

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIĞIR BRUSELLOZUNUN TEŞHİSİ İÇİN SÜTTE  
İNDİREKT ELISA'NIN KULLANIMININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**İbrahim ÇADIRCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK**

**ŞANLIURFA  
2019**

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIĞIR BRUSELLOZUNUN TEŞHİSİ İÇİN SÜTTE  
İNDİREKT ELISA’NIN KULLANIMININ  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**İbrahim ÇADIRCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK**

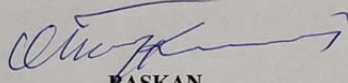
**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15144 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ŞANLIURFA  
2019**

T. C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

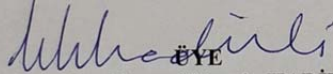
İbrahim ÇADIRCI'nın hazırladığı "SİĞİR BRUSELLOZUNUN TEŞHİSİ İÇİN SÜTTE İNDİREKT ELISA'NIN KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ" başlıklı çalışması 18/06/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Mikrobiyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak kabul edilmiştir.



BAŞKAN

Prof. Dr. Oktay KESKİN

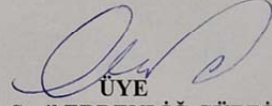
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE

Prof. Dr. Hasan Hüseyin HADİMLİ

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

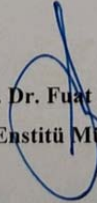


ÜYE

Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun <sup>20.06</sup>.....2019 tarih ve <sup>2019/10</sup>..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, başta tez danışmanım sayın Doç.Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK'e, Anabilim Dalı Başkanım sayın Prof.Dr. Oktay KESKİN ve bölüm hocam Prof. Dr. Osman Yaşar TEL olmak üzere, bu süreçte bana en büyük desteği veren değerli eřim Esra GÖNCÜ ÇADIRCI'ya, akademik tecrübelerinden yararlandığım Harran Üniversitesi Tıp Fakóltesi Aile Hekimliği Ana Bilim Dalı Başkanı kıymetli ablam Uzm. Dr. Öğretim Üyesi Dursun ÇADIRCI'ya ve arkadaşım Mehmet KÜÇÜK'e teşekkür ederim.

**İbrahim ÇADIRCI**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	i
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	ii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	iii
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	iv
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b> .....	v
<b>ÖZET</b> .....	vi
<b>1.GİRİŞ</b> .....	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1. Tarihçe .....	2
2.2. <i>Brucella</i> cinsinin Genel Özellikleri.....	2
2.3. Brusellozun patogenezi ve epidemiyolojisi .....	6
2.4. Brusellozun teşhisi .....	8
2.4.1.Bakteriyel teşhis.....	8
2.4.2.Serolojik Testler.....	11
2.5. Korunma ve tedavi.....	16
<b>3.GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	18
3.1.Gereç .....	18
A) Bakteriyel Suş ve referens serum ELISA antijeni .....	18
B) Referens pozitif ve negatif süt ve serum örnekleri.....	18
C)Test serum ve süt örnekleri .....	18
D)Antijen hazırlanmasında kullanılan besiyeri ve solüsyonlar.....	18
E) ELISA için kullanılan solüsyonlar .....	19
3.2.Yöntem.....	21
<b>4.BULGULAR</b> .....	26
<b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	34
<b>6.KAYNAKLAR</b> .....	39
<b>7.EKLER</b> .....	43
Etik Kurul.....	43
Orjinallik Beyanı.....	45
Turnitin .....	46
Tez Veri Giriş Formu.....	47

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** *B.abortus* biyotip 3 bakterisinden hazırlanan antijen ile kaplı ELISA pleytinde farklı sürülerden alınan sütlerin verdiği reaksiyon. .... 27
- Şekil 4.2.** RBPT ve KFT sonuçları baz alınarak yapılan milk ELISA ROC analizi sonuçları. Area under curve (AUC=0.9941) ..... 33



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Brucella türleri, biyovarları ve konakçıları.....	4
<b>Tablo 2.2.</b> Klasik Brucella türlerinin biyotiplerinin ayırıcı karakterleri .....	10
<b>Tablo 3.1.</b> SRT sonuçlarının değerlendirme kriterleri.....	23
<b>Tablo 4.1.</b> Pozitif referens serumların RBPT ve KFT sonuçları ve bu serumların alındığı hayvanda Brucella izolasyon durumu.....	28
<b>Tablo 4.2.</b> Negatif referens serumların RBPT ve KFT sonuçları .....	29
<b>Tablo 4.3.</b> Test süt ve serumların serolojik ve kültür test sonuçları .....	30
<b>Tablo 4.4.</b> Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması ....	32
<b>Tablo 4.5.</b> Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması .....	33

## **KISALTMALAR VE SİMGELER**

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>ELISA</b>	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>KFT</b>	: Komplement fiksasyon Testi
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>NTCC</b>	: National Collection of Type Cultures
<b>RBPT</b>	: Rose-Bengal Pleyt Testi
<b>ROC</b>	: Receiver-operating characteristic
<b>R-LPS</b>	: Rough Lipopolisakkarit
<b>SRT</b>	: Süt Ring Testi
<b>S-LPS</b>	: Smooth Lipopolisakkarit
<b>WHO</b>	: World Health Organisation
<b>2-ME Testi</b>	: 2-Merkaptoetanol Tüp Aglitünasyon Testi



## ÖZET

### SIĞIR BRUSELLOZUNUN TEŞHİSİ İÇİN SÜTTE İNDİREKT ELİSA'NIN KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

İbrahim ÇADIRCI

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Bruselloz insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli bir zoonozdur. Bu enfeksiyon kamu sağlığı için bir risk ve hayvancılık sektörü için büyük ekonomik kayıplar oluşturur. Serolojik testler, etkenin kültüründen daha çabuk ve daha pratik olduğu için hastalığın tanısında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada sütte anti *Brucella* antikollarını saptamak için bir indirekt süt ELISA prototipi geliştirilmesi hedeflendi. Daha önce *B. abortus* biyotip 3 izole edilen enfekte çiftliklerden alınarak rose bengal pleyt testi (RBPT) ve komplement fiksasyon testi (KFT) ile test edilerek pozitif bulunan toplam 36 süt ve serum örneği ile *brucella* ari sürülerden alınan 45 adet süt ve serum örnekleri tanısız duyarlılık ve özgüllüğün saptanmasında *receiver-operating characteristic* (ROC) ile analiz edildiler. Serum örneklerine uygulanan ile aynı duyarlılık ve özgüllük gösteren testi süt örneklerine uygulamak süt sığırları için avantajlı ve pratik bir yöntemdir. Madem ki sütteki IgG konsantrasyonu serumla korelasyon göstermektedir, o halde sütü, hayvanın immünolojik durumunu yansıtacak bir örnek olarak düşünmek mantıklı olacaktır. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, testin eşik değeri % 29.3 yüzde pozitivite (PP) alınarak, duyarlılık (sensitivite) % 96,15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%80.36-99.9))] ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%85.16-99.47))] olarak saptandı. Sonuçlarımız aynı zamanda aynı hayvandan alınan süt ve serum sonuçları arasında korelasyon göstermiştir. Süt ring testi (SRT) KFT ve RBPT sonuçlarına göre en yüksek oranda yanlış pozitif sonuç vermiştir.

Çalışmanın sonunda elde ettiğimiz bulgular, indirekt süt ELISA prototipinin oldukça duyarlı ve özgül bir test olduğunu ve süttün mevcut olduğu durumlarda hastalığın serolojik tanısı için süt sığırlarında hayvanlarda stress yaratmadan

kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Dolayısı ile süt sığırclığı işletmelerinde bruselloz ile ilgili güvenilir ve sağlam veriler, ekonomik ve pratik olarak elde edilebilecektir.

**Anahtar Kelime: *Brucella abortus*, süt-ELISA, sığır, SRT**



## ABSTRACT

### EVALUATION OF USING ELISA IN MILK FOR DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN CATTLE

İbrahim ÇADIRCI

Veterinary Department of Microbiology, Master Thesis

Brusellosis is an important zoonosis that cause serious infections in man and animals. This infection constitutes a risk for public health and big economical losses in animal industry. Serological tests have been intensively used for serologic diagnosis of the disease because of being quicker and more practical than culturing of the causative organism. In this study it was aimed to develop an indirect milk ELISA prototype was developed for the determination of anti *Brucella* antibodies in milk. A total of 36 serum and milk samples received earlier from infected farms in which *B. abortus* biotype 3 isolated and identified with Rose Bengal Plate Test (RBPT) and Complement fixation test (CFT) records and 45 milk and serum samples from brucellosis free herds were used for receiver-operating characteristic (ROC) analysis in determining diagnostic sensitivity and diagnostic specificity, respectively. A test from milk samples with similar sensitivity and specificity as those applied to serum samples is economically advantageous and practical for dairy cattle. Since concentration of Ig G in milk correlates well with serum levels, it will be reasonable to think that milk reflects the immunological status of the animal. According to our results, it was determined at 29.3 percent positivity (PP) giving a sensitivity of 96,15% with a 95% confidence interval (CI) [95% (80.36%-99.9%)] and a specificity of 95.65% [95% CI ((%85.16-99.47)]. Our results also showed correlation in antibody level in serum and milk received from the same animal. MRT showed high false positive results related to the CFT and RBPT results.

As conclusion our results indicated that the indirect milk ELISA prototype is a highly sensitive and specific test and could be used without being invasive in dairy cattle for serologic diagnosis of brucellosis whenever milk available for this purpose.

Therefore, reliable and robust data about brucellosis in dairy farms would be obtained practically and economically.

**Keywords:** *Brucella abortus*, milk-ELISA, cattle, MRT



## 1.GİRİŞ

Hayvanlarda büyük bir maddi kayba neden olan ve insanlarda da önemli bir zoonoz hastalık olan Brusellozis'in indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testler uygulanmaktadır. Bu testler için hayvanın kanının alınması gerekmektedir. Bu durum gerek hayvanda yarattığı stres ve gerekse maliyet ve personel giderleri açısından süttten yapılacak bir teste göre önemli dezavantajlar taşımaktadır. Günümüzde gerek bireysel ve gerekse tank süt örneklerinde tarama testi olarak süt ring testi (SRT) uygulanmaktadır. Ancak bu testin süt-ELISA'ya göre önemli dezavantajları vardır. Bunlar arasında, testin duyarlılık ve özgüllüğünün daha düşük olması, donmuş ve mastitisli sütlere uygulanamaması sayılabilir.

Bu çalışmamızda *Brucella abortus* biyotip 3'ün daha önceden izole edildiği birkaç enfekte sürüden alınan kan ve süt örnekleri ile hastalığın hikayesinin olmadığı ari sürülerden alınan kan ve süt örnekleri testin geliştirilmesinde ve duyarlık ve özgüllüğün saptanmasında pozitif ve negatif kontrol materyallerini oluşturacaktır. Kıyaslama yapabilmek için pozitif ve negatif serumlara brusellozun serolojik tanısında konfirme edici test olan komplement fiksasyon testi, tarama testi olan Rose-Bengal lam aglütinasyon testi ile birlikte uygulanacaktır. Böylelikle kan serumu ve süt içerdiği antikorlar yönünden birbiri ile kıyas edilirken bu prototipin serum ELISA ya karşı hayvanlarda güvenle kullanılabilir bir alternatif olup olmadığı değerlendirilecektir. Dolayısı ile kan almada olduğu gibi hayvan irrite edilmeden, daha hızlı ve kolay bir şekilde hastalık tanısı konulabilecektir.

Ülkemizde ticari bir milk-ELISA kiti bulunmamaktadır. Çalışmada bu eksiklikten yola çıkılarak duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir ELISA prototipi geliştirilmesi hedeflenmektedir. Çalışmamızda antijen olarak lokal *B. abortus* biyotip 3 kullanılacak olması bir ilktir. Hedefe ulaşıldığında süt sığırcılık işletmelerinde gerek bireysel ve gerekse tank süt örnekleri kullanılarak hastalığın tanısı ve izlenmesi kolay ve pratik bir hale gelmiş olacaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Bruselloz, ilk olarak, Hipokrat'ın yazmış olduğu Epidemics'de (M.Ö. 450) Akdeniz ülkelerinde ve özellikle Yunanistan'da çokça gözlenen, düzenli ve aralıklı ateş şeklinde seyreden bir hastalık olarak belirtilmiştir (1). M.S. 79 yılında Vezüv yanardağının faaliyeti sonucu Roma'nın iki ünlü kenti olan, Pompeii ve Herculanium tamamen yanarak kül haline gelmiştir. Bu şehirlerdeki kalıntılarda bulunan yetişkin iskeletleri üzerinde yapılan incelemeler sonucunda bulunan kemik lezyonlarının tipik *Brucella* lezyonları oldukları görülmüş ve yine bu kalıntılar arasında gömülü olarak bulunan karbonlaşmış peynirlerin yapılan incelemelerinde morfolojik olarak *Brucella*'ya benzeyen kok tarzında formların olduğu tespit edilmiştir (2).

*Brucella* etkeni ilk defa 1887 yılında Sir David Bruce tarafından ölen bir askerin dalağında izole edilmiştir. Profesör Bang 1895 yılında; yaptığı çalışmalarda sığırlarda aborta neden olan etkenin küçük bir basil olduğunu gözlemlemiş ve buna *Bacillus abortus* adını vermiştir. Zammit 1905 yılında; enfekte keçilerden *Brucella* bakterisini izole etmiş ve keçi sütü ile enfekte insanların serumlarında spesifik antikorların var olduğunu gözlemlemiştir. Traum 1914 yılında, ABD'de domuzlarda yavru atımına neden olan bakteriyi izole etmiş ve buna *Bacterium abortus suis* ismini vermiştir (3).

Ülkemizde Bruselloz I.Dünya Savaşından itibaren bilinmektedir. Türkiye'deki çalışmalar 1915 yılında Kural ve Akalın tarafından şüpheli bir hastada hastalığın tespiti için yapmış oldukları çalışmalarla başlamıştır. Berke 1931 yılında; *Brucella* enfeksiyonunu sığırlarda tespit etmiştir. Köylüoğlu ve Aktan 1944 yılında; Bandırma merinos koyun çiftliğindeki koyunlardan tespit etmişlerdir(4).

### 2.2. *Brucella* Cinsinin Genel Özellikleri

*Brucella* türleri; Gram negatif, hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz, genellikle aerob ve fagositik hücreler içerisinde yaşayabilme özelliğine sahip intrasellüler mikroorganizmalardır. *Brucella* türleri *Proteobacteria* aleminde, *Rhodospirilli* sınıfında, *Rhizobiales* takımında ve *Brucellaceae* ailesinde yer almaktadır (5).

*Brucella* cinsinin günümüzde, *B. abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*, *B.ovis*, *B.canis*, *B.neotomae*, *B.ceti*, *B.pinnipedialis*, *B.microti*, *B.inopinata* ve *B.papionis* olmak üzere 11 türü bulunmaktadır (Tablo 2.1.). Bu sınıflandırmada konakçı tercihi, biyokimyasal

ve üreme özellikleri rol oynamaktadır (6). *B.abortus*, *B. melitensis* ve *B.suis* benzer ciddi hastalık tablosu oluştururlar. *B. suis* genel olarak diğer *Brucella* etkenlerine benzemesine rağmen, *B. melitensis* ve *B. abortus*'dan bazı özellikleriyle ayrılır. *B.suis*'in 5 biyotipi bulunmaktadır. Bu biyotiplerden 1, 2, 3 domuzlarda ki brusellozun başlıca etkeni olmakla beraber biyotip-2 Avrupa tavşanlarında, biyotip-3 ise ren geyiklerinde patojendir. Biyotip4 ren geyikleri ve karibu'larda hastalık oluşturur ve domuzlarda rastlanmaz. Biyotip5'in diğer biyotiplerden ayrılmasının nedeni koyun ve keçilerde de hastalık oluşturabilmesidir (7, 8). *B. ovis* etkeni ilk olarak 1952 yılında Yeni Zelanda'da Mc Farland ve arkadaşları tarafından koçlardan izole edilmiştir (9). *B. ovis* etkeni koyunlarda klinik veya subklinik karakterli belirtilere sebep olur. *B. ovis*, koçlarda epididimitis, orşitis gibi genital lezyonlara neden olduğu gibi, dişilerde de abort, plasentitis ve erken yavru ölümlerine neden olur (9). *B.canis* erkek ve dişi köpekler için *Brucella* yönünden enfeksiyöz etkenidir. Diğer hayvan türlerinde hastalık oluşturduğu şimdilik bildirilmemiştir. Dişi köpeklerde özellikle gebeliğin 7. - 9. haftalarında yavru atımına neden oldukları gibi ölü doğumlara da neden olurlar. *B. canis* bulaştığı doğurgan hayvanlarda kısırlığa sebep olabilir. Etken zoonoz özellikte olmasına karşın nadiren insanlarda hastalık oluşturur (7, 8).

Son yıllarda *Brucella* türlerine deniz memelilerinden izole edilen *B. pinnipedialis* ve *B. cetaceae*, tilkilerden izole edilen *B.microti* ve konakçısı kesin olarak belirlenemeyen yeni bir tür olarak *B. inopinata*ve, maymunlardan izole edilen *B. papionis*'de dahil olmuştur. *B. pinnepediae* fok, denizaslanı, mors (denizayısı)'da, *B. cetaceae* yunus balığı, domuz balığı, balinadan izole edilmiş ve insanlar için enfeksiyöz olduğu bildirilmiştir. Koyun ve keçilerde patojen olan *B.melitensis* insanlarda da yüksek patojeniteye sahiptir ve sıklıkla insan brusellozisine yol açar. Bunun aksine *B. ovis* ve *B.neotomae* ile insan enfeksiyonu bildirilmemiştir. *B.canis* ise insanlarda nadiren enfeksiyon oluşturur (6).

*Brucella* etkenleri, 0,5–0,7µm eninde, 0,6–1,5µm boyunda kokobasillerdir. Aynı zamanda sporsuz, hareketsiz ve çift, kısa zincir veya küçük kümeler şeklindedirler. Pilusa sahip değildirler. Kolonilerinin kenarları hafif konveks şeklinde ve uçları yuvarlak biçimdedir. Etkenler kümeler halinde görülür ve bu kümeler tek, çift, kısa zincir veya küçük kümeler şeklindedirler (7, 8).

Küçük oldukları için *Braun* hareket denen moleküler hareketlerle yerlerinde titreşirler. Pasajlarda ve R tipi kolonilerde kapsül bulunmaz. Buna karşın organizmadan yeni ayrılan S tipi kolonilerde ince bir kapsülün bulunduğu tespit edilmiştir. Endospor ve flagella oluşturmazlar. Brusella etkenleri, tam olarak asid-fast değildirler fakat zayıf asitlerle dekolarizasyona dayanıklıdır. Ziehl–Neelsen boya yöntemini modifikasyonu olan Stamp metoduyla kırmızı olarak boyanırlar. Organlardan veya biyolojik sıvılardan hazırlanan preparatların muayenesinde genellikle uygulanan bu yöntemde, öncelikle ısı veya etanol ile sabitleme (fiksasyon) yapılır. Bu yöntemle Brusella etkenleri, mavi zemin üzerinde kırmızı olarak boyanır (10, 11).

**Tablo 2.1.** *Brucella* türleri, biyovarları ve konakçıları(1)

<b><i>Brucella</i> türleri</b>	<b>Biyovarlar</b>	<b>Konakçılar</b>	<b>İnsan için virulensi</b>
<i>B.melitensis</i>	1-3	Koyun,keçi	Yüksek
<i>B.aborus</i>	1-6,9	Sığır, manda	Orta
<i>B.suis</i>	<b>1,3</b>	<b>Domuzlar</b>	<b>Yüksek</b>
	<b>2</b>	<b>Domuzlar</b>	<b>düşük</b>
	<b>4</b>	<b>Ren geyiği</b>	<b>orta</b>
	<b>5</b>	<b>Kemirgenler</b>	<b>yok</b>
<i>B.neotoma</i>	--	Ağaç faresi	Yok
<i>B. ovis</i>	--	<b>Koç, koyun</b>	<b>Yok</b>
<i>B.canis</i>	--	<b>Köpek</b>	<b>Düşük</b>
<i>B.ceti</i>	--	Yüzgeç ayaklılar	orta
<i>B. pinnipedialis</i>	--	<b>Su memelileri</b>	<b>orta</b>
<i>B.microti</i>	--	<b>Çöl faresi, tilki</b>	<b>Bilinmiyor</b>
<i>B.inopinata</i>	--	<b>Bilinmiyor</b>	<b>Orta</b>
<i>B.papionis</i>	--	<b>Bilinmiyor</b>	<b>Bilinmiyor</b>

*Brucella* türlerinin üremesi için sıcaklığın 20–40°C’de olması gerekir. Buna karşın en uygun üreme sıcaklıkları 37°C’ dir. *Brucella* etkenlerinin üremeleri için optimum pH değeri 6,6- 7,4 aralığında bulunmaktadır. *Brucella* türleri; aerobik, Gram



negatif, katalaz pozitif, üre pozitif ve oksidaz pozitiftir. Mac Conkey agarda üremezler. *Brucella* bakterileri aerobiktir. Fakat *B. abortus* ve *B. ovis* ilk izolasyonları için %5–10 CO<sub>2</sub>' li ortama ihtiyaç duyarlar. *Brucella* suşlarında oksidatif aktivitesi farklılık gösterebilir. *Brucella* bakterilerinin proteolitik etkileri zayıftır. Süt ile reaksiyonları hafif alkalidir. İndol oluşturmaz ve jelâtinini eritemezler. Nitrat redüksiyon testi çoğunlukla pozitiftir. Sülfür içeren aminoasitlerde H<sub>2</sub>S üretim süresinde ve miktarında farklılıklar vardır. *Brucella* türleri arasında *B.melitensis* en kısa sürede (1 gün) ve en az miktarda, *B. abortus* orta sürede (2 gün) ve orta miktarda, *B. suis* en uzun sürede (3–5 gün) ve en fazla miktarda H<sub>2</sub>S üretirler (7,8, 10, 12).

*Brucella* suşlarının metabolizmaları oksidatifdir. Karbonhidratlardan asit ve gaz yapmazlar ve glukozu az miktarda kullanırlar. *B. abortus* ve *B. ovis* biovar 2, 3, 4 suşlarında serum noksanlığında çok zayıf ürerler. *Brucella* türlerinin çoğu hücre içi parazitidir ve ilk izolasyonlarında vitamin ile aminoasite gereksinim duyarlar. Bazı suşlar nitrojen veya nitrojen kaynağı bulunan ortamlarda da gelişebilmektedir. *B. abortus* suşlarının gelişmesi için eritrolun bulunması gerekir. *B. abortus* suşları enerji ihtiyacı için glukozu kullanırlar. *Brucella* bakterilerinde gelişmiş bir solunum sistemi mevcuttur. Solunum sistemi yapısında flavoprotein ve inhibitörlere duyarlı sitokrom a1, a2, b, c ve O bulunur. *Brucella* bakterileri ekzotoksin meydana getirmezler (7, 10, 13).

Özel besi yerlerine ihtiyaç duymalarının nedeni genel besi yerlerinde üremelerinin güç olmasıdır. Mikroorganizmaların üremeleri üzerine olumlu etkide bulunmak için glukoz, ascites, karaciğer ekstresi, kan, serum veya protein besi yerine katılabilir. Bazı suşlar (*B. abortus* biyotip2) üremeleri için zorunlu olarak seruma gerek duyarlar. Bununla birlikte mikroorganizmaların çoğalmasını olumlu yönde etkileyen bir faktör olarak eritrol de kullanılmaktadır. *Brucella* etkenlerinin kültürleri için, genellikle katı besi yerleri tercih edilir. Bunun sebebi katı besi yerleri koloni oluşmasını sağlaması dışında form bozukluğunu da sınırlarlar. Kan, periton ve pleura boşluklarındaki sıvı materyalin kültürü için sıvı besi yerlerinden yararlanılabilir. Hemolitik değildirler. Kültürlerden yapılan frotilerde tek tek görünürler. Buna karşılık, enfekte dokulardan veya eksudatlardan yapılan frotilerde kümeler halinde rastlanılır (8,14,15). Smooth suşlar, mat sarı renkte görünürler ve yansıyan ışıpta hafif mavimsi yeşil renk verirler. Bununla beraber düzgün ve parlak yüzeysidirler. Koloniler 6-7 günlük bir inkübasyon sonunda matlaşır ve yapıları bozulmaya başlar. R koloni formunda ki suşlar ise daha

büyük çapta, yassı, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. Bundan dolayı smooth *Brucella* kültürleri rough formlardan ayrılırlar. Belirtilen bu iki ana koloni formundan başka, intermedier (I) ve mucoid (M) özellik gösteren koloni varyasyonlarına ve bunların da alt formlarına rastlanabilir. Bu grup mikroorganizmaların bahsedilen bu iki ana koloni formundan başka intermedier (I) ve mukoid (M) özellik gösteren kolonileri ve bunların alt formlarının bulunduğu da bildirilmektedir. Kültürler sıvı besi yerinde yavaş ürerler (7).

*Brucella* grubu mikroorganizmalar pastörizasyon şartlarında 65°C de 10-15 dakika canlı kalırlar. Otoklav içerisinde de 121°C 15 dakikada kuru sıcaklıkta 160°C-170°C de en az 1 saatte ölürlar. *Brucella* etkenleri antibiyotik ve dezenfektanlardan da etkilenir, % 1 lizol ve formalin içinde 15 dakikalık sürede, % 0,1 süblimede birkaç dakikada kokuşma sonucu kısa zamanda ölürlar. Doku, süt veya uterus akıntıları içinde uzun süre canlı kalabilirler. Kültür içindeki etkenler -20°C 'de 3-6 ay canlılıklarını koruyabilirler (1, 11, 14). Etkenler % 0,1 süblimede birkaç dakikada, % 2 formalinde ve % 0,1 lizol içinde 15 dakikada ölürlar. Süt içerisinde de birkaç hafta yaşamları devam ederken, beyaz peynirde 2,5-3 ay, tereyağında 4 ay, dondurulmuş etlerde 14-15 gün, idrar içerisinde 30 gün, fötüsde 75 gün yaşayabilirler. Enfekte ve pastörize edilmemiş süttten yapılmış dondurmalarda 30 gün, salamura peynirde tuz oranına göre 30-45 gün, nemli toprakta 60 gün, şebeke suyunda 4-8°C'de birkaç ay kadar, donmuş doku ve ortamlarda birkaç yıl yaşamlarını sürdürürler (1, 16, 17, 18).

### **2.3. Brusellozun Patogenezi ve Epidemiyolojisi**

Enfeksiyonda bulaşmanın sindirim sistemi ve genital sistem başta olmak üzere deri ve konjunktiva gibi çeşitli yollarla meydana gelebildiği bildirilmektedir. Hastalık etkeninin çoğunlukla gebe hayvanların uterus içeriği ve akıntıları, fötüs ve fötal membranlar, kolostrum, süt ve spermada bulunduğu ifade edilmektedir. Hastalığın yayılımında, özellikle kronik olarak enfekte asemptomatik hayvanların önemli bir rol oynadıkları vurgulanmaktadır. Sığır, koyun ve keçilerde *B. abortus* ve *B.melitensis* kaynaklı bruselloz vakaları görülürken; insanlar için önem taşıyan türlerin sırasıyla *B.melitensis*, *B.suis* ve *B. abortus* olduğu belirtilmektedir (6, 11, 14).

İnkübasyon periyodu 30-60 gündür. Enfeksiyon sığırlarda genellikle plasentitise bağlı bakteriyemiden sonra lokalize olur. Eğer hayvan gebe değilse lokalizasyon memelerde ve lenf nodüllerinde ya da bunlara yakın yerlerde olur. Mikroorganizma

sütle dışarı atılır. Etken karaciğere, akciğere, lenf nodüllerine veya dalağa lokalize olabilir. *B. abortus* etkeni lokalize olduğu organ veya bölgelerde granulamatoz odak oluşturur. Etken süt, idrar, uterus akıntısı ile dışarı atılabilmesine rağmen sığırlar yıllarca enfekte kalabilir. Boğalarda etken genellikle testis ve sperma kesesine yerleşir ve buralarda lokalize olur. Hastalığın sonlarında irinleşme sıkça görülür ve etken sperma ile atılabilir. Sağlıklı boğalar etken taşıyan ineklerle çiftleştirildiğinde çoğunlukla enfeksiyonu kapmazlar fakat enfekte boğalar çiftleştikleri sağlıklı ineklere hastalığı bulaştırabilirler. Hastalığın bir veya daha fazla belirtisi mevcuttur. Yavru atma en önemli semptom olurken, plasentanın atılmaması, orşitis, epididimitis önemli belirtilerdir. Bununla birlikte nadir olarakta sütle ve uterus akıntılarıyla organizmanın atılımı sonucu arthritis görülmesi sayılabilir (10, 15).

*B. melitensis* ile bulaşan sağlam bir sürüde genellikle abort olayları artar ve şiddetli bir şekilde seyreder. Buna karşılık ikinci ve sonraki yıllar abort olayları belirgin bir şekilde azalır. Bazı olaylarda plasenta atılmaz ve bunun sonucunda septisemiler kısırılığa neden olabilir. Hastalık barındıran sürülerin bakımsız olmaları veya sürü içerisinde paraziter hastalık bulunması abortusları artırabilir. Abortuslar olmadan önce hastalık etkeni süt ve idrarla atılırken, abortusdan sonra uterus akıntıları ile dışarı çıkar. Akut olaylarda görülen semptomlar arasında mastitis, topallık ve higroma bulunur. Mastitis olduğu durumlarda memelerin klinik görünüşünde farklılık yoktur fakat sütte bazı fiziksel değişiklikler görülebilir. Süt sağılınca kolayca pıhtılaşır, renginde değişimler görülür ve miktarında önemli ölçüde azalma olur (6, 11).

Brusellozun retikülo-histositer bir sistem hastalığı olması en önemli özelliğidir. Belirli organ ve dokulara yerleşir. Etkenler vücuda girdikten sonra bölgesel lenf yumrularına ve buradan da birkaç gün içinde kan dolaşımına karışırlar. Kanda 2-3 hafta kalırlar ve bakteriyemi sonucu kan ile doku ve organlara yayılıp sonra kandan yavaş yavaş çekilirler. Bu süreç sonunda organlarda lezyonlar oluşmaya başlar. Hastalık etkenleri zamanla organlardan dalak, meme ve lenf yumruları gibi dokulara yerleşir ve uzun süre bu dokularda canlılıklarını korurlar (10, 14).

Bruselloza ilişkin yapılan çeşitli araştırmalar ve resmi bildirimler, hastalığın Orta ve Kuzey Avrupa, Japonya, Kanada, Avustralya ve Yeni Zelanda gibi gelişmiş olarak nitelendirilen çeşitli ülkelerde kontrol altına alındığını veya büyük ölçüde eradike edildiğini göstermektedir. Bununla birlikte; hastalığın Batı Asya, Orta Doğu, Afrika,

Akdeniz Havzası, Orta ve Güney Amerika ile Karayipler gibi geniş bir coğrafyada halen oldukça yaygın durumda olduğu ve dünya genelinde halk ve hayvan sağlığı açısından tehdit oluşturan en önemli zoonozlardan biri olduğu bildirilmektedir (14, 19, 20).

*B. melitensis* biyotip 1 Latin Amerika, İspanya, Portekiz ve Malta'da en yaygın olarak görülen biyotipken, Yunanistan ve İtalya'da fazla biyotip sirküle etmektedir. Fransa ve Kuzey Afrika'da Biyotip 3 en yaygın olarak görülmektedir. Biyotip 2 ve 3 Batı ve Orta Asya'da en yaygın biyotiplerdir. Etkenin her üç biyotipi Kuveyt, İran, Suudi Arabistan ve Irak'ta yaygın olarak görünmektedir (21).

Resmi veriler dikkate alındığında, ülkemizdeki bruselloz mihrak ve olgu sayılarının gerek insan ve gerekse de hayvan popülasyonunda giderek artmakta olduğu dikkati çekmektedir. Brusellozun gerçek insidensinin hastalık bildiriminin yetersizliği ve subklinik olguların varlığı gibi nedenlerle tam olarak bilinemediği ifade edilirken, hastalığın özellikle Şanlıurfa, Diyarbakır, Erzurum, Kars, Van, Ankara ve Konya gibi illerde yoğunlaştığı söylenmektedir. Yine insanlardaki olguların görülme sıklığına göre sırasıyla Güney Doğu, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde gözlemlendiği vurgulanmaktadır (22, 23, 24, 25,26).

Ülkemizde hayvan ve insan kökenli izolatlardan yapılan çeşitli araştırmalarda koyun ve keçi klinik başta atık yavru olmak üzere çeşitli klinik materyallerden yapılan izolasyonlarda en fazla *B.melitensis* biyotip 3 ve bunu takiben biyotip 1 identifiye edilmektedir. Sığır kökenli *brucella* izolatların yaklaşık %90-95'ini *B. abortus* biyotip 3 oluşturmaktadır (25, 27, 28, 29).

## **2.4. Brusellozun Teşhisi**

### **2.4.1. Bakteriyel Teşhis**

Brusellozun, başlıca klinik bulgusu abort olması ile birlikte çeşitli klinik bulgularla ortaya çıkan bir enfeksiyon olmasına rağmen, klinik olarak veya otopsi bulgularına dayanarak hastalığın kesin teşhisinin mümkün olmadığı belirtilmektedir. Hastalığın teşhisinde kültürel yöntemler, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bruselloz etkenlerinin direkt izolasyonu ve kültürü için katı besi yerleri kullanılmaktadır. Geniş bir yelpazede, ticari temel besi yerleri mevcuttur. Ör: 'Brucella medium base', 'tryptose (or trypticase)-soy agar (TSA)' gibi. *B. abortus* biovar 2 gibi bazı suşların gelişimi için, %2-5 oranında, sığır veya at serumu eklenmesi

gereklidir. Birçok laboratuvar sistematik olarak temel besi yerlerine, ‘blood agar base’ (Oxoid) veya ‘Columbia agar’ (BioMérieux) serum eklemekte ve iyi sonuçlar almaktadırlar. Serum-dekstroz agar (SDA) veya gliserol dekstroz agar (GDA) gibi besi yerleri, başarıyla kullanılır. GDA genellikle, koloni morfolojisinin gözlenmesi için kullanılır (1,7,12). Yukarıda belirtilen tüm temel besi yerleri, selektif besi yeri hazırlanmasında kullanılabilir. Kontamine materyalden yapılan ekimler için ise *Brucella* etkenleri dışındaki organizmaların üremesini baskılamak için uygun antibiyotikler eklenir. En yaygın kullanılan selektif besi yeri ‘Farrell’s medium’dur. ‘Farrell’s medium’, temel besi yerine altı antibiyotik katılması ile hazırlanan bir besi yeridir. Bir litre agara belirtilen miktarlarda bu antibiyotikler eklenir. [polymyxin B sulphate (5000 units = 5 mg), bacitracin (25,000 units = 25 mg), natamycin (50 mg), nalidixic acid (5 mg), nystatin (100,000 units), vancomycin (20 mg)]. Ticari olarak toz halde bu supplement mevcuttur (Oxoid SR0083A). Etkenin izolasyonunun göreceli olarak zor olduğu süt ve vaginal svap gibi klinik örnekler katı selektif besi yerine ekimden önce zenginleştirme sıvı besiyerine ekilirler. Laboratuvara ulaşan süt ve doku örnekleri, eğer hemen kültüre edilmeyeceklerse, dondurulurlar. Bu besiyerinin hazırlanmasında serum ve dekstroz ilave edilmiş triptik soy broth kullanılır. Selektifliği sağlamak için amfoterisin B (1 µg/ml) ve vankomisin (20 µg/ml) ilave edilir. Bu zenginleştirilmiş besiyerinde örnekler % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 6 haftaya kadar inkübe edilirler. İnkübasyon süresince katı selektif besiyerine haftalık alt pasajlar yapılır. Altı hafta boyunca üreme görülmeyen örnekler negatif olarak değerlendirilir. *Brucella* etkenlerinin cins seviyesinde identifikasyonunda bakteri morfolojisi, koloni morfolojisi, *Brucella* anti-A+M poliserumu ile lam aglutinasyon testi, oksidaz ve üreaz testleri kullanılır (Tablo 2.2.). Tür ve biyotip seviyesinde identifikasyonda karbondioksit (CO<sub>2</sub>) gereksinimi ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretimi, tiyonin ve bazik fuksin varlığında üreme, A ve M monospesifik anti-serumlar ile aglütinasyon yöntemleri kullanılır (6).

Hastalığın teşhisinde kültür ve etkenin izolasyon ve identifikasyonunun teşhiste altın standart olmasına rağmen uzun süre alması, etkenle çalışmanın yarattığı enfeksiyon riski ve etkenin biyogüvenlik 3 seviyesinde çalışmalar gerektirmesi teşhiste daha ziyade serolojik ve moleküler yöntemlerin tercih edilmesine neden olmaktadır. Moleküler teşhisinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), single nükleotit polymorfizm (SNP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), multiple lokus variable

number of tandem repeat analysis (MLVA) gibi teknikler başlıca kullanılan yöntemler arasındadır (1, 6).

**Tablo 2.2.** Klasik *Brucella* türlerinin biyotiplerinin ayırıcı karakterleri (7)

Tür	Biyotip	CO <sub>2</sub> Ger.	H <sub>2</sub> S üretimi	Boyalarda üreme <sup>a</sup>		Monospesifik anti-serumlarla Aglütinasyon		
				Tiyonin	B.fuksin	A	M	R
<i>B.melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	+	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-
	4	+	+	-	+ <sup>c</sup>	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
<i>B.suis</i>	9	-, +	+	+	+	-	+	-
	1	-	+	+	- <sup>d</sup>	+	-	-
	2	-	-	+	-	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	- <sup>e</sup>	+	+	-
5	-	-	+	-	-	+	-	
<i>B.neotomae</i>		-	+	- <sup>b</sup>	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	- <sup>e</sup>	-	-	+
<i>B.canis</i>		-	-	+	- <sup>e</sup>	-	-	+

“<sup>a</sup>” Boya konsantrasyonu 20 µg/ml (1/50 000).

“<sup>b</sup>” 1/100.000 boya konsantrasyonunda üreme olmaktadır.

“<sup>c</sup>” Kanada, İngiltere ve USA’dan izole edilen bazı suşlar negatiftir.

## 2.4.2. Serolojik Testler

Sığırlarda *B. abortus*'a karşı gelişen antikorların saptanmasında çok sayıda serolojik test kullanılmaktadır. Serolojik testler indirekt tanı testleri olarak bireyselden çok sürü tarama testleri olarak işlev gören ve hastalığın teşhisinde yukarıda kültür yönteminde bahsedilen dezavantajlardan dolayı en sık başvurulanan testlerdir (7, 11, 14, 20). Ancak brusellozun hastadaki her evresini, her epidemiyolojik durumda ve her hayvanda saptayacak tek bir serolojik test yoktur. Hastalığın serolojik teşhisinde kullanılan testler başlıca Rose-Bengal Plate Testi (RBPT) ve Komplement Fiksasyon Testi (CFT) (bu iki test OIE'nin önerdiği resmi testlerdir), aglutinasyon testleri, sütle yapılan ring test, coombs testi, serum ve sütle yapılan ELISA, cELISA ve Floresans polarizasyon testi (FPA) gibi tekniklerdir (6).

Brusellozun teşhisinde kullanılan başlıca serolojik testler şunlardır;

### Standart Tüp Aglutinasyon Testi

Bruselloz tanısında kullanılan Standart Tüp Aglutinasyon Testi (SAT) testi ilk kez Wright ve arkadaşları tarafından 1897 yılında kullanılmıştır. Hastanın serumunda bulunan antibrucella antikorlarının *brucella* antijenleri ile aglutinasyonu temeline dayanan bir testtir. SAT sığır brusellozunun kontrol programlarında başarılı bir şekilde kullanılmış ve antijene EDTA eklenmesi ile spesifitesi önemli derecede artmıştır. Antijen referens suşlar olan *B. abortus* S99 veya *B. abortus* 1119-3 suşunun fenollü tuzlu su (% 0.85 NaCl (w/v) ve % 0.5 (v/v)fenol) kullanılır. Antijenin final pH değeri  $7.2 \pm 0.2$  olmalıdır (7). Prezon fenomeninin önlenmesi için en azından 3 dilüsyonunun yapılmış olması gerekir. Sonuçların yorumlanmasında bir serumdaki *brucella* aglutinasyonu ml başına uluslararası ünite (IU) kullanılmalıdır. Mililitre başına 30 IU den daha fazla antikor taşıyan serum, brucellosisin serolojik tanısı olarak pozitif kabul edilir. Ancak SAT uluslararası ticarete önerilmemektedir (6). SAT düşük tanısal duyarlılık göstermekte ve özellikle kronik olarak enfekte sürülerde kullanımı sorunludur. Bunun da nedeni akut fazdan sonra aglutine olmayan Ig'G lerin artmasıdır. SAT'da non-aglutinan antikorların varlığı, prezon fenomeni, nonspesifik reaksiyonların fazla olması testin yaygın kullanımını ve uluslararası ticarete önerilmemesinin önemli faktörleridir (30).

**Prezon Fenomeni;** Hasta serumunda antikor fazlalığından düşük sulandırmalarda aglütinasyonun belirmemesi olarak tanımlanır. Bu durumun önlenmesi için serum sulandırılması ileri titrelere kadar devam ettirilir ve sonuçlar bu şekilde değerlendirilir (7).

### **Rose Bengal Pleyt Testi (RBT)**

RBPT düşük pH derecesinde antikorlarının varlığını açığa çıkaran bir testtir. RBPT, kart testi ve tamponlanmış plak aglütinasyon testlerinin tümüne tamponlanmış *Brucella* antijen testleri denmektedir. Bu testlerin non-spesifik aglütinasyona eğilimli olmadığı, prozon fenomeninden etkilenmediği ve dolayısı ile SAT'dan çok daha duyarlı testler olduğu, mevcut diğer serolojik testler arasında enfeksiyonu en erken saptayan bir test olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular 3.65 lik bir asit pH değerinde non-aglütinan IgG1'in aglütinasyon gösterdiğini, bloklama ve prozon fenomenlerinin ortadan kalktığını göstermektedir. RBPT'nin KFT'den bile önce pozitifleri saptaması IgM'nin en azından bir fraksiyonunun hala aktif olduğunu düşündürmektedir. RBPT'nin IgG2'yi ve bir dereceye kadar IgM'yi aglütine etme kapasitesinde antijenin hazırlanış tekniklerine ve değişik ticari formlarında farklılıklar olsa da tümü IgG1'i çok etkili bir şekilde saptar. Bu durumun neden RBPT ve KFT arasında mükemmel bir korelasyon olduğunu ortaya koyduğu bildirilmektedir (6, 30).

### **Coombs Testi**

Gerek insanlarda ve gerekse hayvanlarda brusellosisi takiben hastanın kan serumunda ilk aglütine edici antikor piki oluşur ve daha sonra bazı durumlarda zaman ilerleyince aglütine edici antikorların yerini aglütine etmeyen antikorlar alırlar. Bu antikorlar bakteriye yapışmış olarak kalmakta, aglütine olmamaktadır. Bu antikorlar ancak anti-immunoglobulin serum kullanılarak ikinci bir aglütinasyon ile ortaya konabilirler. Buna brusellozis Coomb's veya anti-immunoglobulin test denir. Bu test, klinik semptomlara bakılarak Brusellozisten şüphe duyulan, fakat özellikle SAT yönteminde sero-negatif sonuç veren hayvanlara uygulanan ve inkomple antikorları tespit etmek için kullanılan hassas bir testtir. Bazı serumlarda spesifik *Brucella* antikorları bulunmasına rağmen aglütinasyon oluşmaz. Bu serumları blokan antikorlar bakımından araştırmak gereklidir. Bu tür antikorlar daha çok subakut klinik durumlarda oluşurlar ve IgG yapısındadırlar (30,31).



### **Merkaptoetanol (ME-2) veya Rivanol Testleri**

Hastalığın aktif olarak devam ettiğini gösteren Ig G antikorların varlığını tespit etmek gerekir. Oluşacak bu durumda total titrenin Ig M' ye ait bölümü için Merkaptoetanol veya Rivanol kullanarak Ig M' deki disülfid bağları ayrılır ve parçalanır. Devamında yüksek titrede Ig G tespit edilirse alevlenme tanısı konabilir. Bir sonraki haftada tekrarlanan testte titre artımı tespit edilir ise tanı kesinleşir (7, 11).

### **Komplement Fiksasyon Testi**

Komplement fiksasyon testi (KFT) yaygın olarak kullanılan ancak kompleks bir yöntem olup iyi laboratuvar uygulamaları ve deneyimli personele ihtiyaç gösteren bir testtir. KFT genellikle çok spesifik bir testtir ancak duyarlılığı RB ve i-ELISA'dan daha düşüktür (6). Prezon fenomeni nedeniyle testte tüm serum örneklerinin titrasyonunun yapılması önemlidir. Çünkü düşük titreli enfekte hayvan serumları komplemanı fikse etmez. Bunun nedeni komplemanı fikse etmeyen yüksek seviyedeki antikor izotipleri antijen bağlanma bölgeleri açısından birbirleri ile yarışır. Daha yüksek dilüsyonlarda bunlar dilüye olur ve komplement fikse edilir. Böyle pozitif örnekler eğer tek bir dilüsyonda test edilecekse gözden kaçabilir. Ayrıca kontamine edici bakteriler veya serumdaki diğer faktörler komplemanı parçalayabilir, fikse edebilir veya antijen yokluğunda bile pozitif reaksiyona neden olabilirler. Bu gibi antikomplementer etkiler testin sonuçlarının alınmasını etkiler (10). KFT farklı formatlarda kullanılabilir. Fakat en güvenli olanı mikroplyt formatında yapılanıdır. Serum antijen ve serum birlikte sıcak ( $37 \pm 2$  °C 30 dakika) veya soğukta ( $5 \pm 3$  °C 14-18 saat) inkübe edilebilir. Kötü kalitedeki serumların anti komplementer aktivitesinin soğuk fiksasyonda daha fazla olduğu bildirilirken, sıcak fiksasyonun prezon fenomeninin oluş sıklığını ve yoğunluğunu artırdığı bildirilmektedir. Testin değerlendirilmesinde 20 ve üzerinde internasyonal komplement fiksasyon birimi (ICFTU/ml) titre veren serumlar hastalık açısından pozitif olarak değerlendirilir. On sekiz (18) ayın üzerindeki aşılmayan hayvanlar test edildiklerinde bu değer 30 ICFTU/ml olarak değerlendirilir (6).

### **Süt Ring Testi**

*B. abortus*'a karşı antikorların sütte tespit edilmesinde yaygın olarak süt ring testi (SRT) kullanılmaktadır. Basit ve pratik bir test olan SRT'nin ilkesi antikorların

sütteki yağ globülinlerine Fc bölgesi ile bağlanması, *brucella* aglütininlerin reaktif bölgelerinin *brucella* bakterileri ile bağlanmaları için hazır halde bulunmalarıdır. Bir lipoprotein olarak bildirilen bu aglütininler sütün yüzeyine krema tabakasına çıkarak burada konsantre olmaktadır (32, 33). Boyalı tüm hücre SRT antijeni ise burada kendisine karşı oluşmuş spesifik antikorlara bağlanarak krema tabakasını koyu mavi bir renkte oluşturmaktadır. Dolayısı ile sütte *brucella* spesifik antikor varsa sütün üstündeki krema tabakası mor bir band oluşturur iken, spesifik antikor olmaması durumunda krema tabakası beyaz renkte olmakta ve mavi renk sütün her tarafına dağılmaktadır (7). Bu test sığırlar için iyi bir tarama testi olmasına karşılık, doğumdan hemen sonra ve laktasyonun sonuna doğru alınan sütlerde, mastitisli sütlerde, donmuş sütlerde kullanılamaması ve kullanılması halinde yanlış pozitif sonuçlar vermesi olasıdır. Büyük sürülerden alınan süt örneklerinde ve enfeksiyonun erken dönemlerinde yeterli duyarlılık göstermemesi ve etçi sığırlarda çok sınırlı bir kullanım alanı bulması nedenleri ile birtakım dezavantajlara sahiptir. SRT'nin *B. abortus* ile enfekte hayvanları ancak %88.5 oranında identifiye ettiğini ve *B. abortus*'un izole edilmediği hayvanların ise ancak %77.4 oranında saptadığını bildirilmiştir (34). Bu testin yapılışında; plastik bir tüp içinde yaklaşık 1 ml süt ile bir damla haematoxilin boyalı antijen karıştırılır. Eğer bu karışım sonucunda sütün üzerinde kremayla birlikte mavi bir halka oluşuyorsa sütte spesifik bir antikor var demektir. Bu test hassastır, ancak büyük bir sürü içinde bulunan az sayıda ki enfekte hayvanların belirlenmesinde başarısız olabilir. Süt ring testi bakteriyel kültürle beraber *B. abortus* ile enfekte sığırları saptamada yıllardır kullanılmakta olan bir testtir. Ancak, SRT erken enfeksiyonlarda ve çok geniş sürülerden alınan tank örneklerinde yeterli duyarlılık gösterememekte ve bu durum sütçü sığırlarda bir tarama testi olarak kullanılabilirliğini sınırlamaktadır (6, 22).

### **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Testi**

Çok sayıda araştırmacı süt ve serumda uygulanan çok sayıda ELISA tabanlı çalışmalar bildirmişlerdir. Thoen ve ark. (35) ısı ile öldürülmüş S19 hücrelerini antijen olarak kullandıkları süt ELISA'da duyarlılığın SRT ile benzer olduğunu ve 11 enfekte olmayan inekte hiç pozitif saptamadıklarını bildirmişlerdir. Boraker ve ark. (36) sütte yaptıkları ELISA'nın SRT ve kültür pozitifliği ile yüksek oranda korelasyon gösterdiğini, SRT'nin yanlış pozitiflerini elimine ettiğini ve bazı SRT negatif örnekleri ise pozitif bulduklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ELISA'nın inek sütünde SRT ile

saptanandan çok daha düşük titrede antikor saptadığını ve bu nedenle gerek bireysel ve gerekse tank sütlerinde iyi bir tarama testi olduğunu bildirmişlerdir. Abuharfeil ve Abo-Shehada (37), koyunlarda *B.melitensis* enfeksiyonunu tespit için kullandıkları RBPT, CFT, ELISA yöntemlerini karşılaştırmışlar ve ELISA yönteminin diğer testlere oranla daha yüksek bir özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olduğunu bulmuşlardır. Kerkhofs ve ark. (38) tarafından sütte Ig G1, Ig G2 ve Ig A antikorlarını, MRT ve ELISA yöntemleriyle analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda MRT ile % 58, ELISA ile Ig G1 için % 92,8 pozitif sonuç elde edilmiştir. Romero ve ark. (39), brusella-ari sürülerden gelen süt örnekleri ile yaptıkları süt ELISA'da özgüllüğü %100 ve 56 *brucella* kültür pozitif hayvandan alınan sütlerin ELISA ile test edilmeleri sonucunda duyarlılığı % 98.2 olarak bulmuşlardır. Güllüce ve Leloğlu (40), tarafından Kars merkez ve ilçelerine bağlı, 22 yerleşim biriminden, aşısız ve enfekte sürülerden 712 adet süt örneği toplanmış, ELISA ve MRT ile çalışılmıştır. *B. abortus* 'a karşı oluşan antikorlar saptanmıştır. Süt örneklerinde ELISA ile 467 (%65.59), MRT ile 401 (%56.32) pozitif sonuç belirlenmiştir.

Biancifiore ve ark. (41), *Brucella* arisürüden elde ettikleri süt örnekleri ile yaptıkları süt ELISA'da özgüllüğü %100 ancak RBPT ve KFT'ye göre süt ELISA'nın duyarlılığını sırası ile % 65 ve % 83 olarak bulmuşlardır. Tanısal duyarlılık kültür pozitifliğine göre yapıldığında duyarlılık % 92 olarak bulunmuştur.

Chand ve ark. (42) süt-ELISA, serum-ELISA, RBPT, SAT ve süt kültürü ile *Brucella melitensis* enfeksiyonu tanısı için 704 laktasyon koyunlarından süt ve kan örnekleri incelemiştir. Bu koyunlardan 209'u enfekte olmayan koyun sürüsünden, 443'ü brusellozla enfekte koyun sürüsünden ve 52'si bruselloz için durumunun bilinmediği özel koyun sürülerindendi. Süt-ELISA'nın bruselloz ari sürüdeki özgüllüğü % 100 ve enfekte sürülerde duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri sırasıyla % 96.11 ve % 94.28 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda süt ve serum ELISA'nın önemli derecede korelasyon gösterdiğini ve bu nedenle süt ELISA'nın özellikle laktasyondaki koyunlarda hastalığın teşhisi için çekici bir alternatif olduğunu savunmuşlardır.

Kamwine ve ark. (43) Güneybatı Uganda'da süt çiftlikleri ve fabrikalardan topladıkları 185 çiğ süt örneğini Milk Ring Testi (MRT) ve İndirekt ELISA yöntemiyle *Brucella* spp. yönünden araştırmışlardır. Araştırmacılar SRT'nin duyarlılığını % 85 ve

özgüllüğünü %95 bulurken milk ELISA'nın duyarlılığını % 98.5 ve özgüllüğünü % 99.5 olarak bulmuşlardır.

Nicoletti ve Tanya (44), Brusellozisli ve S 19 ile aşılaman hayvanlardan sağlanan 828 serum üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, ELISA yöntemleriyle bu ineklerin 278'inde *Brucella abortus* ve S 19 varlığını tespit ederek, bu yöntemin Cart'a göre duyarlı, fakat daha az özgül olduğunu belirlemişlerdir. Nielsen vd. (45), Kanada'daki enfekte olmamış sürülerden sağlamış oldukları 6232 adet süt örneği ile Arjantin ve Şili'de enfekte olmuş sürülerden sağladıkları 202 adet örnek üzerinde ELISA ile yapmış oldukları incelemeler sonucunda, Şili'deki enfekte sürülerden sağlanan örnekler için %95'lik güven sınırı içinde çalışıldığında duyarlılığın %95.2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içinde ki duyarlılığın %98.7 olduğunu tespit etmişlerdir. Vanzini vd. (46), 2119 adet süt örneği ile yaptıkları süt ELISA'nın duyarlılığını %99.6 ve özgüllüğünü % 95.1 olarak bularak indirekt süt ELISA'nın yüksek duyarlık ve özgüllük gösteren ve aynı anda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlayan bir test olduğu sonucuna varmışlardır. Titarelli ve ark. (47), manda sütlerindeki *brucella* antikorlarını saptamak üzere geliştirdikleri süt ELISA'da 100 negatif ve *B. abortus* biovar 1'in izole edildiği 3 ayrı enfekte sürüden topladıkları 30 pozitif süt örneği kullanarak testin duyarlılığını %100 (CI, %90.8-%100) ve özgüllüğünü %98 (CI, %93-%99.4) olarak saptamışlardır (47).

## 2.5. Korunma ve Tedavi

Hastalığın tedavisi insanlarda antibiyotikler ile yapılabilmektedir. Genellik antibiyotikler kombine edilerek uygulanmaktadır (12). Ancak hayvanlarda bu yöntemle tedavi edilen vakalarda ki problem, hastalığın tekrarlaması, tedavinin çok ekonomik olmaması ve hastalık taşıyıcılığını ortadan kaldırmaması nedeniyle hayvanlarda çoğunlukla tercih edilmez. Bu sebeplerden ötürü hayvanlardaki Brusellozis olguları için korunma daha çok önem teşkil etmektedir (14,19, 20,49).

Hayvanlarda hastalıktan koruma yöntemlerinin başında aşılama gelmektedir. Bu aşılama işlemi için, sığırlarda *B. abortus* S 19, koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev 1 aşısı kullanılmaktadır. Ülkemizde son yıllarda brusellozis yönünden yapılan en geniş çalışma, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın 1997 yılında başlatmış olduğu projedir. Bu projenin amacı sığır ve koyun brusellozis'in ülke genelindeki durumunun belirlenmesi ve brusellozis kontrol programının yeniden düzenlenmesidir. Proje kapsamında, 34458

adet sığır ile 30433 adet koyundan alınan toplam 64891 serum örneği brucellozis yönünden incelenmiştir. Bu serum örnekleri ülke genelinde ki tüm illerin dörder ilçesinden örnekleme yoluyla toplanmıştır. Serumlar rose-bengal testi ile taranıp pozitif sonuç alınanların komplement fikzasyon testi (CFT) ile doğrulanması yapılmıştır. 2000 yılında bakanlık tarafından yayınlanan araştırma sonucuna göre ülke genelinde ki brusellozis prevalansının sığırlar için % 1.43, koyunlar için ise bu oran % 1.97 olarak bildirilmiştir (24).

Bu çalışmada *Brucella* türleri içindeki sığırlarda hastalık oluşturan türlerin sütte indirekt ELISA ile belirlenmesidir. Hastalığın teşhisi için bakteriyolojik izolasyon ve identifikasyon altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, hastalığın tanısı büyük ölçüde serolojik testlere dayandırılmaktadır. Sütçü sığır işletmelerinde sütün diğer numunelere göre gerek hayvandan alınmasının daha kolay olması ve hayvanda stress yaratmaması, gerekse daha az masraflı olması nedeniyle süt, serolojik yoklamalarda sık kullanılan bir örnek olarak kabul edilmektedir. Süt ring testi (SRT) en yaygın tarama testi olarak kullanılmaktadır. Süt ring testi (SRT) sığırlarda uygun ve sık kullanılan bir tarama testi olmasına rağmen, doğumdan hemen sonra ve laktasyonun sonuna doğru alınan örnekler ile mastitisli sütlerde yanlış pozitif sonuç vermesi, donmuş ve beklemiş süt örneklerinde kullanılamaması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlardan ötürü ELISA yöntemi daha tercih edilebilir bir yöntemdir. Ülkemizde ticari olarak kullanılan bir süt ELISA kiti bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada bu eksiklikten yola çıkarak sütte uygulanacak bir ELISA prototipi geliştirilmesi hedeflenmiştir.

### 3.GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1.Gereç

##### A) Bakteriyel Suş ve Referens Serum ELISA Antijeni

Çalışmada Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önceki çalışmalarda izole edilmiş ve *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlanan suş, antijen hazırlamada kullanıldı. In House Serum ELISA için kullanılacak solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edildi.

##### B) Referens Pozitif ve Negatif Süt ve Serum Örnekleri

Yeni geliştirilen süt ELISA prototipi ROC analizleri için daha önce etkenin izole edildiği enfekte sığır sürüsünden alınan 36 adet serum ve süt örneği pozitif referens süt (PRS) ve bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt örneği ise negatif referans süt (NRS) olarak kullanıldı. Bu serum örneklerinin bilinen KFT ve RBPT sonuçları ROC analizinde testin duyarlık, özgüllük ve eşik değerinin saptanmasında kullanıldı.

##### C) Test Serum ve Süt Örnekleri

Daha önce brusellozun görüldüğü (A, B, C, D) ve görülmediği (E ve F) toplam 6 ayrı sürüden alınan kan ve süt örnekleri, geliştirilen süt (milk) ELISA, in house serum ELISA ile ve tarama testleri olan RBPT ve süt ring testi (SRT) ile test edildiler. Bu testlerde B maddesinde belirtilen pozitif ve negatif süt ve serum kontrolleri kullanıldı. F ve D sürülerinden sadece süt örnekleri alınırken diğer sürülerden aynı hayvandan hem süt hem de serum örnekleri alındı.

##### D) Antijen Hazırlanmasında Kullanılan Besiyeri ve Solüsyonlar

###### Serum Dekstroz Agar (SDA):

Triptik soy agar	40 gr.
Steril at serumu	50 ml
Steril dekstroz solusyonu (%20 w/v)	50 ml
Distile su	900 ml.

pH 7,2±0.2

Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C de 20 dakika sterilize edildi. Besiyeri otoklavlanma sonrası 56 °C' ye soğutulduktan sonra içine serum ve steril dekstroz çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril petrilere taksim edilerek sterilizasyon kontrolünden sonra buzdolabında +2°C/+8°C'de muhafaza edildi.

### **Farrel's Besiyeri**

Triptik soy agar 40 gr.

Steril fetal buzağı serumu 50 ml

Distile su 900 ml.

pH 7,2±0.2

Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C de 20 dakika sterilize edildi. Besiyeri otoklavlanma sonrası 56°C'ye soğutulduktan sonra içine serum ve *Brucella* Ticari selektif supplement (Oxoid SR0083A) üreticinin direktifleri doğrultusunda hazırlanarak ilave edildi. Hazırlanan besiyeri steril petrilere taksim edilerek sterilizasyon kontrolünden sonra buzdolabında +2°C/+8°C'de muhafaza edildi.

### **Dengeli Tuzlu Su (PBS):**

Di-sodiumhydrogenorthophosphate 1.4 g

Sodiumchloride 7,0 g

Potassiumchloride 0,2 g

Potassium di-hydrogenphosphate 2 g

Distile su 1 litre

Hazırlanan solusyonun pH değeri 7.2'ye ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavlanarak sterilize edildi.

### **E) ELISA İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **1) Pleyt Antijen Saplama Solusyonu**

Sodyum hidrojen karbonat 2,93 g

Sodyum karbonat 1,59 g

Distile su 1 litre

Hazırlanan solüsyonun pH değeri 9.6 olarak ayarlandı ve 121°C’de 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

## 2) Dilüsyon Tamponu

Di-sodyum hidrojen ortofosfat	1,4 g
Sodyum klorid	7,0 g
Potasyum klorid	0,2 g
Potasyum di hidrojen fosfat	2 g
Tween 20	1 ml
Fenol red (%1 w/v)	1 ml
Distile su	1 litre
pH	7.3

## 3) Bloklama Solüsyonu (% 1 BLOTTO)

PBS	500 ml
Süt tozu (yağsız)	5 gr
Tween 20	500µl

## 4) Substrat Solüsyonu (fosfat-sitrat buffer, pH 5.0)

Dibazik sodyum sitrat	0.2 M
sitrik asit	0.1 M
o-Phenlyenediamine Dihydrochlorine	40mM
%30 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4mM



### 5) Yıkama Solüsyonu

Di sodyum hidrojen ortofosfat	0.14 gr
Tween-20	1 ml
Distile su	10 litre

### 3.2.Yöntem

#### Antijen Üretimi

Antijen üretimi için seçilen suşun kültürel özellikleri klasik biyotiplendirme prosedürüne (6, 7) göre kontrol edildikten sonra *B. abortus* biyotip 3 suşu 10 adet serum dekstroz agara ekilerek 37°C'de %5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 72 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ekilen koloniler saflık yönünden kontrol edildi. Antijen olarak Yi ve Hackett (2000)'in bildirmiş olduğu Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı (50). Bu amaçla *B. abortus* biyotip 3'ün üreyen saf kolonileri steril PBS ile toplandılar. Toplanan kültürler ısı ile inaktive edildikten ve canlı bakterinin kalmadığı tespit edildikten sonra +4°C'de 3.500 rpm' de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Alttaki bakteri peleti toplandı. Toplanan her bir gram bakteri peleti için 3 ml Tri-reagent kullanıldı. Karışım oda derecesinde 10-15 dakika kadar uygun bir homojenizasyon için bekletildi. Bu sürenin sonunda, faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri peleti için karışıma 500 µl kloroform eklendi. Süspansiyon vortekste hızlıca karıştırılarak 10 dakika daha inkübe edildi. Karışımlar eppendorf tüplere dağıtılarak 12.000 g.'de 10 dakika süre ile santrifüj edildiler. Böylece su ve organik fazlar ayrıldı. Su fazı ayrı bir steril tüpte toplandı. Tüm ham LPS'nin ekstrakte edilebilmesi için organik faza 200 µl distile su eklendi ve karışım tekrar 12.000 g.'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazları toplandı ve elde edilen bu Tri-reagent ile ekstrakte edilen LPS çözeltisi -20 °C de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

In House Serum ELISA için Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edilen solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) ile 1:6000 oranında ELISA kaplama solüsyonu ile sulandırılarak pleytlere kaplandı.

## **Süt Örneklerinden Etken İzolasyonu Çalışmaları**

Süt örneklerinden etken izolasyonu için OIE Manuel'de belirtilen yöntem kullanıldı (6). Kısaca süt numuneleri, her bir meme lobunda aseptik şartlarda alındıktan sonra aerosol yaratmayacak bir şekilde santrifüj edilerek üstteki krema ve alttaki tortudan selektif Farrel's mediuma ekim yapıldı. Brusella etken sayısı genellikle sütte atık materyallere göre daha düşük bulunduğundan (atıktan hemen sonra alınmamış ise), ön zenginleştirme yapılması tavsiye edilir. Bu besiyerinin hazırlanmasında serum ve dekstroz ilave edilmiş triptik soy broth kullanıldı. Selektifliği sağlamak için amfoterisin B (1 µg/ml) ve vankomisin (20 µg/ml) ilave edildi. Bu zenginleştirilmiş besiyerinde örnekler negatif olarak kabul edilmeden önce % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 6 haftaya kadar inkübe edildiler. İnkübasyon süresince katı selektif besiyerine haftalık alt pasajlar yapıldı.

### **Serolojik Testler**

Süt örneklerinin alındığı hayvanların kan serumları Rose Bengal pleyt test, (RBPT) ve İndirekt ELISA ile test edildiler Tüm test süt örneklerine süt ring testi ve indirekt milk ELISA uygulandı. RBPT ve SRT antijenleri Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'nden temin edildi. Bu testlerin (RBPT ve SRT) uygulanması Alton ve ark. (19) belirttiği yöntemle göre yapıldı.

### **Süt Ring Testi (SRT):**

Bir damla (30 µl) boyalı SRT antijeni küçük bir cam tüpün içinde bulunan 1 ml süte ilave edilerek tüpler çalkalandı. Test sonuçları tüplerin 1 saat süre ile 37°C de inkübe edilmesinden sonra değerlendirildi (Tablo 3.1.).

**Tablo 3.1.** SRT sonuçlarının değerlendirme kriterleri.

Sütün krema tabakasının rengi	Krema tabakası altındaki sütün rengi	Değerlendirme
Koyu mavi	Beyaz	+++ Pozitif
Koyu mavi	Açık mavi	++ Pozitif
Koyu mavi	Koyu mavi	+ Şüpheli
Açık mavi	Koyu mavi	± Şüpheli
Beyaz	Koyu mavi	- Negatif

### **İndirekt Serum ELISA**

Çalışmada kullanılacak olan her bir test ELISA solid faz antijeni Animal and Plant Health Agency (APHA) 0.1 µg/kuyucuk olacak şekilde 0.05M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı pleytlerin (NUNC 692620) blank (kör) olarak kullanılan H11 ve H12 nolu kuyucukları hariç diğer tüm kuyucuklarına 100 µl olarak taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler % 3 süt tozu (skim milk) içeren PBS solüsyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytler% 0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandılar. Primer antikor bağlanması aşamasında, her hayvan türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 süt tozu içeren PBS/T solüsyonu içinde 1:50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından, pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl olarak konuldu. Pleytlerin üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile çalkalayıcı (shaker) üzerinde inkübasyonları yapıldı. Pleytler tekrar 4 kez aynı yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, horseradishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini belirlenen dilüsyonda, %1 süt tozu içeren PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg *ortho-phenylenediamine* ve %0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek pleytler

otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorban değerleri okundu. Testin sonuçlarının belirtilmesinde aşağıdaki formül kullanıldı.

Yüzdelik pozitivite (Percent positivity PP)= Test örneğinin optik dansitesi-ortalama negatif serum optik dansitesi/ortalama pozitif kontrolün optik dansitesi-ortalama negatif serum dansitesi X100.

### **İndirekt Süt ELISA**

İndirekt ELISA, Vanzini ve ark. (1998) bildirdiği yönteme göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı (46). Yeni bir ELISA kiti geliştirileceği için kullanılacak antijen ve konjugatın optimum dilüsyonları belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonlar (Checkerboard) yapıldı. PRS ve NRS arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyon optimum antijen olarak seçildi. Hazırlanan ELISA solid faz antijeni, belirlenen dilüsyonda hazırlanarak 0.05M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solüsyonu içinde sulandırılarak, 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) tüm kuyucuklarına 200 µl olarak taksim edildi. Daha sonra antijenle kaplanan pleytler 4°C de 18-24 saat inkübe edildiler. Bunları takiben pleytler % 0.05 Tween 20 içeren yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Daha sonra NRS, PRS ve test süt örneklerinden 100 µl olarak her numune için ikişer kez olmak üzere pleyte konuldu. Tüm ELISA dizaynlarında H 7-8 kuyucukları pozitif referens, H 9-10 negatif referens ve H 11-12 kuyucukları ise blank (kör) olarak kullanıldı. Pleytler orbital çalkalayıcı üzerinde oda ısısında 1 saat süre ile inkübasyona bırakıldılar. Bu sürenin sonunda yıkama işlemi gerçekleştirildi. Devamında konjugatı (horseradishperoxidaseile işaretlenmiş rekombinant protein A/G) daha önce belirlenen oranda dilüsyon buffer ile sulandırılarak pleytin her bir gözüne 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandılar ve üzerlerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorban değerleri okundu. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü, referens pozitif ve negatif serumların KFT ve RBPT sonuçlarına göre yapılan *receiver perator characteristics* (ROC) analizinin sonucunda belirlenen eşik değerine göre yapıldı.

### **İstatiksel Analiz**

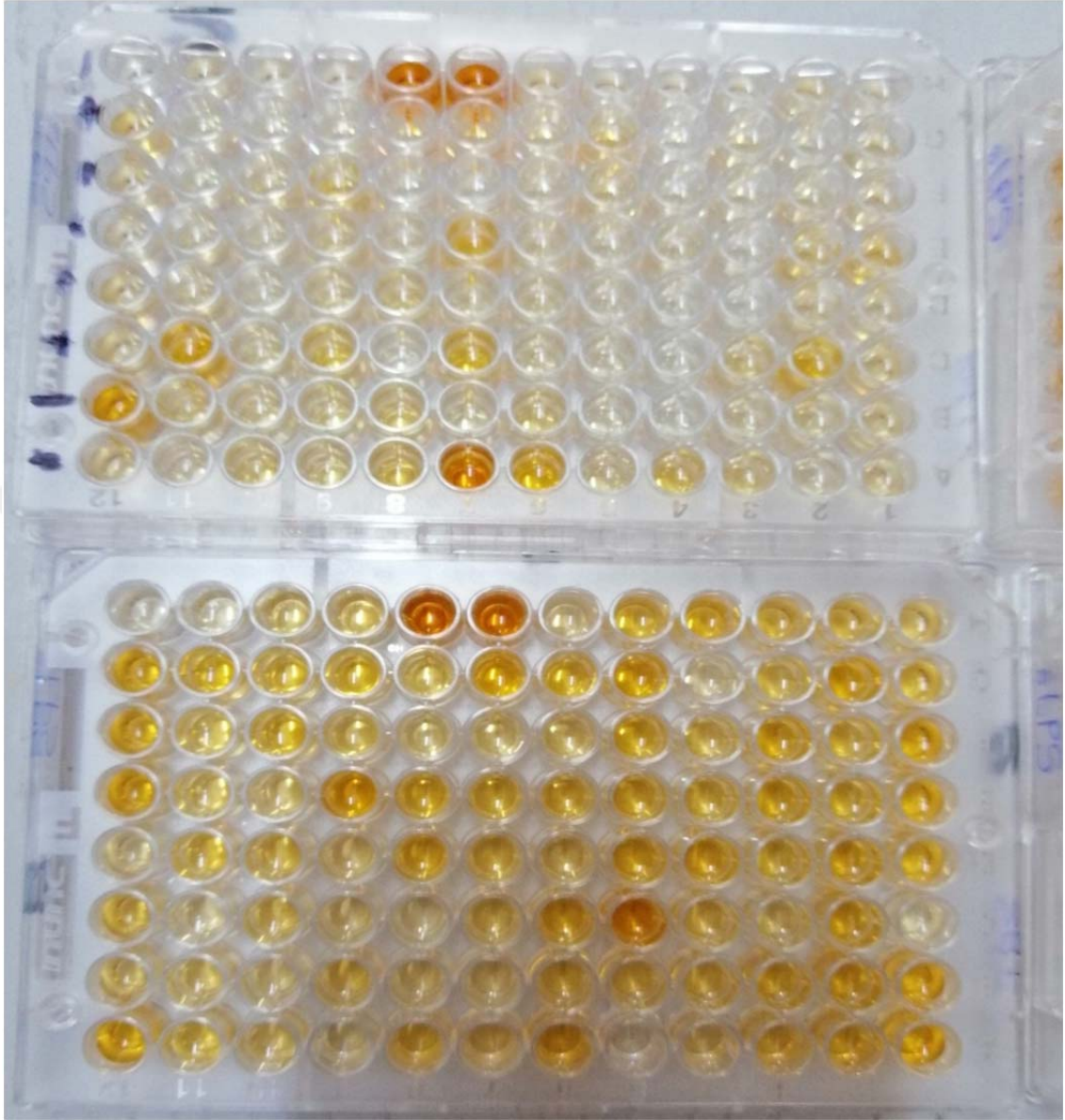
ROC analizi, %95 güven eşiğindeki güvenlik aralıkları, tanısal duyarlık ve özgülük Medcalc software programı kullanılarak yapıldı (48).



## 4.BULGULAR

Prototip milk ELISA için antijen olarak daha önce izole edilmiş *B. abortus* biyotip 3 izolatından hazırlanan ham LPS ile kaplanmış pleytlerde çalışmada 6 farklı sürüden alınan süt örneklerinin milk ELISA sonuçları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

Çalışmada geliştirilen süt ELISA'nın tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü saptamak amacı ile daha önce *B. abortus* izole edilen enfekte sürüden alınan 36 adet serum ve süt (pozitif referens süt (PRS)) örneği ile alınan sonuçlar Tablo 4.1.' de gösterildi. Bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt (negatif referens süt (NRS)) örneği ile alınan sonuçlar Tablo 4.2.' de gösterildi. Bu serum örneklerinin daha önce kaydedilmiş KFT ve RBPT sonuçları ROC analizi ile testin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü belirleyecek eşik değerin saptanmasında kullanıldı. Buna göre duyarlılık (sensitivite) % 96,15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar (%80.36-99.9))] ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) % 29.3 PP olarak belirlendi.



**Şekil 4.1.** *B.abortus* biyotip 3 bakterisinden hazırlanan antijen ile kaplı ELISA pleytinde farklı sürülerden alınan sütlerin verdiği reaksiyon.

**Tablo 4.1.** Pozitif referens serumların RBPT ve KFT sonuçları ve bu serumların alındığı hayvanda *Brucella* izolasyon durumu

Serum no	RBPT	KFT (ICFTU)	M-ELISA (%PP)	kültür
7	+	11,1	11,9	-
114	+	105,1	81,1	-
5985	+	74,3	75,8	-
16	+	841	106,5	+
3462	+	26,3	31,4	-
62	+	74,3	85,8	-
1095	-	26,3	35,0	-
4571	+	125	77,2	-
5947	+	52,6	69,0	-
6794	-	52,6	34,5	-
5076	-	11,1	4,8	-
33	+	52,6	62,8	-
067	+	74,3	73,5	-
67	+	52,6	67,4	-
9346	+	125	51,2	-
1129	+	148,7	90,8	+
3249	-	26,3	21,9	-
9366	+	353,6	94,0	+
6468	+	-	12,2	-
5042	-	11,1	7,1	-
6365	+	74,3	50,3	-
Xx071	-	11,1	10,5	-
5572	-	-	5,2	-
4156	-	-	8,6	-
9366	+	420,5	88,0	+
3003	+	125	53,9	-
1076	+	210,3	67,2	-
net	+	26,3	21,7	-
6226	+	125	92,0	-
2670	+	74,3	40,0	-
4524	+	500	91,9	+
3681	+	353,6	82,6	-
7636	+	353,6	85,7	+
3781	+	125	81,3	-
9159	+	52,6	58,6	-
3452	-	-	8,8	-



Tablo 4.2. Negatif referens serumların RBPT ve KFT sonuçları

Hayvan no	RBPT	KFT (ICFTU)	M-ELISA % PP
1- TR 6383 8294	-	-	6,0
2- TR 6384 2069	-	-	6,2
3- TR 6383 7766	-	-	8,8
4- TR 6383 7773	-	-	14,5
5- TR 6365 0783	-	-	11,1
6- TR 6369 0031	-	11.1	37,6
7- TR 3511 29902	-	-	11,1
8- TR 6370 2902	-	-	3,1
9- TR 6370 4206	-	-	3,5
10-TR 6370 4236	-	-	8,3
11-TR 6370 4250	-	-	16,0
12-TR 6356 0138	-	-	6,9
13-TR 6360 1232	-	-	1,4
14-TR 6370 4216	-	-	1,3
15-TR 3512 32312	-	-	8,3
16-TR 1013 79591	-	-	8,9
17-TR 6370 4209	-	-	12,0
18-TR 4051 8518	-	-	3,5
19-TR 6360 1234	-	-	27,2
20-TR 6370 9245	-	-	6,6
21-TR 6372 8220	-	-	3,5
22-TR 6370 4903	-	-	0,2
23-TR 6372 8218	-	-	11,9
24-TR 6370 1850	-	-	10,1
25-TR 6327 2490	-	-	9,7
26-TR 6356 0129	-	-	1,9
27-TR 6370 4220	-	-	19,4
28-TR 6010 37331	-	-	9,2
29-TR 6365 0785	-	-	10,5
30-TR 6370 4215	-	11.1	32,7
31-TR 3512 23168	-	-	10,9
32-TR 6370 9293	-	-	-0,4
33-TR 6376 6940	-	-	4,3
34-TR 6380 9015	-	-	7,0
35-TR 6374 8577	-	-	8,0
36-TR 6374 9337	-	-	3,4
37-TR 6372 8222	-	-	8,7
38-TR 6380 9019	-	-	5,2
39-TR 6374 8573	-	-	2,3
40-TR 6372 8208	-	-	0,2
41-TR 6380 9026	-	-	22,4
42-TR 4052 6624	-	-	5,6
43-TR 4358 8987	-	-	6,8
44-TR 4049 8695	-	-	4,0
45-TR 6374 8572	-	-	1,4

Belirlenen eşik değeri dikkate alınarak Şanlıurfa ve civarında rastgele olarak seçilen 4 enfekte ve 2 enfekte olmayan işletmelerden alınan kan ve süt (A,B,C,E) ve sadece süt örnekleri (D ve F) serolojik ve kültürel yönden test edildiler. Alınan örnek sayıları ve serolojik test sonuçları her bir serum için Tablo 4.3. da gösterildi.

**Tablo 4.3.** Test süt ve serumların serolojik ve kültür test sonuçları

Hayvan No	Süt		Serum ELISA (PP)	RBPT	Kültür
	ELISA (PP)	SRT			
1 A	-	-	-	-	-
2 A	-	-	-	-	-
3 A	-	-	-	-	-
4 A	-	-	-	-	-
5 A	+%110.6	+	+%93	+	-
6 A	-	-	-	-	-
7 A	-	-	-	-	-
8 A	-	-	-	-	-
9 A	-	-	-	-	-
10 A	-	+	-	-	-
11 A	-	-	-	-	-
12 A	+%41	+	+63.4	+	-
13 A	-	-	-	-	-
3930 B	-%10.6	+	-	-	-
8081 B	+%93.6	+	+%99.9	+	+
8002 B	+%99.8	+	+%132	+	+
3766 B	+%76.8	-	+%97	+	-
3490 B	+%112	+	+%109	+	+
4754 B	+%86.4	+	+%115	+	+
7873 B	+%111.6	+	+%65	+	-
3944 B	-%22.8	-	+%34	+	-
0418 B	+%47.25	+	+%84	+	-
3248 B	-	-	-	-	-
7671 B	-	-	-	-	-
1076 B	+%50.7	+	+%94	+	-
2924 B	-	-	-%18.6	-	-
5076 B	-	-	-	-	-
3491 B	+%91.2	+	+%89.4	+	+
5412 B	-	-	-	-	-
H1 C	-	-	-	-	-
H2 C	-	-	-	-	-
H3 C	-	-	-	-	-
H4 C	-	-	-	-	-
H5 C	-	-	-%23.4	-	-
H6 C	-	-	-	-	-
H7 C	-	-	-%19.8	-	-
H8 C	-	-	-%23.2	-	-

H9 C	-	-	-	-	-
H10 C	-	+	+%46	+	-
2752 D	+%38.7	+	SA	SA	-
6023 D	-	-	SA	SA	-
4151 D	-	-	SA	SA	-
4048 D	+%29.8	+	SA	SA	-
7477 D	-	-	SA	SA	-
H.İncir D	-	-	SA	SA	-
3939 D	-	-	SA	SA	-
6889 D	-	-	SA	SA	-
6415 D	-	-	SA	SA	-
7885 D	+%76.7	+	SA	SA	+
2418 D	-	+	SA	SA	-
9667 D	+%109	+	SA	SA	+
Hilvan düve	-	-	SA	SA	+
2419 D	-	+	SA	SA	-
8734 D	+%86	+	SA	SA	-
2599 D	-%8.3	+	SA	SA	-
3755 D	+%34.2	+	SA	SA	-
4050 D	+%32.8	-	SA	SA	-
1 E	-	-	-	-	-
2E	-	-	-	-	-
3E	-	-	-	-	-
4E	-	-	-	-	-
5E	-%7.2	-	-	-	-
6E	-	-	-	-	-
7E	-	+	-	-	-
8E	-%12.3	-	-%15.3	-	-
9E	-%16.6	+	-%22.1	-	-
10E	-%9.8	-	-	-	-
11E	-	+	-	-	-
12E	-	-	-	-	-
13E	-%8.3	-	-	-	-
14E	-	-	-	-	-
15E	-	-	-	-	-
16E	-%9.3	+	-%15.6	-	-
17E	-	-	-%8.5	-	-
5300 F	-	+	SA	SA	-
7536 F	-	-	SA	SA	-
6314 F	-	+	SA	SA	-
1369 F	-%14.8	+	SA	SA	-
3299 F	-	-	SA	SA	-
7571 F	-%6.7	+	SA	SA	-
8612 F	-	-	SA	SA	-
9863 F	-	-	SA	SA	-
2642 F	-	-	SA	SA	-
9197 F	-	-	SA	SA	-
7017 F	-	+	SA	SA	-

8434 F	-	+	SA	SA	-
9619 F	-	-	SA	SA	-
9565 F	-%27.2	+	SA	SA	-
8498 F	-	-	SA	SA	-

Buna göre sadece süt örneği alınan enfekte D çiftliği nde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%17.6). En fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken bunu milk ELISA (%41.2) izlemiştir. Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuçlar verdiler. Sadece % 46.6 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. (Tablo 4.4.)

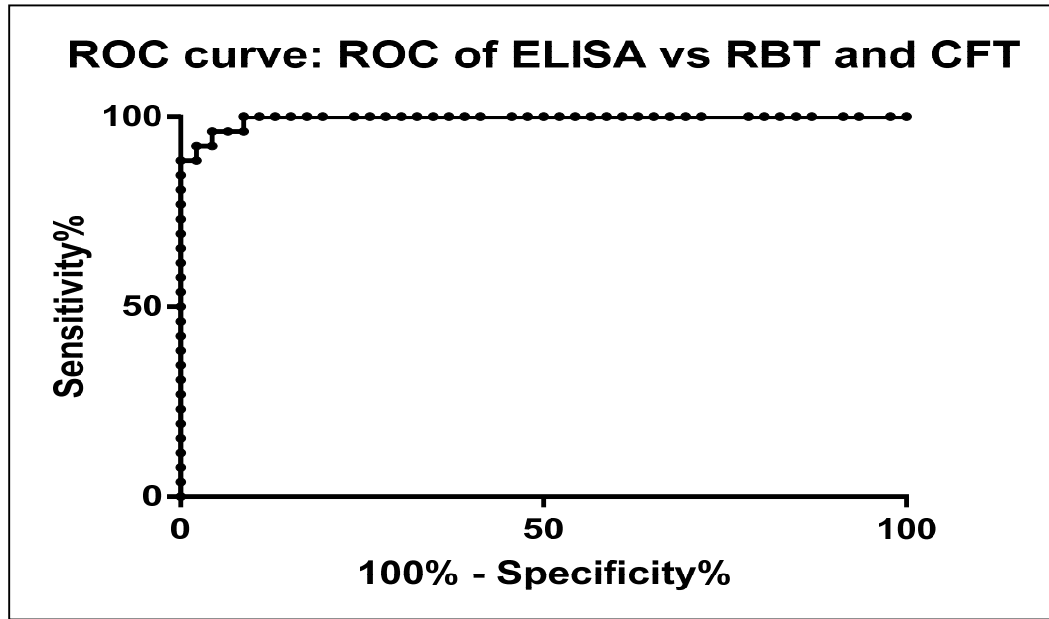
**Tablo 4.4.** Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

D çiftliği (enfekte)	Milk ELISA	SRT	Kültür
3	-	+	-
4	+	+	-
2	+	+	+
1	-	-	+
1	+	-	-
7	-	-	-
17	7 (%41.2)	9 (%52.9)	3 (%17.6)
<b>F çiftliği (non enfekte)</b>			
7	-	+	-
8	-	-	-
15	0	7 (% 46.6)	0

Aynı hayvandan hem serum ve hem de süt örnekleri alınan enfekte A,B,C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12,8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA(%33,3) ile alınırken bunu takiben RBPT (%30,8) ve milk ELISA(%28,2) izledi. Enfekte olmayan F çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdiler. Sadece % 23,5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.5.** Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

A	M ELISA	SRT	S-ELISA	RBPT	Kültür
<b>çiftliği(enfekte)</b>					
10	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-
1	-	+	-	-	-
<b>B çiftliği (enfekte)</b>					
5	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-
1	-	+	-	-	-
1	+	-	+	-	-
1	-	-	+	+	-
<b>C çiftliği (enfekte)</b>					
9	-	-	-	-	-
1	-	+	+	+	-
<b>39 Toplam</b>	11 (%28.2)	13(%33.3)	13(%33.3)	12(%30.8)	5(%12.8)
<b>E çiftliği (non enfekte)</b>					
13	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-
<b>17</b>	0	4(%23.5)	0	0	0



**Şekil 4.2.** RBPT ve KFT sonuçları baz alınarak yapılan milk ELISA ROC analizi sonuçları. Area under curve (AUC=0.9941)

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

*Brucella* cinsinin üyeleri insanlarda ve çiftlik hayvanlarında önemli bir enfeksiyon olan bruselloza neden olurlar. *B. abortus* başta olmak üzere smooth *Brucella* suşları tarafından oluşturulan sığır brusellozu dünyanın birçok ülkesinde ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen abortus, infertilite, süt verimi ve damızlık değeri kaybı gibi önemli ekonomik kayıplara neden olan insanlarda da tehlikeli bir hastalığa neden olan önemli bir zoonozdur (14). Hastalığın teşhisinde bakteriyel izolasyon ve identifikasyon altın standart ve en spesifik yöntem olmakla birlikte, çok sayıda örneğin teşhisi için pratik olmaması, zaman alıcı olması, deneyimli personele ihtiyaç göstermesi, uygulayıcı için riskli olması, süt ve vaginal svablar gibi örneklerde atık materyallere göre daha az sayıda bakteri olabilmesi nedeniyle gözden kaçırılması ve bütün bu sayılan sebeplerden dolayı duyarlılığının düşük olması nedeniyle hastalığın teşhisinde serolojik yöntemler geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (6,7,8,11).

Serum ve süt örnekleri iyi birer antikor kaynağı oldukları için bu örneklerde çok sayıda serolojik test uygulanmaktadır. Süt örneklerinde *B. abortus* için antikor aramaya yönelik testlerin başında süt ring testi (SRT) gelmektedir. Sütçü sığır işletmelerinde, gerek hayvandan alınmasının daha kolay olması, hayvanda stres yaratmaması ve gerekse daha az masraflı olması nedeniyle süt, serolojik yoklamalarda sık kullanılan bir örnek olarak kabul edilmektedir ve süt ring testi (SRT) en yaygın tarama testi olarak kullanılmaktadır. Süt ring testi (SRT) *Brucella* ile enfekte sığır sürülerinin teşhisinde geniş çaplı olarak yıllardır kullanılmakta olan pratik bir tarama testidir. Ayrıca süt örneklerini test edilmesinin, serum örneklerinin test edilmesine olan avantajları bulunmaktadır. Bunlar arasındahayvandan alınmasının daha kolay olması, az masraflı olması, hayvanın örnek alınırken daha az travmatize olması ve dolayısı ile daha az strese girmesi, tek bir testin çok sayıda hayvanın test sonuçlarını temsil etmesi (tank süt örnekleri gibi), örnekleme daha basit ve daha az masraflı oluşu sayılabilir. Ancak SRT, özellikle büyük sürülerden alınan tank süt örneklerinde ve erken enfeksiyonların tanısında yeterli duyarlılık gösterememekte, ayrıca mastitisli, donmuş, doğumdan hemen sonra, laktasyon periyodunun sonuna doğru alınan örneklerde ve erkek hayvanlarda kullanılamaması, kullanımını sınırlamaktadır. Ayrıca mastitisli sütlerde ve kolostrumda yalancı pozitif reaksiyonlar verebilmektedir. Bunlarla birlikte milk ELISA

testlerinin süt ring testi (SRT)'nden çok daha hassas ve spesifik olduğu bildirilmektedir (6,7,30,34,40,42).

Bu çalışmada daha kolay elde edilebilen bir örnek olan süt için SRT'deki dezavantajları taşımayan bir süt ELISA prototipi geliştirildi. Sütün farklı antijeninlerin kullanıldığı çok sayıda ELISA çalışması bildirilmiştir. Bu çalışmalarda araştırmacılar tüm hücre antijeni, bakterinin LPS tabakası ya da ham LPS gibi farklı antijenler kullanarak farklı duyarlılık ve özgüllükte farklı ELISA formatları geliştirmişlerdir (26,35,47).

Bu çalışmada antijen olarak daha önce enfekte sürülerden izole edilmiş olan *B. abortus* biyotip 3 suşunun ham LPS tabakası antijen olarak kullanıldı. Ham LPS tabakası gerek S-LPS ve gerekse dış membran proteinlerini içerdiği için (30) sadece saf LPS tabakasına göre daha fazla hedef epitop taşıyacağı ve dolayısı ile daha duyarlı olacağı düşünüldü. Her ne kadar *Brucella* genusu son derece homolog olsada (5,6) antijen olarak evrensel olarak kabul edilen *B. abortus* S99 (biyotip 1) yerine ülkemizde sığırlardan neredeyse % 95 oranında izole edilen (25-28), *B. abortus* biyotip 3'ü antijen hazırlama da kullanma amacımız, testin özgüllüğün bir miktar artabilme olasılığı idi. Bu çalışmada süt ELISA prototipinin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü %95 güven eşiğinde belirlemek amacı ile daha önce etkenin izole edildiği enfekte sığır sürüsünden alınan 36 adet serum ve süt örneği pozitif referans süt (PRS) (Tablo 4.1.), bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt örneği ise negatif referans süt (NRS) (Tablo 4.2.) olarak kullanılarak serum örneklerinin bilinen KFT ve RBPT sonuçları dikkate alınarak ROC analizleri yapıldı. Çalışmada geliştirilen süt ELISA'nın tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü saptamak amacı ile daha önce *B. abortus* biyotip 3 izole edilen enfekte sürüden alınan 36 adet serum ve süt (pozitif referans süt (PRS)) örneği ile alınan sonuçlar Tablo 4.1.' de gösterildi. Bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt (negatif referans süt (NRS)) örneği ile alınan sonuçlar Tablo 4.2.' de gösterildi. Bu serum örneklerinin daha önce kaydedilmiş KFT ve RBPT sonuçları, ROC analizi ile testin tanısal duyarlılık ve özgüllüğünü belirleyecek eşik değerin saptanmasında kullanıldı. Buna göre duyarlılık (sensitivite) % 96,15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%80.36-99.9))] ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar(%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) % 29.3 PP olarak belirlendi.

Romero ve ark. (39) geliştirdiği süt ELISA için özgüllüğü %100 ve duyarlılığı % 98.2 olarak bulmuşlardır. Biancifiori ve ark. (41) *Brucella* yönünden ari sürüden elde ettikleri süt örnekleri ile yaptıkları süt ELISA'da özgüllüğü %100 ancak RBPT ve KFT'ye göre süt ELISA'nın duyarlılığını sırası ile % 65 ve % 83 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada özgüllük değerleri bu araştırmacılar arasında biraz düşük olmakla beraber, duyarlılık oranımız bu araştırmacıların bulgularına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Chand ve ark. (42) koyunlarda süt-ELISA'nın bruselloz ari sürüdeki özgüllüğü % 100 ve enfekte sürülerde duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri sırasıyla % 96.11 ve % 94.28 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın duyarlılık düzeyi Chand ve ark. (42) elde ettiği düzeyle benzer bulunmuştur.

Kamwine ve ark. (43) SRT'nin duyarlılığını % 85 ve özgüllüğünü %95 bulurken, milk ELISA'nın duyarlılığını ve özgüllüğünü bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak sırası ile % 98.5 ve % 99.5 olarak bulmuşlardır.

Nielsen vd. (45), Şili'deki enfekte sürülerden sağlanan örnekler için %95'lik güven eşiği sınırlarında milk ELISA'nın duyarlılığını %95.2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içinde ki duyarlılığın %98.7 olduğunu tespit etmişlerdir (45). Vanzini ve ark. (46), süt ELISA'nın eşik değerini % 36 yüzdelik seropozitivite (PP) seçerek duyarlılığını %99.6 ve özgüllüğünü % 95.1 olarak bularak indirekt süt ELISA'nın yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren ve aynı anda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlayan bir test olduğu sonucuna varmışlardır. Titarelli ve ark. (47) manda sütlerindeki *brucella* antikorlarını saptamak üzere geliştirdikleri süt ELISA'da *B. abortus* biovar 1 in izole edildiği 3 ayrı enfekte sürüden topladıkları 30 pozitif süt örneği ve 100 negatif serum kullanarak geliştirdikleri testin duyarlılığını %100 (CI, %90.8-%100) ve özgüllüğünü %98 (CI, %93-%99.4) olarak saptamışlardır. Bu çalışmanın duyarlılık ve özgüllük sonuçları ile araştırmacıların sonuçları dabenzerlik göstermektedir.

Kolostrum ve süt aynı serum gibi enfekte ve aşıllı hayvanlarda Smooth *brucella* spp. ye karşı IgM, IgG ve IgA içermektedir. IgG1 ruminant sütündeki en dominant antikor olup kolostrumdaki toplam antikorun %70-80'ini içermektedir. Bunu sırası ile IgM, IgA ve IgG2 izlemektedir. Sütteki çoğu IgA lokal olarak memede üretilmesine karşın süt ve kolostrumdaki IgG1'in çoğunluğu süte direkt olarak serumdan transfer edilmektedir. Kalan kısmı ise diğer Ig izotopları ile birlikte lokal olarak meme bezinde



üretilmektedir. Dolayısı ile süt, serum ve kolostrumdaki antikorların birbirleri ile korelasyon göstereceği kabul edilmektedir. Sığır serumu ve süt arasında antikorların ilişkili seviyelerde olduğunu gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır. Süt örneklerine uygulanan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü serum örneklerine uygulananlarla benzer bulunduğundan, sütçü sığırlarda süt örneklerinin test edilmesi seruma göre daha ekonomik bir alternatif sağlamıştır. Sütteki immunoglobulin konsantrasyonu serum seviyeleri ile korelasyon gösterdiğinden, sütün içerdiği antikor seviyesi hayvanın serolojik tablosunu yansıtacaktır (30,32,33,40,46). Bu olaydan yola çıkarak çalışmamızda ikisienfekte olmayan ve dördü enfekte, toplam 6 ayrı işletmeden süt ve kan örnekleri alınarak bunlarda SRT, RBPT, süt ve serum ELISA yapılmış ve sonuçlarda yukarıda bahsedilen korelasyon aranmıştır.

Buna göre sadece süt örneği alınan enfekte D çiftliği nde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%17.6). Milk ELISA için bulunan % 29.3PP eşik değeri dikkate alındı. Sonuçlara göre en fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken bunu %41.2 ile süt ELISA izlemiştir. Bu sonuçlar kültürün en az duyarlı ve SRT nin özgüllük ve duyarlılığının düşük olduğunu bildiren literatürlerle uyumludur (6,7,10). Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdiler. Sadece % 46.6 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Enfekte olmayan bir sürüde süt ELISA'nın hiçbir pozitiflik göstermemesi testin özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermektedir. SRT ise çapraz reaksiyonlarda, mastitisli ya da herhangi bir şekilde bozulmuş sütlerde yanlış pozitifleri oldukça sık gösteren bir test olduğundan, alınan bu değer normal kabul edilmiştir. Enfekte D çiftliğinden bir hayvan milk ELISA ve SRT ile negatif reaksiyon vermiş ancak bu hayvandan *B. abortus* biyotip 3 izole edilmiştir. Negatif seroloji gösterip kültür pozitif hayvanların nadir olarak görüldüğü ifade edilmektedir (10,30). İşte bu yüzden ki kültür ile serolojin beraber yürütülmesi teşhisin güvenilirliğini artıracaktır (Tablo 4.4.).

Aynı hayvandan hem serum ve hem de süt örnekleri alınan enfekte A,B,C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12.8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA(%33.3) ile alınırken bunu ve takiben RBPT (%30.8) ve milk ELISA (%28.2) izledi. Alınan sonuçlar yukarıdaki paragrafta açıklanan nedenler ile beklenen sonuçlar olmakla birlikte süt ELISA % PP'nin serum ELISA'dan daha düşük çıkması kandaki antikor düzeyinin normalde daha yüksek olmasına

bağlanabilir. B ve C çiftliklerine birer hayvanın süt ELISA ile negatif sonuç verip serum ELISA ile pozitif vermesinin mantıklı bir izahı olmamasına karşın, henüz çok erken bir enfeksiyonun buna neden olabileceği düşünülmüştür. Enfekte olmayan F çiftliğinde de izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdiler. Sadece %23.5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Test işletmelerinden izole edilen toplam sekiz *B. abortus* biyotip 3'ün yedi tanesinin izole edildiği hayvanlardan alınan kan ve serumun kullanılan tüm serolojik testlerde pozitif yanıt vermesi, kültürün düşük duyarlılığı yanında son derece spesifik bir test olduğunu da beklendiği üzere göstermiştir.

Bu çalışmanın sonucunda geliştirilmesi hedeflenen duyarlık ve özgüllüğü yüksek bir milk-ELISA prototipi geliştirildi. Bu prototipte konjugat olarak her hayvan türü için spesifik enzimle işaretlenmiş konjugat yerine, antikorlarının Fc bölgesine bağlanan enzimle işaretli A/G proteini kullanıldığından, bu testin ileride diğer türlerde de kullanılma potansiyeli araştırılacaktır. Geliştirilen bu testin sütçü işletmelerde brusellosiz tanısında ve takibinde non invaziv bir tarzda hastalığın teşhisi kolay ve pratik ve daha ekonomik olarak yapılabilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Zoonoz karakterdeki bu hastalığın sütçü işletmelerdeki durumu hakkında sağlıklı veriler elde edilmiş olacaktır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular ile sütün mevcut olduğu durumlarda, sütte indirekt ELISA'nın hayvanı travmatize etmeksizin brusellozun serolojik teşhisinde kullanılabilecek son derece değerli bir alternatif olduğu kanısına varılmıştır.

## 6.KAYNAKLAR

- 1) Abdelkareem AA. Trakya yöresinde yetiştirilen sığırların sütlerinden *Brucella* türlerinin varlığını bakteriyolojik ve moleküler yöntemlerle karşılaştırmalı olarak araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul; 2008.
- 2) Capasso L. Bacteria in two-millennia-old Cheese, and Related Epizoonoses in Roman Populations. *J. Infec* 2002. 45: 122–127.
- 3) Nicoletti P. A Short History of Brucellosis. *Veterinary Microbiology* 2002. 90: 5-9.
- 4) Özsan K. Brucellosis'in tarihçe ve etiyolojisi; 24. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kayseri 1990. 56-64.
- 5) Verger JM, Grimont F, Grimont PDA, Grayon M. Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol* 1987. 138: 235-238.
- 6) OIE Manual. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Paris 2016. Chapter 2.1.4, 1–44.
- 7) Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory, *Ins. National Dela Recherche Agronomique Paris* 1986. 147-156
- 8) Young EJ. *Brucella Specie, Principles and Practice of Infectious Diseases*, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Churchill Livingstone Inc. New York 1995. 2053-2060.
- 9) OIE: Ovine Epididymitis (*Brucella Ovis*) OIE Terrestrial Manual, Chapter 2.7.9 [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09\\_OVINE\\_EPID.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.07.09_OVINE_EPID.pdf)
- 10) Corbel MJ. Microbiology of the genus *Brucella*. In “Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects”, Ed; Young EJ, Corbel MJ, CRC Press, Inc., Boca Raton. Florida, USA 1989. 54-67.
- 11) Aydın N, İzgür M, Diker KS, Yardımcı H, Esenal Ö, Paracıklıoğlu J ve ark. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar) ANKARA İlke Emek Yayınları 2006.
- 12) Young EJ, Corbel MJ. Brucellosis, Clinical and Laboratory Aspects, Boca Raton, Florida 1989. 11-23.
- 13) Bilgehan H. *Brucella Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, Barış Yayınları, İzmir 1996. 181-194.
- 14) Corbel MJ. Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonose. *Emerging Infectious Diseases* 1997. 3: 25-35.

- 15) Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Blackwell Science Ltd. Oxford 2002. 162-167.
- 16) Taşcı F. Gıda Kaynaklı Brucellozis ve Önemi. Uludağ Üniversitesi J. Fac. Vet. Med 2004. 23(1-2-3): 137-142.
- 17) Disarno A, Izzi R, Sandulli S, Santagata, N. Brucella melitensis Isolation From Fresh Sheep Cheese-Etiology and Epidemiology Industrie Alimentar, J. Clin. Microbiol 1992. 31-33.
- 18) Altekruze SF, Timbo BB, Mawbroyi JC. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, Journal of food protection 1998. 61-63.
- 19) Nicoletti P. Brucellosis: Past, Present and Future. Contributions. Section of Biological and Medical Sciences. Macedonian Academy of Sciences and Arts 2010. 31: 21-32.
- 20) Boschirolu ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis a Worldwide Zoonosis. Curr. Opin Microbiol 2001. 4: 58-64.
- 21) Corbel MJ. Brucellosis: epidemiology and prevalence worldwide. In "Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects", Ed; Young EJ, Corbel MJ, CRC Press, Inc. Boca Raton. Florida, USA 1989. 25-40.
- 22) Gültekin M. Brucellozun laboratuvar tanısındaki sorunlar ve Türkiye'deki epidemiyoloji. 8. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Antalya 1998. 15-22.
- 23) Dabanlıoğlu B, Doğan HO, Kılıç H. Erzincan ilinde bruselloz seroprevalansı ve rose-bengal, wright aglutinasyon test sonuçlarının karşılaştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi 2007. 16: 152-158.
- 24) İyisan A, Akmaz Ö, Düzgün S, Ersoy Y, Eskiizmiller S, Güler L ve ark. Sero – epidemiology of brucellosis on cattle and shepp in Turkey 2000. 31: 21–75.
- 25) Şahin M, Genç O, Ünver A, Otlu S. Investigation of bovine brucellosis in the Northeastern Turkey. Trop Anim Health Product 2008. 40: 281-286.
- 26) Güllüce M. Kars ve Çevresinde Sığırlarda Brucella abortus'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Kars 1993. 35-38, s. 43-56.
- 27) Erdenliç S, İyisan AS, Baklan EA, Aksoy HY. Biovar distribution of Brucella isolates from livestock in Turkey, 1999 to 2006. In: Proceedings of the 15 th. International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, 15-19 May 2007 Pine Bay Resort Hotel, Kusadası, Turkey 27-38.
- 28) İca T, Aydın F, Erdenliç S, Güler L, Büyükçangaz E. Characterisation of Brucella abortus biovar 3 isolates from Turkey as biovar 3b. The Veterinary Record; 2008 November 29: 660-662.

- 29) Kuloglu F, Erdenlig S, Akata F, Tansel O, Gurcan S, Turgul HM. Trakya Üniversitesi Hastanesi'nde 1997-2002 yılları arasında saptanan *Brucella* izolatlarının tür ve biyovar dağılımı. Mikrobiyoloji Bülteni 2004. 38, 187-191.
- 30) Ducrot MJ, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 2016. 171: 81-102.
- 31) Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis. Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature, Rev infect Dis 1991. 13: 359-372.
- 32) Sutra L, Caffin JP, Dupray G. Role of Milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring testi. Vet. Microbiol 1986. 12, 359-366.
- 33) Kenyon AJ, and Jenness R. Effects of proteins on agglutination of fat globules. J. Dairy Sci 1958. 41: 716-725.
- 34) Nicoletti P. Further evaluation of serologic tes procedures used to diagnose brucellosis. Am. J. Vet. Res 1969. 30: 1811-1816.
- 35) Thoen CO, Pietz DE, Armbrust AL and Harrington R. Enzyme Immunoassay for Detecting *Brucella* antibodies in Cow's Milk. J.Clin Microbiol 1979. Aug;10(2): 222-225.
- 36) Broker DK, Stinebring WR, and Kunkel JR. BrucELISA: an Enzyme-Antibody Immunoassay for detection of *Brucella abortus* Antibodies in milk: Correlation with the *Brucella* Ring Test and with Shedding of Viable Organism. J. Clin. Microbiol 1981. 14(4): 396-403.
- 37) Abuharfeil N, Abo-Shehada MN. A comparison between three serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 1998. 22(2), 119-122.
- 38) Kerkhofs P, Botton Y, Thiange P, Dekeyser P, Limet N. Diagnosis of Bovine Brucellosis by Enzyme Immunoassay of milk. Vet. Microbiol 1990. 24: 73-80.
- 39) Romero C, Pardo M, Grillo MS, Diaz R. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples For Diagnosis of Brucellosis in Dair. Cattle, Journal of Clinical Microbiology 1995. 33: 3-10.
- 40) Güllüce M. Kars ve Çevresinde Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Kars 1993. s. 35-38, 43-56.
- 41) Biancifiore F, Nannini D, Di Matteo A, Belfiore P. Assesment of an Indirekt ELISA in milk fort he diagnosis of ovine brucellosis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis 1996. 19(1): 17-24.

- 42) Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, Poonia JS. Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol* 2005. Jul 1;108(3-4): 305-311.
- 43) Kamwine M, Orikiriza P, Taseera K, Iramiot JS, Ojuka P, Ikiriza S, et al. Prevalence of antibodies to *Brucella* species in commercial raw bovine milk in Southwestern Uganda. *BMC Res Notes* (2017) 10: 215 DOI 10. 1186/ s13104-017-2537-5.
- 44) Nicoletti P, Tanya V. 1993 Comparison of enzyme - labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standart serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp infected cows in herds with brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Asso* 1975. 7: 202-208.
- 45) Nielsen K, Smith P, Gall D, Perez B, Cosmos C, Mueller P, et al. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. *Vet. Microbiol* 1996. 52(1-2): 165-173.
- 46) Vanzini VR, Aguirre N, Lugaresi CI, Echaide ST, De Canavesia VG, Guglielmo AA, Marchesino MD, Nielsen, K. Evaluation of a direct ELISA for the diagnosis of the bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. *Prev. Vet. Med* 1998. 36 (3): 211-217.
- 47) Titarelli M, Bonfini B, De Massis F, Giovannini A and Scacchia M. Standardisation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *brucella* antibodies in milk from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Veterinaria Italiana* 2011. 47(1): p. 59-64.
- 48) Schoonjans F, Zalata A, Depuydt C, Comhaire F. MedCalc: A new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed* 1995. 48: 257-262
- 49) Anonymous, "Joint FAO/WHO expert committee on Brucellosis sixth report", WHO technical report series, Geneva 1986. 74-80.
- 50) Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram negative bacteria. *Analyst* 2000. Apr;125(4): 651-656.

## 7.EKLER

### Etik Kurul



**Dollvet**  
Veteriner Aşıları / Veterinary Vaccine

Sayı : 2015/07

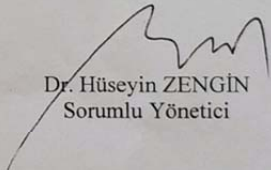
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

23/03/2015

**DOLLVET A.Ş.**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**  
**(DOLLVET-HADYEK)**

Sayın: İbrahim ÇADIRCI

06.03.2015 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz "Brucella kontrolü için Sığırlarda Milk Eliza Testi yönteminin geliştirilmesi" isimli 'HÜBAK' projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhülle bulunduğunuz çerçeve dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

  
Dr. Hüseyin ZENGİN  
Sorumlu Yönetici

**Ek:**

- Karar onayı

Dollvet Veteriner Aşı İlaç Biyolojik Madde Üretim Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Tel: +90 414 3691133 • Fax: +90 414 3691662 • Gsm: +90 533 6900 26 • 1. Organize Sanayi Bölgesi 8. Cad. No: 3 ŞANLIURFA

Ticaret Sicil No: 6776/9048 • Mersis: 0 3100 3407 6700 012

www.dollvet.com.tr • dollvet@dollvet.com.tr

**DOLLVET A.Ş.**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)**

**Karar No:** 2015/07

**Konu :** Yerel Etik Kurul Kararı

06.03.2015 tarihinde kurulumuza yapmış olduğunuz "Brucella kontrolü için Sığırlarda Milk Eliza Testi yönteminin geliştirilmesi" isimli 'HÜBAK' projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza başvuruda bulunulmuştur.

Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.

Dr. Hüseyin ZENGİN  
Sorumlu Yönetici

Hülya KAPLAN  
Veteriner Hekim  
Deney Hayvanları Üretim ve  
Araştırma Laboratuvarı  
Sorumlusu

Dr. Nilay ÜNAL  
Veteriner Hekim  
Viral Aşılar Üretim  
Laboratuvarı Sorumlusu

Cahit BAYBURS  
Veteriner Hekim  
Bakteriyel Aşılar Üretim  
Laboratuvarı Sorumlusu

Derya PİRİNÇÇİ  
Veteriner Hekim  
Kalite Kontrol Birimi  
Sorumlusu

Hilal ZENGİN  
Veteriner Hekim  
Hayvan Refahı Birimi  
Sorumlusu

İbrahim YAŞAR  
Biyolog  
Bakteriyel Aşılar Üretim  
Laboratuvarı

Ramazan ABİKOĞLU  
Biyolog  
Paraziter Aşılar Üretim  
Laboratuvarı Sorumlusu

Hüseyin DURMUŞ  
Veteriner Hekim  
Veteriner Hekimliği Gelişim  
Derneği Üyesi  
(T.C. Vatandaşı)

Adalet Atmak  
Ziraat Mühendisi  
Siyah Öye  
(T.C. Vatandaşı)



## Orjinallik Beyanı



T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

### TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

#### Öğrencinin

Numarası : 145326002  
Adı, Soyadı : İbrahim ÇADIRCI  
Anabilim Dalı : Veteriner Mikrobiyoloji A.B.D.  
Programı : **Yüksek Lisans**  
Tezin Adı : "Sığır Brucellozunun teşhisi için sütte indirek Elisa'nın kullanımının değerlendirilmesi"

#### SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen yüksek lisans çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 47 sayfalık kısmına ilişkin, 27/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, benzerlik oranı % 16'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orjinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntıların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden herhangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 18/06/2019

#### Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı-Soyadı: İbrahim ÇADIRCI

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanım doğruluğunu onaylarım. 18/06/2019

#### Danışmanın

Unvanı-Adı-Soyadı:

Doç. Dr. Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK

İmzası:

Doküman Görüntüleyici

## Turnitin Orjinallik Raporu

İşleme kodu: 27-May-2019 10:48 +03  
 NUMARA: 1136443550  
 Kelime Sayısı: 12351  
 Gönderildi: 1

Deneme İbrahim Çadırıcı tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%16	İnternet Sources: %7 Yayınlar: %4 Öğrenci Ödevleri: %10

[ajantları dahil et](#) [bibliyografya dahil et](#) [5 kelime > çıkarılan eşleşmeler](#) [İndir](#) [Yazdır](#) [Yazdır](#)

mod: raporu hızlı görüntüle (klasik) Change mode

7% match (21-Ağu-2017 tarihli öğrenci ödevleri)	✖
Sınıf: Microbiology	
Ödev: BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERIA GRUBUNA AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA POTANSİYEL UYGULANABİLİRLİĞİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI	
Ödev Numarası: <a href="#">838594604</a>	
1% match (24-Ağu-2015 tarihli internet)	✖
<a href="http://acikarsiv.ankara.edu.tr">http://acikarsiv.ankara.edu.tr</a>	
1% match (yayınlar)	✖
<a href="#">ERDENLİĞ GÜRBÜLEK, Sevil, BAKLAN, Emin Ayhan and AKSOY, Hüseyin Yavuz. "Türkiye'de 2007 ve 2008 Yılları Arasında İzole Edilen Brusella Suslarının İdentifikasyonu ve Faz Duyarlılıklarının Saptanması". Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eyyübiye Kampüsü 63200 Sanlıurfa, 2014.</a>	
1% match (16-Şub-2015 tarihli internet)	✖
<a href="http://www.klimikdergisi.org">http://www.klimikdergisi.org</a>	
1% match (07-May-2019 tarihli internet)	✖
<a href="http://adudspace.edu.edu.tr:8080">http://adudspace.edu.edu.tr:8080</a>	
1% match (10-Eyl-2017 tarihli öğrenci ödevleri)	✖
Sınıf: Microbiology	
Ödev: BRUCELLA VE ALFA-PROTEOBACTERIA GRUBUNA AİT BAZI BAKTERİ CİNSLERİ ARASINDAKİ SEROLOJİK ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN BRUSELLOZUN SEROLOJİK TANISINDA POTANSİYEL UYGULANABİLİRLİĞİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI	
Ödev Numarası: <a href="#">844884648</a>	
<1% match (14-May-2018 tarihli internet)	✖
<a href="http://www.phidias.us">http://www.phidias.us</a>	
<1% match (07-May-2019 tarihli internet)	✖
<a href="http://adudspace.edu.edu.tr:8080">http://adudspace.edu.edu.tr:8080</a>	
<1% match (07-May-2019 tarihli internet)	✖
<a href="http://adudspace.edu.edu.tr:8080">http://adudspace.edu.edu.tr:8080</a>	
<1% match (yayınlar)	✖
<a href="#">Vanzini, V., "Evaluation of an indirect ELISA for the diagnosis of bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina". Preventive Veterinary Medicine, 19980901</a>	
<1% match (31-May-2017 tarihli öğrenci ödevleri)	✖
<a href="#">Submitted to Istanbul University on 2017-05-31</a>	
<1% match (18-Oca-2019 tarihli internet)	✖
<a href="https://es.scribd.com/document/288360035/140318-Reference">https://es.scribd.com/document/288360035/140318-Reference</a>	

## Tez Veri Giriş Formu

24.07.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C.  
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
ULUSAL TEZ MERKEZİ

### TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10274566
Yazar Adı / Soyadı	İBRAHİM ÇADIRCI
T.C.Kimlik No	32921321698
Telefon	5325746554
E-Posta	ibrca_63@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	SİĞİR BRUSELLOZUNUN TEŞHİSİ İÇİN SÜTTE İNDİREKT ELISA'NIN KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ
Tezin Tercümesi	EVALUATION OF USING ELISA IN MILK FOR DIAGNOSIS OF BRUCELOSIS IN CATTLE
Konu	Mikrobiyoloji = Microbiology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Mikrobiyoloji (Veterinerlik) Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	46
Tez Danışmanları	DOÇ. DR. SEVİL ERDENLİĞ GÜRBİLEK
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

24.07.2019

İmza:.....