

TÜRKİYE'DE SIĞIR BRUCELLOSİS'İNİN İNSİDENSİ VE DENEYSEL OLARAK FARKLI AŞILARIN İMMUNOJENİTELERİNİN TAYİNİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR¹

Nejat Aydın²

**W. Bisping³
Müjgan İzgür⁵**

Ömer Akay⁴

Studies on the determination of incidence of bovine brucellosis in Turkey and assessment of immunogenicity of different vaccines.

Summary: *Many serological tests have been developed to detect brucella infected animals, of these Rose Bengal plate test, serum agglutination test (SAT) and the complement fixation test are routinely used. Recently enzyme-linked-immunosorbent assay methods (ELISA) have been described for the diagnosis of brucellosis in cattle and has gained popularity as an alternative to other serological tests.*

The purpose of these studies was to overcome the problems often encountered in the serodiagnosis of bovine brucellosis, and to establish the incidence of bovine brucellosis in Turkey and efficiency and useage of ELISA test for the detection of antibodies to brucella microorganisms and to determine of immunogenicity of Brucella abortus S 19 and Brucella abortus 45/20 vaccines in mice.

Antibodies were detected in 194 (11.9 %) of the 1620 serum samples, 232 (6.4 %) of 3634 milk samples tested with the serum agglutination test (SAT) and the Milk Ring test (MRT) respectively. Sera which have an optical density in the greater than 0.20 were considered as positive in ELISA test. 41 out of 56 sera, which were found SAT positive in different titers ranging 1/40 to 1/640 were positive in the ELISA test.

Both the vaccinated and unvaccinated control mice were challenged with Brucella abortus virulant strain No. 544. There was no significant difference

1 - Bu proje, A.Ü. Veteriner Fakültesi ile Hannover Veteriner Yüksek Okulunun iş birliği ile yürütülmüş ve tamamlanmıştır (BMZ-GTZ-Projekt Nr. 9).

2 - Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

3 - Prof. Dr., Tierärztliche Hochschule, Hannover, Almanya.

4 - Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

5 - Yrd. Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

between Brucella abortus S 19 and Brucella abortus 45/20 vaccines in point of immunogenicity.

Enzyme-linked immnosorbent assay seemed to be more sensitive test than the serum agglutination in the detecting antibody in Brucella infected animals.

Özet: Türkiye'de sığır Brucellosis'nin insidensi ve deneysel olarak farklı aşuların bağışıklık verme yeteneklerini incelemek üzere yapılan bu çalışmada; SAT ve RING testle infeksiyonun yaygınlığı, yeni bir test olan ELISA'nın Brucellosis'in teşhisinde uygulanması ve geçerliliği, ayrıca, Brucellosis'ten korunmada Br. abortus S 19 ve Brucella abortus 45/20 aşularının farelerdeki bağışıklık gücü araştırılmıştır.

16 kaynaktan alınan 1620 kan serumu SAT ile 194 (% 11.9)'u, 18 kaynaktan alınan 3634 süt örneğinin RING test ile 232'si (% 6.4) pozitif bulunmuştur. ELISA testiyle incelenen SAT ile değişik titrelerde pozitif bulunan 56 serumun 41'i OD 0.2 nin üzerinde, 34'ü ise SAT ile 1/40 titrenin üzerinde saptanmıştır.

Farelerde yapılan aşı denemelerinde Br. abortus S 19 ve 45/20 aşularının uygulanmasından sonra Br. abortus 544 suşu ile gerçekleştirilen epruvasyon denemelerinde iki aşı arasında önemli bir fark belirlenememiştir.

Giriş

Brucellosis, yeryüzünde sığır yetiştiriciliği yapılan hemen her ülkede görülen ve büyük ekonomik kayıplara neden olan çok önemli bir infeksiyondur. Ayrıca tehlikeli bir zoonoz oluşu bu önemini daha da artırmaktadır.

Hastalığın yayılışı sürüler, bölgeler, kentler ve ülkeler arasında çok büyük değişiklikler göstermektedir. Brucellosis hayvanlarda genellikle yavru atımına, infertiliteye ve süt veriminde azalmalara neden olarak, özellikle, ekonomik yönden büyük boyutlara ulaşan zararlara yol açar. Ayrıca, sürülerde uygulanacak yetiştirme programlarının aksamasına da neden olur. Bunlardan başka, plasentanın atılmamasına bağlı olarak şekillenen akut metritisler sonucu ölümler de oluşabilmektedir (3, 4, 12, 32).

Uzun araştırma ve denemeler sonucu Brucellosis ile savaşta iki ana prensibe uyulması gereği öngörülmüştür. Bunlardan birincisi infekte hayvanların teşhisi amacıyla bütün ülkelerde standart testlerin uygulanması ile birlikte bakteriyolojik yoklamalarla hastalık etken-

lerinin izolasyon ve identifikasyonu, diğeri ise hastalığa duyarlı olan hayvanların çeşitli yöntemlerle hazırlanmış olan aşılarda aşılama- rıdır (2, 10, 11, 26).

Sığırlarda Brucellosis'in serolojik olarak tanısı amacıyla, kısa bir sürede köy ve çiftlik şartlarında erken teşhis ve daha sonra tamamlayıcı diğ er muayenelerin laboratuvarda yapılmasına ışık tutacak olan bir yöntemin geliştirilmesi için birçok ülkede değerli araştırmalar yapılmıştır (7, 14, 18, 22, 25, 28, 36). Bu amaçla hastalığın sürü tara- malarında ortaya konulmasını sağlayan Ring Test ve infeksiyonun serolojik teşhisinde SAT, CF, FA ve ELISA testleri de güvenceyle uygulanmaktadır (1, 3, 9, 16, 17, 21, 39).

Sarısayın ve Eroğlu (28), Yurdumuzda Brucellosis'in serolojik teşhisinde uygulanan çeşitli muayene metodları üzerinde yaptıkları mukayeseli çalışmada SAT ile Coombs testi ve CF ile Rivanol tes- tinin paralel çalıştığını bildirmişlerdir. Yılmaz (39), sero-ring test metodunun SAT ve CF testleriyle % 100 lük bir uyum içinde çalış- tığını göstermiştir. Tarım-Orman ve Köy İşleri Bakanlığı verilerine göre (32), Türkiye'de sığırlardaki 36 yıllık ortalama reaktör oranının % 4.5 olduğu bildirilmekte ve bu oranın İstanbul çevresinde % 23, Kars'ta % 7 ve Ankara ilinde de % 10 olduğu belirtilmektedir.

Brucellosis'in tanınmasından bu yana hayvanlarda hastalığın kontrolü için çeşitli aşıl ar hazırlanmış ve geniş ölçüde uygulamaya sokulmuştur. Günümüzde hemen her ülkede sığırlarda canlı Br. abortus S 19 aşısı ve ölü inaktive adjuvanlı Br. abortus R 45/20 aşısı kul- lanılmaktadır (10, 11, 20, 26).

Brucellosis'e karşı korunmada uygulanan Brucella aşılarının gü- vence ve etkinlik kontrollerinde istatistiki olarak gerçek bir sonucun elde edilmesi için kullanılan hayvan sayısının fazla olması tercih edi- len bir durumdur. Sığır, koyun ve keçi gibi infeksiyona doğal olarak duyarlı olan deneme hayvanlarının bu amaçla kullanılması hem eko- nomik ve hem de çalışmaların laboratuvarlarda rutin bir şekilde yü- rütülmesi kolay bir iş değildir. Bu nedenle Brucella aşılarının kontro- lünde laboratuvar deney hayvanları ile de çalışmalar yapılmaktadır. Brucella aşılarının güvence ve etkinlik kontrollerinin sığırlarda (10, 11, 15, 18, 26, 31), domuzlarda (34), koyunlarda (1) ve laboratuvar hayvanlarında yapıldığına dair araştırmalar bulunmaktadır. Labo- ratuvar deney hayvanları arasında Brucella aşılarının güvence ve ak-

tivite testlerinde farelerin de (DBA ve CBA gibi) kullanılabilceği üzerinde birçok araştırmacı aynı görüşte birleşmişlerdir (5, 6, 8, 24, 29, 30, 35).

Bu araştırmada, Türkiye'de siğir Brucellosis'inin çeşitli serolojik testlerle (Ring test ve SAT) insidensinin tesbiti ve hastalığın teşhisinde duyarlı bir test olduğu ileri sürülen ELİSA testinin uygulaması ile Br. abortus S 19 ve 45/20 aşılarının fareler üzerinde etkinlik kontrollerinin yapılması planlanarak infeksiyonun teşhis ve korunmasına yönelik verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Serumlar : Araştırma süresince çeşitli bölgelerdeki il ve ilçelerden temin edilen toplam 1620 adet siğir serumu serolojik testlerle muayene edilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Toplanan serum örnekleri ve alındıkları yerler Tablo - 1'de gösterilmiştir.

Süt Örnekleri : Kamu ve özel kuruluşlara ait çeşitli bölgelerde bulunan çiftliklerdeki siğırlardan toplam 3634 adet süt örneği sağlanarak Ring Test uygulanmıştır.

Toplanan süt örnekleri ve alındıkları yerler Tablo - 1'de gösterilmiştir.

Besi Yerleri : Eprüve suşunun bakteriyolojik kontrollerinin yapılmasında ve fareler üzerinde yapılan aşı kontrol denemelerinde, dalaklardan ekim sonucu üreyen kültürlerde bakteri sayımı işlemlerinde Brucella Agar (Difco) ve Tryptose buyyon besi yerlerinden yararlanılmıştır.

Deneme Hayvanı : Brucella aşılarının aktivite kontrollerinde A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakteriyoloji Bilim Dalı deneme hayvanları ünitesindeki 3-4 aylık dişi beyaz farelerden yararlanılmıştır.

Aşılar : Deneme farelerinde aşılardan immunojenitelerini belirlemek üzere yapılan aktivite kontrollerinde kullanılan canlı Br. abortus S 19 aşısı Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden, İnaktif Br. abortus 45/20 aşısı (Abortox) ise Rhone Merieux, Lyon-Fransa'dan temin edilmiştir.

Tablo 1. Toplanan örneklerin alındıkları yer ve sayıları.

İl veya İlçeler	Örnekler	
	Kan Serumu	Süt
Karacabey Harası	305	-
Çayır Mera Enst.	44	44
Etlik Mikrobiyoloji Enst.	43	-
Bakteriyoloji Bilim Dalı (Ank.)	133	-
Hayvan Besleme Bilim Dalı (Ank.)	13	13
Konuklar D.Ü.Ç.	67	-
Eskişehir	188	-
Altındağ	-	563
Çankaya	-	936
Polatlı	-	570
Beypazarı	-	12
Çubuk	-	14
Yenimahalle	-	10
Kayseri	124	118
Kırıkkale	-	20
Sivas	-	480
Kırşehir	-	26
Kaman	-	32
Mucur	-	24
Konya	115	78
Samsun	73	100
İzmir	15	-
Çorum	45	-
Afyon	169	514
Burdur	81	-
Erzurum	54	80
Amasya	151	-
Toplam	1620	3634

Eprüve Suşu: Bakteriyojik olarak tüm özellikleri incelenen ve patojenik olduğu saptanan Fransa Alfort Veteriner Merkez Araştırma Laboratuvarından sağlanan Br. abortus 544 standart suşu cprüvasyon denemelerinde kullanılmıştır.

Antijenler

a- *SAT antijeni*: Sero-aglutinasyon testlerinde kullanılan Br. abortus aglutinasyon antijeni Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanmıştır.

b- *ELISA Test Antijeni*: Bu test için Br. abortus aglutinasyon antijeni Biosonic Bronwill Scientifics'de sonike edilerek hazırlanan bu antijen testte 1/200 oranında sulandırılarak kullanılmıştır (27).

c- *Ring Test Antijeni*: Toplanan sütlerin Ring Testle incelenmesi için Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden sağlanan tetrazoliumla boyalı test antijeninden yararlanılmıştır.

Peroksidazla İşaretli Sığır anti-IgG (Konjuge serum): Almanya'dan sağlanan CAPPEL firmasına ait bu konjugey'ten ELİSA testlerinde yararlanılmıştır.

Substrat: ELİSA testinde, reaksiyon sonucu renk oluşması için substrat olarak 5-amino-salisilik asit (Sigma) + H₂O₂ kullanılmıştır.

MİCRO ELİSA Mini Reader MR 590 (Dynatech): ELİSA testinin değerlendirilmesi bu cihazda, 490 nm (Dalga boyunda) de gerçekleştirilmiştir.

Serolojik Testlerde Kullanılan Tampon Sıvılar: Seroaglutinasyon testinde sulandırma sıvısı olarak % 05 fenollü F.T.S., ELİSA testinde ise antijen sulandırması için Coating Buffer (pH 9.6), konjugey, serum sulandırmaları ve yıkama işlemleri için PBS + Tween 20 kullanılmış ve substrat sulandırmasında da PBS'den yararlanılmıştır.

Serolojik Çalışmalar: Deneme ve incelemelerin çeşitli aşamalarında SAT, ELİSA ve Ring Test uygulamalarına başvurulmuştur.

a- *SAT Testi*: Bu test klasik tüp aglutinasyon yöntemine göre, serumların 1/10'dan 1/1280'e kadar iki katlı sulandırmaları ile uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde aşıllı hayvanlarda 1/80 ve aşısızlarda da 1/40 daki 2 + lık bir reaksiyon pozitif kabul edilmiştir.

b- *Ring Test*: Brucellosis'ten şüpheli ineklerin sütleri alınarak 3 ml. ye 3 damla Ring test antijeni damlatılmış ve 1,5-2 saat 37°C de inkubasyondan sonra sütlerin üst kısmında oluşan kırmızı halka pozitif olarak değerlendirilmiştir.

c- *ELİSA Testi*: Test Ruppaner (27) ve Heitmann ve ark. (19)'nın bildirdikleri yöntemine göre yapılmıştır. Bu testin uygulanmasında serumlar 1/10 dan itibaren iki katlı sulandırılarak daha önceden 2 saat inkube edilmiş ve PBS + Tween 20 ile yıkanmış antijen üzerine 50 µl miktarında damlatılmıştır. 30 dakika inkubasyonu takiben pleytler PBS + Tween 20 ile yıkanarak, her çukura PBS + Tween 20 de 1/1000 sulandırılmış konjugey'ten 50 µl ilave edilerek tekrar 30 dakika inkubasyona bırakılmıştır. Son yıkamayı takiben 50 ml PBS içinde sulandırılan 40 mg 5-amino salisilik asit + 10 µl H₂O₂ den her çukura 100 µl konularak 45 dakika içinde koyu kahve rengindeki renk oluşumu gözle ve mini Reader'le değerlendirilmiştir. SAT ile çeşitli

titrelerde reaksiyon veren 56 adet serum ile 20 adet negatif serum ELİSA testinde işlenmiştir.

d- *Complement Fikzasyon Testi (CF Testi)*: İneklerde 45/20 aşısının etkinlik kontrollerinde aşılı hayvanların kanlarındaki antikor düzeyi bu testle değerlendirilmiştir.

Farelerin Aşılanması ve Eprüvasyon: A.Ü. Veteriner Fakültesi Bakterioloji Bilim Dalı deneme hayvanları ünitesinde yetiştirilen 10'ar adet 3-4 aylık dişi fareler Br. abortus S 19 ve 45/20 aşıları ile subkutan olarak 1/10 sığır dozu ile aşılanmışlardır. Ayrıca 10 fare aşılansız kontrol olarak bırakılmıştır. Aşılamadan önce ve bir ay sonra olmak üzere tüm hayvanlardan kan alınarak SAT testi ile Brucella antikorlarının varlığı araştırılmıştır (5).

Aşılamadan bir ay sonra aşılı ve kontrol grubundaki tüm fareler Br. abortus 544 referens suşundan hazırlanan 0,1 ml. sinde 30.000 bakteri içeren kültürlerle intraperitoneal olarak eprüve edilmişlerdir (13). Eprüvasyondan 11 gün sonra öldürülen hayvanların dalakları alınarak -20 °C de 24 saat dondurulmuştur. Daha sonra donup çözülmüş dalaklar ağırlıklarının 10 misli kadar pH'sı 7.0 olan tamponlu F.T.S. içine alınarak Ultra-turrax ile 1-2 dakika süre ile parçalanarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen bu sıvıdan ve bundan hazırlanan sulandırmalardan uygun besi yerlerine ekimler yapılmış ve 4 gün süre ile 37 °C de inkubasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda üreyen kolonilerin sayımı yapılarak dalaktaki total bakteri miktarı saptanmıştır.

Bulgular

Serolojik Muayene Sonuçları

I- *SAT Bulguları*: Araştırma süresince çeşitli bölgelerdeki il ve ilçelerden sağlanan toplam 1620 sığır serumunun bu testle muayenesi sonucunda 194 (% 11.9) serumun pozitif reaksiyon verdiği saptanmış olup sonuçlar Tablo - 2'de gösterilmiştir.

Tablonun incelenmesinden anlaşılacağı gibi bazı illerde hiç reaktör saptanmamasına karşılık bazı illerde % 0.8 ile % 89'a kadar varabilen reaktör belirlenmiştir.

II- *Ring Test Sonuçları*: Değişik bölgelerdeki il ve ilçelerdeki 198 odaktan sağlanan toplam 3634 hayvana ait süt örneklerine Ring Test

uygulanmış ve sonuç olarak 61 odaktan 232 ineğe ait süt örneklerinde pozitif reaksiyon görülmüştür (Tablo - 3). Pozitif reaksiyon gösteren odaklardan kan serumu da sağlanarak reaktörlerin saptanmasına çalışılmıştır.

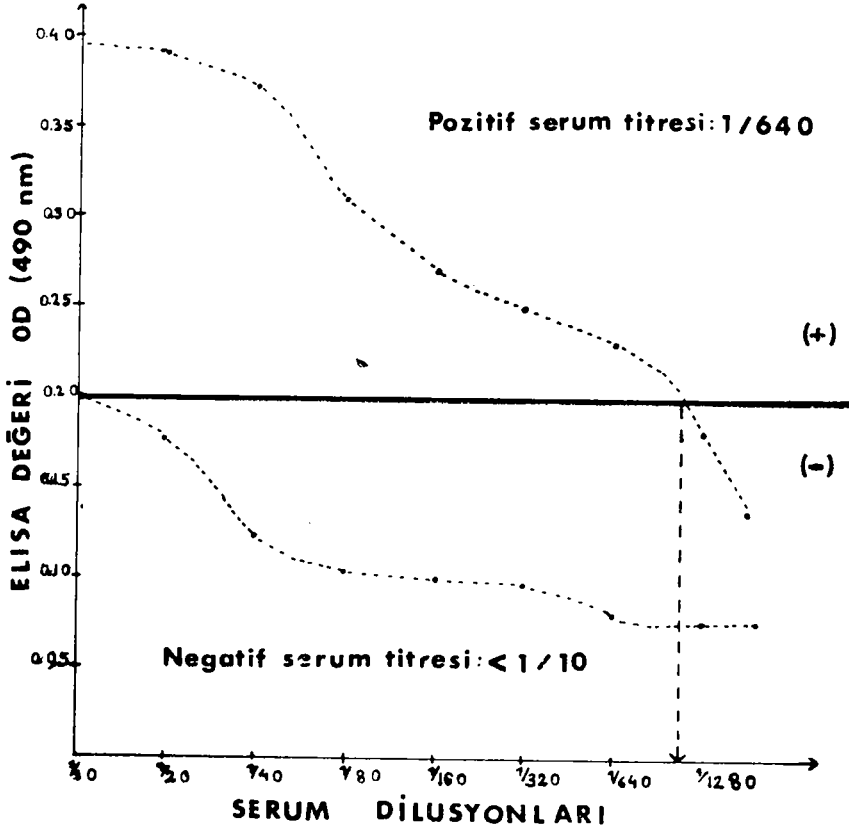
Tablo 2. Sığır Kan Serumları ile yapılan SAT sonuçları.

Serumların Sağlandığı Kaynak	Serum Sayısı	SAT Pozitif Serum Sayısı	Reaktör (%)
Karacabey Harası	305	10	3.2
Çayır Mera Enst.	44	2	4.5
Etlik Mikrobiyoloji Enst.	43	9	2.0
Bakteriyoloji Bilim Dalı	133	26	19.5
Hayvan Besleme Bilim Dalı	13	1	7.6
Eskişehir	188	-	0.0
Konuklar D.Ü.Ç.	67	-	0.0
Kayseri	124	2	1.6
Konya	115	1	0.8
Samsun	73	65	89.0
İzmir	15	3	20.0
Çorum	45	-	0.0
Afyon	169	12	7.1
Burdur	31	-	0.0
Erzurum	54	31	57.4
Amasya	151	32	21.1
Toplam	1620	194	11.9

Tablo 3. Ring Test Sonuçları.

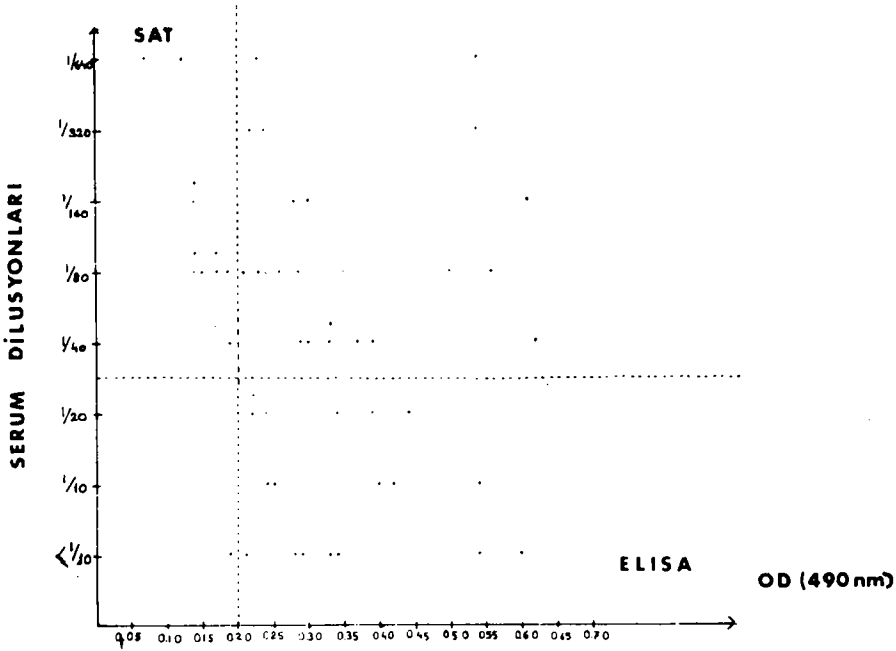
Süt Örneği alınan Yer	Odak Sayısı	İncelenen Süt adedi	Ring Test Pozitif Reaksiyon adedi	
			Odak	Süt
Çayır Mera Enst.	1	44	1	6
Hayvan Besleme Bilim Dalı	1	13	1	2
Altındağ	27	363	4	22
Çankaya	44	936	14	76
Polatlı	25	570	2	2
Bey pazarı	1	12	1	12
Çubuk	1	14	1	14
Yenimahalle	1	10	1	10
Kayseri	14	118	6	23
Kırıkkale	4	20	1	1
Sivas	35	480	9	16
Kırşehir	3	26	1	1
Kaman	3	32	1	1
Mucur	3	24	1	1
Konya	8	78	2	2
Samsun	5	100	4	16
Afyon	16	514	6	8
Erzurum	6	80	5	18
Toplam	198	3634	61	232

III- *ELİSA Test Sonuçları* : SAT testi ile değişik titrelerde reaksiyon veren 56 ve hiç antikor taşımayan 20 negatif serum ELİSA testi ile incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için 20 negatif serum 3 kez ELİSA testine tabi tutulmuş ve alınan değer ortalamaları Volter (38)'e göre düzenlenerek pozitiflik eşiği OD 0,20 olarak belirlenmiştir (Grafik - 1).



Grafik 1. Negatif ve pozitif serumlarla negatiflik kriterinin belirlenmesi.
Determination of threshold level by using of negative sera and positive sera.

ELİSA testi ile incelenen 56 serumun OD ve SAT titre dağılımları araştırmacılara göre (23, 33) Grafik - 2'de gösterilmiştir. Bu tablonun incelenmesinden anlaşılacağı gibi sadece SAT ile 12 serum (% 21.4), sadece ELİSA testi ile 19 serum (% 33.4) pozitif olarak belir-



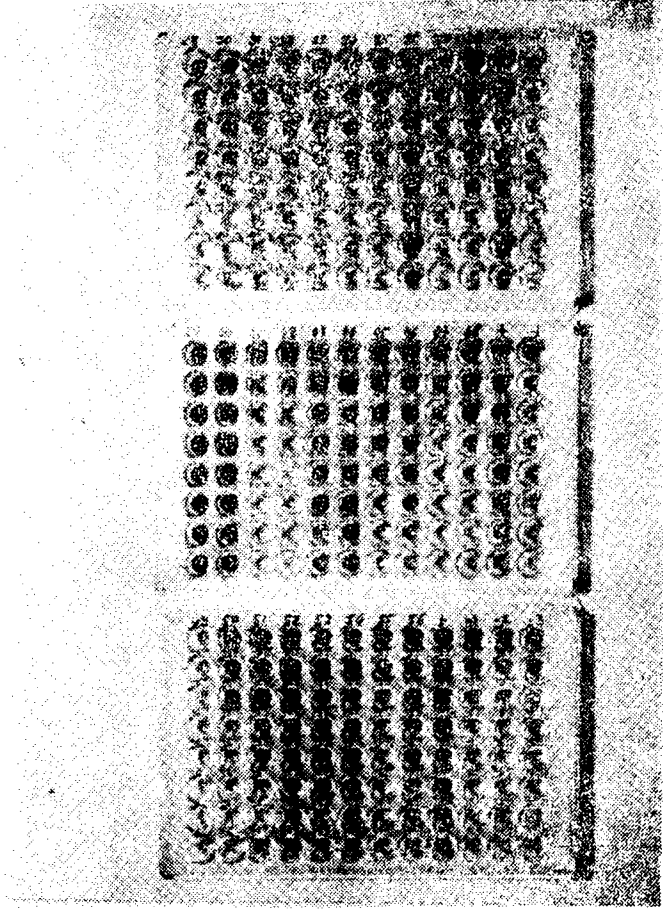
Grafik 2. ELISA testi ile incelenen 56 serumun OD ve SAT titrelerinin dağılımı.
Distribution of OD and SAT titres of 56 sera examined by ELISA test.

lenmiş, SAT-ELISA testi ile 3 (% 5.4) ve aynı testlerle 23 serum (% 39.2) pozitif olarak bulunmuştur (Resim - 1 ve - 2).

Aşı Denemeleri Sonuçları

I- *Serolojik Kontroller*: Aşıların aktivite kontrollerinde kullanılacak farelerden aşılardan önce kan alınarak SAT ile test edilmiş ve hayvanların Brucellosis'e karşı antikor içermedikleri saptanmıştır.

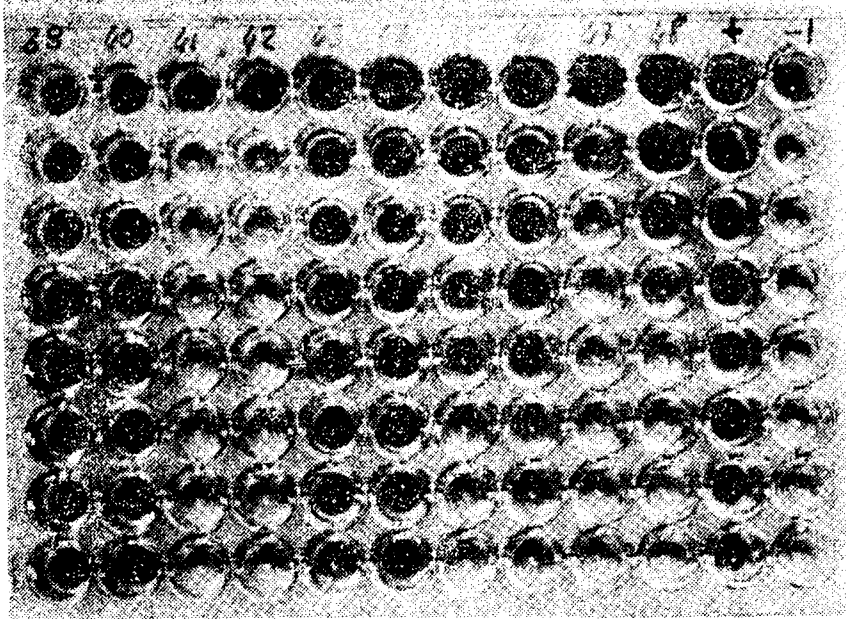
Fareler Br. abortus S 19 ve 45/20 aşısının 1/10 sığır dozu ile aşılandıktan 1 ay sonra kanları tekrar alınarak incelendiğinde S 19 aşıli farelerde homojen bir bağışıklığın elde edildiği, SAT ile 1/160 ve 1/320 titrelerin görülmesiyle ortaya konulmuştur. 45/20 aşısı ile aşıli farelerin serumları ise C.F. testi ile test edilerek 1/4 - 1/8 arasında pozitif bulunmuşlardır.



Resim 1. Test edilen 28 şüpheli, referens pozitif ve negatif serumların ELISA sonuçları.
The results of ELISA tests of 28 suspicious sera and reference positive and negative sera tested.

II-- *Aşıların Koruyucu Etkileri*: Aşılamadan 1 ay sonra bütün fareler Br. abortus 544'ün 0.1 ml de 30.000 bakteri ihtiva eden kültürü ile eprüve edildikten 11 gün sonra öldürülerek dalaklarındaki total bakteri sayısı saptanmıştır. Brucella abortus 544 suşu ile eprüve edilen aşılı farelerle kontrol farelerin dalaklarında saptanan bakteri sayıları ile iki aşının etkinlik kontrolleri Tablo - 4'de gösterilmiştir.

Tablonun incelenmesinden anlaşılacağı gibi gerek Br. abortus S 19 ve gerekse Br. abortus 45/20 aşısı ile aşılanmış farelerin eprüvasyonundan sonra dalaklarındaki total bakteri sayısı kontrol gruba oranla çok düşük düzeyde bulunmaktadır S 19 ile aşılı farelerin 4'ün-



Resim 2. Test edilen 10 şüpheli serum ile referens pozitif ve negatif serumların ELISA sonuçları.

The results of ELISA tests of 10 suspicious sera and reference positive and negative sera tested.

de ve 45/20 ile aşıli farelerin ise üçünde hiç üreme olmadığı gibi ortalama sayılarında birbirine çok yakın değerlerde olduğu görülmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Araştırma süresince Türkiye'nin çeşitli bölgelerindeki 16 kaynağı teşkil eden il ve ilçelerden sağlanan toplam 1620 sığır serumu SAT ile muayene edilmiş ve 194 (% 11.9) serumun pozitif reaksiyon verdiği ortaya konulmuştur. SAT ile test edilen kaynaklar arasında Eskişehir, Konuklar, Çorum ve Burdur'dan sağlanan serumlar bu testte negatif bulunmuştur. Sığır kan serumları ile yapılan SAT sonuçları ve reaktör yüzdeleri Tablo - 2'de verilmiştir. Tablonun incelenmesinde, Türkiye'nin hemen her bölgesinde az veya çok oranda reaktör hayvanın bulunduğu görülmektedir.

Ayrıca 18 kaynağı oluşturan çeşitli il ve ilçelerden 198 odağa ait 3634 süt örneği Ring Testle incelenmiş ve 61 odaktan 232 süt örne-

Tablo 4. 30.000 Br. abortus 544 İçeren Kültürlerle Eprüve edilen Farelde 11. günde Dalaktaki Bakteri Sayıları ve İki Aşının Etkinlik Kontrolleri.

Aşılar ve Kontrol	Fare No	Total Bakteri Sayısı	Ortalama Bakteri Sayısı
Br. S19 Aşısı	1	Üreme yok	1106
	2	Üreme yok	
	3	Üreme yok	
	4	Üreme yok	
	5	50	
	6	150	
	7	1430	
	8	2550	
	9	3310	
	10	3570	
Br. 45/20 Aşısı	1	Üreme yok	1216
	2	Üreme yok	
	3	Üreme yok	
	4	50	
	5	650	
	6	1000	
	7	1200	
	8	2800	
	9	2860	
	10	3600	
Kontrol	1	5455	526.800
	2	7860	
	3	20200	
	4	22400	
	5	46200	
	6	448300	
	7	884350	
	8	963300	
	9	1095000	
	10	1775000	

ğinin pozitif reaksiyon verdiği ve ayrıca bu testle pozitif reaksiyon görülen odaklara ait hayvanların kan serumları SAT ile muayene edildiğinde reaktörlerin varlığı da saptanmıştır. Bu durumu Tablo - 2 ve - 3'ün incelenmesinde görmek mümkündür.

Brucellosis yönünden SAT ve Ring Testle elde edilen muayene sonuçları Türkiye'de araştırmacıların bulgularıyla uygunluk göstermektedir (4, 28, 32, 39).

Yeni bir teknik olan ELİSA testinin sığır Brucellosis'inin serolojik tanısındaki önemi diğer çalışmalarda olduğu gibi (7, 9, 23, 27, 36) bu çalışmada da ortaya konulmuştur. Bu teknik SAT ile de ortaya konulabilen Brucella olgularını incelemede ve aynı zamanda diğer serolojik yöntemlerle negatif sonuç veren akut ve kronik olguları tanımlamada önem taşımaktadır. Çünkü ELİSA testinin Brucella ya karşı

çok düşük düzeydeki antikorların ortaya koyması, Brucellosis'e karşı epidemiyolojik amaçlarla yapılan serolojik çalışmalarda yüksek oranda spesifite ve sensitivite göstermesi bu testin avantajlı olduğunu ortaya koymaktadır (7, 23, 27).

Bu çalışmada ELİSA testi ile incelenen serumların OD ve SAT titre dağılımları Grafik - 2 de görüldüğü gibi sadece SAT ile 12 serum (% 21.4), sadece ELİSA testle 19 serum (% 33.4) pozitif, SAT-ELİSA testi ile 3 (% 5.4) serum negatif ve aynı testlerle 23 serum (% 39.2) pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre SAT ile ELİSA testi pozitiflik ve negatiflik açısından % 44.6 bir uygunluk göstermiştir. Aynı tablo incelendiğinde 1/40 eşliğine göre SAT testi ile toplam 34 serum pozitif bulunurken, ELİSA testinde OD 0.20 eşği sonrasında 41 serum pozitif bulunmaktadır. Bu durum ELİSA testinin Brucella antikorlarını saptamada SAT'a göre daha duyarlı olduğunda belirtmekte ve bu bulgular diğer araştırmacılara ait bulgularla da uygunluk göstermiştir (7, 9, 18, 23, 27, 36, 37).

Brucella aşılarının etkinlik kontrollerinde güvenilir sonuçlar alınabilmesi için çok sayıda standart deney hayvanı kullanılması, deney hayvanlarının barınma koşullarının standart olması, bakım süresinin kısalığı ve eprüve şusunun çok virulent olması ileri sürülmektedir (5, 12, 13, 20). Bu çalışmada, bahsedilen koşulların büyük ölçüde sağlandığı beyaz farelerde Br. abortus S 19 ve 45/20 aşılarının etkinlik kontrolleri gerçekleştirilmiştir. Her iki aşının farelerde iyi bir immunojeniteye sahip oldukları görülmüş ve aşısız kontrol grubu hayvanlara göre de iyi bir korunma sağlandığı belirlenmiştir. Alınan sonuçlar Tablo - 4'de verilmiş olup bulgular araştırmacıların çalışmalarıyla uygunluk göstermektedir (13, 24, 29, 30, 35).

Bu çalışmanın sonucunda, sığır populasyonu yönünden dünyanın önde gelen ülkelerinden biri olan Türkiye'de, Brucellosis'in önemli problem olarak dikkate alınması gerektiği hususu ortaya çıkmakta ve hastalığın teşhisinde ELİSA gibi daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi ile hayvanlarda iyi bir bağışıklık sağlayacak ve az dezavantaja sahip immunojenik aşılardan kullanılması gereği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla başarılı bir Brucellosis kontrol programının uygulanabilmesinin büyük ölçüde geliştirilen yeni, geçerli yöntem ve tekniklere bağlı olduğu da açıkça görülmektedir.

Kaynaklar

1. **Albert, K.** (1985). *Serological testing of cattle and sheep for brucellosis by a simplified immunoenzyme technique*. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig Universitat, Giessen.
2. **Alton, G.G.** (1978). *Recent developments in vaccination against bovine Brucellosis*. Aust. Vet. J., 54: 551-557.
3. **Alton, G.G., Jones, L.M. et Pietz, D.E.** (1977). *La Brucellose, Technique de Laboratoire*. 2. ed. Geneve: Organisation Mondial de la Sante.
4. **Arda, M., Minbay, A. ve Aydın, N.** (1982). *Özel Mikrobiyoloji. Bakteriyel İnfeksiyöz Hastalıklar*. A.Ü. Vet. Fak. Yayn. No. 386. A.Ü. Basımevi, Ankara.
5. **Aydın, ve Minbay, A.** (1979). *Brucella aşularının deneme farelerinde kontrolü üzerinde çalışmalar*. TÜBİTAK Doğa Bilim Derg., III: 185-191.
6. **Bosséray, N. and Plommet, M.A.**, (1983). *A laboratory reference vaccine titrate immunogenic activite of antibrucella vaccines in mice*. Ann. Rech. Vet., 14: 163-168.
7. **Byrd, J.M.W., Heck, F.C. and Hidalgo, R.J.** (1979). *Evaluation of the enzymelinked immunosorbent assay for detecting Brucella abortus antibodies*. Am. J. Vet. Res., 40 (6): 896-898.
8. **Calderon, G.N.** (1976). *Controle d'activite des vaccines antibrucellique sur petits animaux de laboratoire*. These a l'Universite Paris 2. Place Jussieu, Paris.
9. **Cargil, C., Lee, K., Clarke, I.** (1985). *Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in a bovine brucellosis eradication program*. Aust. Vet. J., 62 (2): 49-52.
10. **Coks, E., and Davies, G.** (1973). *Brucella abortus (Strain) 19 vaccine potency test in cattle*. J. Biol. Stand., 1: 171-178.
11. **Eroğlu, M.** (1980). *Brucellosis'te bağışıklık. Brucella aşuları ve korunma değerleri*. Pendik Vet. Kont. Araş. Enst. Derg., 7: 144-161.
12. **FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis** (1986). *Technical Report Series 740*. Wold Realth Organization, Geneva.
13. **Garrec, Y., Calderon, G.N. et Pilet, Ch.** (1976). *Influence du genotype de la souris sur le sensibilite a Br. abortus 544*. Internat. Symp. on Brucellosis (II) Rabat. Develop. Biol. Stand., 31: 287-292.
14. **Gaumont, R.** (1968). *Diagnostic experimental de Brucelloses animales le diagnostic serologique*. Extrait du Bull. de la Soc. Vet. Prat. de France, 6: 25-29.
15. **Gaumont, R., Trap, D.D., Thorel, M.F., Gayot, G., Pierre, F., et Dhennin, L.** (1975). *Utilisation de la genisse contre l'infection experimentale a Brucella abortus comparasion de sept vaccins*. 7 le session. DIE Raport No: 128, Paris.
16. **George, R.** (1979). *Ring-test et lutte contre la Brucellose incidence du H 38 sur le ring-test*. Extrait Bull. de la Soc. Vet. Prat. de France. 63 (7): 1-7.
17. **Heck, F.C., Deyoe, B.L., Williams, J.D.** (1982). *Antibodies to Br. abortus in sera from strain 19 vaccinated and non-vaccinated cows as determined by enzyme linked immunosorbent assay and conventional serologic methods*. Vet. Immun. Immunopathol., 3 (6): 629-634.

18. **Heck, F.C., Williams, J.D., Crawford, R.P. and Flowers, A.I.** (1979). *Comparison of serological methods for the detection of B. abortus antibodies in sera from vaccinated and non-vaccinated cattle.* J. Hyg., Camb., 83: 491-499.
19. **Heitmann, J., Kirchoff, H., Weigt, U., Lindena, J., Dubenkropp, H. und Schmidt, R.** (1983). *Mycoplasma-bovis Infektionen in einem Rinderbestand. 3. Mitteilung: Serologische Untersuchung auf Antikörper gegen Mycoplasma bovis.* Berl. Münch. Tierarztl. Wschr., 90: 43-48.
20. **Huise, E.C. and Carnaghan, R.B.A.** (1970). *Requirements for the production control of "Brucella abortus" (Strain 19) vaccine.* Symp. Series Immunobiol. Standart., 12: 1-10.
21. **Nielsen, K. and Wright, E.B.** (1984). *Enzyme Immunoassay application to the detection of bovine antibody to Brucella abortus.* Minister of Supply and Services, Canada.
22. **Nielsen, K., Balinger, R., Stiler, J., Rosenbown, B.** (1985). *A dipstick, enzyme immunoassay for detection of antibody to Br. abortus in cattle sera.* Can. J. Comp. Med., 49 (3): 298-302.
23. **Pellerin, J.L., Giral, M.F., Lautie, R.** (1980). *Le test immuno-enzymatique E.L.I.S.A. dans le diagnostic serologique de la Brucellose Humaine.* Rev. Med. Vet., 131 (11): 741-766.
24. **Pilet, Ch. et Garrec, Y.** (1966). *Contrôle sur Petits animaux de laboratoire du pouvoir immunogène des vaccins antibrucelliques inactives I. Sur la choix des especes animales et de l'époque du sacrifice.* Ann. Inst. Past., 110: 755-765.
25. **Piroid, R. et Lombard, M.** (1980). *Les methodes immuno-enzymatiques et leurs applications serologiques.* Rev. Med. Vet. 131, (1): 25-42.
26. **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.
27. **Ruppner, R., Meyer, M.E., Willeberg, P. and Behymer, D.E.** (1980). *Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with other test for brucellosis, using sera from experimentally infected heifers.* Am. J. Vet. Res., 41 (8): 1329-1332.
28. **Sarısayın, F. ve Eroğlu, M.** (1969). *Brucellosis'in serolojik teşhisinde uygulanan çeşitli muayene metodları üzerinde mukayeseli çalışma.* Pendik Vet. Kont. Araş. Enst. Derg., 1: 49-59.
29. **Singer, B. Ch.** (1967). *Brucella infection in mice.* J. Infect. Dis., 60: 265-278.
30. **Sterne, M. and Trim, G., Broughtson, F.S.** (1971). *Immunisation of laboratory animals and cattle with non agglutinogenic extract of Brucella abortus 45/20.* J. Med. Microbiol., 4: 185-194.
31. **Sutherland, S.S.** (1984). *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of cattle infected with Br. abortus.* Vet. Microbiol., 10 (1): 23-32.
32. **Tarım-Orman Bakanlığı** (1982). *Türkiye Brucellosis Mücadele Projesi.* Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara.
33. **Terpstra, W.J., Lighthart, G.S. and Schoone, G.J.** (1980). *Serodiagnosis of Human Leptospirosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).* Zblt. Bakt. Hyg., Infk. Abt. Orig. A 247: 400-405.

34. **Toen, C.O., Hopkins, M.P., Armbrust, A.t., Angus, R.D. and Pietz, D.E.** (1980). *Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in sera of Brucella suis-infected swine.* Can. J. Comp. Med., 44 (3): 249-298.
35. **Thornton, D.H. and Musket, J.C.** (1972). *The use of laboratory animals in the potency test of Brucella abortus S 19 vaccine. Response of vaccine and challenge.* J. Comp. Path., 82: 201-208.
36. **Trap, D. et Gaumont, R.** (1984). *Diagnostic Serologique de la Brucellose chez les Bovins comparaison entre L'ELISA (IgG) et les epreuves serologiques classiques.* Develop. Biol. Standard., 56: 451-463.
37. **Vandert, A., Brion, P., Dekeyser, P. Uytterhaegen, L., Sijens, R.J. and Boeye, A.** (1984). *A comparative study of ELISA and other methods for the detection of brucella antibodies in bovine sera.* Vet. Microbiol., 10: 13-21.
38. **Voller, A., Bidwell, D.E. and Bartlett, A.** (1979). *The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).* Dynatech, Europa, Borough. House, London.
39. **Yılmaz, S.** (1977-1978). *İnsan ve hayvan kan serumlarının Brucelloiss bakımından muayenesinde "Ring test" metodu ile yapılan çalışmalar.* Etlik Vet. Mikrobiol. Enst. Derg., 4 (11-12): 156-167.