

BRUSELLOZUN ETİYOLOJİSİ

Ülkü ALTOPARLAK

Brucella'lar, insan ve birçok hayvan türünü infekte edebilen Gram negatif, fakültatif intraselüler bakterilerdir. Günümüzde, özellikle patojenite ve konak seçimi göz önünde bulundurularak, 6 tür tanımlanmaktadır: *B.melitensis*, *B.abortus*, *B.suis*, *B.neotomae*, *B.ovis* ve *B.canis*. Bütün dünyada en patojen türler; insanlarda çok şiddetli infeksiyona yol açan ve koyun, keçi gibi hayvanlarda bruselloza neden olan *B.melitensis*, sığırarda görülen brusellozun en önemli etkeni olan *B.abortus*, domuz brusellozunu oluşturan *B.suis*'tir. Bu üç *Brucella* türü konaklarında düşükler ve doyayıyla büyük ekonomik kayıplara yol açarlar. *B.ovis* ve *B.canis*, sırasıyla, epididimit ve köpek brusellozunun etkenidirler. *B.neotomae* ise çöl farelerinden izole edilen tek türdür. *B.melitensis* (biovar 1,2,3), *B.abortus* (biovar 1,2,3,4,5,6 ve 9), *B.suis* (biovar 1,2,3,4,5) biovarlara sahiptir. Türler ve biovarlar; fenotipik karakterler, faj tipleri, boyalara karşı olan duyarlılık, CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi ve bir takım metabolik özelliklere göre belirlenmiştir (6,27).

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi, bakterilerin *Rhizobiaceae* grubuna aittir. Ayrıca *Proteobacteria* sınıfının α-2 alt sınıfı ile yakın olarak alaklıdır. DNA-DNA hibridizasyon çalışmaları, bilinen 6 *Brucella* türü arasında % 90'dan daha fazla benzerliği ortaya koymaktadır (6,22,27,29).

B.melitensis, *B.abortus*, *B.suis* türleri; major yüzey antijeni olarak, O zinciri içeren smooth lipolisakkarit (S-LPS) taşıdıklarımda smooth (S), O zinciri bulunmayan rough lipolisakkarit (R-LPS) varlığında ise rough (R) suşlar olarak ortaya çıkarlar. *B.ovis* ve *B.canis* major yüzey antijeni olarak R-LPS taşıdıklarımdan dolayı R suşlarıdır. S-LPS en önemli virülans faktörüdür. S-LPS'nin yapısındaki O zinciri *Brucella* hücre yüzeyinin en önemli antijenik yapısını oluşturur. Ayrıca infekte vücutta antikor cevabı için immünodominant olup, günümüzde S *Brucella* suşları tarafından oluşturulan infeksiyonların serolojik tanısı için kullanılan testlerde major antijenik yapıdır (1,2,6,24). Lipolisakkaritlerin yanısıra, *Brucella*'nın dış membranı major dış membran proteinleri tarafından (Outer Membrane Proteins-OMPs) oluşturulur (5,6,27,28). Mikroorganizmanın yüzeyinde koruyucu özgüne sahip iki immunojenik fraksiyon bulunmaktadır: Sodyum dodesil sulfat insolubl (SDS-I) hücre duvarı fraksiyonu ve sıcak tuzlu su (hot saline=HS) ekstraktı (4,11).

B.abortus'un SDS-I fraksiyonu moleküller ağırlıkları 25-27 (Grup 3) ve 36-38 kDa (Grup 2) olan, ayrıca peptidoglikanla sıkıca bağlı iki büyük dış membran proteinini tarafından oluşturulur. Grup 2 proteinleri porin proteinleri olarak adlandırılır (25). *B.melitensis*'in SDS-I fraksiyonu yine pep-

tidoglikanla sıkıca bağlı, 31-34 kDa (Grup 3) ağırlığında başka bir major OMP içerir. Dış membran proteinlerinin immunojenik özellikleri zayıftır ve kendilerine karşı heterojen bir antikor cevabı oluşur. Bu türlerde asıl immunojenik cevap, S suşlarında SDS-I fraksiyon yapısının % 1'den daha azını oluşturan S-LPS tarafından sağlanır (4,7).

B.ovis doğal olarak bir R patojen olup yüzeyinde O zinciri taşımaz (2). *B.ovis*'in HS eksraktı antijenik özelliğe sahiptir (17). Bu eksrat R-LPS ve grup 3 proteinlerinin daha baskın olduğu major dış membran proteinleri tarafından oluşturulur (3). Grup 3 proteinlerinden özellikle 31-34 kDa ağırlığında olanlar, *B.ovis* infeksiyonlarında kuvvetli bir antikor yanımı oluştururlar (3,19,20).

Özet olarak; major dış membran proteinlerinden 36-38 kDa ağırlığında olanlar Grup 2 porin proteinleri, 25-27 kDa ve 31-34 kDa ağırlığında olanlar Grup 3 proteinleri olarak isimlendirilirler ve immunojenik özellikleri azdır. Özellikle 31 kDa ağırlığındaki Grup 3 proteini, *B.ovis* infeksiyonlarında antikor yanıtından sorumlu olan dış membran proteinidir. Son zamanlarda 25-27 kDa'daki dış membran proteinlerinin *B.melitensis*, *B.abortus* ve *B.suis*'in virülansında rol oynadığı da gösterilmiştir. Omp 25 genlerinin uzaklaştırıldığı mutant suşlar aşılama çalışmalarında kullanılmaktadır (12,13).

Brucella'lar iki kromozoma sahip olup, bu da üç rRNA operonunu içeren kromozomal bölgelerin değişik düzenlemeleri ile açıklanmaktadır (18). Kromozomlarda bulunan genlerin en önemlileri özellikle major dış membran proteinlerini kodlayanlar olup, *Brucella* türleri ve biovarlarının belirlenmesinde açık bir rol oynamaktadırlar. Örneğin; 36-38 kDa ağırlığındaki major porin dış membran proteinleri (Grup 2) *omp2* lokusunda kodlanmaktadır. Bu lokus birbirile çok yakın benzerlik gösteren (>% 85) *omp2a* ve *omp2b* genlerini içermektedir (15,16). % 34 oranında benzer olan diğer iki *Brucella* geninden; *omp25*, 25-27 kDa; *omp31*, 31-34 kDa ağırlığındaki (Grup 3) dış membran proteinlerini kodlamaktadır (8). *Brucella* türleri ve biovarlarında, dış membran proteinlerini kodlayan genlerin PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) paternleri tabloda gösterilmiştir.

Brucella'ların hastalık yapma kapasitesi fagozitlerin içerisinde yaşamını sürdürme ve çoğalma yeteneğine bağlıdır. *B.abortus*, trofoblastlar ve Vero hücrelerinde yuvarlak endoplazmik retikulum sisternaları içinde replike olur. Fagozitik hücrelerin iç ortamları oksidatif (miyeloperoksidad, H₂O₂, halid) ve nonoksidatif (katyonik proteinler, proteazlar, laktoferritin, lizozom ve pH 5.4) mekanizmalarıyla mikroorganizmalar için öldürücü özelliğe sahiptir. *Brucella*'ların

Tablo. Brucella türleri ve biovarlarında dış membran proteinlerini kodlayan genlerin PCR-RFLP paternleri.

Brucella spp.	Biovar	omp2a	omp2b	omp25	omp31
B. melitensis	1	B, C	B, D, E	B	A
	2	B	E	B	A
	3	B	B, D, E	B	A
	R	B, C	B	B	A
B. abortus	1	A	A	A	-
	2	A	A	A	-
	3	B	B	A	-
	4	A	B	A	-
	5	B	B	A	-
	6	B	B	A	-
	9	B	B	A	-
	R	A	A, C	A	-
B. suis	1	D	B	A	A
	2	E	F	A	B, C
	3	D	G	A	A
	4	D	G	A	A
	5	F	B	A	A
B. ovis	-	G	H, I, J	C	D
B. canis	-	D	G	A	E, F
B. neotomae	-	H	K	A	A

R: Rough suşlar.

Her büyük harf, bir gen için kullanılan restriksiyon enzimi ile aynı paterni göstermektedir. Tek bir gen için aynı harf aynı restriksiyon paternini yansıtırken, diğer bir gen için aynı paterni göstermez.

bu mekanizmalara nasıl karşı koyabildikleri henüz tam olarak açıklanamamakla beraber, *B. abortus*'un fagozitik vakuoller (fagozom) ile lizozomların birleşmesini inhibe ettiği ve oksidatif olaylara direnç gösterdiği bilinmektedir (14,23,26). *Brucella*'nın lipolisakkarit yapısı ilk doğrulanın virülsans faktörü olup, bir yandan mikroorganizmanın hücre içi yaşam süresini uzatırken, bir yandan da kompleman aracılı parçalanmadan korur (1). DnaK, HtrA, Cu-Zn süperoksit dismutaz ve RecA gibi gen ürünlerinin virülsansla alkalı olduğu düşünlümüş, bu proteinlerin salgılanmadığı delesyon mutantlarını-

da, *Brucella*'ların konağı kolonize ettikleri erken safhalarda ana suşlardan daha az yaşadığı ortaya konmuştur (14,26). Son zamanlarda BvrS/BvrR olarak adlandırılan iki regülatörlü proteik sistemin, *B. abortus*'un makrofajlar ve HeLa hücreleri içerisinde replikasyonu için önemli rol oynadığı kaydedilmiştir (21). Demir alımını düzenleyen FeuP/FeuQ ve nitrojen metabolizmasında rol oynayan NtrB/NtrC *Brucella*'da tanımlanan diğer iki komponentli regülatör sistemlerdir (9,10). Bu sistemler günümüzde hala tanımlanamayan multipl genler tarafından kontrol edilmektedirler.

KAYNAKLAR

- Allen CA, Adams LG, Ficht TA: Transposon-derived *Brucella* abortus rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival, *Infect Immun* 66:1008 (1998).
- Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G: Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry, *Infect Immun* 63:3945 (1995).
- Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS, Dubray G, Cloeckaert A: Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella* ovis by passive immunization of mice with monoclonal antibodies, *Microbes Infect* 2:481 (2000).
- Cloeckaert A, Jacques I, Limet JN, Dubray G: Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice, *J Med Microbiol* 42:200 (1995).
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N: Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*, *FEMS Microbiol Lett* 145:1 (1996).
- Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH: Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future, *Vet Microbiol* 90:229 (2002).
- Cloeckaert A, Zygmunt MS, de Wergifosse P, Dubray G, Limet JN: Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies, *J Gen Microbiol* 138:1543 (1992).

- 8- de Wergifosse P, Lintermans P, Limet JN, Cloeckaert A: Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*, *J Bacteriol* 177:1911 (1995).
- 9- Dorrell N, Guigue-Talet P, Spencer S, Foulongue V, O'Callaghan D, Wren BW: Investigation into the role of the response regulator NtrC in the metabolism and virulence of *Brucella suis*, *Micr Pathog* 27:1 (1999).
- 10- Dorrell N, Spencer S, Foulongue V, Guigue-Talet P, O'Callaghan D, Wren BW: Identification, cloning and initial characterisation of FeuPQ in *Brucella suis*: a new sub-family of two-component regulatory systems, *FEMS Microbiol Lett* 162:143 (1998).
- 11- Dubray G, Bezard G: Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis, *Ann Rech Vet* 11:367 (1980).
- 12- Edmonds MD, Cloeckaert A, Booth NJ, Fulton WT, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH: Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle, *Am J Vet Res* 62:1461 (2001).
- 13- Edmonds MD, Cloeckaert A, Elzer PH: *Brucella* species lacking the major outer membrane protein omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*, *Vet Microbiol* 88:205 (2002).
- 14- Ficht TA: Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence, *Vet Microbiol* 92:213 (2003).
- 15- Ficht TA, Husseinen HS, Derr J, Bearden SW: Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains, *Int J Syst Bacteriol* 46:329 (1996).
- 16- Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E: Limited genetic diversity of *Brucella* spp, *J Clin Microbiol* 39:235 (2001).
- 17- Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Blasco JM, Marin CM, Gamazo C, Winter AJ: Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines, *Infect Immun* 62:632 (1994).
- 18- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M: Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*, *Mol Microbiol* 27:99 (1998).
- 19- Kittelberger R, Diack DS, Vizcaino N, Zygmunt MS, Cloeckaert A: Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay, *Vet Microbiol* 59:213 (1998).
- 20- Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Ross GP, de Lisle GW, Cloeckaert A, de Bruyn J: Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*, *J Vet Diagn Invest* 7:210 (1995).
- 21- Lopez-Goni I, Guzman-Verri C, Manterola L, Sola-Landa A, Moriyon I, Moreno E: Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS, *Vet Microbiol* 90:329 (2002).
- 22- Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H: *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria, *J Bacteriol* 172:3569 (1990).
- 23- Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP: Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages, *Infect Immun* 71:1481 (2003).
- 24- Price RE, Templeton JW, Adams LG: Survival of smooth, rough and transposon mutant strains of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages, *Vet Immunol Immunopathol* 26:353 (1990).
- 25- Sowa BA, Kelly KA, Ficht TA, Frey M, Adams LG: SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*, *Vet Microbiol* 27:351 (1991).
- 26- Teixeira-Gomes AP, Cloeckaert A, Zygmunt MS: Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*, *Infect Immun* 68:2954 (2000).
- 27- Vizcaino N, Cloeckaert A, Verger J, Grayon M, Fernandez-Lago L: DNA polymorphism in the genus *Brucella*, *Microb Infect* 2:1089 (2000).
- 28- Vizcaino N, Kittelberger R, Cloeckaert A, Marin CM, Fernandez-Lago L: Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species, *Infect Immun* 69:7020 (2001).
- 29- Yanagi M, Yamasato K: Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer, *FEMS Microbiol Lett* 107:115 (1993).