

SİĞİRLARDA BRUCELLA ABORTUS'A KARŞI OLUŞAN ANTİKORLARI SAPTAMADA ELISA VE DİĞER SEROLOJİK TEKNİKLERİN KARŞILAŞTIRILMASI*

Hatice AYHAN FİDANCI**
Metin ALABAY**

Seniha AKIN***
Nizamettin GÜVENER****

Comparison of ELISA and Other Serological Techniques for The Detection of Antibodies to *Brucella abortus* in Bovine Sera

Summary: *The diagnostic performance of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine brucellosis was compared with those of two conventional screening tests, the Rose Bengal (RB) and the serum Agglutination (SA) tests.*

Brucella ELISA kit was provided by International Atomic Energy Agency, Seibersdorf laboratory and RBPT and SAT antigens were provided by Pendik Animal Diseases Research Institute.

*A total of 976 bovine sera samples were collected from the different areas and were tested by ELISA, RBPT and SAT. Antibodies against *Br. abortus* were detected 49, 15, 17 with ELISA, RBPT and SAT, respectively.*

The conventional techniques, which works with the different immunoglobulin classes, and ELISA, which is easy to perform, rapid and sensitive, could be recommended to be used in Brucella eradication programmes in Turkey.

Özet: *Sığır brusellozis'inin tanısında ELISA testinin tanı performansı diğer iki serolojik tarama testi (RBPT ve SAT) ile karşılaştırıldı.*

Brucella ELISA kiti Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı, Seibersdorf laboratuvarında, diğer test antijenleri Tarım Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsünden sağlandı.

*Çeşitli yerlerden sağlanan toplam 976 adet sığır serum örneği incelendi. Bu örneklerin 49'unda ELISA, 15'inde RBPT ve 17'sinde SAT ile *Br. abortus*'a karşı antikor saptandı.*

Sığır brusellozisinin tanısında değişik antikor grupları ile çalışan konvansiyonel testler yanı sıra, ELISA testinin de hızlı, uygulaması kolay ve hassas olması gibi nedenlerle Türkiye'de yürürlükte olan Brucella eradikasyon programında kullanılabileceği anlaşılmıştır.

Giriş

azalmayla önemli ekonomik kayıplara yol açan bir zoonozdur.

Brusellozis, Türkiye'de sığır ve koyun yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen, hayvanlarda infertilite, yavru atma ve süt veriminde

Türkiye'de evcil hayvanlarda brusellozisin varlığı uzun yıllardır bilinmektedir (9, 11). Tür-

* Bu çalışma Türkiye Atom Enerjisi Kurumu tarafından desteklenmiştir.

** Doç. Dr., TAEK, Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü Lalahan/ANKARA

*** Doç. Dr., TAEK, Ankara Nükleer Araştırma Eğitim Merkezi Sarayköy/ANKARA

**** Vet. Hek., Tarım ve Köyşileri Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü

kiye'de sığırlarda *Br.abortus* enfeksiyonu ilk kez 1931 yılında, kültür ırkı hayvanların ithaliyle sorun olmaya başlamıştır (4).

Uzun araştırma ve denemeler sonucu, brusellozis ile mücadelede reaktörlerin saptanması (standart testlerin uygulanması ile birlikte bakteriyolojik incelemeler) ve hastalığa duyarlı tüm hayvanların aşılınması gereği öngörülmüştür (6, 10, 18).

1984 yılında, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı beş bölgeye ayırdığı tüm ülkede "Türkiye Brusellozis Mücadele Projesi"ni yürürlüğe koymuştur. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Resmi kayıtlarına göre brusella Mücadele Programı dahilinde projenin uygulandığı bölgeler genelinde 1989 yılında Brusella mihrak sayısı (Süt Ring testi ile) 34 olarak saptanmış ve aynı yıl ülke genelindeki prevalans %3.6 olarak bildirilmiştir (23). 1990 yılı verilerine göre ise, (Rose Bengal Plate Test, Süt Ring Test, Serum Aglutinasyon Test, Rivonol Test ile) *Br. abortus* mihrak sayısı 23, prevalans %2.26 olmuştur. Damızlık ineklerde *Br. abortus*'a bağlı tahmini ekonomik zararları; atıklar, infertil dişi damızlıkların sürüden ayrılması ve süt azalması sonucu meydana gelen zararların toplamı olarak hesaplandığında çok büyüktür. Diğer yandan halk sağlığı üzerine etkileri de kesin rakamlar olmakla birlikte çok önemlidir (23).

Türkiye hayvancılığı yönünden böylesine önemli olan brusellozisin kontrolü ve eradikasyonu için Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından yürürlüğe konan projede Türkiye genelinde, reaktörlerin belirlenmesinde Dünya Sağlık Teşkilatı Standartları gereğince MRT (Milk Ring Test), SAT (Serum Agglutination Test), RBPT (Rose Bengal Plate Test), SPT (Serum Plate Test) ve KFT (Complement Fixation Test) uygulanması öngörülmüştür (14). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsünde brusellozisin teşhisi söz konusu standartlara uygun olarak yapılmakta ve referans laboratuvar olarak da hizmet görmektedir. Ancak son yıllarda aşılı ve aşısızları ayırmakta erken enfeksiyonların belirlenmesinde avantajlar sağlayacak değişik antijenlerin kullanıldığı ELISA testinin uygulanmasına olanak sağlayacak değerli çalışmalar yapılmıştır (12, 20, 21, 22). Rutin amaçlı testlerle birlikte kullanılan ELISA'nın daha duyarlı ve daha spesifik olduğu görüşünde birleşilmektedir (7, 16, 19).

Bu noktadan hareketle çalışmamızda, sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorları ELISA ve diğer serolojik tarama testlerinden

olan RBPT ve SAT ile saptamak ve sonuçları karşılaştırmak amaçlandı.

Materyal ve Metot

Araştırmada, Et ve Balık Kurumu Ankara Et Kombinasyonundan 518, Adana ili ve çevresinden 417 ve kamuya ait bir tarım işletmesindeki sığırlardan 41 adet olmak üzere toplam 976 adet sığır serumu test edildi. Serum örnekleri incelemeye kadar -20 C de saklandı.

RBPT ve SAT antijenleri Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsünden sağlandı.

Brusella-ELISA kiti IAEA (Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı) Seibersdorf laboratuvarından sağlandı. Denemelerde Nunc firmasına ait altı düz polystyren mikrotitrasyon plaklarından yararlanıldı.

RBPT, Morgan ve ark. (20), SAT, Alton ve ark. (1)'nin bildirdikleri yöntemlere göre yapıldı.

İndirekt ELISA'da International Atomic Energy Agency-Seibersdorf laboratuvarlarınca bildirilen protokol uygulandı. Testte *Br.abortus*'tan ekstrakte edilen lipopolisakkarid antijeni, horseradish peroksidaz ile işaretli tavan anti-sığır IgG'si ve kromojen olarak da ABTS kullanıldı. Mikroplaklara antijen fiksasyonu +4 C de 1 gece inkubasyonla yapıldı. Denemelerde test serumunun 1:200 (50' 1) dilusyonu kullanıldı. Eşit miktarlarda (50' 1) konjugat ve substrat ilave edildi. Her serumun OD'si ELISA okuyucuda (Titertek Multiscan) 405 nm dalga boyunda belirlendi. Her plak için lokal olarak belirlenen referans negatif serum ile pozitif serum ve blank kullanıldı. Tüm serumlar paralel olarak çalışıldı.

ELISA'da her test plağında negatiflik/pozitiflik, pozitiflik eşiği (cut-off O.D değerleri) hesaplanarak belirlendi (13).

Bulgular

Çalışmamızda, değişik kaynaklardan sağlanan toplam 976 serum örneğinin 15 (%1.5) inde RBPT, 17 (%1.7)'sinde SAT ve 49 (%5.02)'unda ELISA ile *Br.abortus*'a karşı antikorlar belirlendi (Tablo 1).

Kamuya ait bir tarım işletmesinden aşılanmış oldukları bildirilen sığırlardan sağlanan 41 adet serum örneğinin 2'sinde sadece ELISA ile pozitiflik saptandı (Tablo 2).

Tablo 1. Serolojik İnceleme Sonuçları (RBPT, SAT, ELISA) (Pozitifler adet ve % olarak).
(Results of Serologic Examination -RBPT- SAT- ELISA) (number and % of positives).

Serum Sayısı	RBPT	%	SAT	%	ELISA	%
EBK n=518	5	(0.96)	4	(0.8)	11	(2.1)
KAMU n=41	---	---	---	---	2	(4.9)
ADANA n=417	10	(2.4)	13	(3.1)	37	(8.9)
TOPLAM n=976	15	(1.5)	17	(1.7)	49	(5.02)

Tablo 2. Bir veya Daha Fazla Serolojik Test ile Reaksiyon Veren Serum Sayıları.
(The Number of Positive Sera in One and More Serological Tests).

Testler	E.B.K.*	KAMU**	ADANA***
RBPT-SAT-ELISA	1	--	3
RBPT-ELISA	2	--	2
SAT-ELISA	1	--	-
RBPT-SAT	1	--	-
RBPT	1	--	5
SAT	1	--	7
ELISA	7	2	31

* Et ve Balık Kurumu, Ankara Et Kombinası

** Kamuya ait bir tarım işletmesi

*** Adana ili ve çevresi

Et ve Balık Kurumu Ankara Et Kombinası'na kesim için getirilen 518 sığırın kan serumları, *Brucella abortus*'a karşı antikor varlığı yönünden, RBPT, SAT, ELISA ile incelendi. Bu serumların ikisinin her iki test (RBPT ve ELISA) ile, sadece birer serum örneğinin SAT-ELISA ve RBPT-SAT olmak üzere iki farklı serolojik testte pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Bir Serum örneğinde de uygulanan bütün serolojik testlerle (RBPT-SAT-ELISA) *Brucella abortus*'a karşı antikor belirlendi. Sadece bir serolojik testte (RBPT, SAT, ELISA) reaksiyon veren serum sayısı sırasıyla, 1, 1, 7 adet olarak ortaya kondu (Tablo 2).

Adana ili ve çevresinden temin edilen 417 sığır serum örneğinin 10'unda RBPT, 13'ünde SAT ve 37'sinde ELISA ile *Brucella abortus*'a karşı antikorlar bulundu. İncelenen serumların 3'ü RBPT-SAT-ELISA ile, 2'si RBPT-ELISA ile pozitif bulunurken (Tablo 2) sadece RBPT, SAT ve ELISA ile antikor belirlenen serum sayıları sırasıyla, 5, 7, 31 dir.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada farklı yerlerden alınan, geçmişleri hakkında bilgi alınamayan 935 sığır serum örneği rutin teşhis yöntemlerinden olan RBPT ve SAT yanısıra ELISA ile incelendi.

RBPT ile %1.6, SAT ile %1.8 oranlarında pozitiflik belirlenirken, ELISA ile %5.02 gibi daha yüksek düzeyde bir pozitiflik belirlendi. Pozitiflik saptamada ELISA>SAT>RBPT sırası elde edildi ki bu da yapılan diğer çalışmalarla uygunluk göstermektedir (3, 12, 19, 20). Ayrıca, kamuya ait bir tarım işletmesindeki 41 aşıli sığırdan alınan serumların 2 adedinde ELISA ile *Brusella* antikorları yönünden seropozitiflik belirlendi. Bu durum Lamb ve ark. (15)'nin bulgularıyla desteklenip, LPS antijeninin IgM ile olan nonspesifik reaksiyonunun sonucu olarak açıklanabilir. ELISA de negatif olan 14 serum konvansiyonel testlerin (RBPT ve SAT) bir veya ikisi ile pozitif reaksiyon verdi. Bunların sadece 9 adeti SAT ile pozitif bulundu. %0.9 oranındaki bu pozitiflik nonspesifik olarak değerlendirildi (24). Ayrıca, RBPT pozitif, ELISA negatif olan reaksiyonlar (6 adet) açıklanamamakla birlikte toplamın %0.6'sını oluşturması nedeniyle istatistiksel olarak önemsiz bulundu.

Brusellozis'in serolojik teşhisinde antikorun farklı grupları (IgG1, IgG2, IgM) ile reaksiyon veren konvansiyonel testlerin kombine kullanılmaları yanısıra, ELISA gibi oldukça duyarlı bir testin doğrulama testi olarak kullanılması reaktörlerin kesin olarak belirlenmesinde yararlı olmaktadır. Diğer bir doğrulama testi olan CFT'den daha duyarlı kolay ve hızlı bir test olması nedeniyle de eradikasyon programlarında tercih edilmektedir (12). Bu araştırmada, denemeye alınan 976 sığır serumunda RBPT- SAT- ELISA in kombine uygulanmasıyla RBPT-SAT-ELISA ile 4, RBPT-ELISA ile 4, SAT-ELISA ve RBPT-SAT ile 1'er seropozitiflik saptandı (Tablo 2).

Araştırma bulguları, ELISA'nın sığır *brusellozis*'in teşhisinde başarıyla kullanılabileceği hakkındaki görüşlerle desteklenmektedir. Bu nedenle, Türkiye'de yürürlükte bulunan eradikasyon programında başarıyla uygulanabileceği inancındayız. Ancak, sığır *brusellozis*'inin ELISA ile tanısında tek bir konjugat yerine IgG ve IgM gibi farklı antikor gruplarının oluşturduğu konjugatların uygun antijenlerle birlikte kullanılması halinde daha fazla reaktörü ortaya koyabilmesi nedeniyle yararlı olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- Alton, G.G. (1978). *Recent Developments in Vaccination Against Bovine Brucellosis*. Aust Vet J 54:551-557.
- Aydın, N., Bisping, W., Akay, Ö. ve İzgür, M. (1988). *Türkiye'de Sığır Brucellosis'inin İnsidensi ve Deneyel olarak Farklı Aşıların İmmünojenitelerinin Tayini Üzerine Araştırmalar*. Ankara Üniv Vet Fak Derg 34:224-236.
- Batra, H.W., Chand, P., Ganju, L., Mukherjee, R. and Sadana, J.R. (1989). *Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies in Bovine Brucellosis*. Res Vet Sci 46:143-146.
- Berke, Z. (1974). *Tıbbi Viroloji* Cit 2 Gürsoy Matbaacılık Sanayi, Ankara. Alınmıştır: Arda, M., Minbay, A. ve Aydın, N. (1982). *Özel Mikrobiyoloji. Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar*. Ankara Üniv Vet Fak Yay 386, Ankara.
- Chand, P., Sadana, J.R. and Batra, H.V. (1990). *Comparison of a Dot-ELISA and a PLATE-ELISA for Bovine Brucellosis Diagnosis*. Vet Rec 127:169-170.
- Coks, E and Davies, G. (1973). *Brucella abortus (strain) 19 Vaccine Potency Test in Cattle*. J Biol Stand 1:171-178.
- Dajer, A., Gutierrez, E., Honhold, N., Zapata, D. and Villages, S. (1992). *Comparison of Five Serological Tests to Detect Brucella abortus Antibodies and a Report on Prevalence of the Disease in Livestock. In the State of Yucata; Mexico. Regional Network for Latin America on Animal Disease Diagnosis Using Immunoassay and Labelled DNA Probe Techniques*. IAEA-Tech Rep Ser 657 pp 131-137.
- Demiröz, K., Çelik, M. ve İyisan, A.S. (1994). *Kars ilinde Brucellosis Hastalığının Seropidemiyolojisi*. I. Ulusal Vet. Mikrobiyol. Kong. 27-29 Eylül, Ankara, s. 48.
- Doğuer, M. ve Yılmaz, S. (1963). *Türkiye'de Brucellosis*. Etlik Vet Bakt Ens Derg 2:1-20.
- Eroğlu, M. (1980). *Brucellosis'te Bağışıklık Brusella Aşıları ve Koruma Değerleri*. Pendik Vet Kont Araşt Enst Derg 7:144-161.
- Golem, S.B. (1946). *Brucellosis'in Memleketimizdeki Durumu*. Türk Hij Tecr Biyol Derg 9:3.
- Güllüce, M. ve Leloğlu, M. (1994). *Kars ve Çevresinde Sığırlarda Brucella abortus'a Karşı Oluşan Antikorların ELISA ve Diğer Serolojik Yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) Saptanması ve Sonuçların Karşılaştırılması*. I. Ulusal Vet. Mikrobiyol. Kong. 27-29 Eylül, Ankara, s. 46.
- Joint FAO/IAEA. *ELISA Kit For The Detection of Antibodies Against Brucella abortus*. Animal Production and Health Section Seibersdorf, Austria.
- Joint FAO/WHO (1986). *Expert Committee on Brucellosis*, 6th Rep, WHO Tech Rep Ser 740.
- Lamb, V.L., Jones, I.M., Shring, G.G. and Berman, D.T. (1979). *Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Bovine Immunoglobulin Subclass-Specific Response to Br. abortus Lipopolysaccharides*. Infect Immun 26:240-247.
- Marino, O.C., Ruedo, E., Leon, L.S. and Ramirez, C. (1992). *The Use of ELISA to Detect Antibodies to Brucella abortus. In Naturally Infected Cattle. Regional Network for Latin America on Animal Disease Diagnosis Using Immunoassay and Labelled DNA Probe Techniques*. IAEA-Tech Rep Ser 657, pp. 139-149.
- Morgan, W.J.B. (1967). *The Serological Diagnosis of Bovine Brucellosis*. Vet Rec 80:612-670.
- Reid, M.A. and Harvey, P.R. (1972). *The Use of Brucella abortus 45/20 Adjuvant Vaccine as a Diagnostic aid in the Brucellosis Eradication Campaign in Papua New Guinea*. Aust Vet J 48:495-500.
- Saravı, M.A. and Gregoret, R.J. (1992). *Comparison of An Indirect Enzyme Immunoassay and Conventional Serological Techniques for the Detection of Bovine Antibody to*

- Br. abortus*. Regional Network for Latin America on Animal Disease Diagnosis Using Immunoassay and Labelled DNA Probe Techniques IAEA-Tech Rep Ser 657 pp. 151-162.
20. **Sutherland, S.** (1985). *An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Brucella abortus in Cattle Using Monoclonal Antibodies*. Aust Vet J 62:264-268.
21. **Sutherland, S. and Hollander, L.** (1986). *Comparison of an ELISA Using Monoclonal Antibodies and a CFT for Cattle Vaccinated and Infected with Br. abortus*. Vet Micro 12:55-64.
22. **Tabatabai, I.B. and Deyoe, B.L.** (1984). *Specific ELISA for Detection of Bovine Antibody to Br. abortus*. J Clin Micro 20:209-213.
23. **Tarım ve Köyişleri Bakanlığı** (1991). *Türkiye Brusellosis Mücadele Projesi, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü* Ankara.
24. **Van Aert, A., Brioen P., Dekeyser, P., Uytterhaegen, I., Sijens, R.J. and Boeye, A.** (1984/1985). *A Comparative Study of ELISA and Other Methods for the Detection of Brucella Antibodies in Bovine Sera*. Vet Micro 10:13-21.