



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KOYUNLARDA BRUSELLOZİSİN BAKTERİYOLOJİK VE SEROLOJİK
TEŞHİSİ**

Serpil BALCI

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2009



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KOYUNLARDA BRUSELLOZİSİN BAKTERİYOLOJİK VE SEROLOJİK TEŞHİSİ

Serpil BALCI

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. MİHRİBAN ÜLGEN

Bursa-2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	V
İNGİLİZCE ÖZET	VI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	6
GEREÇ ve YÖNTEM	22
GEREÇ	22
Saha Örnekleri	22
Atık Fetus Materyali	22
Serum Örnekleri	22
Standart Brusella Suşları	22
Brusella Fajları	22
Brusella Antiserumları	22
Besiyerleri	23
Serum Dekstroz Agar (SDA)	23
Brusella Selektif Besiyeri	23
Kanlı Agar	23
Gliserinli Brusella Broth (Sıvı Gliserinli Besiyeri)	23
Üre Besiyeri	23
Boya İçeren Besiyerleri	24
Tiyonin’li Besiyeri	24
Bazik Fuksin’li Besiyeri	24
Safranin-O’lu Besiyeri	24
Antibiyotik İçeren Besiyerleri	25
Streptomisinli Besiyeri	25
Penisilinli Besiyeri	25
İ-eritritol	25
Solüsyonlar	25
Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Maddeler	25
Hidrojen Peroksit	25
Oksidaz Çubuğu	25
Antijenler	26

Rose Bengal Test (RBT) Antijeni	26
Komplement Fikzasyon Test (CFT) Antijeni	26
Kimyasal Maddeler	26
Pozitif ve Negatif Kontrol Serum	26
Komplement	26
Ambosseptör (Hemolizin)	26
Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) Kiti	27
Cihazlar	27
YÖNTEM	27
İzolasyon Çalışmaları	27
Bakteriyoskopi	27
Organ Homojenatlarının Hazırlanması	27
İzolasyon	27
İdentifikasyon Yöntemleri	28
Cins düzeyinde İdentifikasyon	28
Koloni Morfolojisi	28
Bireysel Morfoloji	28
Polivalan Brusella Antiserumu ile Aglütinasyon	28
Akriflavin ile Aglütinasyon	28
Biyokimyasal Testler	29
Katalaz Testi	29
Üreaz Testi (Christensen's Metodu)	29
Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)	29
Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon	29
Fajların Rutin Test Dilusyonunun Hazırlanması	29
Tbilisi ve R/C Fajı ile Lizis	30
Karbondioksit (CO ₂) Gereksinimi	30
Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi	30
Boyalı Besiyerinde Üreme Durumu	31
Tiyonin Varlığında Üreme	31
Bazik Fuksin Varlığında Üreme	31
Safranin-O Varlığında Üreme	31
Antibiyotikli Besiyerlerinde Üreme Durumu	31

Penisilinli Besiyerinde Üreme	31
Streptomisinli Besiyerinde Üreme	32
İ-eritritol içeren besiyerinde Üreme	32
A ve M Monospesifik Anti-Serumlarla Aglütinasyon	32
Serolojik Testler	33
Rose Bengal Test (RBT)	33
Komplement Fiksasyon Test (CFT)	33
Komplementin Titrasyonu	33
Eritrosit Süspansiyonu	32
Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması	33
Testin Yapılışı	34
Antijen-Hemolitik Sistem ve Komplement Kontrollü Çalışma	34
Hemolitik Sistemin Hazırlanması	35
Test Sonuçlarının Okunması	36
Sonuçların Değerlendirilmesi	36
Competitive ELISA (C-ELISA)	36
Verilerin Değerlendirilmesi Risk Analizleri ve İstatik Yöntemler	37
BULGULAR	40
İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları	40
Bakteriyoskopi	40
İzolasyon Çalışmaları	40
Polivalan Brusella Antiserumuyla Aglütinasyon	40
Akriflavin ile Aglütinasyon	40
Biyokimyasal Testler	40
Katalaz Testi	40
Üreaz Testi (Christensen's Metodu)	41
Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)	41
Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları	41
Karbondioksit (CO ₂) Gereksinimi	41
Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretimi	41
Tbilisi Fajı ile Lizis	41
R/C Fajı ile Lizis	41
Boyalı Besiyerlerinde Üreme	42

Tiyonin Varlığında Üreme	42
Bazik Fuksin Varlığında Üreme	42
Safranin-O Varlığında Üreme	42
Antibiyotikli Besiyerlerinde Üreme	42
Penisilinli Besiyerinde Üreme	42
Streptomisinli Besiyerinde Üreme	42
İ-eritritol İçeren besiyerinde Üreme	42
A ve M Mono-Spesifik Anti-Serumlarla Aglütinasyon	43
İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları Sonuçları	43
Serolojik Test Sonuçları	48
Rose Bengal Test (RBT) Sonuçları	48
Complement Fiksasyon Testi (CFT) Sonuçları	49
Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) Testi Sonuçları	49
Risk Analizleri ve İstatistiksel Değerlendirmeler	55
TARTIŞMA ve SONUÇ	59
KAYNAKLAR	65
TEŞEKKÜR	72
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖZET

Bu çalışmada, Bursa ilinden Tarım İl Müdürlüğü'ne getirilen toplam 110 adet koyun aborte fetus materyali *Brucella spp.* izolasyonu amacıyla bakteriyolojik olarak ve bu koyunlara ait 110 adet kan serumu da anti-*Brucella* antikorları yönünden serolojik olarak incelendi. İzolasyon çalışmalarında, fetal organ homojenatları ve mide içerikleri kanlı agar ve Brusella Selektif Agara inokule edildi. Şüpheli kolonilerin identifikasyonu ve biyotip tayinleri standart metodlar ile yapıldı. İzolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucunda, aborte koyun fetuslarından 48 (% 43.7) adet *B. melitensis* suşu izole edildi. Bunların 42 (% 87.5)'sinin *B. melitensis* biyotip 3 ve 6 (% 12.5)'sının *B. melitensis* biyotip 1 olduğu saptandı. Serolojik çalışmalarda aborttan 21 gün sonra alınan 110 adet kan serumu, Rose Bengal Testi (RBT), Komplement Fiksasyon Testi (CFT) ve Kompetitif ELISA (C-ELISA) testleri ile incelendi. RBT, CFT ve C-ELISA için pozitif serum sayıları sırasıyla 43, 45, 46 bulundu.

RBT, CFT ve C-ELISA'nın sensitiviteyi sırası ile % 87.50, % 91.67 ve % 93.75 bulundu. Spesifiteyi tüm testler için eşit ve % 98.39 olarak hesaplandı. Receiver Operating Characteristic (ROC) eğrisi altında kalan alan (REAKA), RBT için 0.929, CFT için 0.950 ve C-ELISA için 0.961 ve istatistiki açıdan önemsiz bulundu ($P>0.05$).

CFT ve RBT ile karşılaştırıldığında C-ELISA değerleri ile eşit spesifiteye sahip olmasına karşın daha yüksek sensitivite, REAKA, pozitif ve negatif olasılık oranlarına sahiptir. Sonuçlar C-ELISA'nın koyun brusellozisinin serolojik tanısında değerli bir yöntem olduğunu ve koyunlarda *B. melitensis* infeksiyonunun tanısında diğer serolojik testlere bir alternatif olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Brusellozis, koyun, bakteriyoloji, seroloji, doğrulama

SUMMARY

BACTERIOLOGICAL AND SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF BRUCELLOSIS IN SHEEP

In this study, a total of 110 aborted sheep fetuses brought from Bursa provinces to Bursa Provincial Directorate of Agriculture were investigated bacteriologically for *Brucella* spp. and 110 sera were tested serologically in order to determine the antibodies against *Brucella* spp. In the isolation studies, abomasum content and homogenates from internal organs of the aborted fetuses were inoculated into blood agar and Brucella Selective Agar. Identification and biotyping of suspected colonies were done by using standard methods. In the result of isolation and identification studies, 48 (43.7 %) *B. melitensis* were isolated from aborted sheep fetuses. It was determined that 42 of the isolates (87.5 %) were *B. melitensis* biovar 3 and 6 isolates (12.5 %) were *B. melitensis* biovar 1. In the serological studies, a total of 110 blood sera taken from sheep at the 21. days after abortion were tested by using Rose Bengal Test (RBT), Complement Fixation Test (CFT) and Competitive ELISA (C-ELISA). The positive sera numbers for RBT, CFT and C-ELISA were found 43, 45 and 46 respectively.

The sensitivity of the RBT, CFT and C-ELISA were found 87.50 %, 91.67 % and 93.75 %, respectively. The spesifity were estimated equal and 98.39 % for all tests. The under of receiver operating characteristic (ROC) area (AUC) were estimated 0.929 for RBT, 0.950 CFT and 0.961 for C-ELISA and was not significant ($P>0.05$).

Compared to CFT and RBT, C-ELISA have higher sensitivity, AUC, positive and negative likelihood ratio but have equal spesifity. Results demonstrated that the C-ELISA is valuable tool for the serological diagnosis of ovine brucellosis and can be used as an alternative to the other serological tests for diagnosing *B. melitensis* infection in sheep.

Key Words: *Brucellosis*, sheep, bacteriology, serology, validation.

GİRİŞ

Brusellozis, dünyanın hemen her yerinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen en önemli zoonotik infeksiyonlardan biridir. Hastalık bir yandan sığır, koyun, keçi gibi büyük ve küçük ruminantlarda yavru atma, infertilite ve süt veriminde kayıplar ile hayvancılık sektörüne ve ülke ekonomisine büyük zararlar verir iken, diğer yandan insanlarda çeşitli sistemlerde ciddi organ komplikasyonları oluşturabilen önemli bir zoonozdur (1, 2). Brusellozis Kanada, Norveç, Belçika, Hollanda, Finlandiya, İngiltere, İsviçre, İsveç, Avusturya, Avustralya, Macaristan, Lüksemburg gibi birçok ülkede eradike edilmesine rağmen Akdeniz ülkeleri, Afrika, Ortadoğu, Orta Asya, Orta ve Güney Amerika'da halen endemik olarak seyretmektedir. Brusellozis, ülkemizde de insanlarda ve hayvanlarda yaygın olarak görülmekte olup, önemli sorunlara neden olmaktadır (3).

Brusellozisin seroprevalansına yönelik olarak yapılan, 1989 yılı ulusal tarama sonucuna göre koyunlarda prevalans % 1.26, sığırlarda % 3.56 olarak belirlenmiştir (4). 1990 yılında ise bu oran koyunlarda % 2.08 olup, sığırlarda % 1.2'dir (5). 1991 yılında yapılan sero-surveyde, koyunlarda % 1.83 ve sığırlarda % 1.01 brusellozis prevalansı saptanmıştır (6). 2000 yılında yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada brusellozis prevalansı sığır popülasyonunda % 1.43, koyun popülasyonunda ise % 1.97 olarak tespit edilmiştir (7).

Koyun brusellozisinin etkeni *Brucella melitensis*'in biyotip dağılımı ülkelere göre farklılık gösterebilmektedir. *B. melitensis*'in mevcut 3 biyotipinden, biyotip 1 Latin Amerika, İspanya, Portekiz ve Malta'da en yaygın olarak görülen biyotiptir. İtalya ve Yunanistan'da en fazla biyotip 2 yaygındır. Biyotip 3 en yaygın olarak Fransa, Mısır, Ürdün, İsrail ve Kuzey Afrika'da görülmekte, ancak İspanya, Yunanistan ve Türkiye'de de bildirilmektedir. Batı ve Orta Asya'da biyotip 2 ve 3 en yaygın biyotiplerdir. Suudi Arabistan, Kuveyt, İran ve Irak'ta her üç biyotip de yaygın olarak bulunmaktadır. *B. abortus* biyotip 1 dünya genelinde sığırlardan en sık izole edilen biyotiptir. Biyotip 1, 2 ve 4 Kuzey ve Güney Amerikada en sık görülen biyotiplerdir. Biyotip 3 ve 6 Afrika ve bazı Asya ülkelerinde yaygın olarak görülmektedir. Biyotip 5 ve 9 nadir olarak görülmektedir (8). Türkiye'de standart metotlara göre *Brucella* izolatlarının identifikasyonları son yıllarda yoğun olarak ele alınmıştır. Ancak standart metotlara göre 1961 yılında Doğuer (9) tarafından yapılan ilk çalışmada 33 yerli *Brucella* suşundan 16'sının *B. abortus* olduğu, 4'ünün intermedier karakterde ve 13'ünün atipik suşlar olduğu ve *B. suis* ve *B. ovis* türlerine Türkiye'de rastlanılmadığı bildirilmiştir.

Sarısayın ve arkadaşları (10), sığır ve manda orijinli toplam 116 yerli *Brucella* suşundan 2'sinin *B. melitensis* biyotip 2 olduğunu bildirmişlerdir. 9 adet koyun orijinli *Brucella* suşunun ise 7'sinin *B. melitensis* biyotip 2 ve 2'sinin *B. melitensis* biyotip 1 karakteri taşıdığını belirtmişlerdir. Erdoğan ve arkadaşları (11), 1993 yılında Trakya bölgesinden gelen toplam 145 koyun-keçi atık fütüsünden 29 adet *Brucella* suşu izole etmişler ve bunlardan 25'inin *B. melitensis* biyotip 1, 3'ünün *B. melitensis* biyotip 2 ve 1'inin ise *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu belirtmişlerdir. Erdenliç ve Şen (12), 1996-1998 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden ve koyun atıklarından izole edilen 78 adet *Brucella* izolatlarının % 88.5'inin *B. melitensis* biyotip 3 ve % 11.5'inin *B. melitensis* biyotip 1 olduğunu belirlemişler, 3 adet izolatın boyalara duyarlılık açısından atipik olduğunu saptamışlardır. Büyükcangaz (13) çalışmasında, 23 koyun izolatının 5'inin *B. melitensis* biyotip 1, 1'inin *B. melitensis* biyotip 2 ve 16'sinin *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu, 1 adet izolatın da atipik özellikte *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu tespit etmiştir.

Brusellozisin laboratuvar teşhisinde doku örneklerinden etken izolasyon ve identifikasyonu halen altın standart yöntem olmaya devam etmektedir. Brusellozisin kontrol ve eradikasyon çalışmalarında ise çok sayıda hayvanın incelenmesi ve izlenmesi gerektiğinden serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır (14). Brusellozisin indirekt teşhisinde serum, süt, vajinal mukus ve seminal plazma da brusella etkenlerine karşı oluşan antikorları saptamaya yönelik birçok serolojik test geliştirilmiştir (14-16).

Klasik serolojik testlerde tanısal spesifitenin artması, o testin saptadığı antikor izotipinin sınırlı olması ile paralellik gösterir. Bruselloziste IgG1 gerek kanda uzun süreli ve en dominant olarak kalması ve gerekse immun cevabın en erken dönemlerinde saptanabilen bir izotip olması nedenleri ile bu izotipi saptayan serolojik testlerin güvenilirliğini arttırmaktadır. Bu açıdan IgG1'i saptayan Rose Bengal Testi (RBT) ve Komplement Fiksasyon Testi (CFT) gerek bireysel ve gerekse sürü bazında taramalar için tavsiye edilen testlerdir. Uluslararası standartlara göre bu testlerden, RBT'nin tarama testi, CFT'nin standart doğrulama testi olarak kullanılması önerilmiştir (14, 17, 18). CFT tekniği kompleks olmasına rağmen, bir çok ülkede küçük ruminantlarda brusellozisin teşhisinde doğrulama testi olarak geniş ölçüde kullanılmaktadır (19, 20).

OIE tarafından da CFT'inin kontrol ve eradikasyon programlarında bir doğrulama testi olarak kullanılması önerilmektedir (14). Ülkemizde brusellozise karşı aşılama uygulanan bölgelerde kayıtların düzenli tutulmaması ve hastalıklı hayvanların aşıli olup olmadıklarının bilinmemesi nedeniyle hastalıklı hayvanların serolojik tanılarında problemler yaşanmaktadır. Son yıllarda aşıli ve infekte hayvanları birbirinden ayırt

edebilecek Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) kitleri geliştirilmiştir.

Brusellozisin teşhisine yönelik olarak geliştirilen serolojik testlerin etkinliklerini değerlendirmeye yarayan sensitivite, spesifite, pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri, pozitif olasılık oranı, negatif olasılık oranı ve ROC (Receiver Operating Characteristic) eğrisi altında kalan alan (REAKA) gibi değerler çeşitli çalışmalarda farklılık göstermektedir. Minas ve arkadaşları (21) C-ELISA'nın sensitivitesini % 89.2 ve spesifitesini % 96.4 olarak tespit etmişlerdir. Diğer bir çalışmada; RBT'nin sensitivite ve spesifiteleri sırası ile % 75.8 ve % 99.7, CFT'nin sensitivite ve spesifiteleri sırası ile % 80.6 ve % 99.1, C-ELISA'nın sensitivite ve spesifitesi % 76.5 ve % 98.5 olarak bildirilmiştir (22).

Burriel ve arkadaşları (23) küçük ruminantlarda *B. melitensis* teşhisinde Fluorescence Polarisation Assay (FPA), Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (I-ELISA), C-ELISA metodlarını karşılaştırmışlar ve FPA'ı en düşük sensitiviteli, I-ELISA ise en düşük spesifiteli test olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, I-ELISA'yı en sensitiv test olarak bulurlar iken, C-ELISA'yı en spesifik test olarak tanımlamışlardır. En yüksek pozitif tahmin değerine C-ELISA'nın takiben de FPA'nın sahip olduğu bulunmuştur. En yüksek negatif tahmin değerine C-ELISA'nın sahip olduğunu tespit etmişlerdir. I-ELISA'nın brusellozis kontrol programının erken döneminde, C-ELISA'nın ise kontrol programının son basamağında kullanılmasının daha uygun olduğunu, FPA ve I-ELISA'nın C-ELISA ile karşılaştırıldığında basit, ucuz ve uygulanmasının hızlı olduğunu, araştırmalardaki değerini tam anlayabilmek için daha fazla ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Nielsen ve arkadaşları (24) Plate test, CFT, I-ELISA ve C-ELISA yöntemleri ile sığır serumlarını test etmişler, aşılı hayvanlarda C-ELISA testinin diğer testlere göre daha duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Nielsen ve arkadaşları (25) yaptıkları diğer bir çalışmada; *B. melitensis* ile deneysel olarak infekte edilen koyunlardan elde edilen kan serumlarına, I-ELISA, C-ELISA, FPA testlerini uygulamışlardır. Testlerin sensitivite ve spesifite değerlerini sırasıyla; I-ELISA için % 91.7 ve % 97.6, C-ELISA için % 75 ve % 99.8, FPA için % 91.7 ve % 89.5 olarak bildirmişlerdir.

Nielsen ve arkadaşları (26) 2213 keçi serumunda I-ELISA, C-ELISA, FPA ve Buffered Antigen Plate Agglutination Test (BPAT) ve CFT'lerini uygulamışlar ve testlerin sensitivite ve spesifite değerlerini sırasıyla I-ELISA'da % 96.2 ve % 99.7, C-ELISA'da %

93.6 ve % 98.9, FPA'da % 88.7 ve % 98.9, BPAT ve CFT'de % 92.3 ve % 61.6 olarak tespit etmişlerdir.

Minas ve arkadaşları (21), C-ELISA'nın pozitif olasılık oranını koyunlarda % 24.9, negatif olasılık oranını ise % 0.11 olarak belirlemişlerdir.

Esendal ve arkadaşları (27) infekte sürüden örneklenen 150 hayvanın bakteriyolojik muayenelerine dayanarak RBT'in sensitivitesini % 85.7, spesifitesini ise % 94.7 olarak belirlemişlerdir. Öngör (28), ELISA testinin rutin testler ile karşılaştırıldığında oldukça duyarlı ve spesifik olduğunu, koyun brusellozisinin teşhisinde kullanılmasının yarar sağlayacağını bildirmiştir. Brusellozis mücadele programında yer alan aşılama uygulaması, brusellozisin serolojik teşhisinde bir takım güçlükler neden olmaktadır. Öngör ve arkadaşları (29), atık yapmış koyunlarda *B. melitensis*'e karşı oluşan antikorları, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), RBT, CFT ile saptamış, çalışmada kullanılan testlerin sensitivite ve spesifiteleri (CFT referans test kabul edilerek) karşılaştırılmıştır. Elazığ ve çevresinde atık yapan 36 koyun sürüsünden elde ettikleri toplam 500 adet kan serumunda ELISA ile 103 (% 20.6), RBT ile 55 (% 11), CFT ile 89 (% 17.8) örnekte pozitiflik saptamışlardır. Bu değerler karşılaştırıldığında; ELISA ile CFT arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı fakat ELISA ile RBT sonuçları arasında önemli bir farklılık olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar kullanılan testlerden ELISA testinin sensitivitesinin % 97 ve spesifitesinin % 96 olduğunu, RBT'in sensitivitesinin % 61 ve spesifitesinin ise % 100 olduğunu tespit etmişlerdir.

Dakman ve arkadaşları (30), *Brucella* Rev-1 genç aşısı ile aşılanmış koyunlar ile *Brucella* spp ile infekte koyunlara ait kan serumlarını konvansiyonel testler ve C-ELISA ile test ederek hayvanlardaki humoral immun yanıtı değerlendirmişler. İnfekte koyun sürülerinde atık yapmış hayvanların % 91.16'sını RBT ile, % 91.16'sını SAT ile % 85.63'ünü CFT ile ve % 86.74'ünü C-ELISA ile pozitif bulmuşlardır. Genel olarak C-ELISA yönteminin özellikle CFT'ne bir alternatif test olarak teşhiste kullanılabileceği ancak aşılı ve doğal infekte hayvanların ayrımı konusunda ülkemizde daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği kanaatine varmışlardır.

Bu çalışmada, Bursa ili ve ilçelerinden elde edilen koyun atık fetuslarının *Brucella* spp. açısından bakteriyolojik olarak incelenmesi ve atık yapan koyunların kan serumlarının *Brucella* antikorları yönünden RBT, CFT ve C-ELISA testleri ile serolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, Bursa ili ve ilçelerindeki koyun atıklarında *Brucella* spp.'nin prevalansının belirlenmesi yanında, bölgedeki biyotip dağılımı, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar arasındaki paralellik araştırılmıştır. Bursa ve

evresinde belirlenen biyotip dağılımları hastalıkla mücadele programları için bilgi kaynağı oluşturacaktır. Serolojik testlerin karşılaştırmalı olarak etkinliklerinin ortaya konulması, hastalık kontrolünde rutin olarak kullanılma olasılığı olabilecek C-ELISA tekniği hakkında bilgi verecektir.

GENEL BİLGİLER

Brusellozis, insan ve hayvanlarda *Brucella* cinsine bağlı mikroorganizmalar tarafından oluşturulan bir infeksiyon olup sığır, koyun, keçi ve domuz gibi hayvanların dişilerinde genital organlara yerleşerek yavru atma, infertilite, mastitis ve artritlere, erkeklerde ise orşitise neden olan, nekrotik yangısal karakterde infeksiyöz bir hastalıktır (27, 29, 31).

Brusellozis, dünyanın hemen her yerinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen en önemli zoonotik infeksiyonlardan biridir. Ülkemizde de yaygın olarak görülen ve hayvan sağlığı üzerine olan ekonomik önemi ve insanlara bulaşma riski olan bir zoonoz olması dolayısı ile evcil hayvan popülasyonlarında kontrol ve eradikasyon programlarına gereksinim duyulan bir hastalıktır (27, 28). İnsanlarda akut ve kronik şekilde çeşitli sistemlerde ciddi organ komplikasyonları oluşturabilen önemli bir zoonozdur. Hastalık ilk kez Malta Adası'nda saptandığından 'Malta Humması', 'Akdeniz Humması', koyunlardan insanlara bulaşması nedeni ile de halk arasında 'Koyun Hastalığı' veya 'Mal Hastalığı' gibi isimlerle anılmaktadır (32, 33).

Brucella cinsinin ilk üyesi 1887 yılında, David Bruce tarafından Malta hummasından ölen bir insanın dalağından izole edilmiş ve etken *Micrococcus melitensis* olarak isimlendirilmiştir (7, 14). 1895 yılında Danimarkalı Veteriner Hekim Dr. Fredrick Bang ve Stribolt fetal membranlar ile uterus sıvılarından saf olarak izole ettikleri Gram negatif bakterilerin üreme için CO₂'e ihtiyaç gösterdiklerini belirtmişler ve ineklerde abort yapan bu etkene *Bacterium Infectiosa* Bang adını vermişlerdir. 1897 yılında Bang, *B. abortus*'un sığırlarda brusellozisin etkeni olduğunu ve insanlara geçtiğini belirlemiştir. Bang'ın çalışmaları 1909 yılında İngiltere'de Mc Fedyean ve Stochman tarafından da teyit edilmiştir. Etken 1920 yılında tekrar *B. abortus* olarak isimlendirilmiştir.

Koyunlarda *Brucella* etkenlerinin Garcia ve Iscara tarafından 1906 yılında izole edildiği bildirilmektedir. Maltalı Dr. Zammit keçilerde ilk brusellozisi 1905 yılında keçi sütünde hastalık etkenini izole ederek belirlemiş ve çiğ sütle insanlara geçebileceğini göstermiştir (34). Huddleson (35) etkeni domuzlardan izole ederek yeni bir tür olan *B. suis*'i tanımlamıştır. Buddle ve Boyes tarafından 1953 yılında koçların epididimitis etkeni Yeni Zelanda'da izole edilmiş ve 1956 yılında *B. ovis* olarak tanımlanmıştır. *B. neotomea* ilk olarak 1957 yılında Stoenner ve Lockman tarafından izole edilmiştir. Carmicheal ve Bruner, 1968 yılında, köpeklerden abortus etkeni olarak *B. canis*'i izole etmeyi ilk defa başarmışlardır (36-40). Ülkemizde sığırlarda brusellozisin ilk izolasyon çalışmaları 1931-

1932 yıllarında Berke tarafından, koyunlarda ise 1944 yılında Aktan ve Köylüoğlu tarafından yapılmıştır (33, 41).

Filogenetik olarak *Brucella* cinsi Proteobacteria filumunun Alfaproteobacteria sınıfı Rhizobiales takımının bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (42). *Brucella* cinsi içinde *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* olmak üzere 6 klasik tür saptanmıştır (3). Bu etkenler, morfolojik, kültürel, biyokimyasal ve serolojik olarak birbirlerine yakın bir karaktere sahiptirler. Adlarını ilk izole eden araştırmacıya atfen Bruce (1887)'dan alırlar (43-47). *Brucella* türlerinin tercih ettikleri konakçıları vardır. Üç klasik tür olan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis*'in tercih ettiği primer konakçıları varsa da bu bakteriler diğer konakçı türlerinde de infeksiyon oluşturabilirler. İnsan sağlığı yönünden en çok rastlanan türler de başta *B. melitensis* olmak üzere bu üç türdür. *B. melitensis*, insanlarda Malta Humması olarak bilinen hastalığın etkenidir, koyun, keçi ve insan brusellozisi oluşturur. Gebeliğin ileri dönemlerinde yavru atma, mastitis, süt yapısında bozulma, eklem şişlikleri ve topallık gözlenir. *B. melitensis*'in 3 biyotipi bulunur. *B. melitensis* en kuvvetli insan patojenidir. Diğer türlerin ise infekte ettiği konakçı türleri primer konakçıların dışında daha dardır (3, 45-51). *B. abortus* sığırlarda enzootik yavru atmanın nedenidir. 7 biyotipi vardır. Etken sığırlar dışında koyun, keçi, domuz ve insanları infekte etmektedir. *B. suis* domuzlarda brusellozisin etkenidir. İnsan ve diğer türlerde de infeksiyon oluşturur ve 5 biyotipi bulunmaktadır. *B. ovis* koç epididimitisin etkenidir ve etkenin patojenitesi bu türe sınırlıdır. 8 haftalıktan büyük koçlarda genellikle tek taraflı bazen de çift taraflı epididimitis yapar. Hastalıklı koçlar etkeni 4 yıla kadar yayabilirler. *B. canis* köpeklerde hastalık yapar. Gebeliğin son üçte birinde abortlara neden olur. İnsanlarda laboratuvar kazaları ve infekte köpeklerle temas sonucu birkaç vakaya rastlanmıştır. *B. neotomae* ile ilgili tek suş çöl farelerinden rapor edilmiştir. Çeşitli *Brucella* suşları 1990'lardan bu yana ayı balığı, yunus, balina gibi pek çok farklı deniz memelilerinden izole edilmektedir (48, 51-57). Avrupa ve Güney Amerika'daki okyanuslardan alınan deniz memelilerinden klasik 6 *Brucella* türünden farklı olan yeni suşlar bakteriyolojik ve genetik olarak tanımlanarak *B. cetacea*, *B. pinnipediae* adını almıştır (57).

Brucella cinsi bakteriler gram negatif ve hareketsizdir, 0.6-1.5 x 0.5-0.7 µm boyutlarında kokobasillerdir. Spor, flagella, pilus ve gerçek kapsül oluşturmazlar. Gerçek asit-fast olmadıkları halde zayıf asitlerle dekolarizasyona dirençli olduklarından bu durum brusellozisin mikroskopik tanısında kullanılan Stamp boyamada etkenin hücreler içinde kırmızı renkli görünmesine yol açar. Kültürlerde tek tek rastlanmasına karşın dokulardan

yapılan frotilerde kümeler halinde görülürler (14). Etkenler 20-40 °C arasında üreyebilmelerine karşın optimum üreme ısı 36- 38 °C'dir ve 6.6 ile 7.4 arasında pH üremeleri için optimum değerlerdir. *B. abortus*'un ilk dört biyotipi ve *B. ovis* ilk izolasyon için % 5-10 CO₂'e ihtiyaç duyarlar. *B. melitensis* sıradan bir katı kültürde CO₂ ve serum gerektirmeksizin 37 °C'de aerobik koşullarda izole edilmektedir. Brusella cinsi bakteriler kemo-organotrofturlar, çoğu suşlar birçok amino asiti içeren kompleks besiyerlerine ihtiyaç gösterirler. Üremeleri için tiamin, nikotinamid ve biotine gereksinim duyarlar. Kan ve serum üremelerine olumlu etki yapar (58).

Brucella spp.'nin üretilmesinde en çok kullanılan temel besiyerleri serum-dextrose agar, serum- tryptose agar ve serum- trypticase agardır. Bunlar ayrıca kullanılan selektif besiyerlerine temel teşkil ederler. Brusella cinsi organizmaların kontamine materyallerden izolasyonunda diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe etmek amacıyla temel besiyerlerine çeşitli antibiyotik ve boyaların katılması ile birçok selektif besiyerleri geliştirilmiştir (59-62). Morgan (63), basitrasin, polimiksin ve aktidion antibiyotiklerinin katıldığı serum dekstroz agarın (SDA) bütün brusella türlerinin üremesini teşvik eden en ideal besiyeri olduğunu bildirmiştir. SDA'ya basitrasin, sikloheksimid, polimiksin B, vankomisin ve nistatinin selektif olarak katıldığı Farrell besiyeri, *B. abortus* ve *B. melitensis*'in kontamine materyallerden izolasyonunda önerilmektedir (14). Marin ve arkadaşları (64), Modifiye Thayer-Mardin besiyerinde *B. melitensis*'e inhibe edici etki gösteren basitrasin olmadığından *B. melitensis* izolasyonunda Farrell besiyerinden daha üstün olduklarını belirtmişlerdir. İzolasyon oranını arttırmak amacıyla, etkenin özellikle ilk izolasyonunda Serum Dekstroz Agar, Brucella Albimi Agar veya Kanlı Agar kullanılmalıdır (14). Modifiye Thayer-Martin's besiyeri ve Farrell's besiyerinin birlikte kullanılmasıyla izolasyon oranı da önemli derecede artmaktadır (64). Sıvı besi yerinde gelişim, genellikle zayıf olmaktadır. Statik sıvı besiyerinde *Brucella spp.*'nin gelişimi, smooth fazdaki kültürlerin dissosiyasyonu ile sonuçlanmaktadır (32). Yarı katı besiyerinde, karbondioksit bağımsız brusella suşları yüzeyin altından tabanın birkaç milimetre üzerine doğru uniform bir turbidite oluştururlarken, karbondioksit bağımlı suşlar, besiyerinin yüzeyinden birkaç milimetre aşağısına doğru gelişim göstermektedirler (32). Uygun katı besiyerinde brusella kolonileri 2 günlük inkübasyon sonrasında görülebilir duruma gelmektedir. Koloniler maksimum büyüklüğe 5-7 gün içinde erişirler ve bu süre sonunda 1-2 mm çapta, smooth, saydam ve bal rengi brusella kolonileri oluşur. Kolonilere üstten bakıldığında konveks olup, parlak beyaz görünürler. Zamanla koloniler genişlemekte ve daha koyu hale gelmektedirler (32). Smooth Brusella türleri üreme

sürecinde çoğu zaman dissosiyeye olmaya eğilim göstermektedirler. Smooth (S) *Brucella* spp. kültürleri subkültürlerinde kuru, opak, granüler rough (R) formuna veya öze değdirildiğinde uzama gösteren mukoid (M) forma bazen de akriflavinle aglutinasyonda ince granüller oluşturan (I) intermediate forma dissosiyeye olmaktadır (65).

Oksidatif metabolizma *Brucella* spp. için temel enerji üretim kaynağıdır (58). *B. ovis* ve *B. canis* dışındakiler nitratı nitrite indirgemektedirler. *B. abortus* H₂S pozitif olmasına rağmen, *B. melitensis* H₂S üretmemektedir. Üreaz aktivitesi hızlıdan yavaş doğru değişebilmektedir. Glukozdan asetil metil karbinol ve triptofandan indol üretimi olmamaktadır (14, 32, 47). *Brucella* spp. katalaz pozitifler, eritrositleri lize etmezler, metil red ve O-Nitropheny-β-D-galactopyranoside (ONPG) negatifler, sitratlı besi yerlerinde üremez ve litmuslu süte etkimezler (58).

İlk stabil brusella fajı 1950'de Rusya'nın Tbilisi eyaletinden izole edilen Tbilisi fajıdır (Tb) ve referans faj olarak tür tayininde kullanılmaktadır. Bu güne kadar çalışılan tüm brusella fajları DNA fajlarıdır ve konakçı affinitesine göre 6 gruba ayrılmışlardır. Grup 1 fajlarının prototipi olan Tb fajı rutin test dilüsyonu (RTD)'nda sadece smooth *B. abortus* kültürlerini lize ederken, 10.000xRTD'nda *B. suis* ve *B. neotoma*'yı lize etmektedir. Grup 2 fajlarının temsilcisi Firenze fajıdır ve *B. abortus*, *B. neotoma* ve *B. suis* biyotip 4'ü lize etmektedir. Grup 3 fajları Weybidge fajı ile temsil edilmektedir. Bu faj *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. suis*'i lize eder, Grup 4 fajlarının prototipi Douglas ve Elberg tarafından izole edilen Berkeley fajıdır. Bu faj tüm smooth brusella suşlarını lize etmektedir. Grup 5 fajları rough suşları lize ederler R ve bunun türevi olan R/O fajları stabil değildirler (14, 32). Ancak *B. canis* Mex 51 üzerinde pasajla elde edilen R/C fajı son derece stabildir ve R/C fajı *B. ovis* ve *B. canis* için litik özelliğindedir (32). Grup 6 fajı İzatnagar fajıdır. Bu faj *Brucella* spp.'in tüm smooth suşlarını aynı zamanda *B. melitensis* ve *B. suis*'in rough suşlarını lize etmektedir (14).

Brusella cinsi ilk izolasyonda in vitro olarak gentamicin, tetracycline, rifampicine duyarlıdır. Birçok suşun erithromycine, kanamycin, ampicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, novobiocin, spectinomycin'e duyarlılık dereceleri; türe, biyotipe ve suşa göre değişmektedir. Bazı suşlar polimiksin, nalidixic acid, cephalosporin, bacitracin, clindamisin, lincomycin, nystatin, vancomycin'e dirençlidir. Penicilin, sığırların aşılmasında kullanılan *B. abortus* S19 aşısı suşundan ve streptomycin de koyun ve keçilerin aşılmasında kullanılan *B. melitensis* Rev 1 suşunun, saha suşlarından ayırımında kullanılmaktadır (14, 65). Brusellalar ısı ve dezenfektanlara duyarlıdır. Kloraminler, formaldehit ve iodoformlar etkili dezenfektanlardır. Brusellalar güneş ışığında 1-12 saatte,

100°C’de hemen ölürlür. Işıktaki ve nemli toprakta 20°C’de 1 ay, kültürlerde ve soğukta 3-6 ay, fötüs dokusunda 4°C’de 1-2 ay, tereyağında 4 ay, fermente peynirde 3,5 ay, sütte birkaç gün ve dondurmada 1 ay canlı kalırlar (58).

Brusella cinsi bakterilerde bugüne kadar doğal plazmidlerin varlığı saptanamamıştır. Doğal koşullar altında nadiren transformasyona uğradıkları bildirilmiştir. Fakat pilusa da sahip olmadıklarından konjugasyon da bildirilmemiştir. *Brucella* spp. faj infeksiyonunu takiben bazı antibiyotiklere direnç geliştirdiklerinden transdüksiyon yaptıkları kabul edilmektedir (67). Brusella hareketsiz bir bakteri olarak tanımlanmasına karşın genomik analizler flagellum yapan bütün yapısal genlerin olduğunu göstermiştir (68).

Brusella bakterilerinin S ve R formda suşların çözünebilir ekstreleri araştırıldığında en belirgin antijeninin lipopolisakkaridler (S-LPS ve R-LPS) olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak natif haptin (NH), B polisakkaridi (poly B) ve yirmiye yakın protein/glikoprotein antijeni bakterinin yapısında bulunmaktadır. LPS antijenler hücre yüzeyinde yer almaktadırlar. Protein antijenlerin büyük kısmı hücre içinde bulunmaktadır. Brusella cinsi yüzey katmanları en içteki sitoplazmik membran; çevresinde sert peptidoglikan katman ve fosfolipid-lipopolisakkaritler (LPS) ve dış membran proteinlerini (OMP) içerir. Smooth Brusella LPS yapısı ile *E. coli* serotip 0:116 ve 0:157, Kaufman White’ın *Salmonella* grup N, *Pseudomonas multophila* ve *Yersinia enterocolitica* serotip 0:9 ve *Vibrio cholera*’nın LPS tabakasındaki N formil-perosamin’ler benzerdir. Bu nedenle bahsedilen bakteriler ile *Brucella* spp. arasında tanı testlerinde kros reaksiyonlar oluşarak yanlış pozitifliğe neden olmaktadır (40, 43, 46). *Brucella* spp.’lerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit molekülünün bir parçası olan O-polisakkarit antijeni *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* türlerinde büyük miktarlarda bulunurken *B. ovis* ve *B. canis* türlerinde ölçülebilir düzeyde bulunmamaktadır. Bu yüzden *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis*’in neden olduğu infeksiyonlara göre daha hafif seyirli infeksiyonlara neden olmaktadır (19). Ayrıca yapılan çalışmalarda, brusella türlerinin üretildikleri ortamdan etkilendikleri, bazı proteinler üreterek stres koşulları karşısında tepki verebildikleri gösterilmiştir (69). Sığırların plasentasından izole edilen *B. abortus* suşunun, in vitro üretilen aynı suştan, intrasellüler öldürme mekanizmalarının etkisine karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (70). Lipopolisakkaritler, uygun koloni formunda aglütinasyonla ilişkili büyük yüzey antijenleri barındırmaktadırlar. Smooth *Brucella* suşları farklı oranlarda dağılımlar gösteren A ve M antijenlerini içermektedirler. Monospesifik A ve M antiserumunun kullanımıyla, türlerin biyotiplerinin ayrımı önem taşımaktadır (32). Türlerle ve biyotiplere göre A ve M

antijenleri farklı orandadırlar. *B. abortus*'un biyotip 1, 2, 3 ve 6, *B. suis*'in biyotip 1, 2, 3; *B. melitensis* biyotip 2 ve *B. neotomae*'nin A antijeni dominant iken *B. abortus*'un biyotip 4, 5, 9, *B. suis*'in biyotip 5 ve *B. melitensis*'in biyotip 1'inde M antijeni dominanttır. *B. melitensis* biyotip 3 ve *B. suis* biyotip 4'de A ve M antijenlerini eşit miktarlarda taşırlar. Rough koloni morfolojisine sahip ve rough lipopolisakkaritleri taşıyan *B. canis* ve *B. ovis* R antijenini taşımaktadır (32, 67). Dominant yüzey antijeninin saptanmasında rutin olarak lam ve tüp aglutinasyon testlerinden yararlanılmaktadır (65).

B. melitensis infeksiyonu dünya çapında yaygındır. Meksika dışında Kuzey Amerika kıtasının *B. melitensis*'ten arı olduğu bildirilmektedir. Kuzey ve Orta Avrupa, Güneydoğu Asya, Avustralya, Yeni Zelanda brusellozisten aridir (14). Türkiye'de biyotiplendirme çalışmalarında elde edilen ortak sonuca göre koyunlarda *B. melitensis* biyotip 3'ün en dominant suş olduğu takiben *B. melitensis* biyotip 1'in nadiren de *B. melitensis* biyotip 2'nin infeksiyon oluşturduğu tesbit edilmiştir (12, 13).

İnfeksiyon kaynakları arasında atık yavru ve zarları, uterus akıntıları, süt ve sperma başta gelir. Hayvanlar etkenle bulaşık materyallerin solunum, sindirim, konjunktiva yolu ile alınması sonucu infekte hale gelmektedir. İnfeksiyon bruselladan arı hayvanların otladığı meralara infekte hayvanların karışması veya infekte materyaller ile gübrelerin kontamine olmasıyla da bulaşabilir. Su ile bulaşma yalnızca kısa mesafelerde olasıdır. Erkeklerde, üreme organlarına yerleşim durumunda brusellanın semen ile saçılımıyla sonuçlanır. Bununla birlikte doğal çiftleşme kullanıldığında infekte erkeklerin duyarlı dişilere bulaştırma riskinin düşük olduğu bildirilmiştir. Buna karşın infekte boğalardan alınan spermalar suni tohumlama ile bulaşma riskini taşımaktadır (44). Köpekler, kediler ve vahşi karnivorlar, tilki ve kurtlar da, fetus ve fetal membranlar gibi infekte materyalleri çevreye taşımaları nedeniyle mekanik yayıcıdırlar (71). İnsanlarda ise kaynatılmamış veya usulüne göre pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi, en önemli riski oluşturur (2, 14, 50). Ayrıca hastalık Veteriner Hekimlere hastaya müdahale sırasında ya da laboratuvarında çalışanlara deri ve konjunktiva yoluyla bulaşabilir (14, 15).

Bakterinin vücuda ilk giriş yeri orofarinksin muköz membranları, üst solunum yolları veya konjunktivadır. Bundan başka dişi veya erkeğin genital kanalı ve muköz membranlarından da bulaşma şekillenmektedir. Brusellozis retikulo-histiyositer sistem hastalığı olup belli organ ve dokulara yerleşir (72). *Brucella* spp. fagositik hücreler içinde yaşayabilme yeteneğine sahip fakültatif intrasellüler mikroorganizmalardır (43, 72). Makrofaj tarafından brusella fagosite edildiğinde, bakteri tarafından 62, 28, 24 ve 17 kDa ağırlığında özel proteinler üretilmektedir ve bu proteinler makrofajlarda bakterinin

öldürülmesi için oluşturulan asidik ortama direnç sağlamaktadır. Organizmanın değişik ortam koşullarına dayanabilmesi de yine aynı şekilde bir takım mekanizmalar sonucu gerçekleşebilmektedir (73). Etken fagositik hücreler (makrofaj ve nötrofil) içersinde bölgesel lenf yumrularına ulaşır ve burada ürer. Bu dönem, süresi 2 hafta ile 7 ay arasında değişen inkubasyon periyodudur. Etken buradan makrofajlar içersinde kana geçer, bakteriyemi oluşturur ve kan yoluyla paranzimatöz organlar (karaciğer, dalak), supramamal lenf yumruları, kemik iliği ve reproduktif organlara ulaşarak buralarda lokalize olur. Bu organlarda etkenin üremesi sonucu yangı odakları, granulom formasyonu ve bazen abselenme şekillenir. Etkenin üremesini uyarıcı eritritol maddesi plasenta ve fötal sıvılarda bol miktarda bulunduğundan gebe hayvanların reproduktif sistemine afinitesi vardır ve buralarda bol miktarda ürer. Fötusa ait korionik villi epitellerinde üreyen etken villileri yağ dejenerasyonu ve nekroza uğratır. Zamanla fötal-maternal bağlantı gevşer, sonuçta yavru atımı meydana gelir. Aynı zamanda etken meme bezlerine de ulaşır ve intermitent olarak sütle atılır. Bulaşma gebelik döneminden önce meydana gelmiş ise, hayvan gebe kaldığında etken lokalize olduğu organlardan (karaciğer, dalak, supramamal lenf yumruları, kemik iliği) kan yoluyla yine uterusu ve meme bezlerine ulaşır. Aynı şekilde abort ve sütle saçılım meydana gelir. Bazen yavru ölür ve mumufiye olarak içerde kalır. Bazen de yavru atımından sonra plasenta atılmayıp içerde kalabilir, bu durumda sekonder infeksiyonlar ve septisemi meydana gelir. Bulaşma gebeliğin ileri dönemlerinde oluşmuş ise abort yerine normal doğum olur ve bakteri saçılımı normal doğum sonrası da görülür. Doğan yavru infekte ve zayıftır. *B. abortus* boğalarda da testis, epididimis ve seminal vesiküllerde yangı meydana getirir. Eritritol sığır, koyun, keçi ve domuzda plasenta, meme bezleri ve epididimiste bol miktarda bulunduğundan bu organlar brusellaların hedef organlarıdır (3).

Gebe olan koyunlar kuzulara oranla infeksiyona daha duyarlıdır ve kontamine plasenta ve fetus ile temaslarının ardından infeksiyona çok çabuk yakalanırlar. Gebe hayvanların infeksiyonu genellikle yavru atma ile sonuçlanır. Koyunlarda infeksiyon kendini sınırlayıcı karakterde olup, infekte hayvanlar kısa zamanda hastalıktan kurtulabilirler ve nadiren ikinci kez yavru atarlar. Keçiler infeksiyona koyunlardan daha duyarlıdır ve bazı durumlarda infeksiyon yıllarca persistent olarak kalabilir. Organizmanın vaginal yolla atılması keçilerde 2-3 ay, koyunlarda ise 3 hafta kadar sürmektedir (62). Süt verimindeki azalma da sığırlara oranla daha fazla olmaktadır. Ancak koyun ve keçilerde infertilite oranı sığırlara oranla daha düşüktür (71, 74).

Brusellozisin en belirgin klinik bulgusu dişilerde gebeliğin son dönemindeki atıklar ve erkeklerde orşitis ve epididimitistir. Kronik infeksiyonlara sahip olan hayvanlar ile infekte anadan doğmuş ve görünüşte sağlıklı olan klinik semptom göstermeyen infekte yavrular, sürüde hastalığın devamında önemlidir (15, 46). Aborttan farklı olarak kondüsyonda düşme, mastitis, topallık gibi semptomlar da koyunlarda ve keçilerde rapor edilmiştir, ancak doğal infeksiyonlarda nadir olarak bu semptomlar gözlenir. Hayvan seksüel yönden olgun değilse infeksiyona duyarlılık düşüktür ve hastalık bu devrede klinik olarak şekillenmez (75).

Brusellozis, insanlarda vücuttaki tüm organları tutabildiğinden çok çeşitli klinik tablolara yol açmaktadır. Hastalar en sık ateş yüksekliği, halsizlik, terleme, eklem ağrıları, yakınmalarıyla başvururlardır. Türkiye'deki olgular klinik bulgular yönünden incelendiğinde, ateş yüksekliği (% 80-100), hepatomegali (% 20-40), splenomegali (% 20-40), lenfadenopati (% 10-20), artrit (% 20-60) gözlemlendiği gastrointestinal (% 70), kas-iskelet (% 20-85), genitoüriner (% 4-20), santral sinir sistemi (< % 5), kardiyovasküler sistem (< % 2) bulguları saptandığı görülmektedir (81-84). İnsanda ve hayvanlarda abortif etkinin farklılığı birkaç faktöre bağlı olabilir. Birincisi, insan plasentasında eritritol bulunmamasıdır. Eritritol brusellanın üremesini arttırıcı etki gösteren ve besleyici olan bir karbonhidrattır. Koyun, keçi, sığır ve domuzda bulunur. İkincisi, insan amniyotik sıvısında brusella bakterisini inhibe eden bir aktivitenin bulunmasıdır (76, 77).

Otopside kotiledonların ortası boz sarı renkte nekroze olmuş ve çevreleri koyu kırmızıdır. Uterus mukozası şişkindir. Atık yavruda milier nekrozlar ve hepatitis tablosu görülür, gebe olmayan koyun uterusunun ise duvarı kalınlaşmış mukozası kabarık ve yer yer kırmızı benek ve mukoz eksudatla kaplıdır. Mastitis olgularında memenin kesitinde içi nekrotik kitlelerle dolu lezyonlar görülür, bunların boyutları bezelyeden ceviz büyüklüğüne kadar değişir. Epididimide nekroz odakları vardır. Testisler 2-3 misli büyümüşlerdir. Lenf yumrularında büyüme görülür (33).

Brusellozis infeksiyonunu meydana getiren etkenler intrasellüler mikroorganizmalardır. Brusella etkenlerinin lökositler tarafından yakalanmaları sonucunda, bakterilerin bu hücreler tarafından sindirilmeleri her zaman mümkün olmamaktadır. Bu durum alınan suşun miktarına, virulensine bağlı olarak değişmekle beraber, antikorların varlığında fagositozis işlemi daha kolay olmaktadır. Deneysel olarak gerçekleştirilen bruselloziste makrofaj aktivasyonu infeksiyonun erken döneminde olur ve bu durum infeksiyonun 3. gününde spesifik sellüler immun yanıt olarak tesbit edilir. Bu arada T-lenfositler makrofajların bakterisidal kapasitelerini ve proliferasyonunu arttırarak

etkili olurlar. Makrofajların aktivasyonu 14. günde maksimal düzeye ulaşır. Gecikmiş tipte hipersensitivite ve γ interferon oluşumu da hücrel immunité kapsamında şekillenmektedir. Makrofajların aktivasyonu sonraki aylarda devam eder ancak bakterisidal etki giderek azalır. Kronik formulu bruselloziste yardımcı T-lenfositlere oranla T-supresör hücre sayısında artma tesbit edilmektedir. Bruselloziste infeksiyondan korunma esas olarak hücrel immunité ile olmasına rağmen antikor üretimi de olur. Yeni infekte hayvanlarda atık yaptıktan sonraki 1-3 hafta içinde antikor tesbiti yapılamayabilir. Bu nedenle atık sonrası serolojik teşhis amacı ile kan serumu atıktan 2- 3 hafta sonra alınmalıdır. Brusella etkenleri ile infekte olan konakçı bakteri hücre duvarı antijenlerine bağılı olarak IgA, IgM, IgG, IgE olmak üzere çeşitli antikorlar oluştururlar. İnfeksiyondan hemen sonra IgM'ler oluşur, bunu takiben IgG antikorları oluşmaya başlar. Brusellozisin akut formunda IgM antikorları dominanttır. Bu durum 4 hafta kadar sürer. Daha sonra IgG'ler artmaya başlar. İnfeksiyon kronik forma dönüştüğünde IgG antikorları dominanttır tekrar brusella etkenleri ile karşılaşılırsa az miktarda IgM'ler görülebilir (14, 78-80). Bazı kronik vakalarda ise hayvanlarda zayıf aglutinasyon veren, ayrıca serumda bulunabilecek IgM antikorlarının etkin aglutinasyon özelliğini maskeleyen yüksek IgG1 titreleri bulunabilir (78-80). Aşılı hayvanların serumunda ilk belirlenen antikorlar, aşılama 5 gün sonra ortaya çıkan, 13-20. günde maksimum düzeye ulaşan IgM'lerdir. IgG'ler ise daha sonra (13-21 gün) ortaya çıkar ve aşılama 28-42. gün de en üst düzeye ulaşır (81). IgM titresi zamanla düşer ve dominant olarak IgG kalır. Konjunktiva yoluyla virulent *B. abortus* inokule edilen hayvanlarda antikor üretimi süresi değişmektedir. Bunlarda IgG titreleri inokulasyondan 25-45 gün sonra IgM titrelerini aşmakta ve 63-84 gün boyunca yaygın antikor tipi olarak kalmaktadır (79, 82). Brusella ile infekte olan ve olmayan hayvanları ayırmak için yapılan çalışmalarda S19 ile aşılı hayvanların serumlarındaki IgM, IgG1, IgG2 antikorlarının dağılımının *B. abortus* ile infekte olanlarınkinden farklı olduğu tesbit edilmiştir. İnfekte hayvanların serumlarında en fazla IgG1 sınıfı antikorlar bulunurken, S19 ile aşılanan sığır ve buzağuların serumunda oluşan antikorların büyük çoğunluğu IgM ve IgG1 sınıfına aittir. IgG2'ler ise daha az miktarlarda bulunmaktadır (80).

Brusellozisin teşhisinde direkt ve indirekt (serolojik testler, vb) tanı metodları kullanılmaktadır. Direkt tanı bakteriyolojik ve moleküler tanı olmak üzere iki kısma ayrılır. Hastalığın kesin teşhisi etken izolasyonu ve identifikasyonuna bağılıdır. İzole edilen suşların cins düzeyinde identifikasyonları koloni ve bireysel morfolojilerinin incelenmesi yanısıra polivalan (A+M) antiserumu ile aglutinasyon, akriflavin ile

aglutinasyon ve katalaz, oksidaz, üreaz gibi biyokimyasal testler ile yapılır. Tür ve biyotip düzeyinde identifikasyon için ise faj lizis testleri, CO₂ gereksinimi, H₂S üretimi, boyalı, antibiyotikli besiyerinde üremeleri ve A ve M monospesifik antiserumlarla aglutinasyon gibi testler uygulanmaktadır (32). İzole edilen suşların tür ve biyotip tanısında kültürün koloni morfolojisi son derece önemlidir. Her zaman non-smooth koloni yapısına sahip *B. ovis* ve *B. canis* dışında diğer türler taze olarak izole edildiklerinde genellikle smooth koloni yapısına sahiptir. Non-smooth kültürleri monospesifik A ve M serumları ve smooth brusella fajları ile tiplendirmek mümkün olmadığından, tiplendirme için smooth koloniler seçilmesi gerekmektedir. *Brucella* spp.'nin tip tayininde kültürün koloni morfolojisi önemli olduğundan koloniler 45°C açı ile oblik ışıkta stereoskopik mikroskopta incelenirler. Brusella cinsi mikroorganizmalarda dissosiyasyon değişik metotlarla saptanmaktadır. Bunlardan en basit olanı % 0.1'lik akriflavin solusyonunda kolonilerin emulsifiye edilmeleridir. Smooth koloniler homojen bir emulsiyon gösterirlerken, Rough koloniler derhal aglutine olurlar. Bir diğer metot da kolonilerin kristal viole boya solusyonu ile boyanmalarıdır. Smooth koloniler bu metotla boya almazken Rough koloniler kırmızı ve morun değişik nüansları ile boyanırlar ve kolonilerin yüzeyinde radial çatlaklar görünür (32). Aşı suşlarının saha suşlarından ayırımında çeşitli testler kullanılmaktadır. *B. melitensis* Rev.1 aşı suşu, saha suşundan daha yavaş üremeleri, daha küçük koloniler meydana getirmeleri ve streptomisine dirençli olmaları ile ayrılır (79). *B. melitensis* Rev.1 aşı suşu, 20 µg/ml bazik fuksin ve tiyoninde ürememesi, 2.5 µg/ml streptomisin konsantrasyonunda üremesi ile saha suşlarından ayrılmaktadır *B. abortus* S19 aşı suşu virulent saha suşundan CO₂'e bağımlı olmaması, 2 µg/ml tiyonin mavisi, 1 mg/ml i-eritritol ve 5 IU /ml penisilin'de inhibe olması ile ayrılır (32, 83-85).

Brusella türleri arasında yüksek DNA homolojisine rağmen moleküler tekniklerin kullanıldığı gelişmiş tiplendirme metodları yaygınlaşmıştır (86). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (87), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), Repetitive extragenic polindromic-polymerase chain reaction (REP-PCR) (88) ve Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) teknikleri başarıyla kullanılmaktadır. RAPD tekniği herhangi bir DNA sekans bilgisi gerektirmemektedir ve tekniğe pratiklik, uygulamada kolaylık kazandırmaktadır (89).

İnfekte hayvandan etken izolasyonu uzun zaman almaktadır ve çok sayıda hayvan söz konusu olduğunda kültürel muayenelerle infekte hayvanları saptamak saha ve laboratuvar personeli için pratik değildir. Bu yüzden hastalığın kontrol ve eradikasyon programlarında teşhis serolojik testlerle reaktörlerin saptanması esasına dayandırılmıştır

(14, 32). Brusellozisin indirekt teşhisinde Rose Bengal Test (RBT), Yavaş Tüp Aglutinasyon Testi (SAT), Komplement Fikzasyon Testi (CFT), mukusla yapılan aglutinasyon, sperma ile yapılan aglutinasyon, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Floresans Polarizasyon Tekniği (FPA) gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır (14, 19, 32). Bu testlerden bazılarında kros reaksiyonlar (22, 90-92) ve nonspesifik antikorlar yanlış sonuçlar alınmasına neden olmaktadır (93). Uluslararası standartlara göre bu testlerden RBT'in tarama testi olarak, CFT'in ise standart konfirmasyon testi olarak kullanılması önerilmiştir (14, 15, 19). Ancak her bir testin farklı immunglobulinleri ortaya koyması ve yanlış pozitifliklerin görülmesi, kronik ve aktif infekte hayvanların serolojik testlere düzensiz yanıt verebilmesi ve inkubasyon devresinde serolojik yanıtın oluşmaması, aşı ve doğal infeksiyon sonucu oluşan bağışıklığın karışması gibi olumsuzluktan dolayı brucellozisin serolojik tanısında en az iki testin birlikte yapılarak, sonuçların değerlendirilmesi tavsiye edilmektedir (14, 32, 90). *B. abortus*, *B. melitensis* ve *B. suis* türlerinde smooth LPS molekülünde ortak epitoplara bulunması nedeniyle, bu etkenlere karşı oluşan antikorların tespit edilmesinde kullanılan serolojik testlerde *B. abortus* antijeni ortak olarak kullanılmaktadır (20).

Rose bengal testinde rose bengal ile boyanmış ve genellikle 3.65 ± 0.05 gibi düşük PH'ya ayarlanmış antijen kullanılır (94). Bu asidite, serumdaki IgM'lerin aktivitesini önleyerek IgG'lerin özellikle IgG1'lerin reaksiyona katılmasına yardımcı olur (19, 94).

Serum tüp aglutinasyonunda tampon solusyon olarak kullanılan fizyolojik tuzlu suyun sığır serumları için % 0.85'liği, koyun ve keçi serumları için yüksek konsantrasyonda bulunan ve aglutine olmayan IgG1 yüzünden oluşan prozonu önlemek için % 5'liği kullanılmaktadır (95, 96). SAT'de nötral veya hafif düşük pH'da aktif olan aglutininlerin en önemli kısmını IgM izotipi teşkil eder (14).

Komplement fikzasyon testinde rol oynayan antikorlar IgG1'lerdir. IgG2'lerin kobay komplementini fikze edici özelliği olmadığından testte etkinliği yoktur. İnaktivasyon derecesinden dolayı IgM'lerin etkinliği azdır. Serumun inaktivasyon derecesi yükseldikçe (65°C) IgM inaktive olur (32). CFT'de inaktif komplement için serumların ısı işlemine tabii tutulması zorunludur ve çok zaman alır çok fazla sayıda kontrolün kullanılması zorunluluğundan dolayı reagentlerin test için sürekli titre edilmesini gerektirir ve uzmanlaşmış personele ihtiyaç vardır (19). Bunlara ek olarak antikomplementer reaksiyon gösteren serum CFT ile test edilemez ve yüksek titrede antikorlu serum prozon fenomeni yüzünden negatif sonuçlar üretebilir (95).

Geniş ölçüde doğrulama testi olarak kullanılmasına rağmen CFT oldukça karmaşık, uygulaması ve testte kullanılan reagentlerin standardizasyonu bir hayli zor ve iyi bir laboratuvar alt yapısı gerektiren serolojik bir testtir. Ayrıca her örneğin bir seri dilusyonunun test edilmesi gerekmektedir. Sayısız varyasyonları olan CFT'in en sık kullanılan şekli mikrotiter şeklindedir. CFT oldukça spesifik bir test olmasına rağmen diğer bütün serolojik testlerde olduğu gibi aşılı hayvanlarda yanlış pozitif sonuç alınabilir. Ayrıca kötü kalite serumlar (hemolitik ve antikomplementer etkili) CFT testi için uygun değildir (19, 96).

Fluoresan polarizasyon testi küçük solubl ve floresans işaretlenmiş bir antijen ile antikorların birleşme reaksiyonudur. Düşük oranda depolarize ışık gerektirir (97). Testin mekanizması solüsyondaki moleküllerin rastlantısal rotasyonuna bağlıdır. Moleküler ebat rotasyonun oranını etkileyen ana faktördür ve moleküler ebat ile rotasyon arasında ters orantı bulunmaktadır. FPA'da küçük moleküler ağırlıktaki antijen (22 kD) fluorokromla belirlenerek seruma yada farklı bir akışkana eklenmiştir. Antikoru varlığını test etmek için işaretlenmiş antijene olan ek, rotasyon hızını düşmesine neden olmaktadır. Bu düşmede ölçülebilmektedir. Brusellozisin teşhisi için *B. abortus*'un O-polisakarit'in küçük moleküler ağırlıklı parçası (22kD) FITC ile işaretlenerek antijen olarak kullanılmaktadır. Bu antijen dilue edilmiş seruma yada tüm kana eklenerek antikor içeriği bir floresan polimerizasyon analizi ile kullanılarak 2 dakika içinde sonuç elde edilebilmektedir. FPA, sığır ve domuzlarda brusellozisin teşhisinde OIE 'nin önerdiği bir testtir. Laboratuvar ortamında veya sahada uygulanabilir, çabuk sonuç veren bir testtir (14).

Koyun ve keçilerde görülen smooth brusella infeksiyonlarının teşhisi için en yaygın kullanılan Buffered *Brucella* Antigen Tests (BBAT) ve CFT'dir. Koyun ve keçilerde bu iki test sonuçları arasında çelişkiler görülmektedir. Tamamıyla brusellozisten eradike edilmemiş bölgelerde kontrolü arttırabilmek için iki testin sonuçları karşılaştırılmalıdır. Eradikasyon programlarında BBAT ve CFT'in (pratiklik ve ekonomik nedenlerden dolayı) birlikte kullanılmadığı durumlarda BBAT'nin sensitivitesinin arttırılması için testte 75 µl serum, 25 µl antijen kullanılmasıyla yapılan basit modifikasyon BBAT'nin sensitivitesini arttırarak CFT sonuçları ile uyumsuzluğu minimuma indirmektedir (14).

Çeşitli antijenler kullanılarak uygulanan, özellikle smooth-lipopolisakarid (s-LPS) antijen olarak kullanıldığında Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (I-ELISA) ve Competitive- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (C-ELISA) testleri koyun ve keçilerde BBAT ve CFT'ine göre daha yüksek sensitiviteye sahiptir (14).

Kompetitif-ELISA'da antijenle kaplı mikropleytte test edilecek serum ile monoklonal antikor (Mab) ilave edilerek serumda bulunan antikorlar ile Mab'nin yarışması, antijen-antikor kompleksine enzimle işaretli anti-mause antikorlarının bağlanması ve reaksiyonun substrat ilavesi ile renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Test edilen serumda antikor varlığında reaksiyon renksizdir. Antikor yokluğunda ise renklenme şekillenir. Reaksiyonun optikal dansitesi ölçülerek pozitiflik değerlendirilir. Kompetitif-ELISA'da OPS (oligopolisakkarit) için spesifik monoklonal antikorlar kullanıldığından C-ELISA'nın I- ELISA ya göre daha spesifik olduğu bildirilmiştir (24, 96).

Küçük ruminantlarda, Brucellin alerjik deri testi aşısız sürülerde, purifiye lipopolisakkarit kullanılmadan standart antijen hazırlanması şartıyla tarama testi olarak kullanılabilir. Sonuçlar uygulama tarihi serolojik ve kültürel sınama sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir (14).

Türkiye'de brucellosis mücadele projesi ile 1984 de başlayan 26 yıllık Eradikasyon Planı kapsamında, 4-8 aylık bütün dişi sığırların *B. abortus* S-19 suşu ile aşılınması, 3-8 aylık kuzu ve oğlakların *B. melitensis* Rev.1 suşu ile aşılınması bölgelere göre aşamalı olarak başlatılmıştır. 1989 yılındaki çalışmada prevalans sığırlarda % 3.56, koyunlarda % 1.26, 1990 yılında prevalans sığırlarda % 1.2, koyunlarda % 2.08, 1991 yılında yapılan sero-surveyde ise sığırlarda % 1.01, koyunlarda % 1.83 olarak tespit edilmiştir (4-6). 1999 sonunda prevalans sığırlarda % 1.43, koyunlarda % 1.97 olarak bulunmuştur (7). Türkiye'de brusellozise karşı kullanılan aşılarda Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nde üretilmektedir. Sığırlarda S19 aşısı, *B. abortus* S19 suşundan hazırlanan canlı, attenuue, liyofilize bir aşıdır. *B. abortus* S19, sığırlarda *B. abortus* infeksiyonuna, *B. melitensis* Rev 1 de koyun ve keçilerde *B. melitensis* ve *B. ovis* infeksiyonuna karşı koruma sağlamaktadırlar. Koyun ve keçilerde *B. melitensis* Rev.1 aşısı *B. melitensis* biyotip 1'den hazırlanan canlı, attenuue, liyofilize bir aşıdır ve her bir doz aşısı $1-3 \times 10^9$ mikroorganizma içermektedir. 2009 yılında yapılan değişiklikle aşısı 3-6 aylık dişi ve erkek, kuzu ve oğlaklara 1 ml subkutan yolla uygulanmaktadır. *B. melitensis* Rev.1 Ergin aşısı, her bir doz aşısı $5-10 \times 10^4$ mikroorganizma içermektedir. Brusella ile infekte olduğu laboratuvar raporu ile tespit edilen ve atıkların seyrettiği sürülerde gebelik dönemine bakılmaksızın tüm ergin dişi hayvanlar hemen Ergin Rev 1 aşısı ile aşılanır. İkinci yıl aşının daha güvenli bir dönem olan gebeliğin son ayı veya laktasyon döneminde yapılması önerilmektedir (98, 99).

Her ne kadar ülkemizde halen subkutan aşılama yapılmakta ise de aşidan kaynaklanan uzun süren sero-pozitiflik nedeniyle subkutan aşılama OIE tarafından eradikasyon programları için tavsiye edilmemektedir (14). Diğer yandan, *B. melitensis* Rev 1 aşısı konjuktival uygulandığında uzun süren antikor yanıtına neden olmadığından kombine olmuş eradikasyon programlarının uygulanmasını kolaylaştırmaktadır. Koyunlar gebe iken tam doz yada azaltılmış doz *B. melitensis* Rev 1 aşısı ile aşılandıklarında abort ve sütle etken dışarı atılmaktadır. Bu nedenle yetişkin hayvanlar çiftleşmeden önce veya gebeliklerinin son ayı boyunca tam doz konjuktival aşılamayla aşılandıklarında bahsedilen yan etkiler azalmaktadır. Eğer sürünün aşılama brusellozisi kontrol etmedeki tek araç ise hayvanların gebe olmadıkları dönemde yada kuzulama döneminde konjuktival yolla *B. melitensis* Rev 1 aşısı önerilmektedir (14, 99).

İnaktif aşı çalışmalarında genç ve ergin koyun ve keçiler için *B. melitensis*-H38 ve benzerleri bakterilerden hazırlanan aşılardan yeterli immünite elde edilememiştir. *B. melitensis* H38 aşısı; smooth formunda ve formaldehit ile inaktive edilerek mineral yağ adjuvantlı formda hazırlanmıştır. Brusellozis nedenli abortlara karşı koruma sağlamasına rağmen istenmeyen lokal reaksiyonlar meydana gelmiştir. Canlı attenué *B. melitensis* Rev.1 aşısı ile karşılaştırıldığında ise yetersiz immünite meydana geldiği ve rapel uygulanması gerektiği bildirilmiştir (100, 101).

B. abortus S19 aşılması sonucu meydana gelen aglutine edici antikorların kan serumunda uzun süre bulunmalarından dolayı, alternatif aşı çalışmaları *B. abortus* S19 aşısı için de yapılmıştır. *B. abortus* 45/20 suşu sahadan izole edilmiş ve kobayda yapılan 20 pasaj sonunda R formuna çevrilmiştir. Fakat yapılan denemelerde S formuna dönme eğiliminde olması ve stabil kalmadığından saha uygulamalarında tercih edilmemektedir (102-104). Canlı attenué, smooth *B. suis* (S2) aşısı, aglutinojen olmayan aşıdır. Çin'de, hayvanların aşılmasında kullanılmıştır. *B. suis* (S2) aşısı, *B. suis* biyotip1 ile ortak özellik gösteren bir suştan hazırlanan attenué bir aşıdır koyun ve keçilerin içme suyu ile aşılmasına da olanak sağlamaktadır. Sığırlara ve gebe koyunlara yapılan aşılamaların sonucunda iyi bir korunma sağlandığı belirtilmiştir (105). *B. abortus* RB51 aşısı *B. abortus* biyotip 1'in rifamisine dirençli mutant türüdür. Aglutinojen olmayan bir aşıdır. Uygulayanlar açısından tehlikeli değildir. İnfeksiyonlarda teşhisin doğru konulması gibi yararları vardır. RB51 aşısı koçlarda *B. ovis*'e karşı koruma sağlayamazken, *B. melitensis* ve *B. suis*'in rough suşlarıyla yeni aşı alternatifleri aranmaktadır (101). *B. abortus* RB51 ve *rfbK* aşıları ile keçiler üzerindeki yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunduğu bildirilmiştir (106, 107). *B. abortus* RB51 aşısı ile koyunlar üzerinde yapılan çalışmada

tek doz aşılama yapılması durumunda yeterli immunité meydana getirmediği daha fazla saha çalışması gerektiği bildirilmektedir (108). *B. abortus* RB51 aşısı ile keçiler üzerinde yapılan çalışmada *B. melitensis* infeksiyonuna karşı koruduğu fakat bir aşılama programı ile deneme çalışması yapılması gerektiği ortaya konulmuştur (106). *B. melitensis* 16M ve *B. suis* (biyotip 4) rough mutant türleri olan VTRM1 ve VTRS1 aşıları ile yapılan çalışmada *B. abortus* RB51 aşısına göre daha fazla immunité verdiği bildirilmiştir (109). DNA aşıları ile intrasellüler patojen olan brusellaya karşı immunitenin sınırlı oranda da olsa sağlandığı bildirilmiştir. L7/L12 DNA aşılarının da *Brucella* spp.'ye karşı etkinliğinin denenmekte olduğu bilinmektedir. HSP 62 geninin, tüm *Brucella* türlerine karşı koruyucu etkili olduğu saptanmıştır (110). *B. melitensis* Rev 1 aşı suşu genç hayvanlarda subkutan yolla tam doz halinde uygulandığında aglütinasyon testinde uzun süreli serolojik tepki oluşturmaktadır. Bu durum *B. abortus* S19 aşı suşunda da görülmektedir. Serolojik testlerde saha suşları ile aşı suşları arasında infeksiyon ile aşılama antikrlerini ayıran testler geliştirilmektedir (14, 19, 20, 65).

Ülkemizde brusellozis ile mücadele yönetmeliği 03.04.2009 tarih ve 27189 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan yeni yönetmeliğe göre değiştirilmiştir. Bu yönetmeliğe göre işletmeler sınıflara ayrılmıştır. M1 Tipi koyun ve keçi sürüsü: nceki klinik ve aşılama geçmişi ile serolojik durumu bilinmeyen sürüyü ifade etmektedir. M2 Tipi koyun ve keçi sürüsü: nceki klinik ve aşılama geçmişi ile serolojik durumu bilinen (Rose Bengal testinin koyun veya keçi sürülerinde resmi olarak brusellozisten ari ve brusellozisten arilik statüsünün elde edilmesinde izleme testi olarak kullanıldığı) ve işletmenin M3 tipi ya da M4 tipi koyun ve keçi sürüsü statüsüne getirilmesinin amaçlandığı, rutin izleme testlerinin yapıldığı sürü olarak tanımlanmıştır. M3 Tipi koyun ve keçi sürüsü: brusellozise duyarlı hayvanlarda en az son 12 aydır brusellozisin klinik belirtilerini göstermemiş olmalı ve en az iki yıl önce genç *B. melitensis* Rev–1 aşısı ile ya da bakanlık tarafından tespit edilen prosedüre uygun olarak onaylanmış başka bir aşı ile aşılanmış hayvanların dışında aşılanmış hiçbir koyun ve keçi bulunmamalıdır. Altı ayın üzerindeki bütün koyun ve keçiler, altı ay ya da daha fazla aralıkla yapılan RBT ve CFT'in sonuçları negatif sonuç vermelidir. Sürüde, yalnızca sürüde doğmuş olan koyun ve keçiler bulunmalı ya da resmi olarak brusellozisten ari sürülerden gelen koyun ve keçilerden oluşmalıdır. M4 Tipi koyun ve keçi sürüsü: Brusellozise duyarlı bütün hayvanlarda en az son oniki aydır brusellozisin klinik belirtileri görülmemiş olmalıdır. En az iki yıl önce genç *B. melitensis* Rev–1 aşısı ile ya da Bakanlık tarafından tespit edilen prosedüre uygun olarak onaylanmış başka bir aşı ile aşılanmış hayvanların dışında aşılanmış hiçbir koyun ve keçi bulunmamalıdır. Altı ayın

üzerindeki bütün koyun ve keçiler, altı ay ya da daha fazla aralıkla yapılan RBT ve CFT’i sonuçları negatif sonuç vermelidir. Sürüde, yalnızca sürüde doğmuş olan koyun ve keçiler bulunmalı ya da resmi olarak brusellozisten ari sürülerden gelen koyun ve keçilerden oluşmalıdır. Sürü *B. melitensis* Rev-1 aşısız hayvanlardan oluşmalıdır. Bu özellikteki sürü M4 Tipi koyun ve keçi sürüsü olarak tanımlanmaktadır (111).

2009 yılında yayımlanan Hayvan Hastalıkları ve Zararlıları ile Mücadele Programında aşılama konusunda değişiklikler yapılmıştır. Önceki yıllarda sığır brusellozisi hastalığı çıkan bölgede infekte sürüdeki hayvanlara Ergin S-19 aşısı uygulanırken yeni programa göre, sığır brusellozisi hastalığı çıkan bölgedeki 3-6 aylık dişi danaların tümüne hastalık çıkış anında ve takip edecek 5 yıl boyunca genç S-19 aşısı yapılması, Ergin S-19 aşısı uygulamalarının bakanlık brusellozis mücadele programından çıkarılması önerilmiştir. Rutin olarak 3-6 aylık dişi ve erkek kuzu ve oğlakların Genç Rev-1 aşısı ile aşılması ve koyunlarda son 5 yılda hastalık çıkan yerlerde 3-6 aylık dişi-erkek kuzu ve oğlaklara hastalık çıkış anında ve takip edecek 5 yıl boyunca Genç Rev-1 aşısı yapılması önerilmiştir. Ergin Rev-1 aşısının kullanımı, yalnızca hastalık çıkışına bağlı olarak, hastalık çıkan sürüde uygulanması ile sınırlandırılmıştır (98).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇ

Saha Örnekleri

Atık Fetus Materyali

Bursa ili ve ilçelerindeki koyunculuk işletmelerinde atık yapan koyunlardan Bursa Tarım İl Müdürlüğü'ne getirilen toplam 110 adet aborte fetusa ait fötal akciğer, karaciğer, böbrek, dalak ve kalp ile abomasum içeriği *Brucella* spp. izolasyonu amacı ile kullanıldı.

Serum Örnekleri

Aborttan 21 gün sonra 110 adet koyundan kan alındı, serumları çıkarıldı ve serolojik testlerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

Standart *Brucella* suşları

<i>B. abortus</i> biyotip 1	544	(NCTC 10093)
<i>B. abortus</i> biyotip 2	86 / 8 / 59	(NCTC 10501)
<i>B. melitensis</i> biyotip 1	16 M	(NCTC 10094)
<i>B. melitensis</i> biyotip 2	63 / 9	(NCTC 1058)
<i>B. melitensis</i> biyotip 3	Ether	(NCTC 10505)
<i>B. suis</i> biyotip 1	1330	(NCTC 10316)
<i>B. ovis</i>	63 / 290	(NCTC 10512)
<i>B. canis</i>	RM6 / 66	(NCTC 10854)

Standart *Brucella* suşları Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Brucella Fajları

Tblisi Fajı ve R/ C Fajları, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Brucella Antiserumları

A+M *Brucella* polivalan serumu

Brucella monospesifik A ve M antiserumları

Brucella Rough (R) antiserumu, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Besiyerleri

SDA (Serum Dekstroz Agar)

Tryptone Soy Agar (Oxoid- CM 0131) hazırlandı, otoklavda sterilizasyonu sonrasında 56 °C'ye kadar soğutularak içine % 10 oranında steril buzağı serumu (Biochrom, United Kingdom) ve son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde steril dekstroz (Merck-1.08337.0250) solüsyonu ilave edildi. *Brucella* spp. izolasyonu için kullanıldı (32).

***Brucella* Selektif Besiyeri**

Brucella Medium Base (Oxoid, CM0169) içine *Brucella* Selective Supplement (Oxoid-SR 083A) katılarak saha örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu için kullanıldı (32).

Kanlı Agar

Blood Agar Base No: 2 (Oxoid, CM 0271) içine % 10 oranında steril defibrine koyun kanı katılarak saha örneklerinden *Brucella* spp. izolasyonu için kullanıldı.

Gliserinli *Brucella* Broth (Sıvı Gliserinli Besiyeri)

Brucella Broth (Difco, No: 87576JC) içine % 15 oranında gliserin katılarak *Brucella* spp. izolatlarının saklanması için kullanıldı.

Üre Besiyeri

Christensen Medium

Pepton	1 g.
NaCl	5 g.
KH ₂ PO ₄	2 g.
Fenol Red	0,012 g.
Dekstroz	1 g.
Agar	20 g.
Distile su	1000 ml.
pH	6,8

Agar distile suda eritildi, ph 6.8'e ayarlandı ve tüplere 5'er ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 20 dk. steril edildi. Daha sonra tüpler 45°C'ye soğutulularak içlerine filtrasyonla steril edilmiş (45 µm por çaplı filtrelerden) % 20'lik üre solüsyonundan 0,5 ml. ilave edilerek % 2'lik üre konsantrasyonu sağlandı. Tüpler 45° eğimde tutularak besiyerinin yatık olarak katılaşması sağlandı (32).

Boya İçeren Besiyerleri

Tiyonin'li besiyeri

Tiyonin (Sigma T- 3387)'in distile suda % 0.2' lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C'ye kadar soğutuldu. İçine son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. Besiyeri içine tiyoninin stok solüsyonundan 5 ml (% 0.5) eklenerek 1/50.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü (32).

Bazik Fuksin'li Besiyeri

Bazik Fuksin (Sigma / Aldrich B-0904) 'in distile suda % 0.2'lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat boyunca bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C' ye kadar soğutuldu ve içine son konsantrasyonu % 5-10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. Besiyeri içine bazik fuksinin stok solüsyonundan 5 ml (% 0.5) ilave edilerek 1/50.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü (32).

Safranin-O'lu Besiyeri

Safranin O (Sigma S 2255)' nun distile suda % 0.5'lik stok solüsyonu koyu renkli şişelerde hazırlandı ve kapakları sıkıca kapatılarak sterilizasyon amacıyla kaynayan suda 1 saat bekletildi. SDA, 500 ml olacak şekilde hazırlanarak otoklavda sterilize edildi ve 56 °C' ye kadar soğutuldu ardından içine son konsantrasyonu % 10 olacak şekilde steril buzağı serumu (Biochrom) katıldı. SDA besiyerine Safranin-O stok solüsyonundan 10 ml (% 0.5) ilave edilerek 1/10.000 konsantrasyonunda hazırlandı. Elde edilen homojen karışımlar petri kutularına döküldü (32).

Antibiyotik İçeren Besiyerleri

Streptomisinli Besiyeri

Streptomisin (Sigma S 6501) SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 2.5 µg/ml olacak biçimde katılarak hazırlandı (32).

Penisilinli Besiyeri

Penisilin (Benzylpenicillin 1.000.000, PEN-B, Sigma) SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 5 İÜ/ml olacak biçimde katılarak hazırlandı (32).

İ-eritritol'lü Besiyeri

İ-eritritol (Sigma E-7500, meso-eritritol, 25 gr.) SDA besiyeri bileşimine son konsantrasyonu 1mg/ml olacak şekilde katılarak hazırlandı (32).

Solüsyonlar:

Peptonlu Tuzlu Su

Bakteri ve fajların hazırlanması ile tüm dilüsyonlarda bu solüsyon kullanıldı

Pepton	(Sigma- P6463)	10 gr.
Sodyum Klorür (NaCl)	(Merck- 1.06404.1000)	5 gr.
Distile su (pH 7.0-7.2)		1 lt.

Akriflavin Solüsyonu

Nötral akriflavin (Euflavine, Sigma A 8126)'in distile suda 1/1000'lik solüsyonu her test için günlük olarak hazırlandı.

Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Maddeler

Hidrojen Peroksit

% 3'lük Hidrojen peroksit, katalaz testi için kullanıldı.

Oksidaz Çubukları

Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Identification Sticks Oxidase (Oxoid -BR64A) kullanıldı.

Antijenler:

Rose Bengal Pleyt Test Antijeni

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Komplement Fikzasyon Antijeni

Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Kimyasal Maddeler

Veronal Buffer (Virion/serion Kat no: 2017-04/ bioMerieux, Ca-Mg- Veronal Buffer KN: 72 171/ Oxoid, Barbitone CFT Diluent Tablets KN: BR0016) ve % 10'luk sodyum sitrat solüsyonu komplement fikzasyon testinde kullanıldı.

Pozitif ve Negatif kontrol serum

Ulusal Standart anti- *Brucella* Abortus Serum (USAbS): 1 ml'sinde 1000 internasyonal Komplement Fikzasyon Ünitesi (ICFTU) içermektedir. Liyofilize olan serum 1 ml distile su ile çözündürüldü. 1/5 oranında veronal buffer ile dilüe edildikten ve su banyosunda 56°C de 30 dakika inaktive edildikten sonra CFT'inde kullanıldı.

Daha önce test edilmiş ve negatif olduğu tespit edilmiş kan serumu, negatif kontrol olarak CFT'inde kullanıldı.

Komplement

Daha önceden alınmış küçük volümler halinde -20 °C'lik deep-freezede saklanmış kobay serumu CFT'inde komplement kaynağı olarak kullanıldı.

Eritrosit süspansiyonu

Sodium sitratlı (% 10) koyun kanından hazırlandı. % 2 oranında veronal buffer dilüent (VBD) ile sulandırıldı.

Amboceptor (Hemolizin)

Hemolytic anti-koyun eritrosit serumu

BioMerieux, KAT: 72202

Institute Virion/Serion, KAT: 9002

Fa.Behring, Amboceptor 6000 for CFTKN: ORLC 25

Competitive ELISA Kiti:

SVANOVIR® *Brucella* Ab-C-ELISA (Art. No: 10-2701-02), Svanova Biotech AB, Uppsala, Sweeden kullanıldı.

Cihazlar

Etüv: Heraeus 37°C

Karbondioksitli Etüv: Shel-Lab Model 2300, USA.

Stereomikroskop: Olympus SZ61, Binoküler, USA.

Vorteks: IKA Vortex Tube Shaker, Model 312 12 24, GERMANY.

Ultraturraks: MICCRA D- 15, 1520 Watt, 8.800-33.600 rpm., GERMANY

Mikroskop: Nikon Alphaphot TS

ELISA Reader: Biotek ELx-808-IU- USA

Su banyosu: 37 °C ve 56°C (Wedingen W22)

Santrifüj (Heraeus, Medifuge 1.0)

YÖNTEM

İzolasyon Çalışmaları

Bakteriyoskopi:

Alık fetus aseptik şartlarda açıldıktan sonra fotal dokulardan yapılan sürme preparatlar modifiye Ziehl-Neelsen tekniği ile boyandı. Mavi zemin üzerinde kırmızı kokobasiller arandı.

Organ Homojenatlarının Hazırlanması

Aborte fetusa ait karaciğer, dalak, akciğer, kalp ve böbrek, kontaminasyonları önlemek amacıyla etanole batırılıp ateşten geçirildi. Organlar steril makas ve pens yardımıyla 50 ml'lik steril santrifüj şişelerine küçük parçalar halinde aktarıldı ve üzerine 10 katlı steril FTS ilave edilerek ultraturraks yardımıyla homojenize edildi. Böylece suspansiyon şeklinde organ homojenatı hazırlandı (32).

İzolasyon

Organ homojenatlarının içine steril svap daldırılarak *Brucella* Selektif Agar ve Kanlı Agar yüzeyine ekimler yapıldı. Mide içeriğinden yapılan ekimler için abomasum

duvarı kızgın spatülle dağıldı ve içerik steril enjektör yardımıyla çekilerek Brucella Selektif Agar ve Kanlı Agar yüzeyine birkaç damla bırakıldıktan sonra steril öze ile yayılması sağlandı. Hazırlanan homojenat ve mide içerikleri CO₂'li ortam (% 10) ve aerobik ortamda inkübe edilmek amacıyla iki ayrı besiyerine inoküle edildi. Her iki grup da 37°C'lik etüvde, 3-8 gün inkübe edildiler. Ayrıca tür ve biyotip tanısında kontrol amaçlı kullanılan standart suşların da ekimleri SDA petrilere yapıldı ve en az 4 gün CO₂'li ortamda inkübe edildiler. Tipik *Brucella* spp. morfolojisine sahip koloniler SDA'ya ekilerek uygun koşullarda inkübe edildi ve identifikasyonda kullanıldı. İzolatların tür ve biyotip tayinleri standart yöntemlere göre yapıldı (32).

İdentifikasyon Yöntemleri

Cins düzeyinde İdentifikasyon

Koloni Morfolojisi

Şüpheli koloniler, koloni morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla 45°'lik oblik ışıkta stereomikroskopta incelendi (32).

Bireysel Morfoloji

İnkübasyon süresi sonunda besiyeri yüzeyinde gelişen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif, kokobasil görünümünde olanlar *Brucella* spp. açısından değerlendirmeye alındı (32).

Polivalan Brucella Antiserumu ile Aglütinasyon

Şüpheli kolonilere polivalan (A+M) anti-Brucella serumu ile lam aglütinasyon testi uygulandı. Polivalan antiserum ile aglütinasyon vermeyen Rough formundaki *B. canis*, kontrol olarak kullanıldı (32).

Akriflavin ile Aglütinasyon Özelliği

Fizyolojik tuzlu su ile suspanse edilen izolatlardan birer damla temiz bir lam üzerine aktarıldı. Üzerine bir damla akriflavin solüsyonu konularak tahta bir çubukla karıştırıldı. Reaksiyon sonuçları bir dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre okunarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak Rough koloni yapısı gösteren *B. ovis* 63/290 ve smooth koloni yapısı gösteren *B. melitensis* 16 M kullanıldı (32).

Biyokimyasal Testler

Katalaz Testi

Temiz bir lam üzerine % 3'lük Hidrojen Peroksit'ten 25µl konularak, taze katı kültürden alınan *Brucella* spp. kolonileri ile tahta çubuk yardımıyla karıştırıldı. Testte kontrol olarak kullanılan katalaz negatif özellikte olan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* suşu kullanıldı (32).

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)

İçinde üre besiyeri olan yatık tüplere ekim yapıldı. Besiyerinin sarı olan renginin pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak üreaz aktivitesi açısından negatif özellik gösteren *B. ovis* suşu kullanıldı (32).

Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)

Etkenin oksidaz aktivitesinin belirlenmesinde Identification Sticks Oxidase (Oxoid -BR64A) kullanıldı. Taze hazırlanmış *Brucella* spp. kültüründen bir öze dolusu alınarak, oda ısısındaki oksidaz çubuğuna değdirildi. Reaksiyonun oluşması için 2 dakika beklendi ve oksidaz çubuğunun ucundaki eflatun bölgenin mor renge dönüşmesi, pozitif olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak oksidaz negatif özellikteki *B. ovis* suşu kullanıldı (32).

Tür ve Biotip Düzeyinde İdentifikasyon

Brucella spp. izolatlarının tür ve biyotip düzeyinde identifikasyonları amacıyla aşağıda belirtilen testler kullanıldı (32, 47).

Fajların Rutin Test Dilüsyonunun (RTD) Saptanması

Tbilisi fajının rutin test dilüsyonunun saptanması amacıyla fajın konakçı suşu olan *B. abortus* 544'ün, R/C fajı için *B. ovis* 63/290 konakçı suşu kullanıldı. SDA besiyerine ekimleri yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkubasyon sonrasında oluşan koloniler, peptonlu tuzlu su ile agar yüzeyinden yıkanarak toplandı ve Mac Farland No: 4'e göre yaklaşık 10^9 / ml olacak şekilde suspansiyon hazırlandı. Bakteri suspansiyonunun SDA besiyerine homojen bir şekilde ekimleri yapıldı ve petrilerin yüzeylerinin kuruması beklendi. Fajların lizis oluşturduğu dilüsyonu tespit etmek amacıyla peptonlu tuzlu suda 10^{-1} 'den 10^{-5} 'e kadar on katlı dilüsyonları yapıldı. Kuruyan SDA petrilerinin alt yüzeylerine bir cam kalemiyle fajların dilüsyonları yazıldı. Fajların her bir dilüsyonundan SDA petrilerindeki

İlgili yüzeye steril ve ayrı pipet uçları kullanılarak 20'şer µl damlatıldı. Petri, yüzeyinin kurummasını takiben % 10 CO₂'li etüvde, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek dilüsyonu fajların RTD olarak saptandı (32).

Tbilisi Fajı ve R/C fajı ile lizis

Her SDA besiyerine 4 izolat olacak şekilde sıvı gliserinli besiyerinden birbirine paralel şeritler halinde ekim yapıldı. Şeritlerin sol tarafına daha önce RTD'da hazırlanmış olan Tbilisi fajından, şeritlerin sağ tarafına ise R/C fajından 20 µl damlatıldı. Tüm izolatlara aynı işlem uygulandı. Faj solüsyonunun emilmesi beklenerek petriler 37 °C'de % 10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. Sonuçlar lizis durumuna göre belirlendi. Tbilisi fajı ile lize olan *B. abortus* 544 suşu kontrol olarak kullanıldı (46). R/C fajında lize olan *B. ovis* 63/290 suşu kontrol olarak kullanıldı (32).

Karbondioksit (CO₂) Gereksinimi

Örneklerden izolasyon amacıyla çift ekim yapılan petrilere biri aerob ortamda, diğeri % 10 CO₂ li ortamda inkübe edilerek üreme durumlarına göre, CO₂ gereksinimleri belirlendi.

Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretimi

İzolatların H₂S üretim özellikleri kurşun asetat strip metodu ile incelendi. Daha önce SDA besiyerinde üretilmiş olan her bir *Brucella* spp. izolatından iğne uçlu öze yardımıyla tek bir koloni alınarak yatık SDA tüplerine ekimi yapıldı. Şerit şeklinde kesilen ve kurşun asetat emdirilen kağıtlar sterilize edilerek test için kullanıldı. Kağıtlar, besiyerine temas etmeyecek şekilde, tüp kenarı ile vidalı kapak arasına sıkıştırılarak yerleştirildi. Tüpler % 10 CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca kurşun asetatlı kağıtlar her gün değiştirildi. Süre sonunda kağıtlarda siyahlaşma olması H₂S üretimi açısından pozitif kabul edildi. Testte kontrol suşu olarak H₂S pozitif olan *B. abortus* 544 suşu ve H₂S negatif olan *B. melitensis* 16M suşu kullanıldı.

Boyalı Besiyerinde Üreme Durumu

Tiyonin Varlığında Üreme

İzolatlar tiyonin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel şeritler halinde ekildi. Ekim, her petriye dört adet izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C'de, % 10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 4 günlük inkübasyon süresini takiben tiyoninli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak tiyoninli besiyerinde üreme göstermeyen *B. abortus* 544 suşu kullanıldı (32).

Bazik Fuksin Varlığında Üreme

İzolatlar bazik fuksin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel şeritler halinde inoküle ekildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden her petriye dört adet izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C'de, % 10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. 4 günlük inkübasyondan sonra izolatların bazik fuksinli besiyerinde üreme durumu değerlendirildi. Kontrol olarak bazik fuksinli besiyerinde üremeyen *B. abortus* 86/8/59 suşu kullanıldı (32).

Safranin–O Varlığında Üreme

İzolatlar safranin-O (1/10.000) içeren SDA besiyerlerine birbirine paralel şeritler halinde ekildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petriye dört adet izolat olacak şekilde yapıldı. Petriler 37 °C'de, % 10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 4 günlük inkübasyon süresini takiben safranin-O içeren besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak safranin–O içeren besiyerinde üremeyen *B. suis* 1330 suşu kullanıldı (32).

Antibiyotikli Besiyerinde Üreme Durumu

Penisilinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen sığır orijinli olması şüpheli izolatların, aşı suşu olan *B. abortus* S19'dan ayrımı amacıyla, tüm izolatlar 5 IU/ml penisilin içeren SDA besiyerine ekildi. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Besiyerleri 37 °C'de, % 10 CO₂ li ortamda inkübe edildi. 4 günlük inkübasyon süresini takiben penisilinli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak penisilinli besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 suşu kullanıldı (39).

Streptomisinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen koyun orijinli izolatların aşı suşu olan *B. melitensis* Rev 1'den ayrımı amacıyla streptomisin (2.5 µg/ml) içeren besiyerine ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Besiyerleri 37 °C'de, % 10 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 4 günlük inkübasyon süresini takiben streptomisinli besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak streptomycin içeren besiyerinde üremeyen *B. melitensis* 16M suşu ile üreme özelliği gösteren *B. melitensis* Rev 1 kullanıldı (32).

İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen sığır orijinli olması şüpheli izolatların *B. abortus* S19 suşundan ayrımı amacıyla i-eritritol (1 µg/ml) içeren SDA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ekim işlemi sıvı gliserinli besiyerinden steril svaplar yardımıyla ve her petride birbirine paralel şeritler halinde dört izolat olacak şekilde yapıldı. Besiyerleri 37 °C'de, % 10 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İzolatlar, 4 günlük inkübasyon süresini takiben i-eritritol içeren besiyerinde üreme durumuna göre değerlendirildi. Kontrol olarak i-eritritol içeren besiyerinde üremeyen *B. abortus* S19 suşu kullanıldı (32).

A ve M Monospesifik Anti-Serumlarla Aglütinasyon

Testi yapılacak her izolatın bir öze dolusu yoğun kültürü 0.25 ml fizyolojik tuzlu su içinde suspanse edildi. Temiz bir lam üzerine A ve M monospesifik anti-serumlarından birer damla konuldu ve üzerlerine yine birer damla olacak şekilde incelenecek izolatın suspansiyonundan eklenerek bir kürdanla karıştırıldı. Reaksiyon sonucu birkaç dakika içinde oluşan aglütinasyon durumuna göre değerlendirildi. Testte kontrol olarak sadece A anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 63/9 ve sadece M anti-serumu ile aglütine olan *B. melitensis* 16M ile her ikisi ile de aglütine olan *B. melitensis* Ether ve hiçbirisi ile aglütine olmayan *B. ovis* 63/290 kullanıldı (32).

Serolojik Testler :

Brucella Rose Bengal Testi:

Fayans üzerine test edilecek 0.03 ml serum ile buzdolabından çıkarılan 10 dakika oda derecesinde bekletilen bir damla RBPT antijeni damlatıldı, cam bağıtle karıştırıldı. Fayansın oval hareketleri sonucu 4–5 dakika içinde oluşan ++'lık aglutinasyon pozitif, homojen görüntü negatif olarak kabul edildi (32).

Komplement Fiksasyon Testi:

Tüm serumlara Komplement Fiksasyon Testi uygulandı (14, 112).

Komplementin Titrasyonu:

Dokuz tüpten oluşan 3 sıra yapıldı. Komplementin ön dilusyonu hazırlandı Dilüsyon aşağıda gösterilmiştir:

TÜP	Complement (1/40)	VBD (Veronal Buffer Dilusyonu)	VBD
1	0.1 ml	0.4 ml	1.5 ml
2	0.150 ml	0.350 ml	1.5 ml
3	0.200 ml	0.300 ml	1.5 ml
4	0.250 ml	0.250 ml	1.5 ml
5	0.300ml	0.200m	1.5ml
6	0.350ml	0.150m	1.5ml
7	0.400ml	0.100ml	1.5ml
8	0.450 ml	0.05 ml	1.5 ml
9	0.5ml -	1.5ml	

Tüpler 37°C de su banyosunda 1 saat bekletildi. Her tüpe 0.5 ml amboseptör ve 0.5 ml koyun eritrositleri eklendi. Tüpler dikkatlice çalkalanarak tekrar 30 dakika için su banyosuna konuldu .

Örneklerin hazırlanması ve saklanması

Test serumu, pozitif ve negatif kontrol serumu 12'lik set olarak düzenlenerek çalışıldı. Bütün serumlar 1:5 oranında sulandırıldı (0.1 ml serum+0.4 ml VBD) ve 56 °C'lik su banyosunda 30 dakika inaktive edildi.

Testin Yapılışı:

Serum örnekleri ve kontroller için testin yapılış prosedürü tablo-1’de sunulmuştur.

1. Gün

U tabanlı mikropleytlerin hazırlanması

-B ile G arasındaki sıralara 25 µl VBD ilave edildi.

A, B, H kuyucuklarına dilüe edilmiş serumlardan (1:5 oranında örnekler ve kontroller) 25 µl konuldu.

Serumlar B sırasından başlayarak G sırasına kadar 25 µl dilüe edildi ve G sırasından sonra 25 µl atıldı

Tablo 1: Serum örnekleri ve kontroller için CFT’inin yapılış prosedürü

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	serum	K +	K -
A	1:5											AC
B	1:10											AC
C	1:20											HS
D	1:40											HS
E	1:80											CC
F	1:160											CC1
G	1:320											CC2
H	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	ACA	CC3

K +: Kontrol pozitif, K -: Kontrol negatif

Çalışma dilüsyonundaki antijen A ile G arasındaki kuyulara 25 µl ilave edildi. Antikomplementer aktivitenin kontrolü (ACA) için H sırasına antijen ilave edilmedi onun yerine 25 µl VBD ilave edildi.

Çalışma dilüsyonundaki komplement tüm pleyte 25 µl olarak ilave edildi.

Antijen, hemolitik sistem ve komplement kontrollü çalışması

USAbS (PC), negatif kontrol (NC), Antijen kontrolü (AC), Hemolitik sistem kontrolü (HS) ve Komplement kontrolü (CC) uygulanan günlük testte sadece bir pleyt yapıldı.

Test edilen serumun veya pozitif/ negatif serumun antikomplementer aktivitesi (ACA): 25 µl serumun 1/5 dilusyonu+ 25 µl VBD+ 25 µl komplement+ 50 µl hemolitik sistem

Antijen kontrolü (AC): 25 pl VBD+25 µl antijen+ 25 µl komplement+ 50 µl hemolitik sistem

Hemolitik sistem kontrolü (HS): 75 µl VBD+ 50 µl hemolitik sistem

2 ünite komplement kontrolü (CC) çalışma dilusyonunda komplement

-1, 0.5 ve 0.25 komplement ünite kontrolü (CC1 CC2 CC3) 25 µl çalışma dilusyonundaki komplementin 1:2, 1:4 ve 1:8 dilusyonları+ 25 µl antijen+ 25 µl VBD+ 50 µl hemolitik sistem eklendi.

-CC1 CC2 ve CC3'deki kuyucuklar içine 25 µl VBD ilave edildi.

CC ve CC1'deki kuyulara çalışma dilüsyonundaki komplementten 25 µl ilave edildi. CC1 den başlayarak CC3 e kadar 25 µl dilüe edildi. CC3 den 25 µl dışarı atıldı.

-CC-CC3'deki kuyucuklara 25 µl antijen ve VBD konuldu.

-Pleytler dikkatli bir şekilde karıştırıldıktan sonra üzeri kapakla kapatıldı. 2-8 °C de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı.

2. Gün

Hemolitik sistemin hazırlanması

-Çalışma dilüsyonundaki amboseptör % 2 eritrosit süspansiyonu ile 1:1 oranında karıştırıldı. Hemolitik sistemi hazırlamadan önce eritrosit süspansiyonu dikkatli bir şekilde karıştırılarak homojen hale getirildi. Hazırlanan karışım oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

-Hemolitik sistem hazırlanırken pleytler buzdolabından çıkarılarak oda ısısında 30 dakika bekletildi.

Süre sonunda tüm deliklere 50 µl ilave edildi..

Pleytin yüzeyi bantla kapatıldı ve 37 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.

-Soniçlar okunmadan önce pleytler yarım saat buzdolabında bekletildi . Böylece lize olmamış hücrelerin çökmesi sağlanmış oldu.

Test Sonuçlarının Okunması

% 100 hemoliz inhibisyonu: 4 (++++) olarak kaydedildi.

% 75 hemoliz inhibisyonu: 3 (+++) olarak kaydedildi.

% 50 hemoliz inhibisyonu: 2 (++) olarak kaydedildi.

% 25 hemoliz inhibisyonu: 1 (+) olarak kaydedildi.

Eser (iz-ufacık bir miktar) hemoliz inhibisyonu +1- =negatif olarak kaydedildi.

Tam hemoliz: 0=negatif olarak kaydedildi.

Soniçların Değerlendirilmesi:

ICFTU (Test serumunun her ml'sindeki internasyonal CFT ünitesi) 31, 25 ve üzeri olarak tespit edilen titreler pozitif olarak kabul edildi (112).

Competitive ELISA (C-ELISA):

ELISA Testi: Test, SVANOVIR® *Brucella* Ab-C-ELISA (Art. No: 10-2701-02) kiti kullanılarak, üretici firmanın kit klavuzundaki talimatlara göre uygulandı.

C-ELISA Testinin Yapılışı:

1. Kullanılmadan önce bütün reagentler oda ısısına getirildi.
2. Örnek ve kontrollerin dilusyonu başka bir pleytte ön dilusyon yaparak gerçekleştirildi. Bu amaçla 20 µl kontrol yada örneğin üzerine 180µl dilusyon buffer eklenerek 1/10 oranında dilue edildi.
3. Dilue edilen kontrol ve serum örneklerinden test pleytine 50 µl miktarında uygun kuyucuklara eklendi. Ayrıca 50 µl dilusyon buffer 2 kuyucuğa konjugat kontrolü amacıyla eklendi. Kontroller çift kuyucuk çalışıldı.
4. Kontrol ve örnekler için kullanılan bütün gözlere 50'şer µl mAb solusyonundan eklendi.
5. Çalkalayıcıda 5 dakika pleyti çalkalayarak reagentlerin karışması sağlandı.

6. Pleyt 30 dakika oda ısısında inkube edildi.
7. İnkubasyon sonunda Pleyt 4 sefer PBS tween buffer ile yıkandı, her seferinde kuyucuklar tam dolduruldu ve sertçe vurarak sıvıdan uzaklaştırıldı.
8. Her göze 100 µl konjugat solusyonu eklendi ve 30 dk. oda ısısında inkube edildi.
9. PBS yıkaması tekrar edildi
10. 100µl substrat solusyonu eklendi ve oda ısısında 10 dk. inkube edildi.
11. Bütün kuyucuklara 50µl stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

Sonuçları 450 nm de okundu, OD değerlerinde değişimi önlemek için stop solusyonu koyduktan sonra 15 dk. içinde OD değerini ölçümü yapıldı.

Hesaplamalar

Her kontrol ve serum örneği için OD değeri hesaplandı.

Hem kontrol hem de örnekler için yüzde inhibisyon oranını hesaplamak için aşağıdaki formül uygulandı.

$$PI=100- (\text{Ortalama OD}_{\text{örnek/kontrol}}) \times 100 / \text{ortalama OD}_{\text{konjugat kontrolCc}}$$

Sonuçların Yorumlanması

Doğruluğu kesinleştirmek için, kontrol değerlerinin şu limitler arasında olmasına dikkat edildi:

OD Cc	0.75-2.0
PI Pozitif Kontrol	85-110
PI zayıf Pozitif Kont	30-60
PI Negatif kontrol	(-10)-15

Kit talimatına göre PI değeri ≥ 30 ise pozitif, < 30 ise negatif kabul edildi.

Verilerin Değerlendirilmesi, Risk Analizleri ve İstatistiksel Yöntemler

Serolojik testlerin sonuçlarının değerlendirilmesinde tablo 2 ve 3'de sunulan formüllerden yararlanılarak, testlerin sensitivite, spesifite, pozitif olasılık oranı, negatif olasılık oranı, pozitif tahmin değeri ve negatif tahmin değeri hesaplandı. Sperman sıra korelasyon katsayıları ve korelasyonların önem kontrolleri MedCalc 8.0 programı yardımı ile yapıldı (113).

Tablo 2 : Test sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan formüller

Bakteriyolojik İzolasyon					
Test	Var	n	Yok	n	Toplam
Pozitif	Gerçek Pozitif (GP)	<i>a</i>	Yanlış Pozitif (YP)	<i>c</i>	<i>a + c</i>
Negatif	Yanlış Negatif (YN)	<i>b</i>	Gerçek Negatif (GN)	<i>d</i>	<i>b + d</i>
Toplam		<i>a + b</i>		<i>c + d</i>	

Tablo 3 : Risk analizlerinde kullanılan formüller

Sensitivite	$\frac{a}{a + b}$	Spesifite	$\frac{d}{c + d}$
Pozitif Olasılık Oranı	$\frac{\text{Sensitivite}}{1 - \text{Spesifite}}$	Negatif Olasılık Oranı	$\frac{1 - \text{Sensitivite}}{\text{Spesifite}}$
Pozitif Tahmin Değeri	$\frac{a}{a + c}$	Negatif Tahmin Değeri	$\frac{d}{b + d}$

Testlerin etkinlikleri ROC eğrileri altında kalan alanlarının hesaplanması ile karşılaştırıldı. Serolojik testlerin ROC eğrisi altında kalan alanları SPSS 17 paket istatistik programından yararlanılarak elde edildi (113). ROC eğrisi altında kalan alanların ikili karşılaştırmalarında MedCalc 8.0 programı kullanıldı (114).

Sensitivite: Bir testin sonucunun hastalığın varlığı durumunda pozitif olma olasılığıdır. Gerçek pozitifleri belirleme oranı olarak da adlandırılabilir, yüzde değer olarak gösterilir.

$$\text{Sensitivite} = a / (a+b)$$

Spesifite: Hastalığın olmadığı durumda bir testin sonucunun negatif olma olasılığıdır. Gerçek negatiflik oranı olarak da adlandırılabilir, yüzde değer olarak gösterilir.

$$\text{Spesifite} = d / (c+d)$$

Pozitif Olasılık Oranı: Hastalığın varlığında bir testin pozitif sonuç verme olasılığı ile hastalığın yokluğunda bu testin pozitif sonuç verme olasılığı arasındaki orandır.

Pozitif Olasılık Oranı = Gerçek pozitif oranı / Yanlış pozitif Oranı = Sensitivite / (1- Spesifite)

Negatif Olasılık Oranı: Hastalığın varlığında bir testin negatif sonuç verme olasılığı ile hastalığın yokluğunda bu testin negatif sonuç verme olasılığı arasındaki orandır.

Yanlış Negatif Oranı / Doğru Negatif Oranı= (1-Sensitivite) / Spesifite

Pozitif Tahmin Değeri: Test pozitif olduğunda hastalığın var olma olasılığıdır (Yüzde değer olarak ifade edilir).

Pozitif Tahmin Değeri= $a / (a + c)$

Negatif Tahmin Değeri : Test negatif olduğunda hastalığın olmama olasılığıdır (Yüzde değer olarak ifade edilir).

Negatif Tahmin Değeri= $d / (b+d)$

ROC Analizi (Receiver Operating Characteristic Analysis)

ROC eğrisi altında kalan alanın hesaplanması ile bir testin beklenen doğruluğu belirlenmiş olur. Türkçeye “doğru işleme özelliği analizi” olarak çevirilebilir. Eğri altında kalan alanın 0.96 olarak hesaplanmış olması bu testin 100 vakanın sonucunu 96 kez doğru verdiği şeklinde yorumlanır.

BULGULAR

İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları

Bakteriyoskopi

110 adet şüpheli materyalin 48'inde fetal dokulardan yapılan modifiye Ziehl-Neelsen boyamada mavi zeminde kırmızı kokobasiller görüldü.

İzolasyon Çalışmaları

Kolonilerin morfolojileri stereomikroskopta incelendi. Kültür çalışması sonrasında incelenen toplam 110 atık örneğin 48 (% 43,63) adedinde *Brucella* spp. yönünden şüpheli koloniler tespit edildi. Stereomikroskopik incelemede, oluşan kolonilerin smooth karakterli, şeffaf, şebnem tanesi görünümünde olduğu gözlemlendi. Kolonilerden yapılan gram boyamada da gram negatif kokobasiller görüldü.

Polivalan *Brucella* Antiserumuyla Aglütinasyon

Polivalan (A+M) anti-*Brucella* serumu ile yapılan lam aglütinasyon testi sonucunda *Brucella* spp. yönünden şüpheli 48 adet izolata ait kolonilerin tümü aglütinasyon gösterdi.

Akriflavin ile Aglütinasyon

Nötral akriflavin ile muamele edilen toplam 48 adet izolatın hiçbiri aglütinasyon göstermedi. Bu nedenle, çalışılan bütün izolatların smooth yapıda olduğuna karar verildi. Testte kontrol olarak kullanılan ve rough koloni yapısına sahip *B. ovis* 63/290, akriflavin ile aglütinasyon verirken, smooth koloni yapısına sahip *B. melitensis* 16 M aglütine olmadı.

Biyokimyasal Testler

Katalaz Testi

Brucella spp. yönünden şüpheli 48 koloninin hepsinde köpüklenme olduğu, katalaz pozitif özellikte oldukları saptandı. Kontrol olarak kullanılan *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, katalaz testinde negatif özellik gösterdi.

Üreaz Testi (Christensen's Metodu)

Şüpheli 48 izolat üreaz testinde pozitif sonuç vererek besiyerinin rengini pembeye dönüştürdü. Testte kontrol olarak kullanılan *B. ovis* üreaz aktivitesi açısından negatif özellik gösterdi.

Oksidaz Testi (Kovak's Modifikasyonu)

İncelenen 48 adet izolat, oksidaz çubuğunun ucundaki eflatun bölgeyi mor renge dönüştürdü ve oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak kullanılan *B. ovis* oksidaz yönünden negatif özellik gösterdi.

Tür ve Biyotip Düzeyinde İdentifikasyon Sonuçları

Karbondioksit (CO₂) Gereksinimi

Tüm izolatların hem aerobik hem de % 10 CO₂'li ortamda üreme gösterdikleri saptandı. Testte kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu sadece % 10 CO₂'li ortamda üredi.

Hidrojen Sülfür (H₂S) üretimi

Dört günlük inkübasyon süresi sonunda hiçbir izolatta kurşun asetatlı kağıtlarda siyahlaşma görülmedi. H₂S üretimi negatif kabul edildi. Testte kontrol suşu olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu H₂S pozitif iken, *B. melitensis* 16 M H₂S negatif olarak saptandı.

Tbilisi Fajı ile Lizis:

Tbilisi fajının konakçısı olan *B. abortus* 544'in SDA besiyerine ekimi yapıldı ve inkübasyon süresi sonunda damlanın çevirdiği alanda tam bir lizisin görüldüğü en yüksek faj dilüsyonu 10⁻² olarak tespit edildi. Dört günlük inkübasyon süresi sonunda kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu'nun Tbilisi fajı (10⁻² RTD) ile lize olduğu saptandı. Saha izolatları Tbilisi fajının RTD'da lizis göstermedi.

R/C Fajı ile Lizis

Dört günlük inkübasyon süresi sonunda kontrol olarak kullanılan *B. ovis* 63/290 suşu'nun lize olduğu saptandı. Saha izolatlarının hiçbirisi R/C fajı ile lizis göstermedi.

Boyalı Besiyerlerinde Üreme

Tiyonin varlığında üreme

Tiyonin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan toplam 48 adet izolatın tümü dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 544 suşu üreme göstermedi.

Bazik fuksin varlığında üreme

Bazik fuksin (1/50.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan 48 adet izolatın tümü dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. abortus* 86/8/59 üreme göstermedi.

Safranin - O varlığında üreme

Safranin-O (1/10.000) içeren SDA besiyerlerine ekimi yapılan 48 adet izolatın tümü, dört günlük inkübasyon süresi sonunda üreme gösterirken, kontrol olarak kullanılan *B. suis* 1330 suşu üreme göstermedi.

Antibiyotikli Besiyerinde Üreme

Penisilinli Besiyerinde Üreme

Penisilin (5 IU/ml) içeren SDA besiyerine ekimleri yapılan 48 adet izolatın tümünün inkübasyon süresi sonunda üreme gösterdiği tespit edildi. Testte kontrol amacıyla kullanılan mutant aşı suşu *B. abortus* S19 besiyerinde üremedi.

Streptomisinli Besiyerinde Üreme

Çalışmada incelenen 48 adet izolatın hiçbiri streptomisinli besiyerinde üreme göstermezken, kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* Rev 1 suşu'nun ürediği görüldü.

İ-Eritritol İçeren Besiyerinde Üreme

İnkübasyon süresi sonunda i-erithritol içeren besiyerinde tüm izolatlar üreme göstermesine karşın, kontrol amacıyla kullanılan *B. abortus* S19'un ümediği görüldü.

A ve M Mono spesifik Anti-serumlarla Aglütinasyon

Çalışmada incelenen 1, 2, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 no'lu izolatlar *Brucella* A ve M monospesifik antiserumları ile aglütinasyon gösterdi ve *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlendi. Sadece M antiserumu ile aglütinasyon gösteren 3, 7, 8, 10, 11, 14 no'lu izolatlar ise *B. melitensis* biyotip 1 olarak değerlendirildi. Testte kontrol olarak kullanılan *B. melitensis* 63/9 (Biyotip 2) sadece A-antiserumu, *B. melitensis* biyotip 16M (Biyotip 1) sadece M antiserumu ve *B. melitensis* Ether (Biyotip 3) ise A ve M antiserumlarının her ikisi ile de aglütinasyon gösterdi. Rough koloni yapısına sahip *B. ovis* 63/290 se hiçbir anti-serumla aglütine olmadı.

İzolasyon ve İdentifikasyon Çalışmaları Sonuçları

Koyun atıklarından elde edilen toplam 48 adet *Brucella* spp. izolatının biyotip dağılımları Tablo 4'de gösterilmektedir. Buna göre 48 adet izolatın 6 adedi *B. melitensis* biyotip 1, 42 adedi *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlendi. Atıkların hiçbirinden *B. melitensis* biyotip 2 ve *B. melitensis* Rev 1 aşısı izole edilmedi.

Tablo-4: İzolatların antibiyotik, boya ve i-eritritol katkılı besiyerlerinde üreme durumu, biyokimyasal aktiviteleri, fajlarla lizis ve antiserumlarla aglütinasyon özellikleri

İzolat No	Atık No	Koloni Tipi	Oksidaz	Katalaz	Üre	Akriflavin	H ₂ S	Bazik Fuksin	Tiyonin	Safranin O	Streptomisin	Penisilin	i-eritritol	Tbilisi fajı ile lizis	Anti -A	Anti -M	Anti-A+M	Sonuç
1	8	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
2	11	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
3	16	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
4	20	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
5	27	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
6	29	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
7	30	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
8	35	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
9	39	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
10	40	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
11	41	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
12	42	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
13	43	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
14	46	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
15	47	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
16	48	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
17	54	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
18	56	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
19	57	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
20	58	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
21	59	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
22	60	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
23	61	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
24	62	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
25	63	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
26	64	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
27	65	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
28	66	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
29	67	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
30	68	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
31	70	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

Tablo-4: İzolatların antibiyotik, boya ve i- eritritol katkılı besiyerlerinde üreme durumu, biyokimyasal aktiviteleri, fajlarla lizis ve antiserumlarla aglütinasyon özellikleri

İzolat No	Atık No	Koloni Tipi	Oksidaz	Katalaz	Üre	Akriflavin	H ₂ S	Bazık Fuksin	Tiyonin	Safranin O	Streptomisin	Penisilin	i-eritritol	Tbilisi faji ile lizis	Anti-A	Anti-M	Anti-A+M	Sonuç
32	71	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
33	72	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
34	74	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
35	75	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
36	76	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
37	77	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
38	86	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
39	87	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
40	99	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
41	100	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
42	101	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
43	103	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
44	106	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
45	107	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
46	108	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
47	109	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
48	110	Smooth	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

Çalışmada elde edilen *B. melitensis* biyotiplerinin Bursa ve çevresindeki dağılımları Tablo 5’de açıklanmaktadır. Nilüfer ilçesinden alınan koyun izolatlarının onyedisi *B. melitensis* biyotip 3 ve dört adedi *B. melitensis* biyotip 1 olarak tanımlanırken, Osmangazi ilçesinden alınan üç koyun izolatı *B. melitensis* biyotip 3, Orhaneli’den elde edilen izolatların beş adedi *B. melitensis* biyotip 3 ve bir adedi *B. melitensis* biyotip 1, Büyükşehir’den elde edilen izolatların bir adedi *B. melitensis* biyotip 3, İnegöl’den elde edilen izolatların yedi adedi *B. melitensis* biyotip 3 ve bir adedi *B. melitensis* biyotip 1, M K Paşa’dan elde edilen bir adet izolat *B. melitensis* biyotip 3, Kestel’den elde edilen izolatların iki adedi *B. melitensis* biyotip 3 ve bir adedi *B. melitensis* biyotip 1, Karacabey’den elde edilen iki adet izolat *B. melitensis* biyotip 3, Mudanya’den elde edilen iki adet izolat *B. melitensis* biyotip 3, Orhangazi’den elde edilen bir adet izolat *B. melitensis* biyotip 3 olarak tanımlanmıştır.

Tablo-5: *Brucella* spp. izole edilen atık vakalarının Bursa’daki dağılımı

İzolat No	Atık No	Örneklerin Gönderildiği köy/İlçe	Sonuç
1	8	Yaylacık Köyü/Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
2	11	Erenler Köyü/Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
3	16	Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
4	20	Aktaş Köyü Büyükorhan	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
5	27	Badırğa Köyü/ Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
6	29	Doğancı Köyü Osmangazi	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
7	30	Çavuş Köyü /İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
8	35	Hasanağa Köyü/ Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
9	39	Başköy Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
10	40	Hasanağa Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
11	41	Hasanağa Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
12	42	Gökçeören Köyü Osmangazi	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
13	43	Hacıahmet Köyü M.K.Paşa	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

Tablo-5 (Devamı) *Brucella* spp. izole edilen atık vakalarının Bursa'daki dağılımı

İzolat No	Atık No	Örneklerin Gönderildiği İlçe	Sonuç
14	46	Gölcük Köyü Kestel	<i>B. melitensis</i> biyotip 1
15	47	Gölcük Köyü Kestel	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
16	48	Gölcük Köyü Kestel	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
17	54	Unçukuru Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
18	56	Söğüt Köyü Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
19	57	Konaklı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
20	58	Doğancı Köyü Osmangazi	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
21	59	Örnek Köy Orhangazi	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
22	60	İsaköy/İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
23	61	İsaköy/İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
24	62	İsaköy/İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
25	63	İsaköy/İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
26	64	İsaköy/İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
27	65	Akçalar/Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
28	66	Akçalar/Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
29	67	Akçalar/Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
30	68	Akçalar/Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
31	70	Söğüt Köyü/Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
32	71	Söğüt Köyü/Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
33	72	Orhaneli	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
34	74	Yolçatı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
35	75	Yolçatı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

Tablo-5 (Devamı) *Brucella* spp. izole edilen atık vakalarının Bursa'daki dağılımı

İzolat No	Atık No	Örneklerin Gönderildiği İlçe	Sonuç
36	76	Yolçatı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
37	77	Yolçatı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
38	86	Emirleryenicesi Köyü/ Mudanya	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
39	87	Emirleryenicesi Köyü/ Mudanya	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
40	99	Konaklı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
41	100	Konaklı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
42	101	Konaklı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
43	103	Özlüce /Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
44	106	Akhisar Köyü/Karacabey	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
45	107	Akhisar Köyü/Karacabey	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
46	108	Konaklı Köyü Nilüfer	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
47	109	İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3
48	110	İnegöl	<i>B. melitensis</i> biyotip 3

Serolojik Test Sonuçları

Rose Bengal testi sonuçları tablo 6'da sunulmuştur. İncelenen 110 adet koyun kan serumunun 43'ü (% 39.09) RBT ile pozitif sonuç vermiştir.

Tablo-6: Rose Bengal Testi Sonuçları

RBT Sonuçları	Bakteriyolojik İzolasyon	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	42	1
Negatif	6	61
Toplam	48	62

Rose Bengal testi sonuçları teşhiste altın standart olarak kabul edilen bakteriyolojik test sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, serumların 42 adedinin gerçek pozitif sonuç verdiği, 6 adedinin ise negatif yanıt verdiği belirlenmiştir. Serumların 61 adedinden gerçek

negatif reaksiyon elde edilmiş, 1 adet serumun ise yanlış pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür (Tablo- 6).

İncelenen 110 adet kan serumunun 45'i (% 40.90) CFT ile pozitif sonuç verdi. Komplement fikzasyon testi sonuçları bakteriyolojik test sonuçlarına göre değerlendirildiğinde serumların 44 adedinin gerçek pozitif sonuç verdiği, 4 adedinin negatif yanıt verdiği belirlenmiştir. Serumların 61 adedinden gerçek negatif reaksiyon elde edilmiş, 1 adet serumun ise yanlış pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür (Tablo-7).

Tablo-7: Komplement Fikzasyon Testi Sonuçları

CFT Sonuçları	Bakteriyolojik İzolasyon	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	44	1
Negatif	4	61
Toplam	48	62

İncelenen 110 adet kan serumunun 46'sı (% 41.81) C-ELISA'da pozitif olarak belirlendi. C-ELISA testi sonuçları bakteriyolojik test sonuçlarına göre değerlendirildiğinde serumların 45 adedinin gerçek pozitif sonuç verdiği, 3 adedinin ise negatif yanıt verdiği belirlenmiştir. Serumların 61 adedinden gerçek negatif reaksiyon elde edilmiş, 1 adet serumun ise yanlış pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür (Tablo-8).

Tablo-8: C- ELISA Testi Sonuçları

C-ELISA Sonuçları	Bakteriyolojik İzolasyon	
	Pozitif	Negatif
Pozitif	45	1
Negatif	3	61
Toplam	48	62

Bakteriyolojik ve Serolojik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

İncelenen atıkların bakteriyolojik ekim sonuçları, elde edilen suşların biyotipleri ve kan serumlarına uygulanan serolojik testlere ilişkin sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 9'da sunulmuştur. Tablodan da izleneceği üzere bakteriyolojik test sonuçlarına göre; 48 pozitif, 62 negatif sonuç elde edilir iken; RBT'ne göre 43 pozitif, 67 negatif; CFT'i

sonuçlarına göre 45 pozitif 65 negatif; C-ELISA testi sonucuna göre 46 pozitif, 64 negatif sonuç elde edilmiştir.

Tablo-9: Bursa Yöresinde Atık Yapan Koyunlardan elde edilen numunelerin karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik test sonuçları

Atık No	Biyotip	Bakteriyolojik	RBT	CFT	C-ELISA
1		-	-	-	-
2		-	-	-	-
3		-	-	-	-
4		-	-	-	-
5		-	-	-	-
6		-	-	-	-
7		-	-	-	-
8	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
9		-	-	-	-
10		-	-	-	-
11	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
12		-	-	-	-
13		-	-	-	-
14		-	+	-	-
16	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	+
17		-	-	-	-
18		-	-	-	-
19		-	-	-	-
20	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	-	+
21		-	-	-	-
22		-	-	-	-
23		-	-	-	-
24		-	-	-	-
25		-	-	-	-
26		-	-	-	-
27	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	-	+
28		-	-	-	-
29	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	+	+
30	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	-
31		-	-	-	+
32		-	-	-	-
33		-	-	-	-
34		-	-	-	-
35	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	+
36		-	-	+	-
37		-	-	-	-
38		-	-	-	-
39	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+

Tablo-9 (Devamı): Bursa Yöresinde Atık Yapan Koyunlardan elde edilen numunelerin karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik test sonuçları

Atık No	Biyotip	Bakteriyolojik	RBT	CFT	C-ELISA
40	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	+
41	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	+
42	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	+	+
43	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	-	-
44		-	-	-	-
45		-	-	-	-
46	<i>B. melitensis</i> biyotip 1	+	+	+	+
47	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
48	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
49		-	-	-	-
50		-	-	-	-
51		-	-	-	-
52		-	-	-	-
53		-	-	-	-
54	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
55		-	-	-	-
56	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
57	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
58	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
59	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
60	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
61	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
62	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
63	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
64	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	+	+
65	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
66	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
67	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
68	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
69		-	-	-	-
70	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
71	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
72	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
73		-	-	-	-
74	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
75	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
76	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	+	+
77	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	-	+
78		-	-	-	-

Tablo-9 (Devamı): Bursa Yöresinde Atık Yapan Koyunlardan elde edilen numunelerin karşılaştırmalı bakteriyolojik ve serolojik test sonuçları

Atık No	Biyotip	Bakteriyolojik	RBT	CFT	C-ELISA
79		-	-	-	-
80		-	-	-	-
81		-	-	-	-
82		-	-	-	-
83		-	-	-	-
84		-	-	-	-
85		-	-	-	-
86	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	-
87	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
88		-	-	-	-
89		-	-	-	-
90		-	-	-	-
91		-	-	-	-
92		-	-	-	-
93		-	-	-	-
94		-	-	-	-
95		-	-	-	-
96		-	-	-	-
97		-	-	-	-
98		-	-	-	-
99	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
100	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
101	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
102		-	-	-	-
103	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
104		-	-	-	-
105		-	-	-	-
106	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	-	+	+
107	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
108	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
109	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
110	<i>B. melitensis</i> biyotip 3	+	+	+	+
	TOPLAM	48	43	45	46

Risk Analizleri ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Testlerin sensitivite, spesifite, pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri, pozitif olasılık oranı ve negatif olasılık oranına ilişkin sonuçlar ile bu değerlerin % 95 güven sınırları Tablo- 10'da sunulmuştur.

Tablo-10 :Testlerin etkinliklerine ilişkin çeşitli parametreler

	TESTLER		
	RBT	CFT	C-ELISA
Sensitivite (%)	87.50 (74.74-95.24) *	91.67 (80.00-97.6) *	93.75 (82.78-98.62) *
Spesifite (%)	98.39 (91.30-99.73) *	98.39 (91.30-99.73) *	98.39 (91.30-99.73) *
Pozitif Tahmin Değeri (%)	97.67 (87.67-99.61) *	97.78 (88.19-99.63) *	97.83 (88.43-99.64) *
Negatif Tahmin Değeri (%)	91.04 (81.51-96.62) *	93.85 (94.97-98.26) *	95.31 (86.89-98.97) *
Pozitif Olasılık Oranı	54.25 (7.74 -380.19) *	56.83 (8.11- 397.86) *	58.13 (8.307 – 406.709) *
Negatif Olasılık Oranı	0.13 (0.0601 – 0.269) *	0.08 (0.0331 – 0.217) *	0.06 (0.0212 – 0.190) *

*Parantez içinde verilen değerler % 95güven aralıklarını belirtmektedir.

RBT, CFT ve C-ELISA'nın; sensitivite değerleri sırasıyla % 87.50; 91.67 ve 93.75 olarak spesifite değerleri ise % 98.39 ile tüm testlerde eşit olarak belirlenmiştir. Pozitif tahmin değeri RBT için % 97.67, CFT için % 97.78, C- ELISA için % 97.83 hesaplanmıştır. Negatif tahmin değeri RBT için % 91.04, CFT için % 93.85, C- ELISA için % 95.31 bulunmuştur. Pozitif olasılık değeri RBT için 54.25, CFT için 56.83, C- ELISA için 58.13 hesaplanmıştır. Negatif olasılık değeri RBT için 0.13, CFT için 0.08, C- ELISA için 0.06 bulunmuştur.

İncelenen test yöntemlerinin sonuçları arasındaki Sperm sıra korelasyon değerleri Tablo-11'de sunulmuştur. Bakteriyojik test sonuçları ile C- ELISA, CFT ve RBT arasındaki korelasyon sırası ile 0.926, 0.908 ve 0.873 hesaplanmıştır. RBT ile C-ELISA ve

CFT'leri arasındaki korelasyon katsayıları sırası ile 0.794 ve 0.811 elde edilir iken CFT'i ile C- ELISA testi arasındaki korelasyon 0.869 düzeyinde belirlenmiştir.

Hesaplanan tüm korelasyon katsayılarının $P < 0.001$ düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır.

Tablo-11 :Test Yöntemleri arasındaki Sperman Sıra Korelasyon Katsayıları (R), % 95 Güven Aralıkları ve İstatistikî Önem Düzeyleri

		C-ELISA	CFT	RBT
Bakteriyolojik	R	0.926***	0.908***	0.873***
	% 95 GA¹	0.894-0.949	0.869-0.936	0.820-0.911
RBT	R	0.794***	0.811***	
	% 95 GA	0.713-0.854	0.735-0.866	
CFT	R	0.869***		
	% 95 GA.	0.814-0.908		

¹: (GA): Güven Aralığı, ***: $P < 0.001$ Önemlidir.

Koyunlarda brusellozisin teşhisine ilişkin olarak kullanılan test yöntemlerinin ROC eğrisi altında kalan alanları tablo 12'de, ROC eğrileri Şekil 1'de, testlerin ROC eğrisi altında kalan alanlarının ikili istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 13'te sunulmuştur.

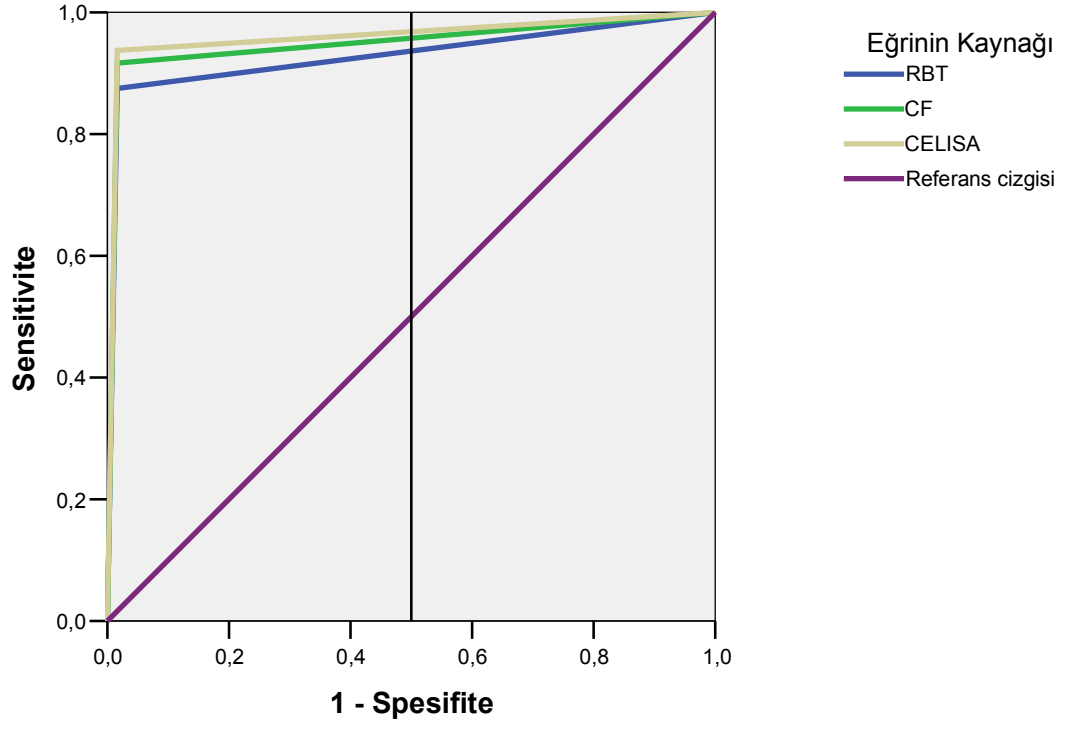
Test yöntemlerinin ROC eğrisi altında kalan alanları C-ELISA, CFT ve RBT'leri için sırası ile 0.961, 0.950 ve 0.929 belirlenmiştir.

Tablo-12 :Testlerin ROC eğrisi altında kalan alanları

	REAKA*	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı
C-ELISA	0.961	0.0204	0.905 – 0.988
CFT	0.950	0.0229	0.891 – 0.982
RBT	0.929	0.0272	0.864 – 0.969

REAKA: ROC eğrisi altında kalan alan

ROC EĞRİSİ



Şekil 1 : Test yöntemlerinin ROC eğrileri

Tablo-13 :Testlerin ROC eğrisi altında kalan alanlarının ikili istatistiksel karşılaştırmaları

C-ELISA ~ CFT	
Alanlar arasındaki fark	0.0104
Standart Hata	0.0296
% 95 Güven Aralığı	-0.0475 – 0.0684
z değeri	0.352
Önem Düzeyi	P = 0.725
C-ELISA ~ RBT	
Alanlar arasındaki fark	0.0312
Standart Hata	0.0335
% 95 Güven Aralığı	-0.0343 – 0.0968
z değeri	0.934
Önem Düzeyi	P = 0.350
CFT ~ RBT	
Alanlar arasındaki fark	0.0208
Standart Hata	0.0349
% 95 Güven Aralığı	-0.0475 – 0.0892
z değeri	0.598
Önem Düzeyi	P = 0.550

Test yöntemlerinin ROC eğrisi altında kalan alanları arasındaki farkların 0.0104 ile 0.312 arasında değiştiği saptanmıştır. Her üç test yönteminin ROC eğrileri arasında kalan alanlarının istatistiki karşılaştırmaları sonucunda anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur ($P>0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde halen en önemli zoonozlardan biri olma özelliğini sürdüren brusellozis ile ilgili epidemiyolojik veriler hastalığın proflaksisinde çok önemlidir. Bu tez projesinde Bursa ili ve ilçelerinde küçükbaş hayvancılık yapılan işletmelerde koyun abort vakalarından *Brucella* etkenlerinin izole edilmesi ve kan serumlarının RBT, CFT ve C-ELISA testleriyle incelenmesi ile brusellozisin bakteriyolojik ve serolojik teşhisi amaçlanmıştır. Serolojik test yöntemlerinin altın standart olarak kabul edilen bakteriyolojik ekim sonuçları ile karşılaştırılarak etkinliklerinin ortaya konulması, uygulanacak serolojik testin ekonomiklik, uygulanabilirlik, kolay ulaşılabilme, sonuçların güvenilirliği ve hata paylarının ortaya konulması açısından önem taşımaktadır.

Ülkemizde bölgesel olarak ya da Türkiye genelinde brusellozisin varlığı ve prevalansı ile ilgili bir çok çalışma mevcuttur (4-7, 11, 115). Trakya bölgesinde 1993 yılında yürütülen bir çalışmada koyun atıklarında brusellozis oranı % 20 olarak bulunmuştur (11). Muş ili ve çevresinde 1995 yılında yapılan serolojik bir çalışmada koyun brusellozisi % 7 oranında tespit edilmiştir (115). Bursa bölgesinde 2007 yılında yürütülen bir çalışmada ise koyunlarda atık vakalarından % 37.09 oranında *Brucella* spp. izole edilmiştir (13). Bu çalışmada ise incelenen 110 adet aborte koyun fetusunun 48'inden (% 43.7) *Brucella* spp. izole edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen % 43.7'lik oranın diğer çalışmalara (11, 13) göre oldukça yüksek oluşu dikkat çekicidir ve Bursa bölgesindeki koyun atıklarında brusellozisin öneminin artarak devam ettiğini göstermektedir. Türkiye'de brusellozis mücadele projesinin 1984 yılından itibaren aşılama programları ile yürütüldüğü göz önüne alındığında, Bursa ve çevresi için ortaya konulan bu yüksek infeksiyon oranı, brusellozis eradikasyon projesinin başarısız olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca 1989 yılından itibaren yapılan ulusal tarama ve çalışmalarda da koyun brusellozisi seroprevalansının azalmaması, tersine az da olsa 1989'da % 1.26'dan, 2000 yılında % 1.97'ye yükselmiş olması, yine bu eradikasyon projesinin Türkiye genelinde de başarısız olduğunu göstermektedir (4-7). Resmi gazetede 03.04.2009 tarihinde yayınlanan yeni brusellozis mücadele yönetmeliğinde brusellozisten ari sürülerin oluşturulması hedeflenmiştir. Rutin izleme testlerinin düzenli olarak uygulanması, sürüye dışarıdan hayvan sokulmaması ve aşılama da zamanla azaltılması ile kapalı ve ari sürüler oluşturulabileceği düşünülmektedir (111).

Çalışmamızda 110 adet aborte koyun fetusunun 48'inden (% 43.7) izole edilen *Brucella* suşlarının identifikasyon çalışmalarında 42 adet (% 87.5) izolatin *B. melitensis*

biyotip 3, 6 adet (% 12.5) izolatın *B. melitensis* biyotip 1 olduğu saptanmıştır. *B. melitensis*'in mevcut 3 biyotipinden biyotip 1 Latin Amerika, İspanya, Portekiz ve Malta'da en yaygın olarak görülen biyotiptir. İtalya ve Yunanistan'da en fazla biyotip 2 yaygındır. Biyotip 3 en yaygın olarak Fransa, Mısır, Ürdün, İsrail ve Kuzey Afrika'da görülmektedir ancak İspanya, Yunanistan ve Türkiye'de de bildirilmektedir. Batı ve orta Asya'da biyotip 2 ve 3 en yaygın biyotiplerdir. Ancak Suudi Arabistan, Kuveyt, İran ve Irak'ta her üç biyotip de yaygın olarak bulunmaktadır (8). Türkiye'de koyun izolatlarının tiplendirilmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. 1993 yılında Trakya bölgesinde yapılan bir çalışmada toplam toplam 145 koyun-keçi atık fetusundan 29 adet brusella suşu izole edilmiş ve bunlardan 25'inin *B. melitensis* biyotip 1, 3'ünün *B. melitensis* biyotip 2 ve 1'inin ise *B. melitensis* biyotip 3 belirtilmiş, bu bölge için biyotip 1'in predominant olduğuna dikkat çekilmiştir (11). Ancak Erdenliç ve Şen (12), 1996-1998 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinde koyun atıklarından izole edilen 78 adet *Brucella* spp. izolatının % 88.5'ini *B. melitensis* biyotip 3 ve % 11.5'ini *B. melitensis* biyotip 1 olarak belirlemişler ve Türkiye'de *B. melitensis* biyotip 3'ün predominant olduğunu bildirmişlerdir. Büyükcangaz (13) ise Bursa ili ve çevresinde yürüttüğü çalışmasında, 23 adet koyun izolatının 5 adedini *B. melitensis* biyotip 1, 1 adedini *B. melitensis* biyotip 2 ve 16 adedini *B. melitensis* biyotip 3 olarak belirlemiş, 1 adet izolatın atipik özellikte *B. melitensis* biyotip 3 olduğunu tespit etmiştir. Bizim çalışmamızda da da koyunlarda *B. melitensis* biyotip 3 % 87.5 oranında, *B. melitensis* biyotip 1 ise % 12.5 oranında tespit edilmiştir. Bulgularımızın Büyükcangaz (13)'in çalışmalarıyla uyumlu olması çalışılan bölgenin aynı olmasından, Erdoğan ve arkadaşlarının (11) bulgularından farklı olması da yine bölge farkından kaynaklanmış olabilir. Ancak Türkiye'de genel olarak yaygın biyotipin biyotip 3 olduğu bizim çalışmamızla bir kez daha ortaya konmuştur. Biyotip 2 bizim çalışmamızda saptanmamasına rağmen diğer iki çalışmada (11, 13) belirlendiği bildirilmiştir. Türkiye'nin Asya ve Avrupa arasında geçiş bölgesi olması, hayvan hareketlerinin yeterince kontrol edilememesi, sınır boylarında yasa dışı hayvan kaçakçılığının tamamen önlenememesi, zaman zaman yasal hayvan ithalatlarına dayalı olarak dışarıdan hayvan getirilmesi, infekte hayvan hareketlerinden dolayı hem Avrupa hem de Asya da sıklıkla görülen *B. melitensis* biyotip 1, 2 ve 3'ün Türkiye'de de görülmesi normal karşılanmalıdır.

Brusellozisin indirekt teşhisinde serum, süt, vajinal mukus ve seminal plazmada brusellalara karşı oluşan antikorları saptamaya yönelik birçok serolojik test geliştirilmiştir (14, 15, 25). Brusellozisin kesin teşhisi etken izolasyonu ve identifikasyonuna bağlıdır.

Etkenin izolasyonu ve identifikasyonu epidemiyolojik çalışmalarda ve eradikasyon programlarında atılacak en önemli adımdır. Fakat brusellozisin bir sürü hastalığı olması, etken izolasyonunun zaman alıcı olması nedeniyle teşhis, kontrol ve eradikasyon programları, serolojik testlerle reaktörlerin saptanması temeline dayandırılmıştır. Uluslararası standartlara göre bu testlerden RBT'in tarama testi, CFT'in ise standart doğrulama resti olarak kullanılması önerilmiştir (32). Ayrıca son yıllarda konvansiyonel teşhis yöntemlerine alternatif olarak ya da konfirme edici olarak C- ELISA gibi yöntemler de uygulanmaktadır (14).

Türkiye' de brusellozisin serolojik teşhisine yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur (27-30). Ancak atık yapan hayvanlarda bakteriyolojik ve serolojik çalışmaların birlikte yürütüldüğü çalışma sayısı azdır. Çünkü Türkiye' de atık yapan koyunların aborte fetus materyalinin incelenmesi sonrasında serolojik teşhis amaçlı 21 gün sonra kan alınması, sürüde koyunların takibinin hayvan sahibi tarafından yapılmaması nedeniyle genellikle mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla çalışmamız, ülkemizde bakteriyolojik ve serolojik çalışmaların birlikte yürütüldüğü bir çalışma olması yönüyle önemlidir. Ayrıca Türkiye' deki diğer çalışmalarda (27-30) testlerin etkinliklerini değerlendirmek amacı ile karşılaştırmalı olarak testlerin sensitivite, spesifite, pozitif tahmin değeri, negatif tahmin değeri, pozitif olasılık oranı, negatif olasılık oranı, ROC eğrisi altında kalan alan gibi karşılaştırma yöntemlerinin hepsine yer verilmemiştir. Testlerin etkinliklerinin istatistiki verilerle karşılaştırılması net ve sağlıklı bilgi vermektedir. Bizim çalışmamızda izolasyon ve identifikasyon çalışmaları temel alınarak serolojik testlerin etkinlikleri değerlendirilmiş ve genel olarak şu sonuçlar elde edilmiştir. Test yöntemlerinin her üçünün de spesifite değerleri % 98.39 bulunmuş olmakla birlikte en yüksek sensitivite değeri C-ELISA testinde saptanmıştır. Bunu sırası ile CFT ve RBT'i izlemiştir. Her üç testin pozitif tahmin değerleri % 97'nin üzerinde ve birbirlerine oldukça benzer bulunmuştur. C-ELISA en yüksek negatif tahmin değerine sahiptir. Negatif tahmin değeri en düşük ise RBT'inde bulunmuştur. Pozitif olasılık oranı en yüksek C -ELISA testinde belirlenmiş bunu CFT ve RBT izlemiştir. Negatif olasılık oranı en yüksek RBT'inde hesaplanır iken C-ELISA testinin en düşük orana sahip olduğu belirlenmiştir. Test yöntemleri arasında en yüksek korelasyonun C-ELISA ile bakteriyolojik izolasyon arasında olduğu, en düşük korelasyonun ise C- ELISA ile RBT arasında hesaplandığı görülmüştür. Tüm test yöntemleri arasındaki korelasyonların yüksek ve istatistiki düzeyde önemli olduğu saptanmıştır. ROC eğrisi altında kalan alan en yüksek C- ELISA

testinde, en düşük RBT'inde saptanmış olup, değerler birbirine yakın düzeydedir. İstatistik karşılaştırmalarda test sonuçları arasında anlamlı fark görülmemiştir.

Brusellozis'in serolojik teşhisinde kullanılan testlerin etkinliklerini yukarıda belirtilen karşılaştırma yöntemleri ve istatistiki veriler ile karşılaştıran ülkemizde az çalışma olmasına rağmen yurt dışında bir çok çalışma mevcuttur (21-26). Bu çalışmalarda kullanılan serolojik test yöntemleri ise genellikle birbirine benzer olarak RBT, CFT, I-ELISA, C-ELISA gibi rutinde de kullanılan testlerdir. Rose Bengal Plate testin spesifitesini araştırmacılar farklı oranlarda bulmuşlardır. Minas ve arkadaşları (22) ile Öngör ve arkadaşları (28), RBT'ni sırasıyla % 99.7 ve % 100 oranlarıyla en spesifik test olarak belirlemişlerdir. Diğer yandan Nielsen ve arkadaşları (25) ile Burriel ve arkadaşları (23) C-ELISA' in spesifitesinin sırasıyla %99.8 ve %98.5 oranlarında olduğunu belirleyerek kullanılan diğer serolojik testler arasında C-ELISA'in en spesifik test olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda en spesifik test olarak CFT'ini (21) ve I-ELISA'i (26) belirlemiş olan araştırmacılar da mevcuttur. Bu çalışmada ise spesifite oranı tüm testlerde eşit olarak (%98.39) bulunmuştur. Spesifite açısından ortaya konulan bu farklılıklar Brusellozis'in serolojik teşhisinde en az iki testin birlikte kullanılması gerekliliğine bir kez daha dikkati çekmektedir. Rose Bengal Testinin prozon fenomeni nedeniyle yanlış negatif sonuç verme olasılığına rağmen, infekte sürülerde hastalığın tespiti ya da bruselladan ari sürülerde negatifliğin garanti altına alınmasında tarama testi olarak mutlaka kullanılması OIE tarafından önerilmektedir (14).

Bu çalışmada en yüksek sensitivite değeri % 93.75 ile C-ELISA testinde saptanmıştır. Çalışmamızla paralel olarak Minas ve arkadaşları (21) ile Biancifiore ve arkadaşları (116) da C-ELISA'i sırasıyla % 89 ve % 99.4 oranlarıyla en duyarlı test olarak belirlemişlerdir. Bazı araştırmacılar tarafından da I-ELISA en sensitiv test olarak belirlenmiştir (21, 23). Minas ve arkadaşları (22) ise çalışmalarında kullandıkları RBT, CFT ve C-ELISA arasında CFT'ini en duyarlı test olarak belirlemişlerdir. Sensitivite açısından testler ve araştırmacılar arasındaki bu farklılıkların, farklı hayvanların farklı enfeksiyon dönemleri ve farklı antikor sınıflarına sahip olmalarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda da olduğu gibi C-ELISA yönteminin sadece sensitivitesi değil spesifitesinin de yüksek olduğu, bazı Gram negatif bakterilerle oluşabilecek kros reaksiyonları en aza indirdiği, CFT ile karşılaştırıldığında eşit ya da ondan daha iyi sonuçlar alındığı yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. Bazı C-ELISA kitleri ile aşılı ve doğal infekte hayvanların ayırt edilebilmesinin bu teste bir üstünlük sağladığı bildirilmiştir. Testin yapılışının kolay olması, kısa zamanda sonuç alınması,

farklı türlerdeki hayvanlara ait serum örneklerinin birlikte test edilebilmesi gibi özelliklerinin büyük bir avantaj sağladığından söz edilmektedir (21, 78, 115).

Çalışmamızda CFT'inin sensitivite (% 91.67) ve spesifite (% 98.39) değerleri yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde CFT'ini en spesifik (21) ve en sensitiv (22) test olarak belirleyen çalışmalar da mevcuttur. Literatürlerde (16, 95) CFT ile yanlış negatif sonuçlar ile karşılaşılabilceği belirtilmekle birlikte, çalışmamızda CFT ile elde edilen sonuçların C-ELISA testine yakın olduğu, hasta olmayanları oldukça yüksek oranda tahmin ettiği, hasta olanları tahmin etmede % 100 kesin sonuç vermemekle birlikte yüksek oranda başarılı olduğu kanaatine varılmıştır. CFT'de komplementin inaktivasyonu için serumların ısı işleme tabi tutulması zorunluluğu, testin zaman alıcı olması, reagentlerin test için sürekli titre edilmesi gerekliliği, uzmanlaşmış personele gereksinim göstermesi gibi literatürde (19) bildirilen zorlukları ile çalışmamızda da karşılaşmıştır. Bu nedenle CFT'in sadece RBT ile pozitif bulunan serumlara halihazırda uygulandığı şekilde doğrulama amaçlı uygulanmasının daha pratik olduğunun bir kez daha vurgulanması gerekli görülmüştür.

Bu çalışmada C-ELISA'in pozitif olasılık oranı (% 58.25), negatif tahmin değeri (% 95.31) ve REAKA (0.961) kriterleri yönünden en yüksek değerlere sahip olduğu, pozitif tahmin değerinin de diğer testlere eşit (% 97.83) olduğu ortaya konmuştur. Burriel ve arkadaşları (23) da C-ELISA'in en yüksek pozitif tahmin değerine (% 98) ve en yüksek negatif tahmin değerine (% 92.5) sahip olduğunu vurgulamışlardır. Minas ve arkadaşları (21), C-ELISA'in pozitif olasılık oranını düşük (% 24.9), negatif olasılık oranını ise bizim çalışmamızdaki değere (0.0635) göre yüksek (% 0.11) bulmuşlardır. Çalışmamızda ROC eğrisi altında kalan alan hesaplanmış ve testlerin doğruluk oranları belirlenmiştir. Eğri altında kalan alan değerinin 100'e yakın oluşu, testin doğruluk değerinin yüksek olduğunu ifade etmektedir. Türkiye'deki diğer çalışmalarda REAKA değeri hesaplanmamıştır. Bu çalışmada C-ELISA'nın REAKA değeri 0.961 olarak saptanmıştır. Minas ve arkadaşlarının yürütmüş oldukları iki çalışmada (21, 22) da REAKA değerleri bizim çalışmamıza yakın bulunmuştur (0.994 ve 0.968). Nielsen ve arkadaşları (24) ise C-ELISA'in REAKA değerini 0.841 olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında çalışmamızda kullanılan C-ELISA testinin REAKA değerinin 100'e yakın olması nedeniyle oldukça yüksek bir doğruluk değerine sahip olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, testlerin spesifitelerinin birbirine benzer olmalarına karşın sensitivite değerlerinin farklı olduğu, en yüksek

sensitivite değerine C- ELISA testinin sahip olduğu belirlenmiştir. Bakteriyolojik sonuçlar ile karşılaştırıldığında her u testin de hasta olmayanları çok yüksek oranda doğru şekilde tahmin ettikleri, test yöntemleri arasındaki korelasyonların yüksek ve istatistiki düzeyde önemli olduğu görülmektedir. Bu alışmada C-ELISA testi ile diğer testlerin etkinlikleri arasında istatistiki anlamda fark bulunmamakla birlikte en yüksek ROC eğrisi altında kalan alana sahip olması, sensitivitesinin diğer testlere göre nisbeten fazla oluşu ve uygulamada çeşitli avantajlara neden olması nedenleri ile tercih edilebileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. WHO, report of MZCP training course on the establishment of a human and animal. Brucellosis national surveillance system, MZCP/BRUC/93.2, 28-30 October, Heraklion, Greece, 1993.
2. ARDA M. Türkiye’de hayvan brusellozisin genel durumu ve brusellozis mücadele projesi 1. Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları, 11: 166-178, 1993.
3. ÜLGEN M. Özel Mikrobiyoloji. U.Ü. Vet. Fak. Yayınları, Bursa, (Basılmamış Ders Notları).
4. TARIM ve KÖY İŞLERİ BAKANLIĞI. Ankara, 1989 yılı epidemiyolojik sero– survey raporu.
5. TARIM ve KÖY İŞLERİ BAKANLIĞI. Ankara, 1990 yılı epidemiyolojik sero– survey raporu.
6. TARIM ve KÖY İŞLERİ BAKANLIĞI. Ankara, 1991 yılı epidemiyolojik sero– survey raporu.
7. İYİSAN AS, AKMAZ Ö, DÜZGÜN SG, ERSOY Y, ESKİİZMİRLİLER S, GÜLER L, GÜNDÜZ K, IŞIK N, İÇYERİOĞLU AK, KALENDER H, KARAMAN Z, KÜÇÜKAYAN U, ÖZCAN C, SEYİTOĞLU Ş, TUNA İ, TUNCA T, ÜSTÜNAKIN K, YURTALAN S, Türkiye’de Sığır ve Koyunlarda *Brucellosis*’in Seroepidemiolojisi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 31 (1): 21-75, 2000.
8. FAO/ OIE/ WHO Animal Health Yearbook. 1995- 1997, FAO Animal Production and Health Series, FAO, Rome, Italy, 1997.
9. DOĞUER M. Türkiye’de izole edilen *Brucella* suşlarının identifikasyonları. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 1 (3): 155-188, 1961.
10. SARISAYIN F, EROĞLU M, NADAS UG. Yurdumuzda izole edilen brusella suşlarının tür ve biyotiplerini tayini ile dağılımı durumu üzerine bir çalışma. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 1: 24-35, 1969.
11. ERDOĞAN İ, GÜREL A, TEKİN C, UYANIK F, BİTGEL A. Trakya bölgesinde koyun, keçi ve sığırlarda bakteriyel abortların tespiti ve dağılımı. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 24 (1): 23-35, 1993.
12. ERDENLİĞ S, ŞEN A. Koyun atıklarından *Brucella* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu ve biyotiplendirilmesi. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 31: 31-42, 2000.
13. BÜYÜKCANGAZ E. Sığır ve Koyun atıklarında *Brucella* cinsi mikroorganizmaların bakteriyolojik tanısı. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
14. OIE, Chapter 2. 7. 2. Caprine and Ovine *Brucellosis* (excluding *B. ovis*). 974-983, 2009.
- 15- NIELSEN K, DUNCAN R. Animal *Brucellosis*, CRC press, 1990.
16. AYDIN N, MİNBAŞ A, İZGÜR M, YARDIMCI H. Brucellosis in sheep and goats (in relation to epidemiology and human Infection) *Brucella* and Brucellosis in man and animals. Publication of the Turkish Microbiology Society, Ege University pres. 16: 51-65. 1991.
17. NICOLETTI P. Sığır brusellozisi. Uluslararası brusellozis sempozyumu. Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Yayınları, 9: 1-2, 1989.
18. OLDS R.J. Ortadoğu ülkelerinde brusellozis ve kontrolü. Uluslararası brusellozis sempozyumu, Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Yayınları, 9: 28-35, 1989.
19. NIELSEN K. Diagnosis of *Brucellosis* by serology. Veterinary Microbiology, 90, 447-459, 2002.

20. GARIN-BASTUJI B, BLASCO JM, MARIN C, ALBERT D. The diagnosis of *Brucellosis* in sheep and goats, old and new tools. *Small Ruminant Research*, 62: 63- 70, 2006.
21. MINAS A, STOURNARA A, CHRISTODOULOPOULOS G, KATSOULOS DP. Validation of competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *The Veterinary Journal*, 177, 411-417, 2008.
22. MINAS A, STOURNARA A, MINAS M, STACK J, PETRIDOU E, CHRISTODOULOPOULOS G, V. KRIKELIS. Validation of a fluorescence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests used for diagnosing. *Journal of Immunological Methods*, 320, 94–103, 2007.
23. BURRIEL R., CHRISTODOULOPOULOS G, BISIAS G, FTHENAKIS GC. Comparison of fluorescence polarization assay, indirect ELISA and competitive ELISA methods for diagnosis of *Brucella melitensis*–infection in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 54; 243-247, 2004.
24. NIELSEN K, KELLY H, GALL D, NICOLETTI P, KELLY W. Improved Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of bovine *brucellosis*. *Veterinary and Immunology and Immunopathology*, 46, 285-291, 1995.
25. NIELSEN K, GALL D, SMITH P, BALSEVICIUS S, GARRIDO F, DURAN FERRER M, BIANCIFIORI F, DAJER A, LUNA E, SAMARTINO L, BERMUDEZ R, MORENO F, RENTERIA T, CORRAL A. Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(3), 979-987, 2004.
26. NIELSEN K, GALL D, SMITH P, BERMUDEZ R, MORENO F, RENTERIA T, RUIZ A, VAZQUEC AS, DAJER A, LUNA E, SAMARTINO L, HALBERT G. Evaluation of serological tests for detection of caprine antibody to *Brucella melitensis*. *Small Ruminant Research*, 56: 253-258, 2005.
27. ESENDAL ÖM, YARDIMCI H, KESKİN O, ALTAY G. Sığır, koyun ve keçi brusellozisinin serolojik tanısında konvansiyonel testler ve Combs testinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 48, 97-102, 2001.
28. ÖNGÖR H. Elazığ yöresinde atık yapmış koyunlarda brusellozisin kan serumunda ELISA ile teşhisi ve diğer serolojik testlerle karşılaştırmalı araştırması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Elazığ, 1999.*
29. ÖNGÖR H, MUZ A, ÇETİNKAYA B. Atık Yapmış Koyunlarda brusellozisin teşhisinde ELISA ile diğer serolojik testlerin karşılaştırılması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25; 21-26, 2001.
30. DAKMAN A, KÜÇÜKAYAN U, ÜLKER U, DEMİR M Ö. Doğal enfekte ve aşıli sığır ve koyunlarda Brusellozisin teşhisinde kompetitif ELISA tekniğinin uygulanması. *Etlık Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, T.C.TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Hayvan Sağlığı Araştırmaları Program Değerlendirme Toplantısı, 2008.*
31. GÜLLÜCE M. Kars ve Çevresinde, Sığırlarda *B. abortus*'a Karşı Oluşan Antikorların ELISA ve Diğer Serolojik Yöntemlerle (RBT, SAT, MRT) Saptanması ve Sonuçların Karşılaştırılması. *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1993.*
32. ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD, VERGER JM. Techniques for the *Brucellosis* laboratory. *INRA, Paris, page 13-61, 1988.*
33. AYDIN N. *Brucella* infeksiyonları. Editörler: AYDIN N, PARACIKOĞLU J. *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar), Brucella* infeksiyonları. 1.baskı, İlke Emek Yayınları, Ankara, sayfa 145-163, 2006.

34. BANAI. M. Control of small ruminant *brucellosis* by use of *B. melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations Department of Bacteriology, Veterinary Microbiology, Israel 90, 497–519, 2002.
35. HUDDLESON IF. *Brucellosis* in Man and Animals. The Commonwealth Fund, New York, 1943.
36. BENKIRANE A. Opening adress. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA, Alfort, France, page 21-22, 1995.
37. MORENO E, MORIYO I. *B. melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(1): 1–3, 2002.
38. PERRY QL. *B. melitensis*: The evaluation of a putative hemagglutinin gene's effect on virulence in the caprine model. Louisiana State University, 2007.
39. BAE JE. Generation of baculovirus-*B. abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and 17/112 recombinant proteins. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1999.
40. JONES LM, ZANARDI M, LEONG D, WILSON JB. Taxonomic position in the genus *Brucella* of the causative agent of canine abortion. Journal of Bacteriology, page: 625-630., 1968.
41. T.C. Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü, *Brucellosis ve Tuberculosis* şubesi, 14 yıllık -Sığırlarda *Brucellosis ve Tuberculosis* Mücadele Projesi, Ankara, 1965.
42. YANAGI M, YAMASATO K. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16 srRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiology Letter, 107:115-120, 1993.
43. TIMONEY JF, GILLESPIE JH, SCOTT FW, BARLOUGH JE. Hagan and Bruner Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th edition, Comell University Pres, London, page 135-152, 1988.
44. CORBEL MJ. *Brucellosis* an Overview.1. st International Conference on Emerging Zoonoses Jarussalem, page 213-221, 1997
45. CORBEL MJ. DNA Analysis of *Brucella* Species:An Update. Editör: TÜMAY E, HİLMİ S, ANG Ö. *Brucella* and *Brucellosis* in man and animals, Ege University Pres, İzmir, page 11-25, 1991.
46. QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, first publishing, Blackwell Science Cornwall, page 162-167, 2002
47. QUINN PJ, CARTER ME, MARKEY BK, CARTER GR. Clinical Veterinary Microbiology, Mosby, Edinburg, page 261-267, 2000.
48. ROSS HM, FOSTER G, REID RJ, JAHANS KL, MAC MILLAN AP.*Brucella* Species İnfection in Sea Mammals. Veterinary Record, 134-359, 1994.
49. GODFROID J. *Brucellosis* in Wildlife Life. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 21: 277-286, 2002.
50. MEYER ME. Evolutionary development and taxanomy of the genus *Brucella*. Advances in *Brucellosis* Research, First edition, editor: ADAMS LG, Texas A, M University pres, College Station, TX, USA, 12-35, 1990.
51. BENKIRANE A. Ovine and Caprine *Brucellosis*: World distribution and control/eradication strategies in West Asia /North Africa Region. Small Ruminant, 62: 19-25, 2006.
52. FOSTER G, JAHANS KL, REID RJ, ROSS HM. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. Veterinary Record, 138: 583- 586, 1996.
53. EWALT DR, PAYEUR JB, MARTIN MB, CUMMINGS DR, MILLER WG. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Turciops truncatus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6: 448- 452, 1994.

54. CLAVAREAU C, WELLEMANS V, WALRAVENS K, TRYLAD M, VERGER JM, GRAYON M, CLOECKAERT A, LETESSON JJ, GODFROID J. Phenotypic and molecular characterisation of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology*, 144: 3267-3273, 1998.
55. FOSTER G, MAC MILLAN AP, GODFROID J, HOWIE F, ROSS HM, CLOECKAERT A, REID RJ, BREW S, PATTERSON IAP. A review of *Brucella* spp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Veterinary Microbiology*, 90: 563- 580, 2002.
56. GONZALES L, PATTERSON IA, REID RJ, FOSTER G, BARBEREAN M, BLASCO JM, KENNEDY S, HOWIE FE, GODFROID J, MAC MILLAN AP, SCHOCK A, BUXTON D. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* spp. in live-stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Journal of Comparative Pathology*, 126: 147- 152, 2002.
57. WATSON CR, HANNA R, PORTER R, CONNELL W, GRAHAM DA, KENNEDY S, MC DOWELL SWJ. Isolation of *Brucella* species from common seals in Northern Ireland. *Veterinary Record*, 153: 155-156, 2003.
58. HOLT JG, KRIEG NR, SNEATH PHA, STALEY JT, WILLIAMS ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9. edition, Williams and Wilkins Baltimore, USA, 37: 137- 138, 1994.
59. ALTON GG, JONES LM, PIETZ DE. *Laboratory Techniques in Brucellosis* second edition WHO Monograph Series, No: 55, WHO, 11-59, 1975.
60. GARIN-BASTUJI B, BLASCO JM. *Caprine and ovine Brucellosis*. OIE Manual: Amendment, 2, (3. 3. 2), 1995.
61. HOYER BH, MC CULLOUGH NB. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. *Journal of Bacteriology*, 95: 444-448, 1968.
62. ENRIGHT F M. The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. *Animal Brucellosis*, Edited by NIELSEN K, DUNCAN J R, CRC Press, Inc, Boca Raton Florida, USA, 97-120, 1990.
63. MORGAN WJB. Comparison of various media for the growth and isolation of *Brucella*, *Research Veterinary Science*, 1: 47-52, 1960.
64. MARIN CM, JIMENEZ DE BAGUES MP, BARBERAN M, BLASCO JM. Comparison of two selective media for the isolation of *B. melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*, 138: 409-411, 1996.
65. European Commission Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, SANCO.C.2/ AH/ R23/ 2001, *Brucellosis in Sheep and Goats (Brucella melitensis)*, 2001.
66. MORGAN WJB, CORBEL MJ. Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Developments in Biological Standardization*, 31: 27-37, 1975
67. CORBEL J M. *Microbiology of the genus Brucella. Brucellosis: Clinical and the Laboratory Aspect*, Editors: YOUNG E J, CORBEL MJ. CRC Press, Inc, Boca Raton. Florida, USA, 54-67, 1989.
68. LETESSON JJ, LESTRATE P, DELRUE RM, DANESE I, BELLEFONTAINE F, FRETIN D, TAMINIAU B, TIBOR A, DRICOT A, DESCHAMPS C, HAINE V, LEONARD S, LAURENT T, MERTENS P, VANDENHAUTE J, DE BOLLE J. Fun stories about *Brucella* the 'furtive nasty bug' *Veterinary Microbiology*, 90: 317-328, 2002
69. CORBEL MJ. *Brucella*. Editors: COLLIER L, BALOWS A, SUSSMAN M, TOPLEY W. *Microbiology and Microbial Infection*, page. 829, Georgina, Bentliff, U.K 1998.

70. ELZER PH, PHILLIPS RW, ROBERTSON GT, ROOP RM. The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infection and Immunity*, 64:4838, 1996.
71. GRILLO MJ, BARBERAN M, BLASCO JM, Transmission of *B. melitensis* from sheep and lambs. *Veterinary Record*, 140: 602- 605, 1997
72. BLOOD DC, RADOSTITS OM. *Veterinary Medicine*, 7: 677-697, 1989.
73. TEIXEIRA-GOMES AP, CLOECKAERT A, ZYGMUNT MS. Characterization of heat, oxidative, and acid stress response in *B. melitensis*. *Infection and Immunity*, 68:2954, 2000
74. SARISAYIN F. Koyun brusellozisi alanındaki son gelişmeler semineri. TÜBİTAK, V. H. A. G, No: 2 Ankara, 1969.
75. ALTON GG. *B. melitensis*. *Animal Brucellosis*. Editors NIELSEN K, DUNCAN JR. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida USA, page 384-404, 1990
76. TAŞOVA Y, SALTOĞLU N, YILMAZ G, İNAL S. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 12(3): 307-12, 1998.
77. ATAMAN-HATİPOĞLU C, BİLGİN G, TULEK N, KOSAR U. Pulmonary involvement in *Brucellosis*. *Journal of Infection*, 51(2): 116-119, 2005.
78. SUTHERLAND SS. Immunology of bovine *Brucellosis*. *Veterinary Bulletin*, 50(5): 359-368, 1980.
79. ARDA M, AKAY Ö, ESENDAL Ö. M. Brusellozisin immunolojisi. Uluslararası Brusella Sempozyumu, Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 9: 90-107, 1989.
80. SUTHERLAND SS, SEARSON J. The immune response to *B. abortus* Humoral response in: *Animal Brucellosis*. Editors: NIELSEN K, DUNCAN JR. CRC Press, Boca Raton Florida, page: 65, 1990.
81. MORGAN WJB. *B. abortus*. In: *Handbuch der bakteriellen infektionen bei tieren*. Band IV Editors: H BLOBEL, T SCHLIEBER, GUSTAV FISCHER. Verlag –Stuttgart, page 53-213. 1982.
82. GARIN-BASTUJI B. The quality insurance of living *Brucella* vaccines. the French experience with the Rev I vaccine FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev I vaccine in small ruminants and cattle, CNEVA-ALFORT, page 21-22, 1995.
83. ALTON GG, ELBERG SS, CROUGH D. Rev 1 *B. melitensis* Vaccine. The stability of the degree of attenuation. *Journal of Comparative Pathology*, 77: 293-300, 1967.
84. Requirements for *B. melitensis* strain Rev 1 vaccine in WHO Expert Committee on Biological Standardization. 28 th Report Technical Report Series, 610: 94, 1977.
85. *B. melitensis* Rev 1 reference orinnal seed. Description and Note for preparation and control, CNEVA-ALFORT, page. 1-6, 1993.
86. MACMILLAN AP, GREISER-WILKE I, MOENNIG V, MATHIAS LA. Competition enzyme immunoassay for *Brucellosis* diagnosis. *Dtsch Tierarztl. Wochenschr*, 97, 83-85, 1990.
87. BRICKER BJ. PCR as a diagnostic tool for *Brucellosis*. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4): 435-446, 2002.
88. ALLARDET-SERVENT A, CARLES-NURIT MJ, BOURG G, MICHOUX S, ROMUZ M. Physical map of the *B. melitensis* 16M chromosome. *Journal of Bacteriology*, 173(7): 2219-2224, 1991.
89. MERCIER E, JUMAS BILAS E, ALLARDET-SERVENT A, O'CALLAGHON D, ROMUZ M. Polymorphism in *Brucella* strain detected by studying distribution of two short repetitive DNA elements. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5): 1299-1302, 1996

90. FEKETE A., BANTLE JA., HALLING MS, SANBORN M.R. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 216-227, 1990.
91. DIAZ-APARICIO E, ARAGON V, MARIN C, ALONSO B, FRONT M, MORENO E, PEREZ-ORTIZ S, BLASCO JM, DIAZ R, MORIYON I. Comparative Analysis of *Brucella* serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* 0:9 polysaccharides for serological diagnosis of *Brucellosis* in cattle, sheep and goats. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:29, 3136-3147, 1993.
92. İZGÜR M, AKAY Ö, ARDA M, ERDEĞER J. Sığır Brusellozisinin Teşhisinde EDTA ve 56 °C'de Aglutinasyon testlerinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 39(1-2): 191-200, 1992.
93. MITTAL KR, TIZARD I. Serological cross reaction between *B. abortus* and *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9. *Veterinary Bulletin*, 51, 501-505, 1981.
94. MORGAN WJB, MACKINNON DJ, LAWSON JR., CULLEN GA. The rose bengal plate agglutination test in the diagnosis of *Brucellosis*. *The Veterinary Record*, 85, 636-641, 1969.
95. MAC MILLAN A. Conventional serological Tests. In: *Animal Brucellosis*, editors: Nielsen K, Duncan JR. CRC Pres Inc., Boca Raton, page: 153-198, 1990.
96. GARIN-BASTUJI B. Reliability of serological tests in the diagnosis and control of *Brucellosis* with regard to species and herd prevalence review of current research. Expert consultation on strategie in diagnosis and control of *Brucellosis* in Asia Beijing, 5-9, 1992
97. NEILSEN K, GAIL D. Fluorescence polarization assay for diagnosis of *Brucellosis*. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 22: 183-201, 2001.
98. HAYVAN HASTALIKLARI VE ZARARLILARI İLE MÜCADELE PROGRAMI KİTABI, Ankara, sayfa: 24-27, 2009.
99. BLASCO JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 31: 275-283, 1997.
100. XIE X. Orally administrable brucellosis vaccine *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*, 4, 212, 1986
101. BLASCO JM. Existing and future vaccines against *Brucellosis* in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 62: 33-37, 2006.
102. CLOECAERT A, VIZCAINO N, PAQUET JY, BOWDEN RA, ELZER PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90: 229-247, 2002.
103. MAHAJAN NK, KULSHRESHTHA RC, MALIK G, DAHIYA JP. Immunogenicity of major cell surface protein(s) of *B. melitensis* Rev 1. *Veterinary Research Communications*, 29: 189-199, 2005.
104. FICHT TA. Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Veterinary Microbiology*, 90: 311-315, 2002.
105. VERGER JM, GRAYON M, ZUNDEL E, LECHOPIER P AND OLIVER-BERNARDIN V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *B. melitensis* Rev.1 live vaccines against *B. melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 13: 191- 196, 1995.
106. DIAZ-APARICIO E, HERNANDEZ L, SUAREZ-GUEMES F. Protection against *Brucellosis* in goats, five years after vaccination with reduced dose *B. melitensis* Rev-1 vaccine. *Tropical Animal Health and Production*, 36(2): 117-121, 2004.
107. MORIYON I, GRILLO MJ, MONREAL D, GONZALEZ D, MARIN C, LOPEZGONI I, MAINAR-JAIME RC, MORENO E, BLASCO JM. Rough vaccines in animal *Brucellosis*: structural and genetic basis and present status. *Veterinary Research*, 35: 1-38, 2004.

108. JIMENEZ DE BAGUES MP, ELZER PH, JONES SM, BLASCO JM, ENRIGHT FM, SCHURIG GG, WINTER AJ. Vaccination with *B. abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *Infection and Immunity*, 62: 4990-4996, 1994.
109. MOLIN LH. Evaluation of rough *Brucella* strains as vaccines for *Brucellosis* and pseudorabies in swine. Louisiana State University, 2004.
110. COMMANDERA NJ, SPENCER SA, WRENB BW, MacMILLAN AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *B. melitensis* 16M genes. *Vaccine*, 25: 43-54, 2007.
111. TARIM ve KÖY İŞLERİ BAKANLIĞI. Brusellozis ile Mücadele Yönetmeliği, 03.04.2009 tarih ve 27189 sayılı Resmi Gazete.
112. Commission Regulation (EC) No.535/2002 of 21 March 2002. Amending Annex C to Council Directive 64/434/EEC and amending Decision 2000/330/EC.
113. SPSS 17.0 for Windows, Copyright ©, SPSS Inc., 1989-2004.
114. SCHOONJANS F, ZALATA A, DEPYDT C, COMHAIZE F. Medcalc: a new computer program for medical statistisc. *Computer methods and programs in Biomedicine*. 48, 257-262, 1995.
115. Ertürk Lee S. Muş ilinde koyunlarda brusellozisin seroprevalansının Rose Bengal Plate test (RBPT), Serum tüp aglütinasyon testi (SAT), Rivanol Test (RT) ve Immunosorbent Assay Test (ELISA) ile saptanması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensttitüsü, İstanbul, 1995.
116. BIANCIFIORI F, GARRIDO F, NIELSEN K, MASCATI L, DURAN M, GALL D. Assessment of a monoclonal antibody-based competitive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) for diagnosis of *Brucellosis* in infected and Rev. 1 vaccinated sheep and goats. *New Microbiology*, 23(4): 399-406, 2000.

TEŞEKKÜR

Tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, değerli fikirleriyle tezime yön veren danışman hocam Prof. Dr. Mihriban Ülgen'e, tezimin tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, yetişmemde büyük emekleri olan Mikrobiyoloji Anabilimdalı'ndaki değerli hocalarım Prof. Dr. K. Tayfun Çarlı, Prof. Dr. Ayşin Şen ve Prof. Dr. Cengiz Çetin'e, Doç. Dr. Kadir Yeşilbağ'a, Patoloji Anabilimdalı'ndaki değerli hocam Prof. Dr. Gürsel Sönmez'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları Dr. Esra Büyükcangaz, Araş. Gör. Kaan Önat, Araş. Gör. Serpil Kahya ve laborant Ayşe Şerikoğlu'na tezimin seroloji çalışmalarında yardımcı olan Dr. Selma İyisan'a, Dr. Nesrin Turan'a, biyotiplendirme çalışmalarında destek veren Dr. Sevil Erdenliğ ve Veteriner Hekim Ayhan Baklan'a ve manevi desteklerini sürekli hissettiğim Tarım İl Müdürlüğü, Hayvan Hastalıkları Laboratuvar Şefliğindeki arkadaşlarım Dr. Mine Akbarut, Dr. Figen Tavukçuoğlu ve Dr. Figen Kahraman'a teşekkür ederim.

Tezimin istatistik ve risk analizlerinde yardımcı olan eşim Doç. Dr. Faruk Balcı'ya hep yanımda olan sevgili anneciğim ve babacığım, çocuklarım Tolga ve Nehir'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

Serpil Balcı, 23. 10. 1970 tarihinde Bursa'da doğdu. Hürriyet İlkokulu, Hürriyet Ortaokulu ve Bursa Kız Lisesi'ni bitirdikten sonra, 1988 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdi, 1993 yılında eğitimini tamamladı ve Veteriner Hekim ünvanı aldı. 1994-1995 yılları arasında Eczacıbaşı İlaç Firması'nda, 1995-1997 yılları arasında da Servier İlaç Firmasında Tıbbi Satış Mümessili olarak çalıştı. 1997-1998 yılları arasında öğretmenlik yaptı. 1998 yılında Bursa Tarım İl Müdürlüğü'nde çalışmaya başladı. 2003 yılı Güz döneminde Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2006 yılında Hayvan Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı'na geçti. Halen Bursa Tarım İl Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Şube Müdürlüğü'nde Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır. Evli ve iki çocuk annesidir.