu infeksiyon kolayca alınabilir. Su ile yumuşamış sağlam deriden Leptospiralar kolayca girebilirler (Levett PN., 2005)

### 1.2.2. Patogenezis

Leptospiralar en fazla deri, mukoza ve konjunktivalardan vücuda girerek infeksiyon oluştururlar. Vücuda girdikten 4-6 gün içinde kanda çok fazla üreyerek septisemi (*Leptospiraemia*) meydana getirir ve bütün vücuda yayılır. Bu devrede ateş yükselmiştir ve kandan kolayca mikroorganizma izole edilebilir. Ancak, antikorlar henüz kanda görülmemiştir. Birinci haftanın sonunda ve infekte eden etkenin virulensine, miktarına ve üremesine göre antikorlar belirmeye başlar ve giderek titresi artar ve 4-5 hafta içinde en yüksek düzeye ulaşır. Septisemi dönemi sonunda, kanda Leptospiralar azalmaya, antikorlar artmaya başlar ve mikroorganizmalar böbreklere yerleşir ve idrarla dışarı çıkarlar (*Lepstpiruria*). Bu ikinci dönemde mikrop böbreklerden başka karaciğere de yerleşebilir ve bozukluklar yapabilir. Böbreklerde lokalize olan Leptospiralar tubulusların bozulmasına ve nekrotik odaklara yol açarlar. Eğer erken sağaltıma başlanmazsa, böbrekler düzeltilemeyecek kadar bozulabilir (Dieffenbach ve ark 1995).

Laboratuvar hayvanlarından Leptospiralara karşı en duyarlı olanlar hamster, kobay, çinçila ve bir günlük civcivlerdir. Hamster ve kobaylar izolasyon ve karışık kültürlerin saflaştırılmasında kullanılırlar. Hamsterler kobaylardan daha duyarlıdır. *L. icterohemorrhagiae* hem hamster ve hemde kobayları öldürmesine karşın, *L. canicola* kobayları öldürmeyebilir.

İnfeksiyonun inkubasyon süresi vücuda giren Leptospira türünün serotipi, miktarı, virulensi ve konakçının duyarlılığı ile ilişkilidir. Bu süre, genellikle, 5-15 gün arasında değişebilir. Klinik belirtiler başlıca 3 formda belirirler:

1- Akut form: İnfeksiyonun bu formu (*akut leptospirozis*) daha ziyade 3-4 aylık danalarda ve erişkinlerde görülür. Hastalık yüksek ateş (41-42 °C) anoreksia, mukozalarda peteşi, depresyon, akut hemolitik anemi, hemoglobinuri, anuri, sarılık ve mukozalarda solgunlukla kendini belli eder. Ancak yukarda bildirilen klinik belirtilerin hepsi bir hayvan da bulunmayabilir. İnfekte hayvanların idrarlarında hemoglobin, albumin, bilirubin ve urobilinojen vardır.

Hastalığın çok çabuk seyrettiği hallerde (*perukut leptospirozis*) hemoglobinuri görülmeden, ilk klinik belirtiler çıktıktan 5-45 saat sonra ölümler meydana gelebilir. Bu form genellikle, 1-2 aylığa kadar olan buzağılarda görülür.

Süt veren hayvanlarda zamanla süt tamamiyle kesilir. Hayvanların memeleri palpasyonla çok yumuşak bir kıvam alır. Hayvanlar iyileşseler bile süt verimi eski düzeye ulaşamaz. İleri gebe hayvanlar infeksiyon nedeni ile yavrularını atarlar. Abortuslar bazı sürülerde 20-30'a kadar ulaşabilir. Plasenta genellikle içerde kalır. Yavruya ait membran ve göbek kordonu ödemlidir.

Bazı hayvanlarda infeksiyonun eklemlere yerleşmesi sonu sinovitis görülür ve hayvanlar topallar. Bazılarında da derinin çeşitli yerlerinde bacaklarda, meme başlarında, perineal bölgede ve derinin tüysüz yerlerinde nekrotik dermatitis oluşur (Dieffenbach ve ark 1995).

Perakut ve akut dönemde ölümler fazladır. Mortalite % 50'ye ulaşabilir. Kurtulan hayvanların iyileşmesi için uzun bir süre geçer. Hayvanlar, genellikle eski kondisyon ve verimini bulamazlar. Ağır böbrek ve karaciğer bozukluğu olanlar sağıl tıma alınsalar bile tam iyileşmezler.

2- Subakut form: Hastalığın bu formu daha ziyade erginlerde ve akut tablonun daha hafif bir şekli olarak görülür. Ateş, anoreksi, depresyon hemoglobinuri ve diğer bulgular bu dönemde de vardır. Ancak, şiddeti veya derecesi daha hafiftir ve daha az belirgindir. Ayrıca bütün semptomlar da görülmeyebilir. Süt salgısı azalmıştır ve sonraları da kesilir. Abortuslara daha az oranda rastlanır. Bu dönem 1-3 hafta sürebilir.

3- *Kronik form:* Bu tablo ergin hayvanlarda oluşur ve klinik belirtiler çok daha az belirgindir. Hayvanlarda zayıflama, reproduksiyonda düşme ve abortuslar gözlenir. Hastalığın seyri, mortalite ve klinik tablo bölgelere göre değişebilir ve aylarca sürebilir.

Bazı hayvanlarda atipik klinik tabloya ve leptospiral meningoensefalitis'e rastlanabilir. Otopside, anemi, sarılık, subseröz ve submukoz hemorajiler göze çarpar.

Abomazum mukozasında ülser ve hemorajiler, iç organlarda (karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, barsaklarda) kanamalar vardır. Hemoglobininin fazla olduğu olgularda akciğerlerde ödem ve anfizem bulunur. Göğüs karın ve perikart boşluğunda kanlı bir sıvı toplanmıştır. Böbrek büyümüş ve kapsulası altında hemorajik nekrotik odaklara rastlanır. Kronik olgularda intersitisyel nefritis görülür. Karaciğerde büyüme, solgunluk ve sentrilobuler nekrozlar vardır. Lenf düğümleri ödemli ve kanlıdır.

Aborte olmuş fetusun göbek kordonu kalınlaşmış ve ödemlidir. Böbrek ve karaciğer kesitlerinde Levaditi veya Fontana yöntemleriyle, Leptospiraları görmek mümkündür. Hastalığın seyri ve prognozu, oluşan klinik tabloya, infeksiyonun tahribatına ve sağaltımın erken başlamsına göre değişebilir. Perakut ve akut olaylarda meydana gelen hemolitik anemi sonu mortalite % 50 ye kadar çıkabilir. İyileşmeler, anemi böbrek ve karaciğer bozuklukları sonu, çok yavaştır. Bazen de tam bir iyileşme olamaz. İyileşseler bile zayıf verimsiz ve hasta halde olurlar veya başka infeksiyonlara kolayca yakalanabilirler (Dieffenbach ve ark 1995).

### 1.2.3. Teşhis

İnfeksiyonun (öldürücü olması, abortus yapması ve süt verimine etkilemesi) büyük ekonomik zararlara neden olması dolayısıyla erken teşhis hastanın hayatı ve sağlığını için çok önemlidir.

**1.2.3.1. Klinik Teşhis:** Semptomlar eğer tam olarak bulunursa veya olay tipik tablosu ile seyrediyorsa klinik bulgulara dayanarak doğruya yalan teşhis konulabilir. Ancak, infeksiyonun diğer birçok hastalıkların klinik tablosuna benzemesi nedeniyle, bazı karışıklıklar meydana gelebilir. Bazı durumlarda da semptomlar tam teşhise yeterli bir derecede olmayabilir (atipik olgular). Leptospirozis klinik olarak en fazla, babesiozis, anaplasmozis, üzüm posası ve bitki zehirlenmesi, basiller ikterohemoglobinuri ile abortuslar da brusellozis, listeriozis, *Campylobacter fetus* (*Vibrio fetus*) ve *Tritrichomonas foetus* infeksiyonları ile; süttten kan gelmesi ve süttün kesilmesi de diğer etkenlerden ilerigelen mastitislerle karışabilir (Farr, 1995).

**1.2.3.2. Otopsi Bulguları:** Otopsi bulguları da aynı tarzda teşhis için kesin, tam veya yeterli sayılamaz. Böbreklerin büyümesi, kapsula altında nekrozlar, karaciğer bozuklukları ve diğer otopsi bulguları leptospirozis için patognomonik sayılmamalıdır. Histopatolojik muayenede, böbreklerin tubular epitelinde, granülasyon, vakuolizasyon, şişme ve civarda çok sayıda lenfosit ve plazma hücreleri infiltrasyonu bulunur. Karaciğerde sentrilobuler nekrozlar ve lenfosit infiltrasyonları vardır.

**1.2.3.3. Laboratuvar Muayeneleri:** Leptospirozis'in direk ve indirek teşhisinde laboratuvar yöntemleri çok önemlidir ve değerli sonuçlar verir. Muayene için laboratuvara, idrar, kan, serum, böbrek, karaciğer, serebrospinal sıvı vs. gönderilir (Farr, 1995).

**1.2.3.3.1. Bakteriyoskopi:** Etkenin gösterilmesi üzerine dayanan bakteriyoskopi laboratuvar muayenesinin ilk ve önemli basamağıdır. Bunun için aşağıdaki tarzda hareket edilir.

**a)** Leptospiraemia döneminde (hastanın ateşli olduğu dönem ve genellikle ilk 7-10 gün) hayvandan defibrine kan alınır. Bu kandan preparat hazırlanarak karanlık saha mikroskobu ile muayene edilir ve leptospiralar aranır. Bundan sonra eritrositler çok hafif santrifugasyonla çöktürüldükten sonra plazma alınarak muayene edilir. Leptospiralar görülmezse bu takdirde plazma çok kuvvetli santrifüje edilir (5000 dev.jdak-30 dakika) ve tortudan preparat hazırlanarak karanlık sahada muayene edilir ve leptospira aranır, kan almada, antikoagulan madde kullanılır: 1 mL. % 1 oksalat solusyanu (bufferlı, pH. 8.0) + 10 mL. kan için yeterlidir (Farr, 1995).

Kandan yapılan karanlık saha muayenelerinde, leptospiralara çok benzeyen aliyuvarların etrafındaki fibrin uzantıları veya diğer fibriller görülebilir.

**b)** Hayvandan alınan kanla yapılan preparatlar *Giemsa* ile boyanarak; muayene edilebileceği gibi, kongo red ile de negatif boyama yöntemiyle incelenebilirler.

**c)** Leptospiuria döneminde (hastalığın genellikle ikinci haftasından sonraki period) leptopiralar idrarla çıkar ve bu çıkış çoğu kez kesintili olarak sürdürülür. Hastadan aseptik koşullar altında sonda ile idrar alınır ve hemen laboratuvara getirilerek çok hafif santrifüje edilir ve üstten alınan bir damla idrar karanlık sahada muayene edilir. Herhangi bir şey görülmezse, bu sefer idrar 5000 dev. /dk. ile 30 dakika santrifüje edilir ve tortudan (varsa) aynı tarzda muayene yapılır. Sonucun negatif olduğu hallerde, hastadan 6-7 gün sonra tekrar idrar ılınarak muayeneye tabi tutulur. İdrar asit karakterde olduğundan ve leptospiralar üzerine olumsuz etki yapacağından, bunu gidermek için idrar ya hemen kullanılmalı yada pH' sı, steril buffer ile 7.2-7.4 ayarlanmalıdır.

**d)** Böbrek ve karaciğer doku~arından tekniğine uygun olarak kesitler yapılır. ve bunlar Levaditi veya Fontana) gümüşleme yöntemleriyle boyanarak leptospira yönünden muayene edilirler. Leptospiralar bu tekniklerle böbrek veya karaciğer dokuları içinde kolayca görülürler.

e) Eğer elde mevcut serotiplere 6zgü konjugat varsa, fluoresan antikor tekniğinden de yararlanılabilir. İdrar plazma, serobrospinal sıvı dokularda. pl6ra ve periton sıvılarındaki leptospiraları ortaya koymada bu metod son yıllarda fazla kullanılmaktadır.

**1.2.3.3.2. K6lt6r:** Leptospiraları izole etmek ve 6retmek için 6zel besi yerleri kullanılır.

**a) Kandan izolasyon:** Ateşli d6nemde (leptopirama) alınan kan 4 tane 5ml. lik sıvı veya yarı katı besi yerine (Fletcher, EMJH, Korthoff, Stuart, Sch6ffner, v.s) sıra ile 1,2,2,4 damla miktarlarında ekilir. Daha fazla kan. serum içindeki muhtemel antikor nedeniyle 6remeye mani olabilir ve bu sebeble fazla kan ekilmemelidir. Ekilen besiyerleri 28-32 6C. ler arası 5-6 hafta s6re için inkubasyona bırakılır. Besi yerlerin kurumaması için ağızları vidalı kapaklı t6pler tercih edilir. Kontrol için birer hafta aralıkla g6zle (makroskopik) ve karanlık sahada (mikroskopik) muayene uygulanır. Eğer katı ortamlarda kullanılırsa 6reme, y6zeyden 0,5-1,0 cm. kadar aşağıda ve halka tarzında g6r6l6r. Bazı durumlarda ilk izolasyon için 37 6C uygun olmaktadır. Bu nedenle kan inokulasyonlarını çift t6pe yaparak bir serisini de 37 6C. de tutmak daha uygun olur.

Besi yerlerine 5- fluoruracil (pirimidin analogu) katılması (100- 150 mcg./ml.), diğer kontaminatların 6remesine mani olduğundan leptospira izolasyonu bakımından 6nerilmektedir (Farr, 1995).

**b) İdrardan izolasyon:** Hayvanlardan 2 nci haftadan sonra aseptik koşullar altında alınan idrardan direk ekim yapıldıktan sonra geri kalanı, fosfat bufferle veya Stuart sıvı besi yeri ile 1/10 oranında sulandırılır (0,1 ml. idrar + 0,9 mL. sıvı). Bu stok solusyondan, iki katlı (1/20,1/40, 1/80) dilusyonlar hazırlanır. Sonraki haftalarda ise alınan idrarda leptospiralar daha az bulunacağından sulandırılmadan ekimleri yapmak daha uygundur. Dilusyonların birbirinden sıra ile birer damla besi yerlerine (Fletcher, EMJH, DAC, vs) ekilir. 28-32 6C. de 5-6 hafta inkubasyona bırakılır. Ekilen besiyerleri aynı kan k6lt6rleri gibi muayene edilirler.

**c) Serobrosipinal sıvı (SSS) dan izolasyon:** Hastalığın ilk haftasında (7-10 gün içinde) alınan serobrosipinal sıvı (0,5 mL.) çeşitli ortamda (Fleteher, EMJH, DAC), ekilir. Çünkü bu sıvıda, daha az leptospira bulunur. Muayeneler aynı kan ve idrardaki gibi uygulanır.

**d) Otopsi materyallerinden izolasyon:** Hayvan ölür ölmez otopsi yapılarak steril siringa ile sidik kesesinden idrar çekilir ve konvansiyonel tarzda kültürü yapılır.

**e) Beyinden izolasyon:** Beyin çıkarıldıktan sonra çok küçük parçalara ayrılır, suspansiyon yapılır ve yarı katı ortamlara ekilir.

**f) Sulardan izolasyon:** Sudan izolasyon için ya sular çok kuvvetli sarıtrifuje edilir ve tortudan ekim yapılır veya deneme hayvanlarına (çok genç hamster-gerbil) inokule edilir sulardan, en az 5 tane hayvana 1 mL. miktarı, karın içi verilir. Hayvanlar her gün ateş ve diğer klinik semptomlar yönünden incelenir. Ölen hayvan hemen açılır ve organlarından (karaciğer, böbrek, beyin) 1/10 oranında emulsiyon yapılır, sıvı ve yan katı besiyerlerine birer (veya ikişer) damla ekilir. Muayeneler aynen diğerleri gibi uygulanır.

**1.1.3.4. Hayvan Deneyleri:** Leptospiraları izole etmede deneme hayvanlarından fazlaca yararlanır. Bu amaçla en duyarlı olan hamster ve kobaylar fazlaca kullanılırlar. Daha az duyarlı olan civcivlerden ise bazen yararlanır.

Leptospirozis'in teşhisinde kullanılan serolojik testlerin başlıcaları aşağıdaki şekildedir.

**A- Makroskopik lam aglutinasyon testi:** Bu testi uygulamak için önce antijen hazırlamak veya standart antijen kullanmak gerekir. Makroskopik lam aglutinasyon testi için hazırlanan antijen formollü ve konsantredir. Testi uygulamak için lam üzerine şüpheli serumdan 0,02 mL. kadar konur ve buna 1 damla (0.05mL. grup antijenlerden ilave edilerek iyice karıştırılır. Sonra lam 1 dakika kadar sağa-sola bükülmek suretiyle hareket ettirilir. Sonuç, gözle ve pozitif (+), şüpheli (±) ve negatif (-) olarak değerlendirilir. Test sonu pozitif reaksiyon veren serumlar, grupta bulunan serotip antijenlerle teker teker karşılaştırılır. Bir kaç antijenle pozitif reaksiyon elde edildiği durumlarda serum (L/5) sulandırılır ve bundan lamlara



0,04-0,02-0,01 mL. miktarlarında konur ve üzerine standart antijen katılarak reaksiyon yapılır. Arada fark bulunmazsa serum bu sefer O/SO) sulandırılarak aynı işlem yinelenir. Pozitif reaksiyonlar, aglutinasyonun durumuna göre aşağıdaki tarzda değerlendirilir:

4+	%100
3 +	%75
2 +	%50
1 +	%25

**B- Mikroskopik aglutinasyon testi:** Bu aglutinasyon testinde başlıca iki tür antijen kullanılır. Ancak, burada antijen konsantr olmayıp taze sıvı kültürlerden yararlanılır.

**C- Semi mikro test (SMT) ve mikro titre (MT) yöntemleri:** Son yıllarda mikroskopik aglutinasyon testi, SM ve MT yöntemleri ile de yapılmaktadır. Bu metodlar genellikle plastik bloklarda ve çok az materyal. (serum ve antijen) kullanarak uygulanmaktadır.

**D- İndirek-hemaglutinasyon testi:** Koyun (veya insan O) alyuvarlarına adsorbe edilen leptospiral antijenik komponentlerin, şüpheli serumlardaki antikorları ortaya koymada çok duyarlı sonuç verdiği bildirilmiştir.

**E- Komplement fikzasyon reaksiyonu:** Bu test te diğerleri kadar iyi çalışır.

Ancak, antijenin ve reaksiyonun yapılma güçlüğü nedeniyle pratikte pek fazla kullanılmaz (Farr, 1995).

#### 1.2.4. Sağaltım

Leptospirozis teşhisi konduktan sonra yapılacak en önemli iş zaman geçirmeden, yani infeksiyon böbrek ve karaciğerde ağır bozukluklar yapmadan, sağıtıma başlamaktır. Septisemi döneminde antibiyotiklerle başlanan tedavi genellikle iyi sonuçlar verir. Eğer hemolitik anemi başlamış sağıtım güçleşebilir. Sağıtımda aşağıdaki tarzda hareket edilir:

1- Hayvan ayrılır, temiz bir ahıra konur, iyi bir bakım besleme uygulanır.

2- Antibiyotik kürüne alınır. Bu amaçla aşağıda bildirenlerden birisi uygulanır:

a) Streptomisin (veya) dihidrostreptomisin: Bu antibiyotikten 10 mg/kg vücut ağırlığı/günlük doz olarak ve 3-5 gün süre ile kas içi yolla verilir.

b) Streptomisin+penisilin kombinasyonu: Aynı miktar ve dozda streptomisinle birlikte prokain penisilin 20.000 V.L/kg vücut ağırlığı/günlük doz/3 gün süre ile verilir.

c) Klortetrasiklin: Bu antibiyotikten, 5 mg/kg. vücut ağırlığı/günlük doz 5 gün süre ile parentreal verilir.

d) Oksitetrasiklin: 10 mg./kg. vücut ağırlığı/günlük doz/kas içi yolla 5 gün süre ile verilir (Farr, 1995).

### 1.2.5. Leptospira Türlerinin Moleküler Karakterleri

Leptospiraların konvansiyonel yöntemlerle identifikasyonunun zor ve zaman alıcı olması nedeni ile bu alanda moleküler tanı yöntemlerine büyük ilgi duyulmuştur.

DNA restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı yöntemlerde özellikle sığır izolatlarından *L. hardjobovis* A, B, C, genotipleri isimlendirilmiştir.

Ribotiplendirme ise leptospiraların filogenetik klasifikasyonunda 11 adet alt türe ayrılmasını sağlamıştır (Abdulkader, 1997)

PCR çalışmalarında ise 16S ribozomal RNA probu kullanılmış, *L. icterohaemorrhagiae* ve *L. copenhageni* serotipleri multiple restriksiyon enzimleri ile alt türe ayrılmıştır. *L. interrogans* serovars copenhageni ve *L. icterohaemorrhagiae* türlerinin

genetik korelasyon açısından benzerliği de bu yöntemle ortaya çıkarılmıştır. G1 ve G2 primerlerinin 258 bp fragman kullanılarak sekans analizlerinin yapılması sonucu *L. interrogans* sensu ile *L. noguchii* 'nin ayrımı yapılmıştır (Postic ve ark, 2000)

Fakat moleküler yöntemlerdeki kısıtlayıcı faktörler, çok büyük miktarlarda purifiye DNA miktarının kullanılmasını gerektirir.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. GEREÇ**

#### **2.1.1. Materyal**

Bu çalışmada Aydın ili çevresinde bulunan sığırlardan rasgele örnekleme metodu ile toplanmış 200 adet tam kan örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Laboratuara getirilen kan örnekleri mPCR çalışmalarına kadar -20 °C deep freeze'de saklanmıştır.

#### **2.1.2. DNA Ekstraksiyon Kiti**

DNA ekstraksiyonu amacıyla MBI Fermentas<sup>®</sup> firmasının Genomic DNA Ekstraksiyon kiti kullanılmıştır.

#### **2.1.3. DNA Ekstraksiyon Kiti**

Araştırmada MBI Fermentas<sup>®</sup> firmasının 500 U Taq DNA polymerase enzimi kullanılmıştır.

#### **2.1.4. dNTP mix**

Araştırmada MBI Fermentas<sup>®</sup> firmasının içinde her bir dNTP'den 200 µm olan dNTP mix seti kullanılmıştır.

### 2.1.5. Oligonukleotid Primerler

Araştırmada Bailey ve ark (1992) ve Mrien ve ark (1992)'larının kullandığı oligonukleotid primer dizilimleri üretici firmaya dizayn ettirilerek kullanılmıştır. Bu oligonukleotid primer dizilimleri aşağıda belirtilmektedir:

B4 =5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3' ve

B5 = 3'-CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG-5' (Bailey ve ark 1992)

Lep1 = 5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3' ve

Lep2= 3'-TTAGAACGAAGTTACCCCCCTT-5' (Mrien ve ark 1992)

### 2.1.6. Standart Suşlar

Araştırmada *B. abortus* S 19 aşı suşu ve *L. İcterohemorrhagiae* (ADÜ Vet. Fak. Öğr. Üyesi Doç. Dr. Nihat Toplu'dan alınan referans suştur) kullanılmıştır.

### 2.1.7. Agarose

Araştırmada Prona<sup>®</sup> firmasının ürettiği agarose kullanılmıştır.

### 2.1.8. Solusyonlar

**TE buffer** : Araştırmada MBI Fermentas<sup>®</sup> firmasının ürettiği kullanıma hazır pH 9.0 buffer kullanılmıştır.

**TAE buffer** : Araştırmada MBI Fermentas<sup>®</sup> firmasının ürettiği kullanıma hazır buffer kullanılmıştır.

**Ethidium bromide** : Araştırmada Sigma<sup>®</sup> firmasının ürettiği agarose elektroforezi için uygun ethidium bromide solusyonu kullanılmıştır.

### **2.1.9. Kullanılan Cihazlar ve Aletler**

Araştırmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin teşhis laboratuvarında bulunan Thermal Cyclers, Güç Kaynağı, Elektroforez tankları, tarakları,otomatik pipetler, mikro santrifüj, benmari ve diğer alet-ekipmanlar kullanılmıştır.

## **2.2. YÖNTEM**

### **2.2.1. DNA ekstraksiyonu**

Araştırma materyalini oluşturan ve -20 °C deep freeze'de saklanan kan örnekleri oda ısısında çözdürüldükten ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra ilgili kit ile DNA ekstraksiyonuna tabii tutuldu. DNA ekstraksiyonu prosedürü aşağıdaki şekildedir:

1. 200 µl kan örneği 400 µl lizis solusyonu ile aynı epeendorfa knuldu ve 65 °C'de 5 dakika su banyosunda inkube edildi.

2. İnkubasyon sonrasında karışımın üzerine 600 µl kloroform ilave edildi ve 10000 rpm de 2 dk santrifüje edildi.
3. Santrifüjden sonra eppendorf tüpler içinde oluşan beyaz tabakanın üzerindeki sıvı alınarak yeni eppendorflara aktarıldı.
4. Bu üst sıvıların üzerine 800 µl presipitasyon solusyonu ilave edildi ve oda ısısında 2 dk. İnkube edildi.
5. İnkubasyon sonrasında karışım 10000 rpm de 2 dk santrifüje edildi.
6. Santrifüjden sonra eppendorf tüpler içinde oluşan üst sıvı atılarak dipteki pelet bırakıldı.
7. Bu peletlerin üzerine NaCl solusyonundan 100 µl ilave edildi ve peletler çözdürüldü.
8. Peletler üzerine % 96'lık soğuk ethanolden 300 µl ilave edildi ve -20 °C deep freeze'de 10 dk. bekletildi.
9. -20 °C deep freeze'de inkubasyondan sonra 10000 rpm de 4 dk santrifüje edildi.
10. Santrifüjden sonra eppendorf tüpler içinde oluşan üst sıvı atılarak dipteki pelet bırakıldı.
11. Peletler üzerine % 70'lik soğuk ethanolden 300 µl ilave edildi ve karıştırıldıktan sonra 10000 rpm de 4 dk santrifüje edildi.
12. Santrifüjden sonra eppendorf tüpler içinde oluşan üst sıvı atılarak dipteki pelet bırakıldı ve havada kurutuldu.
13. Elde edilen pelet halindeki DNA lar üzerine 100 µl steril deiyonize su ilave edildi ve bu DNA lar PCR işlemine kadar 20 °C deep freeze'de saklandı.

### **2.2.2. DNA amplifikasyonu**

mPCR aşamasında saklanan kan örneklerinden DNA ekstraksiyon kitleri ile prosedüre uygun olarak DNA'lar ayrılmıştır. Brucella ve Leptospira türlerinin varlığının ortaya çıkarılmasında kullanılan mPCR tekniğinde, Baily ve ark. (1992) ile Mérien ve ark. (1992) bildirdikleri cins spesifik baz dizilişleri kullanılmıştır.

mPCR için kullanılan solusyonlar ve bileşenleri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (1 örnek içindir):

İçerisinde 15 µl Milli-Q su, 5 µl taq reaction buffer 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 9.0), 8 µl dNTPmix, 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 10 pm/ml her bir primerden 2.5 µl B4, B5, Lep1 ve Lep2, 0.5 µl Taq DNA polymerase (5 U/ml) ve 10 µl ekstre edilmiş DNA bulunan 50 µl toplam hacimli mikrotüpler kullanılmıştır (Richtsenshain ve ark 2002).

### 2.2.3. PCR

mPCR için hazırlanan master mixler aşağıda belirtilen mPCR koşulları ile PCR işlemine tabii tutulmuşlardır (Richtsenshain ve ark 2002):

Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	3 dk	1 siklus
DNA Denatürasyonu	94 °C	1 dk	35 siklus
Primer bağlanması	60 °C	1 dk	
DNA ekstensiyonu	72 °C	1.5 dk	
Son Ekstensiyon	72 °C	10 dk	1 siklus

### 2.2.4. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

mPCR sonunda elde edilen ürünler % 2 lik agaroz jel elektroforez ile yürütülmüş ve ethidium bromid ile boyanmıştır. Daha sonra UV görüntüleme sisteminde ürünler görüntülenmiştir. 100 bp lik moleküler ağırlık işaretleyicisi (100 bp ladder MBI Fermentas®) satıncı ölçü olarak kullanılmıştır. Amplikonların yaklaşık olarak Brucella sp. için 223 bp ve Leptospira için 331 bp aralığında olup olmadığı gözlemlenmiştir (Richtsenshain ve ark 2002).

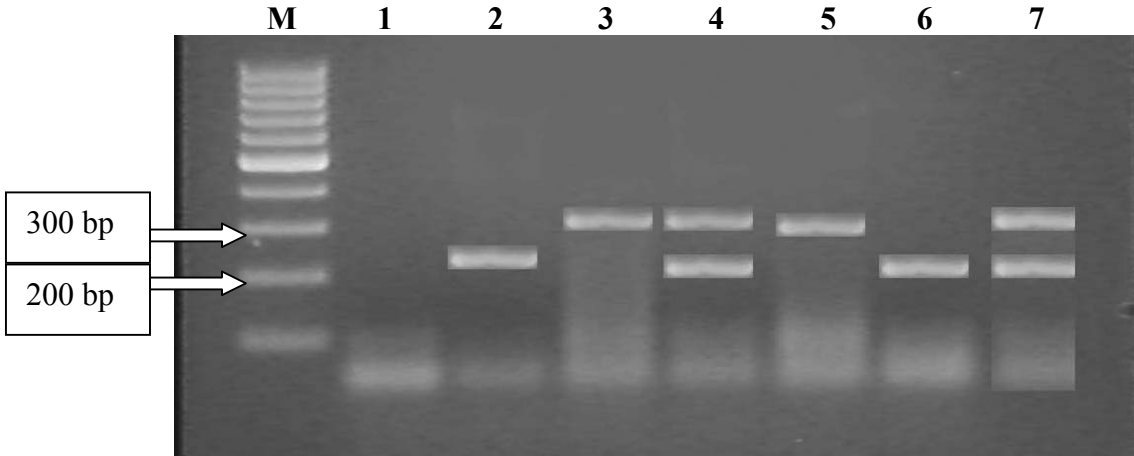
### 2.2.5. mPCR İşleminin Spesifite ve Sensitivitesi



mPCR işleminin sensitivitesi için pozitif kontrol olarak kullanılan *B. abortus* S 19 aşısı suşu ve *L. icterohemorrhagiae* suşlarından  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$ , 3 CFU/ml oranlarında iki seri dilüsyon hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu DNA lar mPCR işlemine tabii tutulmuştur (Richtsenshain ve ark 2002).

### 3. BULGULAR

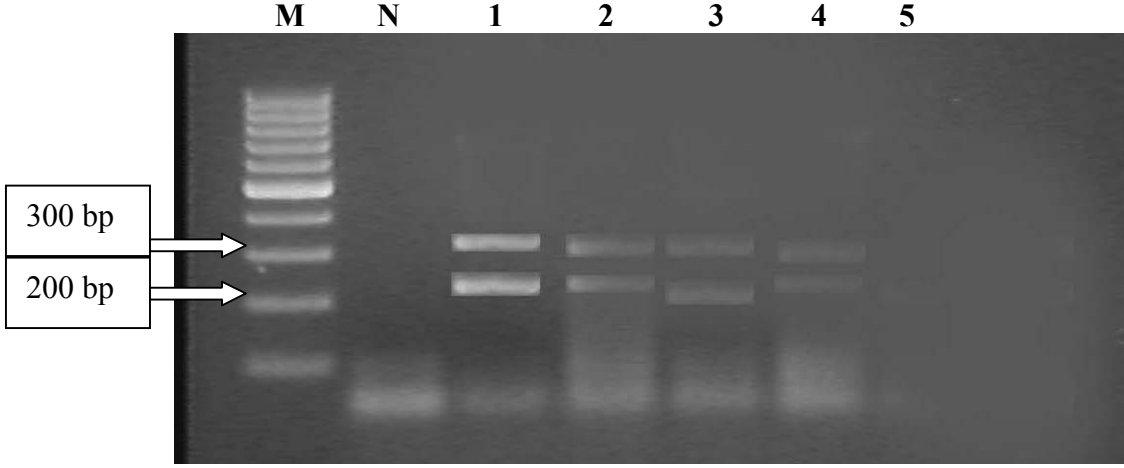
Bu çalışmada Aydın ili çevresinde bulunan sığırlardan rasgele örnekleme metodu ile toplanmış 200 adet tam kan örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Bu kan örneklerinden DNA ekstraksiyonları yapılmış ve *Brucella* ve *Leptospira* türleri için mPCR yapılmıştır. mPCR ürünleri görüntülenmiştir. Bu görüntüleme sonucunda *Brucella sp.* pozitif ürünlerinin yaklaşık olarak 223 bp aralığında ve *Leptospira sp.* pozitif ürünlerinin yaklaşık olarak 331 bp aralığında görüntü oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* için mPCR (*Brucella* türleri için spesifik amplifikon yaklaşık olarak 223 bp ve *Leptospira* türleri için spesifik amplifikon yaklaşık olarak 331 bp aralığındadır). Sütun M: 100 bp'lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100 bp ladder), Sütun 1: negatif kontrol, Sütun 2: *Brucella* pozitif kontrol (*B. abortus* S19 aşısı), Sütun 3: *L. icterohemorrhagiae* pozitif kontrol, Sütun 4: *Brucella* ve *Leptospira* pozitif örnek, Sütun 5: *Leptospira* pozitif örnek, Sütun 6: *Brucella* pozitif örnek ve Sütun 7: *Brucella* ve *Leptospira* pozitif örnek.

mPCR işleminin sensitivitesi için pozitif kontrol olarak kullanılan *B. abortus* S 19 aşısı suşu ve *L. İcterohemorrhagiae* suşlarından  $3 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^2$ ,  $3 \times 10^1$ , 3 CFU/ml

oranlarında iki seri dilusyon hazırlanmıştır. Bu dilusyonlardan DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Bu DNA lar mPCR işlemine tabii tutulmuştur. mPCR sonucunda  $3.10^1$  bakteri/ml oranında sonuç elde edilmiş ve bu metodun hem spesifik ve hem de duyarlı olduğuna karar verilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* için mPCR sensitivitesi. Sütun M: 100 bp'lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100 bp ladder), Sütun N: negatif kontrol, Sütun 1:  $3 \times 10^4$  CFU/ml *Br. abortus* ve *L. icterohemorrhagiae* dilusyonu, Sütun 2:  $3 \times 10^3$  CFU/ml *Br. abortus* ve *L. icterohemorrhagiae* dilusyonu, Sütun 3:  $3 \times 10^2$  CFU/ml *Br. abortus* ve *L. icterohemorrhagiae* dilusyonu, Sütun 4:  $3 \times 10^1$  CFU/ml *Br. abortus* ve *L. icterohemorrhagiae* dilusyonu ve Sütun 5: 3 cell CFU/ml *Br. abortus* ve *L. icterohemorrhagiae* dilusyonu.

Elde edilen mPCR sonuçlarına göre 200 örneğin 77 (% 38.5)'sinde *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* tespit edilmiştir. mPCR pozitif toplam 77 örneğin 24 (% 31.2)'ünde hem *Brucella sp.*'ne hem de *Leptospira sp.*'ne ait bantlar ortak olarak görülmüştür. Kalan 53 (% 68.8) örneğin 33(% 62.3)'ü sadece *Brucella sp.* ve 20 (% 37.7)'si ise sadece *Leptospira sp.* için pozitif bulunmuştur.

Yapılan bu araştırma sonucunda 200 adet sığırın 77 (% 38.5)'sinde Brucellosis ve Leptospirosis enfeksiyonlarının bulunduğu ve 123 (% 61.5)'ünde ise Brucellosis ve Leptospirosis enfeksiyonlarının bulunmadığı görülmüştür.

## 4. TARTIŞMA

Brucella türlerinin PCR ile çeşitli marazi maddelerden identifikasyonunda, saf kültürlerle çalışılmak üzere değişik metodlar kullanılmıştır (Fekete ve ark., 1990; Herman ve Ridder, 1992; Romero ve ark., 1995a). Ayrıca sığırlardan elde edilen süt ve kan örnekleri (Leal-Klezevas ve ark., 1995), peynir örnekleri (Serpe ve ark., 1999), insan kan örnekleri (Matar ve ark., 1996 ; Queipo-Ortun˜o ve ark., 1997) ve doğal enfekte ineklerden elde edilen örnekler de kullanılmıştır (Gallien ve ark., 1998). Yavru atma ile seyreden Brusellozis olgularında ise infeksiyon etkenlerinin PCR ile sığırlarda ve koyunlarda değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Fekete ve ark., 1992; Çetinkaya ve ark., 1999).

Leptospira türlerinin PCR ile belirlenmesinde ise sığırlardan elde edilen idrar örnekleri (Van Eys ve ark., 1989), deneysel olarak kontamine edilmiş olan kan örnekleri, idrar ve serebrospinal sıvı (Me'rien et al., 1992), saf olarak izole edilmiş mikrobiyolojik kültürler (Woodward ve ark., 1991), deney hayvanı olan gerbillerden alınan kanlar, deneysel olarak kontamine edilmiş olan domuz böbrekleri (Savio ve ark., 1994), damızlık boğaların sperma, kan ve idrar örnekleri ve insanlardan alınan serebrospinal sıvı örnekleri kullanılmıştır (Romero ve ark., 1998). Fakat yavru atma ile karakterize Leptospirozis olgularında klinik örneklerden elde edilen örnekler için standart bir PCR metodu kullanılmamıştır (Leonardo ve ark., 2002).

Brucella türlerinin PCR ile belirlenmesinde mikrobiyolojik kültürün referans test olarak kullanılabildiğini belirten bazı çalışmalar vardır. Fekete ve ark. (1992), sığırlardan alınan klinik örneklerden % 98 sensitivite ve % 96 spesifite göstermiş olan, *B. abortus* türünün 43 kDa dış membran protein geni ile hedeflenmiş primer sekans dizilimleri ile yaptıkları çalışmada mikrobiyolojik kültür kullanmışlardır. Çetinkaya ve ark. (1999), atık olarak doğan kuzuların gastrik içeriklerinden izole ettikleri mikrobiyolojik kültürlerden yaptıkları çalışmada 16S rRNA ile hedeflenmiş primer sekans dizilimleri ile yaptıkları çalışmada ise % 80 sensitivite ve % 91 spesifite belirlemişlerdir. Rijpens ve ark. (1996), Brucella etkenlerinin süttten izolasyonunda etkenlerin süttün yağlı kısmına çok büyük

affinite duyduklarını bildirmiş ve süt komponentlerinin enzimatik ekstraksiyonuna dayalı yaptıkları PCR çalışmasında  $2.8 \times 10^4$  sensitivite rapor etmişlerdir.

Ana ve ark. (1997)'nin, Brucella cinsinin *B. abortus* (biyovar 1), *B. canis*, *B. ovis*, *B. melitensis* (biyovar 1), *B. suis*, *B. neotoma* olmak üzere 6 adet türü ile yaptıkları çalışmada ise çalışmanın konusu olan türlerin hepsinin spesifik amplifikasyona dayalı sonuçlar verdiğini bildirmiştir. Primerlere bağlanma sıcaklık derecesi olarak 66 °C kullanılmış ve böylece Omp2 gen lokuslarının primerlere daha spesifik olarak bağlanacağı belirtilmiştir. Fakat sonuçlarda sırasıyla 900 bp, 720 bp, 600 bp ve 200 bp elektroforetik bant olmak üzere 4 adet farklı sinyal amplifikasyonu saptadıklarını da belirtmiştir. Elde edilen farklı amplifikasyonlara rağmen Brucella türlerinde bulunan porin dış membran proteinini kodlayan Omp2 geninin sekans analizlerinde ortaya çıktığını bildirmiştir (Ana ve ark. 1997).

Moriyon ve Berman (1982) Brucella etkenlerinin hücre duvarlarının diğer gram negatif bakterilere göre noniyonik deterjanlar, EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), Tris gibi çözücülere daha dayanıklı olduğunu bildirmiştir. Bundan dolayı Brucella bakterilerinin hücre duvarlarının lize edilebilmesi için ekstraksiyon aşamasında uygun lysis solusyonlarının kullanılmasını gerektiğini bildirmişlerdir.

Bricker ve ark. (1995), *B. abortus* S19 aşısı suşundan elde edilen DNA ürünlerinin amplifikasyonunda  $10^6$  ölü bakteri ve 5 ng purifiye genomik DNA (her örnekte 50 µl) kullanılması gerektiğini bildirmiştir. Ayrıca Bricker ve ark. (1995), *B. abortus* 544, S19, 2308 ve RB51 aşısı suşlarından elde edilen genlerin, 35 siklus olmak üzere 94 °C'de 1.2 dakika, 55,5 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika olmak üzere yaptıkları PCR çalışmasında *B. abortus* 544 ve S19 suşlarından elde edilen DNA'ların 498 bp aralıkta bant verdiği, *B. abortus* 2308 ve RB51 suşlarından elde edilen genlerin de 364 bp aralıkta bant verdiğini bildirmiştir.

Aşısı suşları da PCR çalışmalarında kontrol grubu olarak kullanılabilen, hem de üretilen aşısı ürününün kesin olarak hangi suşa ait olduğu belirlenebilmektedir. (Bricker ve ark., 1995). Özellikle *B. abortus* S19 suşu, mikrobiyolojik kültür metoduyla çoğaltılabilir

fakat bu yöntem hızlı değildir ve kontaminasyon tehlikesi bulunmaktadır. Bu suşun katı besiyerinde kolayca üretilmesi için besiyerine eritritol katılması gerektiği de bildirilmiştir (Jones ve ark., 1965), böylece 702 bp aralıkta eritritolu katabolize eden eri adlı lokus da saptanabilmektedir (Sangari ve ark., 1994).

Saad ve ark. (1997), *Leptospira* etkenlerinin boğa spermalarında, idrarında ve serumunda saptanabilmesi için PCR yönteminin, FAT (Floresan Antikor Testi) ve MAT (Mikroskopik Aglutinasyon testi) yöntemlerine göre daha hızlı ve duyarlı olduğunu belirtmiştir. FAT ve MAT testi doğal enfeksiyon geçiren hayvanları ve aşı uygulanmış hayvanların ayırımında herhangi bir etkinlik gösterememiştir. Mikroskopik Aglutinasyon testi, deneysel olarak enfekte edilmiş boğaların serumlarında 50 µl örnekte sadece 1:50 oranında titre gösterdiği bildirilmiştir (Saad ve ark. 1997). 50 µl serum PCR çalışmasında kullanıldığında deneysel infeksiyondan sonra 1 hafta içinde *Leptospira* etkeninin belirlendiği bildirilmiştir (Saad ve ark. 1997).

Belirtilen tüm araştırmalarda *Brucella* ve *Leptospira* türleri ayrı ayrı çalışılmış ve Richtzenhain ve ark. (2002) yaptığı multiplex PCR araştırmasına kadar bu iki türün bereaber araştırılması düşünülmemiştir. Richtzenhain ve ark. (2002)'nin araştırması ile *Brucella* ve *Leptospira* türlerinin tek bir tüp içerisinde mPCR ile tanısının yapılabileceği ve bu işlemin sensitivitesinin % 100.0 ve spesifitesinin ise % 92.0-93.0 oranlarında olduğu belirtilmektedir. Ayrıca mPCR ile bu iki patojen bakterinin daha duyarlı ve daha hızlı bit şekilde rutin laboratuarlarda tanısının yapılabileceği de belirtilmektedir.

Araştırmamızda da bu verilerden yola çıkarak, *Brucella* ve *Leptospira* türlerinin sığırlarda mPCR ile tanısının yapılabileceğine karar verdik. Çalışmamızda sığırlardan alınan kan örneklerinden DNA purifikasyon kiti ile nükleotidlerinin ayrılması ve multipleks PCR ile moleküler tiplendirilmesi yapılmıştır. Elde edilen mPCR sonuçlarına göre 200 örneğin 77 (% 38.5)'sinde *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* tespit edilmiştir. mPCR pozitif toplam 77 örneğin 24 (% 31.2)'ünde hem *Brucella sp.*'ne hem de *Leptospira sp.*'ne ait bantlar ortak olarak görülmüştür. Kalan 53 (% 68.8) örneğin 33(% 62.3)'ü sadece *Brucella sp.* ve 20 (% 37.7)'si ise sadece *Leptospira sp.* için pozitif bulunmuştur. Kan örneklerindeki düşük miktarlarda olan etkenin belirlenmesi açısından uygulanan mPCR yönteminin % 98 oranında sensitiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Yapılan bu araştırma sonucunda 200 adet sığırın 77 (% 38.5)'sinde Brucellosis ve Leptospirosis enfeksiyonlarının bulunduğu ve 123 (% 61.5)'ünde ise Brucellosis ve Leptospirosis enfeksiyonlarının bulunmadığı görülmüştür.

Mikrobiyolojideki konvansiyonel yöntemler dikkate alındığında moleküler yöntemin, klasik kültür yöntemlerine göre daha hızlı ve daha duyarlı sonuçlar verdiği görülmüştür.

Ayrıca tek lokus dizilimi prensibine göre çalışan PCR metoduna göre de aynı anda iki türe ait bakterilerin ortaya çıkarılmasında multipleks PCR yönteminin optimal düzeyde kullanılabilir olduğu ortaya çıkmıştır.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışmada Aydın ili ve çevresinde bulunan sığırlardan toplanan 200 adet kan örneğine DNA ekstraksiyonu uygulanmış ve *Brucella* ve *Leptospira* etkenlerine ait genetik materyal araştırılmıştır.

Yapılan mPCR sonucunda sensitivite  $3.10^1$  bakteri/ml oranında olduğu görülmüş ve mPCR sonuçlarına göre 200 örneğin 77 (% 38.5)'sinde *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* tespit edilmiştir. mPCR pozitif toplam 77 örneğin 24 (% 31.2)'ünde hem *Brucella sp.*'ne hem de *Leptospira sp.*'ne ait bantlar ortak olarak görülmüştür. Kalan 53 (% 68.8) örneğin 33(% 62.3)'ü sadece *Brucella sp.* ve 20 (% 37.7)'si ise sadece *Leptospira sp.* için pozitif bulunmuştur. 200 adet sığırın 123 (% 61.5)'ünde ise Brucellosis ve Leptospirosis enfeksiyonlarının bulunmadığı görülmüştür.

Kullanılan multipleks PCR metodunun, gerek klasik mikrobiyolojik yöntemler ve serum analiz yöntemlerine, gerekse tek gen hedefli PCR yöntemlerine göre daha hızlı ve kesin sonuç verdiği, rutinde kullanımının pratik ve güvenilir olduğuna karar verilmiştir.



## ÖZET

### Sığırlarda *Brucella* ve *Leptospira* Türlerinin Multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (mPCR) ile Tanımlanması

Bu çalışmada Aydın ilindeki sığır sürülerinden 200 adet kan örneği materyal olarak toplandı. Bu kan örneklerinden DNA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra *Brucella* ve *Leptospira* bakterilerine ait spesifik genlerin multipleks PCR yöntemi ile identifikasyonu yapıldı. Yapılan multipleks PCR sonucunda 200 örneğin 77 (% 38.5)'sinde *Brucella sp.* ve *Leptospira sp.* tespit edilmiştir. mPCR pozitif toplam 77 örneğin 24 (% 31.2)'ünde hem *Brucella sp.*'ne hem de *Leptospira sp.*'ne ait bantlar ortak olarak görülmüştür. Kalan 53 (% 68.8) örneğin 33(% 62.3)'ü sadece *Brucella sp.* ve 20 (% 37.7)'si ise sadece *Leptospira sp.* için pozitif bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmada konvansiyonel mikrobiyolojik kültür yada serum analiz teknikleri ile *Brucella* ve *Leptospira* türlerinin tayini konusunda meydana gelen hatalı sonuçların ve kontaminasyon tehlikesinin hassas ve hızlı bir teknik olan multiplex PCR yöntemi ile elimine edilmiştir. Ayrıca her iki bakteri türünün identifikasyonunda da zaman kaybetmeden güvenilir sonuç alınabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella sp.*, *Leptospira sp.*, Multiplex PCR

## SUMMARY

### Detection of *Brucella* and *Leptospira* by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Cattle

In this study, blood samples of 200 cattle in Aydin region were collected. After the extraction of DNA, the specific genes related *Brucella* and *Leptospira* species were detected by multiplex PCR method and identified. As a result of this multiplex PCR study for 200 samples, *Brucella sp.* and *Leptospira sp.* was detected from 77 (38.5%) samples. mPCR positive out of 77 samples, 24 (% 31.2) of them have shown bands both related to *Brucella s.p* and *Leptospira sp.* From the remaining 53 (% 68.8) samples, 33(% 62.3) of them have shown positive bands only related to *Brucella sp.* and 20 (% 37.7) of them have shown positive bands only related to *Leptospira sp.*

As a result, the danger for contamination of samples and false statements in detection of *Brucella* and *Leptospira* by conventional methods and serum analysis methods were eliminated by multiplex PCR. In addition, trustworthy results would be obtained for identification of these two bacteria species without time expansions.

**Keywords:** *Brucella sp.*, *Leptospira sp.*, Multiplex PCR

## KAYNAKLAR

**Abbas F, Andreassen JR, Jackwood MW** (1996) *Development of a polymerase chain reaction and a radioactive DNA probe for infectious laryngotracheitis virus*. Avian Dis., 40: 56-62.

**Abdulkader R** (1997) *Acute renal failure in leptospirosis*. Renal Fail. 19:191–198.

**Adzahr A, Shaw K, Britton P, Cavanagh D** (1996) *Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction*. Avian Pathol., 25: 817- 836.

**Akın A, Lin TL** (1999) *Amplification and cloning of infectious bursal disease virus genomic RNA segments by long and accurate PCR*. J. Virol. Methods, 82 (1): 55-61.

**Altan GG, Jones LM, Peitz DE** (1975) *Laboratory techniques in Brucellosis, 2<sup>nd</sup> edition Geneva*, World Health Organisation, Monograph, No:55.

**Ana M, Hugo A.** (1997) *Barrera-Saldaina Molecular Medicine*, Volume 3, Number 11, November 1997 734-739.

**Anon J** (1986) *Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Genova WHO Technical Report 6<sup>th</sup> Report*, Series No:740.

**Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS** (1997) *Özel Mikrobiyoloji Gram Negatif Küçük Çomaklar Brusella İnfeksiyonları, Medisan Yayın Serisi No:26, 4. Baskı* 110-124.

**Bandjevic B, Bajrovic T** (1981) *Rose Bengal Test u seroloskoj dizagnostici Brucelloza*, Ljudi Zivotinja Veterinaria, 30, 71-81.

**Betsy J, Shirley M** (1999) *Halling Journal Of Clinical Microbiology*, June 1995, P. 1640–1642.

**Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S** (2000) *Molecular characterization of Brucella strains isolated from marine mammals*. J. Clin. Microbiol. 38, 1258-1262.

**Cetinkaya B, Ongor H, Muz A, Ertas HB, Kalender H, Ergogan HM** (1999) *Detection of Brucella species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR*. Vet. Rec. 144, 239–240.

**Davies G** (1971) The Rose Bengal Test Bull of Epiz, 76, 717-720.

**Dieffenbach CW, Dveksler GS** (1995) *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 714.

**Diker KS** (1998) *İmmunoloji*. Medisan Yayın Serisi:37, Birinci Baskı.

**Farr RW** (1995) *Leptospirosis*. Clin Infect Dis 1995; 21: 1-8.

**Fekete A, Bantle AJ, Halling SM** (1990). *Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction*. J. Appl. Bacteriol. 69, 216–227.

**Ficht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden SW** (1996) *Species-specific sequences at the omp2 locus of Brucella type strains*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 329-331.

**Heinemann MB, Garcia JF, Nunes CM, Gregori F, Higa ZM, Vasconcellos SA, Richtzenhain LJ** (2000) *Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism*. Vet. Microbiol. 73, 261–267.

**Herman L, Ridder H** (1992) *Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction*. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2099–2101.

**Huang HB** (1987) *Use of a Biotin-Avidin ELISA for detecting Brucella Antibodies in sheep*. Chinese J. Vet. Sci. Tech., 10, 3-7.

**Jones LM, Montgomery V, Wilson JB** (1965) *Characteristics of carbon dioxide-independent cultures of Brucella abortus isolated from cattle vaccinated with strain 19*. J. Infect. Dis. 115:312–320.

**Leblebicioğlu H, Sünbül M** (2003) *Leptospirosis: Diagnosis and treatment*. Infectious Diseases for Clinician 2003;172-174.

**Levett PN** (2005) *Leptospirosis Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition*. New York, Churchill Livingstone 2005;2789-2794.

**Me'rien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I** (1992) *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples*. J. Clin. Microbiol. 30, 2219–2224.

**Morgan WJB** (1967) *The serological diagnosis of bovine Brucellosis*, Vet. Rec., 80, 612-620.

**Moriyo'n I, Berman DT** (1982) *Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the Brucella cell envelope*. J. Bacteriol. 152:822–828.

**Nicoletti P** (1980) *The epidemiology of bovine Brucellosis*, Adv. Vet. Sci. Comp. Path, 24, 69-97.

**Postic D, Riquelme-Sertour N, Merien F, Pe'rolat P, Baranton G** (2000). *Interest of partial 16S rDNA gene sequences to resolve heterogeneities between Leptospira collections: application to L. meyeri*. Res. Microbiol. 151:333–341.

**Rachel AM, Britigan E** (1997) *Role of oxidants in microbial pathophysiology*. Clin. Microbiol. Rev., Jan. 1997, p. 1-18.

**Richtzenhain, L. J., Cortez, A., Heinemann, M. B., Soares, R. M., Sakamoto, S. M., Vasconcelos, S. A., Higa, Z. M., Scarcelli, E., Genovez, M. E.** (2002) *A multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses*, Vet. Microbiol., 87: 139-147.

**Rijpens NP, James G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman L** (1996) *Direct detection of Brucella spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes*. Appl. Environ. Microbiol. 62:1683–1688.

**Romero C, Gamzo C, Pardo M, Lo'pez-Goni I** (1995a) *Specific detection of Brucella DNA by PCR*. J. Clin. Microbiol. 33, 615–617.

**Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lo'pez-Goni I** (1995b) *Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle*. J. Clin. Microbiol. 33, 3198–3200.

**Saad A, Phuong T, Pamela S, Howard CJ** (1995) *A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Leptospira spp. in Bovine Semen*. J Vet Res 1997; 61: 15-20.

**Sangari FJ, Garcí'a-Lobo JM, Agüero J** (1994) *The Brucella abortus vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes*. FEMS Microbiol. Lett. 121:337–342.

**Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML** (1994) *Detection and identification of Leptospira interrogans serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA*. J. Clin. Microbiol. 32, 935–941.

**Smith LD, Ficht TA** (1990) *Patogenesis of Brucella*. Crit. Rev. Microbiol., 17:209.

**Sutherland SS** (1980) *Immunology of bovine Brucellosis*, Vet. Bul., 50, 359-368 A.

**Svetlana B, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M** (2002) *Identification of the Brucella melitensis Vaccine Strain Rev.1 in Animals and Humans in Israel by PCR Analysis of the PstI Site Polymorphism of Its omp2 Gene*. Journal Of Clinical Microbiology, Apr. 2002, p. 1475–1480 Vol. 40, No: 4.

**Ünel S** (1972) *Rose Bengal Plate Test ve önemi*, Türk Mikrob. Cemiyeti Derg., 2, 47-52.

**Van Eys GJJM, Gravekamp C, Gerritsen MJ, Quint W, Cornelissen MTE, Ter Schegget J, Terpstra WJ** (1989) *Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction*. J. Clin. Microbiol. 27, 2258–2262.

**Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Grayson M** (1985) *Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 292-295.

**Woodward MJ, Redstone JS** (1993) *Differentiation of Leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism*. Vet. Rec. 132, 325–326.

**Woodward MJ, Sullivan J, Palmer NMA, Woolley JC, Redstone JS** (1991) *Development of a PCR test specific for Leptospira hardjo genotype bovis*. Vet. Rec. 128, 282–283.



## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında Aydın`da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimini Aydın`da tamamladıktan sonra 2001 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım ve 2006 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldum. Aynı yıl içinde Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak Yüksek Lisans eğitimine başladım. Halen öğrenimine devam etmekteyim. Yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim.



## TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans tez konusunun seçimi ve çalışmaların yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Yrd. Doç. Dr. Şükrü KIRKAN'a, çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Osman KAYA'ya ve tüm Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ile değerli mesai arkadaşım Araştırma Görevlisi Serten TEKBIYIK'a, Leptospira pozitif kontrolünü sağlamamda yardımcı olan Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nihat TOPLU'ya ve ayrıca çalışmalarımnda manevi destek veren aileme sonsuz teşekkür ederim.