

BÖLÜM 13

***Brucella* TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYON VE GENOTİPLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN GÜNCEL MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

Tülin GÜVEN GÖKMEN¹

GİRİŞ

Brusellozis dünyada, özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde, Ortadoğu, Batı Asya, Afrika ve Güney Amerika' da endemik olarak görülen en yaygın zoonotik hastalıktır⁽¹⁾. Sığır, koyun, keçi, domuz ve köpek gibi memelileri infekte eden *Brucella* türleri; solunum yolu, deri ve mukoza yolu, kontamine süt ve süt ürünleri veya doğrudan hasta hayvanlara temas ile bulaşır. Ülkemizde de oldukça sık görülmekte ve halen önemini korumaktadır⁽²⁾.

Brucella türlerinin tanısında insanlarda altın standart olarak kültür yöntemi kullanılmakta, serolojik test olarak Serum Aglütinasyon Testi (SAT) diğer adıyla Wright testi tercih edilmektedir. Ancak, bu test IgG ve IgM ayrımı yapamadığı için 2-ME (Merkaptoetanol) veya ELISA testi ile desteklenir. Ayrıca tarama testi olarak Rose-Bengal testi kullanılabilir. Klinik olarak şüpheli ancak aglütinasyon testleri negatif olan hastalara ise Coombs testi uygulanmaktadır. Son yıllarda dipstick testler ile de duyarlılığı %90'ın üzerinde olan sonuçlar elde edilmektedir⁽³⁾.

Hayvanlarda brusellozis tanısında ise sahada tarama çalışmalarında en çok Rose-Bengal testi ve bazı ülkelerde Brucellin testi tercih edilmektedir. Kültür yöntemleri altın standart olarak değerini korumaktadır. Hasta hayvanların kan örneklerine; Çabuk aglütinasyon testi, Serum aglütinasyon testi, Kompleman fiksasyon testi, Coombs testi, ELISA, Pasif hemaglütinasyon testi ve Floresan antikor testi gibi serolojik testler uygulanır. Süt örneklerinde *Brucella* spp. etkenleri Ring testi ile tanımlanabilirken, süt serumu, atık yavrunun kas sıvısı, vajinal mukus ve sperm örneklerine aglütinasyon testleri yapılabilir. Ayrıca bakteriyofaj uygulamaları da yapılmaktadır⁽⁴⁾.

Hem insanlarda hem hayvanlarda *Brucella* türlerinin tanımlanmasında kullanılan tüm bu konvansiyonel yöntemler tür ve biyotip düzeyine kadar identi-

¹ Doç. Dr., Çukurova Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, tguven@cu.edu.tr

metodudur. Ancak *Brucella* türlerinin genomunda görülen yüksek homoloji nedeniyle MLVA yöntemi kadar etkili olmadığı düşünülmektedir⁽⁴¹⁾. Yapılan bazı çalışmalarda ise PFGE yönteminin etkin bir genotiplendirme metodu olabileceği bildirilmiştir⁽⁴⁶⁾. Restriksiyon enzimi olarak *XbaI* enzimi tercih edilebilir. Kesim sonucu oluşan DNA fragmentleri, belirli sürelerle 3 yönden verilen elektrik akımı ile jel içerisinde moleküler ağırlığına göre ilerler. Bu elektroforez cihazlarında elektrotlar farklı açılarla dizilmiştir ve elektroforez bant bükülüklerinden dolayı oldukça uzun sürmektedir. Oluşan DNA paternleri özel yazılım programları ile değerlendirilir. Patern kıyaslamaları bant bazlı Dice coefficient ile, dendrogramlar ise UPGMA analizi ile yapılabilmektedir⁽⁴⁷⁾.

Whole-Genome Sequencing-SNP Analizleri

Eski dönemlerde bir bakterinin tüm genom analizini zahmetli, pahalı ve uzun süre gerektirirken, yeni nesil dizileme teknolojileri ile tüm genom verileri oldukça erişilebilir hale gelmiştir. Özellikle SNP bölgelerinin tespiti ile genotipik ilişkiler kolaylıkla değerlendirilebilmektedir. Etkenin potansiyel kökenlerinin ve yayılımının tespitine, aşı ve saha suşlarının ayırımına imkân sağlamaktadır⁽⁴⁸⁾. Ancak veritabanlarında henüz yeterli sayıda izolatin tüm genom profilinin bulunmaması, çalışmalarda kıyaslama yapılacak izolatların eksikliğine ve trace-back analizlerin yapılamamasına neden olur⁽⁴⁹⁾.

KAYNAKÇA

1. Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H., et al. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 2007; 7, 775-786.
2. Yilmaz, B., Ozdemir, G., Aktas, E., et al. Brucellosis suspicion is the most important criterion for diagnosis particularly in endemic regions. *Open Orthopaedic Journal*, 2016; 29, 10.
3. Yagupsky, P., Morata, P., Colmenero, J. D. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clinical Microbiology Review*, 2019; 33, e00073, 19.
4. OIE (2018). OIE Terrestrial Manual: Brucellosis (*B.abortus*, *B.melitensis* and *B.suis*). 2021. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
5. Le Flèche, P., Jacques, I., Grayon, M., et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiology*, 2006; 6, 9.
6. López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, M., et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46, 3484-3487.
7. Bricker, B. J. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*, 2002; 90, 435-446.
8. Kumar, V., Bansal, N., Nanda, T., et al. PCR Based Molecular Diagnostic Assays for Brucellosis: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 2019; 8 (2), 2666-2681
9. Amenov, A. A., Kalendar, R. N., Abeldenov, S. K., et al. Development and application of rapid xtreme chain reaction and loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of leukaemia and brucellosis of cattle. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2017; 3, 49-55.

10. Bricker, B. J., Halling, S. M. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33, 1640-1642.
11. Bricker, B. J., Ewalt, D. R., Olsen, S. C., et al. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2003; 15, 374-378.
12. Ocampo-Sosa, A. A., Agüero-Balbin, J., Garcia-Lobo, J. M. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. *Veterinary Microbiology*, 2005; 110, 41-51.
13. Garcia-Yoldi, D., Marin, C. M., de Miguel, M. J., et al. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clinical Chemistry*, 2006; 52, 779-781.
14. Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C. M., et al. Evaluation of a multiplex PCR assay (*Bruceladder*) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008; 46, 3484-3487.
15. Schmoock, G., Ehrlich, R., Melzer, F., et al. Development of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect and differentiate *Brucella* spp. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011; 71, 341-353.
16. Redkar, R., Rose, S., Bricker, B., et al. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular Cell Probes*, 2001; 15, 43-52.
17. Newby, D. T., Hadfield, T. L., Roberto, F. F. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR green I, 5-exonuclease, and hybridization probe assays. *Applied Environmental Microbiology*, 2003; 69, 4753-4759.
18. Queipo-Ortuño, M. I., Colmenero, J. D., Baeza, G., et al. Comparison between LightCycler Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) assay with serum and PCR-enzyme-linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clinical Infectious Disease*, 2005; 40 (2), 260-4.
19. Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of Microbiological Methods*, 2008; 75, 375-378.
20. Winchell, J. M., Wolff, B. J., Tiller, R., et al. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010; 48 (3), 697-702.
21. Kim, J. Y., Kang, S., Lee, J. J., et al. Differential diagnosis of *Brucella abortus* by real time PCR based on a Single- Nucleotide Polymorphisms. *Clinical Microbiology*. 2015; 4, 5-10.
22. Nan, W., Zhang, Y., Tan, P., et al. A rapid cycleave PCR method for distinguishing the vaccine strain *Brucella abortus* A19 in China. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2016; 28 (3), 214-218.
23. Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., et al. The detection of *Brucella* spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. *Clinical Laboratory*, 2004; 50 (7-8), 387-94.
24. Mohammad Hasani, S., Mirnejad, R., Amani, J., et al. Comparing Rapid and Specific Detection of *Brucella* in Clinical Samples by PCR-ELISA and Multiplex-PCR Method. *Iranian Journal Of Pathology*, 2016; 11 (2), 144-150.
25. Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., et al. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*, 1995; 141, 2111-2121.
26. Prusty, B. R., Chaudhuri, P., Chaturvedi, V. K., et al. Visual detection of *Brucella* spp. in spiked bovine semen using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Indian Journal of Microbiology*, 2016; 56, 142-147.

27. Prusty, B. R., Tabassum, R., Chaudhuri, P., et al. A closed tube loop-mediated isothermal amplification assay for identification of *Brucella* Species in Bull Semen. *The Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*, 2018; 88, 707-713.
28. Genç, O., Serdar, G. Bruselloz tanısı ve epidemiyolojik çalışmalarda moleküler yöntemlerin kullanılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2019; 16 (1), 23-28.
29. Çiçek, M., Bıçakçığıl, A., Çelebi, B., et al. *Brucella melitensis* misidentified as *Roseomonas gilardii* by MALDI-TOF MS: experience of a clinical microbiology laboratory. *Klinik Dergisi*, 2019; 32 (1), 105-7.
30. Uzun, H. (2020). *Türkiye'nin Farklı Coğrafi Bölgelerinden İzole Edilen Brucella melitensis İzolatlarından Elde Edilen Ortak İmmünodominant Proteinlerin İmmünoproteomik Yöntemle Araştırılması*. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi Basım evi.
31. Mesureur, J., Arend, S., Cellière, B., et al. A MALDITOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018; 12 (10), e0006874.
32. Olsen, S. C., Stoffregen, W. S. Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Review of Vaccines*, 2005; 4, 915-28.
33. Sing, A. (2015). *Zoonoses-infections affecting humans and animals: Focus on public aspects*. Netherlands: Springer.
34. Whatmore, A. M. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009; 9 (6), 1168-84.
35. Aslan, S. (2015). *Klinik örneklerden izole edilen brucella izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin multi-locus variable number tandem repeat analysis ve pulsed field gel electrophoresis yöntemleri ile tespiti*. Adana: Çukurova Üniversitesi Basım evi.
36. Kiliç, S., Ivanov, I. N., Durmaz, R., et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis genotyping of human *Brucella* isolates from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011; 49, 3276-83.
37. Gokmen, T. G., Nagiyev, T., Aslan, S., et al. Molecular epidemiological characteristics of *Brucella spp.* isolated from human and animal brucellosis. *Indian Journal Of Animal Research*, 2019; 53, 399-403.
38. De Massis, F., Ancora, M., Atzeni, M., et al. MLVA as an Epidemiological Tool To Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound Emerging Disease*, 2015; 62, 463-469.
39. MLVABank (2008). MLVABank *Brucella* genotyping database. 2021. <http://mlva.u-psud.fr>
40. Dal, T., Durmaz, R., Ceylan, A., et al. Molecular Investigation of the Transmission Dynamics of Brucellosis Observed Among Children in the Province of South - East Anatolia, Turkey, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2018; 11 (3), e58857.
41. Nagiyev, T., Guven, T., Aslan, S., et al. Determination of epidemiological characteristics of animal *Brucella* strains by multilocus variable number tandem repeat analysis and pulsed-field gel electrophoresis in Turkey. *ESCMID Congress*, 2017; p2092, 1-2.
42. Chawjiraphan, W., Sonthayanon, P., Chanket, P., et al. Multilocus Sequence Typing of *Brucella* Isolates From Thailand. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2016; 47 (6), 1270-1287.
43. PUBMLST (2010). Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. (2021) https://pubmlst.org/bigsubdb?db=pubmlst_brucella_isolates&page=query&prov_field1=f_country&prov_value1=Turkey&submit=1
44. Ma, J. Y., Wang, H., Zhang, X. F., et al. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. *Infectious Disease of Poverty*, 2016; 5, 26.
45. Kılıç, S., Çelebi, B., Turan, M. *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* genotyping via real-time PCR targeting 21 variable genome loci. *Journal of Microbiological Methods*, 2021; 180, 106125

46. Bahmani, N., Mirnejad, R., Arabestani, M. R., et al. Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of *Brucella* isolates from human and livestock specimens. *Saudi Journal of Biology Science*, 2019; 26 (2), 256-262.
47. Patil, R. M., Bannaliker, S. A., Dighe, V. D., et al. Fingerprinting of *Brucella* isolates by pulse field gel electrophoresis (PFGE). *Indian Journal of Veterinary Research*, 2014; 23 (2), 38- 41.
48. Tan, K. K., Tan, Y. C., Chang, L. Y., et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. *BMC Genomics*, 2015; 16 (1), 93.
49. Georgi, E., Walter, M. C., Pfalzgraf, M. T., et al. Whole genome sequencing of *Brucella melitensis* isolated from 57 patients in Germany reveals high diversity in strains from Middle East. *PLoS One*, 2017; 12 (4), e0175425.