



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

**KONJUKTİVAL YOLLA UYGULANAN AZALTILMIŞ (REDUCED) DOZ  
BRUCELLA REV 1 AŞI ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Senem HACİÖMEROĞLU**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA - 2008**



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

KONJUKTİVAL YOLLA UYGULANAN AZALTILMIŞ (REDUCED) DOZ  
BRUCELLA REV 1 AŞI ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Senem HACİÖMEROĞLU

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Aysin ŞEN

Bursa-2008

## İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TÜRKÇE ÖZET.....	III
İNGİLİZCE ÖZET.....	IV
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
GEREÇ.....	23
<i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 aşısı.....	23
Standart Patojen Suş.....	23
Kobay.....	23
Besiyerleri.....	23
(GDA) Gliserin Dekstroz Agar.....	23
Benzilpenicillin' li GDA.....	23
Kanlı Agar.....	23
(SDA) Serum Dekstroz Agar.....	23
Otomatik Pipetler.....	23
Vorteks.....	24
Karbondioksitli Etüv.....	24
Etüv.....	24
Laminar Flow Cabinet.....	24
Hassas Terazî.....	24
Kobay Bakım Ünitesi.....	24
YÖNTEM.....	24
Kobayların Bakımı.....	24
<i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Hazırlanması.....	24
Azaltılmış Doz <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Hazırlanması.....	24
Ergin Doz <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Hazırlanması.....	24
Standart Patojen Suşun Hazırlanması.....	25
Çalışma Grupları.....	25
Zararsızlık Testleri.....	25

Yetişkin Kobaylarda.....	25
Gebe Kobaylarda.....	26
Bağışıklık Testleri.....	26
Yetişkin Kobaylarda Bağışıklık Kontrolü.....	26
Değerlendirme Kriteri.....	26
Zararsızlık Testleri.....	26
Yetişkin Kobaylarda Zararsızlık Testleri.....	26
Gebe Kobaylarda Zararsızlık Testleri.....	27
Bağışıklık Testleri.....	28
Bakteriyolojik İzleme.....	28
BULGULAR.....	29
<i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Hazırlanması.....	29
Azaltılmış Doz <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Dozunun Ayarlanması.....	29
Ergin Doz <i>Brucella melitensis</i> Rev. 1 Aşısının Dozunun Ayarlanması.....	29
Zararsızlık Testleri.....	29
Yetişkin Kobaylarda Zararsızlık Test Sonuçları.....	29
Gebe Kobaylarda Zararsızlık Test Sonuçları.....	32
Bağışıklık Testleri.....	37
Dalak ağırlığı.....	37
Dalakta <i>Brucella</i> spp. kolonizasyonu.....	37
Bakteriyolojik İzleme.....	40
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR.....	46
TEŞEKKÜR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	55

## ÖZET

Bu çalışmada ülkemizde üretilen, farklı doz ve yol ile uygulanan *Brucella melitensis* Rev.1 aşısının ergin ve gebe kobaylarda zararsızlık, ergin kobaylarda bağışıklık ve aşı etkeninin vücuttan atılımının kontrolü amaçlandı. Zararsızlık testinde konjuktival azaltılmış ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı uygulanan ergin kobayların ortalama dalak ağırlıkları sırası ile 0.556 ve 0.590 gram, dalak ağırlık indeksi 0.16 ve 0.17 bulundu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptandı. Gebe kobayların abort yapmadığı ve normal doğum yaptığı gözlemlendi. Aşının koruyucu etkisinin incelenmesinde; aşı ve kontrol grubu kobaylar *B.melitensis* H38 ile eprüve edildi. Konjuktival azaltılmış doz uygulanan grupta ortalama dalak ağırlıkları eprüvasyondan sonra 3.ve 6. haftalarda sırası ile 1.077 ve 1.211 gram iken, subkutan ergin doz uygulanan grupta ise 0.951 ve 1.202 gram ve kontrol grubunda ise 2.373 ve 3.403 gram olarak bulundu. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasındaki farkın önemli olduğu saptandı. Tüm dalaktaki *Brucella* spp. kolonizasyonu ise, eprüvasyondan sonra 3. ve 6. haftalarda her iki deneme grubunda da 0.86 CFU/ dalak iken, kontrol grubunda ise sırası ile 2.31 ve 2.38 CFU/dalak olarak saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı. Aşı etkeninin vücut ekskretlerinden saçılımının kontrolünde *Brucella* spp. izolasyonu yapılmadı. Bütün değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının virulent karakterde olmadığı, gebelik periyodunda güvenli olduğu bulundu. Aşının *B.melitensis* H38 suşuna karşı korucuyu etkisinin olduğu ve aşı etkeninin vücuttan atılım riskinin bulunmadığı saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** *Brucella melitensis* Rev.1, azaltılmış doz, konjuktival yol, zararsızlık, bağışıklık

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF EFFECTIVENESS OF REDUCED DOSE BRUCELLA REV. 1 VACCINE APPLICATION BY CONJUNCTIVAL ROUTE

The purpose of this study was to examine the safety of *B.melitensis* Rev.1 vaccine in adult and pregnant guinea pigs, the level of immunity in adult ones and the discard of the vaccine agent from the body after application of the vaccine in different doses and routes in our country product. In safety test, adult guinea pigs were applied with conjunctival reduced and subcutaneous adult doses of *B.melitensis* Rev.1 vaccine. The average spleen weights of the animals were found as 0.556 gram and 0.590 gram and the spleen weight indexes were as 0.16 and 0.17, respectively, but no statistical difference was determined when compared with the control group. Pregnant guinea pigs did not abort and gave normal births. In order to examine the effectiveness of vaccine protective factor, vaccinated guinea pigs and guinea pigs in the control group were challenged with *B.melitensis* H38. After challenging with the pathogen strain the average spleen weights at the 3rd and 6th weeks were 1.077 gram and 1.211 gram in the conjunctival reduced dose group, 0.951 gram and 1.202 gram in the subcutaneous adult dose group, and 2.373 gram and 3.403 gram in the control group, respectively, which revealed a significant difference between the control group and the challenged groups. Colonization of the whole spleen was found 0.86 CFU/ spleen in both vaccinated groups at 3rd and 6th weeks after challenge and 2.31 and 2.38 CFU/spleen in the control group, respectively. When compared with the control group, a significant statistical difference was observed in the vaccine groups. When the spread of the vaccine factor from the body extracts was controlled, no *Brucella* spp. isolation was possible. In the comparison of all the variables among the groups, it was found that conjunctival reduced dose *B.melitensis* Rev.1 vaccine did not have virulent character and its use was safe during pregnancy period. The vaccine had protective effect against *B.melitensis* H38 strain and there was no risk of vaccine factor discarded from the body.

**Keywords:** *Brucella melitensis* Rev.1, reduced dose, conjunctival route, safety, immunity.

## GİRİŞ

Koyun ve keçilerdeki Brucellosis insan ve hayvan sağlığına önemli etkileri olan zoonoz bir hastalıktır. Başta Akdeniz ülkeleri ve Orta Doğuda olmak üzere birçok ülkede hastalık görölmektedir. *B. melitensis* koyun ve keçi brucellosis etkenidir. Brucella genusu içinde *B.melitensis* ilk tanımlanan türüdür ve 1887 yılında Malta adasında David Bruce tarafından ilk izolasyonu yapılmıştır.

Brucellosis meslek hastalığı olarak veteriner hekimler, çiftçiler, laboratuvar teknisyenleri, kesimhane çalışanlarında görölmektedir. Hayvanlar ile direkt teması olmayan insanlar için çiğ süt ve süt ürünleri hastalığın ana kaynağıdır. Hastalıkta en riskli dönem doğum mevsimidir, insanlardaki brucellosis' in prevalansı doğum mevsimi sırasında en yüksek seviyeye ulaşır (1).

Ekonomik ve zoonotik öneminden dolayı endemik bölgelerde brucellosisin koyun ve keçilerde kontrol edilmesi ve eradikasyonu önemlidir. Pek çok ülke koyun ve keçilerdeki hastalığın insidensini düşürmek için en etkili ve pratik yolun aşılama olduğunu kabul etmişlerdir. Gelişmekte olan ülkeler ve bazı Avrupa Birliği ülkelerinde koyun ve keçilerde brucellosis görölmekte ve hastalığın kontrol altına alınması için aşılamalar yaygın olarak kullanılmaktadır (2).

*B.melitensis* Rev.1 günümüzde koyun ve keçi brucellosis için kullanılan en etkili aşıdır. Genç ve ergin hayvanlarda *B.melitensis* Rev.1 aşılamasının yerleştirilmesi hastalığın prevalansının azaltılmasında etkilidir. Gebe hayvanlara aşı uygulaması abort riski oluşturmakta ve aşı suşu aglutinojenik olması nedeni ile aşıya bağlı uzun süreli seropozitiflik meydana getirmektedir. Bu durum aşılanmış hayvanlarda hastalığın tanısında klasik serolojik testlerin kullanılmasını engellemektedir. Diğer yandan *B.melitensis* Rev.1 aşısının subkutan uygulanması büyük sürülerde her hayvanın tek tek aşılanmasında zorluk yaratmaktadır, ayrıca aşı uygulanması deride istenmeyen lezyonlara yol açabilmektedir. Bu istenmeyen etkilerin azaltılması veya ortadan kaldırılması için farklı uygulama yolu ve azaltılmış doz uygulamaları ile *B.melitensis* Rev.1 aşılamaları daha güvenli hale getirilmeye çalışılmaktadır. Aşının azaltılmış doz aralığında yapılan saha denemelerinde,  $10^3$ - $10^6$  bakteri/ml doz aralığının koyun ve keçilerdeki brucellosis' in kontrolü ve gebelerde güvenli kullanımı için uygun olduğu bildirilmiştir. Genç hayvanlarda *B.melitensis* Rev.1' in  $0,5$ - $2 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda subkutan uygulama yerine konjunktival uygulama ile aynı

immun yanıt meydana getirdiği ve aşıya bağlı oluşan sero-pozitifliğin daha kısa olduğu bildirilmektedir (3).

Koyun ve keçilere konjuktival *B.melitensis* Rev.1 aşısının uygulanması ile sistemik yan etkiler kısıtlanmaktadır. Aşının konjuktival uygulanması subkutan aşılama ile kıyaslandığında eşit immuniteye sahip olduğu bildirilmektedir. *B.melitensis* Rev.1' in konjuktival uygulanmasının genç ve ergin koyun ve keçilerde etkin ve uygun yol olduğu, gebelik dönemindeki hayvanların aşılmasında kullanılabileceği ortaya konulmuştur (4).

Koyun ve keçi brucellosisinde etkin ve ideal bir aşı; aşıya bağlı uzun süreli infeksiyon oluşturmaksızın etkin olmalı, brucellosis' in serolojik tanısında kullanılan testleri için yanıtıcı sonuç oluşturmamalı, gebelik periyodunda güvenle kullanılabilmeli ve aşılama yapanlar için risk oluşturmamalıdır. Bu özellikler dikkate alındığında konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşıları günümüzde subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşılarına alternatif olarak değerlendirilmektedir (5).



## GENEL BİLGİLER

Dünyada 2003 yılı rakamlarına göre 1.024.039.610 baş koyun ve 1.371.116.510 baş sığır bulunmaktadır (6). Ülkemizde ise Devlet İstatistik Enstitüsü' nün 2006 yılı verilerine göre 25.616.912 baş koyun ve 10.871.364 baş sığır mevcuttur (7). 1970' li yıllardan bugüne gerek sığır gerekse koyun sayısında yıllar itibari ile düşüş bulunmasına karşın hayvancılık sektörü ülkemiz ekonomisindeki önemini korumaktadır. Hayvancılık sektörünün en önemli problemlerinin başında bulaşıcı hastalıklar gelmekte bu hastalıkların arasında da brucellosis ilk sıralarda yer almaktadır. Brucellosis, birçok dünya ülkesinde olduğu gibi ülkemiz hayvancılığı açısından da önemli zoonotik hastalıklardan biridir. Ekonomik kayıplarının yanı sıra insan sağlığını da etkilemesi nedeniyle hem dünya ülkeleri hem de ülkemizde, salgın hayvan hastalıkları ile mücadelede ilk sıralarda yer almaktadır. Yüz yıllık bir geçmişe sahip olan Brucellosis enfeksiyonu dünyanın birçok ülkesinden eradike edilemediği gibi, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) raporlarına göre, her yıl yaklaşık yarım milyon insan brucellosise yakalanmaktadır.

Brucellosis; sığır, koyun, keçi, domuz, koç gibi hayvanlarda özellikle testis, meme, uterus gibi genital organlara yerleşerek yavru atmalara ve infertiliteye neden olan kronik, bulaşıcı ve nekrotik, yangısal enfeksiyonlarla ortaya çıkan zoonoz bir hastalıktır. Hayvanlarda organ enfeksiyonları, yavru atma ve süt azalmasına yol açarak önemli ekonomik kayıplara neden olur (8). En önemli zoonoz hastalıklardan olan brucellosis, insanlarda soğuk algınlığı semptomlarına benzer belirtiler, dalgalı ateş, generalize ağrı ve organlar da granulomatoz lezyonlar ile ortaya çıkar. Kardiyovasküler sistem, genital sistem ve merkezi sinir sisteminde ciddi komplikasyonlar meydana getirir (9-11).

*Brucella* cinsinin ilk izolasyonu 1887 yılında, David Bruce tarafından Malta'da genç bir askerın dalağında yapılmış ve etken *Micrococcus melitensis* olarak isimlendirilmiştir. İnsanlardaki Malta Fever hastalığının etkeninin bu gram negatif kokoid mikroorganizmalar olduğunu saptamıştır. Etken Meyer ve Shaw tarafından 1920 yılında hücrel morfolojisi ve aglutinasyon özelliğine göre adı *B. melitensis* olarak yeniden adlandırılmıştır. *Brucella abortus*, Fredrick Bang tarafından 1897 yılında atık sığır fötusundan izole etmiş ve etkene *Bacillus abortus* adı verilmiştir. Etken 1920 yılında yeniden adlandırılarak *B. abortus* olarak isimlendirilmiştir. Koyunlardaki *Brucella* etkenleri Garcia ve Iscara tarafından 1906 yılında izole edilmiştir. Keçilerdeki ilk brucellosis 1905 yılında Zammit tarafından tanımlanmıştır. *Brucella suis* 1914 yılında Hindistan'da domuz sürülerinde Traum

tarafından izole edilmiş, Huddleson tarafından isimlendirilmiştir. Koçların epididimitis etkeni 1953 yılında Buddle ve Boyes tarafından Yeni Zelanda' da izole edilmiş ve 1956 yılında *Brucella ovis* olarak tanımlanmıştır. *Brucella neotomea* ilk olarak Stoenner ve Lockman tarafından 1957 yılında izole edilmiştir. *Brucella canis*, 1966 yılında köpeklerde abortla seyreden bir salgın sırasında izole edilmiş ve 1968 yılında Carmicheal ve Bruner tarafından isimlendirilmiştir (12-16).

Türkiye'de ilk brucellosis vakası 1915 yılında Kural ve Akalın tarafından teşhis edilmiştir. İlk izolasyon çalışmaları sığırlarda 1931-1932 yıllarında Berke tarafından, koyunlarda ise 1944 yılında Aktan ve Köylüoğlu tarafından yapılmıştır (17, 18) .

*B.melitensis*, gram negatif, katalaz pozitif, oksidaz pozitif, hareketsiz, spor oluşturmeyen, özellikle tek tek, çiftler veya nadiren kısa zincirler halinde görülen kısa oval, kokoid şekilde, 0.5x1 µm boyutunda mikroorganizmadır. Etken 20-40 °C'ler arasında üreyebilmekle birlikte, optimal üreme sıcaklıkları 37 °C'dir. İnaktif hale 63 °C'de 7-10 dakikada gelmektedir. Bütün *Brucella* türleri dezenfektan ve antibiyotiklere duyarlıdır. Karanlık yerlerde, doku, süt veya uterus akıntıları içinde uzun zaman canlı kalabilirler. Güneş görmeyen toprakta 70 gün, suda 35 gün kadar yaşayabilirler. Kültürler buzlukta 3-6 ay canlı kalabilirler. Etkenler % 0.1 süblimede birkaç dakika, % 2 formalin ve % 0.1 lizol içinde 15 dakikada ölürlür. *Brucella*'ların üremeleri için optimal pH değeri 6.6-7.4; maksimum pH 8.7, minimum pH ise 5.8 olarak bildirilmiştir. Hastalık olgularından yeni izole edilen bakterilerin smooth (S) formundaki suşlarında kapsül tespit edilmiştir. Etken mikroaerofilik özelliğe sahiptir ve ilk izolasyonda % 10 CO<sub>2</sub>' e gereksinim gösterirler. Besi yerlerine glukoz, ascites, karaciğer ektresi, serum, eritrol veya protein katılması üreme üzerine olumlu etkide bulunur ve dissosiasyonu da sınırlı kalır. Sıvı materyallerin kültürü için sıvı besi yeri kullanılır. Mikroorganizma hemolitik değildir. Besi yerlerinde koloniler, yuvarlak, konveks, kenarları düzgün 0.5 mm çapında S formundadır. Mikroorganizma genellikle indol, jelatin, metil red Voges-Proskauer testi (VP) reaksiyonları yönünden negatif olmalarına karşılık üreaz, nitrat ve katalaz pozitifdir. İlk izolasyonda serum-dekstroz agar, Tween-dekstroz agar, kontaminasyon ihtimaline karşı antibiyotik ilave edilmiş besi yeri kullanılmalıdır. Kullanılan besi yerlerinin esasını nutrient agar oluşturur bununla birlikte patates infuzyon, karaciğer infuzyon ile trypticase soy agar, tryptose agar, brucella albimi agar, Columbia agar, Brucella agar gibi hazır ticari besi yerleri temel diğer besi yerleri olarak kullanılmaktadır.

*Brucella* cinsi mikroorganizmaların klasik sınıflandırmasında 6 tür olarak tanımlanmaktadır;

*B. melitensis*: İnsanlarda Malta humması olarak bilinen hastalığın etkenidir. Başlıca konakçıları, koyun, keçi ve yabani sığırlardır. Etkenin 3 biyotipi vardır.

*B. abortus*: İneklerde yavru atmalara neden olur. İnsanlarda Bang hastalığı etkenidir. Serolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarla birbirinden farklı 9 biyotipi bulunur.

*B. suis*: Evcil domuzlarda hastalık yapar, 4 biyotipi vardır.

*B. ovis* : Koçlarda kısırlık, koyunlarda yavru atmalara neden olur.

*B. canis*: Köpeklerde yavru atmalara neden olmaktadır.

*B.neotomae*: İlk kez Amerika'da ağaç ratlarından izole edilmiştir.

Deniz memelilerinden de *Brucella* spp. tespit edilmiştir. 1990' larda Avrupa ve Güney Amerika'daki okyanuslardan alınan deniz kabuklularından (cetaceanlar ve pinnipedler), klasik 6 *Brucella* türünden farklı olan yeni suşlar bakteriyolojik ve genetik olarak identifiye edilerek *B.cetacea*, *B.pinnipediae* adını almıştır (19).

*Brucella* vakaların çoğundan en invaziv ve virulent tür olan *B.melitensis* sorumludur (20). Etken insanlarda da oldukça ciddi infeksiyonlara sebep olmaktadır. Virulans yönünden *B.melitensis*' i *B.suis* ve *B.abortus* izler. Etken koyunlarda infeksiyonla birlikte abort meydana getirir. İnfekte hayvanlarda abortun meydana gelmesi ile plasenta ve fötüsle birlikte çevre kontamine olur ve hastalığı taşımayanlar için risk oluşturur (21). Gebe koyunlar infeksiyona daha duyarlıdır (18). Hayvanlar kontamine plasenta ve fetus ile temas edilmesinin ardından infeksiyona kısa sürede yakalanırlar. Gebe hayvanlarda infeksiyon sonucu yavru atmalar gözlenir. Keçiler infeksiyona koyunlardan daha duyarlıdır ve yıllarca persistent infekte kalabilirler (22). *B. melitensis* koyun ve keçilerin yanı sıra insan ve sığırlarda da hastalığa sebep olduğu gibi sporadik abortlara da neden olur. Buna ek olarak infekte sığırlarda kolostrum ile etken yavruya geçer ve subklinik şekilde hastalığı taşırlar. Brucellosis hem evcil hem de yabani hayvanlarda görülmektedir. Üç klasik tür olan *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. suis* ' in tercih ettiği primer konakçılar dışında diğer konakçı türlerde de infeksiyon oluşturabilirler. *B. ovis*, *B. canis* ve *B. neotomea* ' nın infekte ettiği konakçı türleri primer konakçılarının dışında sınırlıdır. *B. abortus* ' un birincil konakçıları evcil ve yabani sığırlardır. Ancak etkenin koyun ve keçileri, domuzları, atları, vahşi ruminantları, develeri ve kedi ve köpekleri infekte ettiği bildirilmektedir. *B. melitensis* ' in birincil konakçıları koyun ve keçilerdir ancak etkenin sığırları, domuzları, vahşi hayvanları, kedi ve köpekleri infekte ettiği bilinmektedir (19).

Brucellosis' de bulaşma başlıca sindirim, konjunktiva, deri, çiftleşme ve sağım sırasında memenin kontaminasyonu ile meydana gelir. İnfeksiyon kaynakları arasında atık yavru ve

yavru zarları, uterus akıntıları, süt ve sperma bulunmaktadır. Etkenin geçişi anadan yavruya, gebelik döneminde plasenta yolu ile laktasyon döneminde de süt ile olmaktadır. İnfeksiyonun yayılımı, hayvan hareketleri ve direkt temas ile meydana gelir. İnfekte hayvana ait abort materyalleri ve diğer akıntılar, direkt temas ve hava yolu ile etkenin alınması, sürüdeki hayvanların hastalanmasına neden olur (23). Etkenin sütle atılımı en az iki laktasyon periyodu boyunca sürebilmektedir. Koyun ve keçilerde etkenin vaginal yolla atılımı sığırlara oranla fazla ve daha uzun olup süt verimindeki düşüş de genelde sığırlara oranla daha fazladır. Sığırlardaki infertilite ise koyun ve keçilere göre daha fazladır (24).

Brucellosis, Akdeniz Zoonoz Kontrol Programı (Mediterranean Zoonose Control Program; MZCP)'na bağlı ülkelerin çoğunda ve ülkemizde sağlık ve sosyo-ekonomik etkileri dolayısıyla önemli zoonozlarından biridir. Koyun ve keçi brucellosis' i Uluslararası Salgın Hastalıklar Ofisi (Office International des Epizooties; OIE)' nin çoklu türlerin hastalıkları adı altındaki listede yer almaktadır (25- 27). Hayvanlarda uygulanan kontrol ve eradikasyon programları sonucunda insanlardaki brucellosis insidensinde azalma meydana gelmiştir (28).

Koyun ve keçilerde *B.melitensis*' in neden olduğu brucellosis Akdeniz, Orta Doğu, Batı Asya, Afrika, Latin Amerika ülkelerinde ve ülkemizde ciddi klinik semptomlarla seyreden multisistemik bir hastalıktır (29). Rusya' da *B. melitensis* ilk 1930 yılında izole edilmiştir. Japonya' da 1930' ların ortasında *B. melitensis* izolasyonu yapılmıştır (30). Etken Amerika da Malta' dan New York' a ihraç edilen keçiler aracılığı ile 1905 yılında görülmüştür (31). İkinci Dünya Savaşı sırasında insan hareketleri ve yiyecek taşınması sırasında özellikle koyunlarda *B. melitensis* infeksiyonu Slovenya, Almanya, Doğu Avrupa ve Rusya' da başlamıştır. 1960 yılında Moğolistan' da insanlarda *B. melitensis*' e bağlı yüksek insidensle seyreden infeksiyon rapor edilmiştir. Basra Körfezinde 1980 yılında yüksek insidensle seyreden infeksiyon ortaya çıkmıştır. İran' da ve diğer petrol zengini ülkelerdeki koyun çiftliklerinde brucellosis nedeni ile ciddi problemler meydana gelmiştir. Suudi Arabistan' da hastalık 38,000 koyunu etkilemiş ve hayvan bakıcılarındaki sero-pozitiflik % 24 olarak bildirilmiştir (30, 32, 33). Koyun ve keçilerdeki *B.melitensis* infeksiyonları OIE' nin hastalıklar listesinde yer alan ve beş kıtada görülen bir hastalıktır. Güney Afrika' da 1996-2003 yılları arasında hastalık Angola, Etopya, Kenya ve diğer bazı bölgelerinden bildirilmiştir (34, 35). Okyanus ülkelerinden 1993 yılında Guam, 2000 yılında Fransız Polinezyasından hastalık bildirilmiş, diğer ülkelere hastalık bildirimi olmamıştır. Güney Asya ülkelerinde Hindistan, Pakistan ve Bangladeş' de endemik, bazı

Güney-Doğu Asya ülkelerinde Malezya, Tayland ve Burma' da sporadik şekilde görülmektedir. Moğolistan' da yoğun, Asya kıtasındaki ülkelerde endemiler şeklinde görülmektedir. Latin Amerika ülkelerinde Meksika, Peru, Arjantin' de düzenli olarak hastalık rapor edilmektedir. Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Kosta Rika, Dominik Cumhuriyetinde de hastalığın şu anda bulunduğu bildirilmiştir (2, 36). Sığırlarda görülen *B.melitensis* infeksiyonları Güney Avrupa ülkelerinde, İsrail, Kuveyt ve Suudi Arabistan ile ülkemizde ciddi problem oluşturmaktadır (37). Dünya üzerinde Afrika, Amerika, Avrupa, Okyanusya ve Asya olmak üzere kıtalara göre toplam 175 ülkenin 120'sinde brucellosis görülmektedir. Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'nın *B.melitensis*' in infeksiyonu yönünden ari olduğu kabul edilmektedir (2).

Ülkemizde hastalığın prevalansını ortaya koymak için 1952-1992 yılları arasındaki 40 yıllık süreçte ülke çapında yapılan epidemiyolojik çalışma sonuçları Tablo-1' de özetlenmiştir. Ülkemiz Asya ve Avrupa arasında coğrafik konumundan dolayı geçiş noktasıdır hastalığın kontrolü hem önemli hem de zordur (17). Brucellosis ile ilgili 1997 yılında en kapsamlı çalışma Tarım ve Köyişleri Bakanlığının yaptığı projedir. Yapılan çalışma sığır ve koyun brucellosis' in prevalansının ortaya konulması amaçlanmıştır. Ülkemizdeki her ilin dörder ilçesinden tesadüfi örnekleme ile 34,458 adet sığır ve 30,433 adet koyun serum örneği alınmıştır. Toplam 64,891 adet serum Rose-Bengal testi ile taranmış; pozitif bulunan serumların Komplement Fiksasyon ile doğrulandığı belirtilmiştir. Brucellosis prevalansı sığır popülasyonunda % 1,43, koyun prevalansı % 1,97 olarak saptandığı bildirilmiştir. Sürü prevalansını belirlemek için her ilçenin dörder köyünden seçilen 1,313 baş sığır ve 1077 baş koyun sürüsünde örnek alınmış ve sığırlarda sürü prevalansı % 11.4, koyunlarda ise % 15 olarak saptanmıştır. Taranan iller arasında en yüksek prevalans Kars ilinde olduğu; sığırlarda % 20.8, koyunlarda % 15 prevalans ile ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir (38).

Brucellosis' in en önemli özelliği retikülo-histiositer sistem hastalığı olması ve belli organ ve dokulara lokalize olmasıdır. *Brucella* cinsi mikroorganizmalar vücuda girdikten sonra bölgesel lenf yumrularına ve buradan da kan dolaşımına ulaşırlar. Bakteriyemi ile organlara yayıldıktan sonra kandan yavaş yavaş çekilir ve ardından organlardaki lezyonlar ortaya çıkar. Etken zaman içinde organlardan lenf yumrularına, dalak, meme, iliosekal lenf yumruları gibi lenfoid dokulara yerleşir ve uzun süre kalırlar. *Brucella* spp. özellikle memelerde, gebe uterusunda, lenf düğümlerinde, testislerde ve daha seyrek olarak eklem, tendo kılıflarında yerleşir (24).

*Brucella* spp. fötüs dokularına, maternal ve fötal membranlara karşı özel affinitesi vardır. Cinsel olgunluğa erişmemiş hayvanlarda, mikroorganizmalar meme ve uterusu yerleşme eğilimi göstermesine rağmen kısa süre içinde lenf yumrularına lokalize olabilir. Gebe olmayan bir hayvanın uterusuna yerleşmez. Gebe olmayan ergin hayvanlarda meme, meme lenf yumruları, uterus, dalak ve karaciğer gibi organlara etken yerleşebilir. Eğer hayvan gebe kalırsa, memeden orijin alarak bakteriyemi oluşur. *Brucella* cinsi mikroorganizmaların dışı üreme sistemi doku ve organlarına duyduğu afinitesinin sebebinin, bu bölgedeki yüksek eritritol içeriğine bağlı olduğu bildirilmektedir (39). Eritritolun sığır, koyun, keçi ve domuz gibi brucellosisdeki akut plasentitise duyarlı hayvanların plasentasında bulunduğu ve dolayısı ile *Brucella* spp. için üreme stimulanı olduğunu belirtilmiştir (16). Gebe hayvanların uterusunu istila eden mikroorganizmalar fötusa ait koriyonik villi epitellerinde ürer ve buradan korion ile uterus mukozası arasına yerleşir. Villilerde yağ dejenerasyonu ve otoliz meydana gelir. Fibrinopruilent eksudat fötal ve maternal zarlar arasındaki bağlantının gevşemesine, fötal membranların ayrılmasına ve yavrunun atılmasına yol açar. Bazen fötal membranın ayrılması sadece yavrunun ölümüne neden olur ve içeride mumifiye olur. Yavrunun etrafı kalın ve yapışkan bir eksudantla çevrilidir. Eğer infeksiyon gebeliğin son döneminde meydana gelmiş ise fötüs doğabilir fakat yavru, septisemi ve konstitusyonel bozukluklar sonucu ölür. Yavru yaşayabilirse, hastalığa karşı bir bağışıklık olmadığından cinsel olgunluğa geldiğinde infeksiyona karşı duyarlıdır ve klinik semptom göstermeyebilir (24) .

*Brucella* spp. dişi ve erkek üreme sistemine lokalizasyonu ile en önemli klinik semptomu dişilerde abort ve erkeklerde infertilitedir (40). Brucellosis' in en belirgin klinik semptomu gebeliğin son döneminde atıklar ve plasenta retensiyonu, erkeklerde ise orşitis ve epididimitisdir. İnfeksiyonun lokalizasyonuna göre hygroma, artrit, metritis, vulvo-vajinitis, bronşitis, parezi, keratit oluşabilir (41, 42).

Brucellosis dünyada ve ülkemizde insanlarda en yaygın gözlenen zoonotik infeksiyonlardan biridir (43). İnsanlarda akut ateşli bir hastalık tablosu meydana getirir. Hastalık kronik forma dönüşerek iskelet, kardiyovasküler ve merkezi sinir sisteminde ciddi komplikasyonlara yol açabilir. Daha az oranda endokarditis sonucu ölüm meydana gelebilmektedir. Merkezi sinir sisteminin etkilenmesi ile genellikle meningoencephalitis (44, 45) ortaya çıkar ve ek olarak subaraknoid hemoraji ve myelitis meydana gelir (41, 46, 47). Etkenlerin identifikasyonu ve tiplendirilmesi bakteriyolojide kullanılan birkaç klasik test esasına dayanan biyotiplendirme, oksidatif metabolizma ve boyaların bakteriyostatik etkisine bağlı olarak gerçekleştirilen testlerle yapılır. En çok kullanılan teknikler arasında,

ürez testi, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S oluşumu, thionin ve bazik fuksin' in bakteriyostatik etkilerinin incelenmesi bulunmaktadır. Ek olarak bakteriyofaj duyarlılıklarının belirlenmesi ile biyotiplendirilmesi yapılmaktadır. Brucellosis' in laboratuvar teşhisi, genellikle serolojik testler kullanılarak yapılmaktadır. Serolojik taramada infekte hayvanların hepsini saptamak mümkün olmadığından en az iki hafta ara ile üç serolojik metodun ve allerjik muayene uygulanması tanı konulabilir. Serolojik teşhiste çabuk veya yavaş aglutinasyon, Komplement Fiksasyon, Rose Bengal Plate Test, Coombs (antiglobulin) test, süt serumu ile yapılan aglutinasyon, mukusla yapılan aglutinasyon, sperma ile yapılan aglutinasyon, ELISA (Enzymes Linked Immun Sorbent Assay), floresans antikor tekniği ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi teşhis metodlarından yararlanılmaktadır.

Türkiye' de 1980-1995 (ilk 6 ay) yılları arasında brucellosis odak sayısı *B.abortus* için 261, *B. melitensis* için 1481 olmak üzere toplam 1742 adet olarak bildirilmiştir (Tablo-2). Ulusal *Brucella* Kontrol ve Eradikasyon projesi 1983 yılında başlatılmış ve 4-8 aylık dişi sığırların *B.abortus* S19 aşısı ile aşılması, 3-8 aylık kuzu ve oğlakların ise *B. melitensis* Rev. 1 aşısı ile 26 yıl boyunca aşılması planlanmıştır. Bu proje kapsamında 1983-1995 yılları arasında 6,782,500 baş buzağı ve 63,550,000 baş küçük ruminant aşılanmıştır. Ergin aşılamasına pilot bölge olarak 1991 yılında Trakya bölgesinde başlanmış, 124,000 baş ergin sığır ve 884,000 baş ergin koyun ve keçi aşılanmıştır. 1995 yılı sonunda toplam 517,000 baş ergin sığır ve 3,900,700 baş ergin koyun ve keçi aşılanmıştır. 1983-1995 yılları arasında sahaya sevk edilen aşı sayıları Tablo-3 verilmiştir (17).

Tablo-1 Türkiyede 1952-1992 yıllarında brucellosis prevalansı

Yıllar	Koyun %	Yıllar	Sığır %
1952-1963	2,6	1957-1970	4,4
1960-1970	5-9	1957-1986	1,6
1989	1,26	1989	3,56
1990	2,08	1990	1,20
1991	1,83	1991	1,01
1992	1,48	1992	0,6

Tablo-2 Türkiye’ de 1980-1995 yıllarında sığır ve koyun brucellosis odak sayıları

<b>Yıllar</b>	<b><i>B.abortus</i></b>	<b><i>B.melitensis</i></b>	<b>Toplam</b>
1980	8	-	8
1981	16	-	16
1982	22	22	44
1983	35	129	164
1984	41	191	232
1985	32	98	130
1986	16	77	93
1989	15	97	112
1990	23	152	175
1991	16	185	201
1992	18	170	188
1993	6	237	243
1994	11	97	108
1995 (ilk 6 ay)	2	26	28
Toplam	261	1481	1742



Tablo-3 Türkiye’ de 1983-1995 yılları arasında uygulamada kullanılan *Brucella* aşı dozları

<b>Yıllar</b>	<b><i>B.abortus</i> S19 genç aşı</b>	<b><i>B.melitensis</i> Rev. 1 genç aşı</b>	<b><i>B.abortus</i> S19 ergin aşı</b>	<b><i>B.melitensis</i> Rev. 1 ergin aşı</b>
1983	98,000	1,200,000		
1984	250,500	9,350,000		
1985	343,000	4,700,000		
1986	481,000	5,000,000		
1987	776,000	6,400,000		
1988	725,000	5,700,000		
1989	783,000	6,900,000		
1990	809,000	6,600,000		
1991	707,000	6,000,000	124,000	884,000
1992	674,000	5,500,000	168,000	1,001,000
1993	391,000	3,500,000	50,700	715,700
1994	325,000	2,700,000	175,000	1,300,000
1995	420,000	3,000,000	2,000	600,000
<b>Toplam</b>	<b>6,782,500</b>	<b>63,550,000</b>	<b>517,700</b>	<b>3,900,700</b>

Brucellosis, Besin ve Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization; FAO), WHO ve OIE tarafından dünyadaki en yaygın zoonoz olarak bildirilmektedir. Brucellosis'in bulaşıcılığı, hayvan ve insan sağlığına zarar vermesi ve ekonomik kayıplara neden olması hastalığın önemini arttırmaktadır. Orta Doğu'da yapılan serolojik taramalarda, *B. melitensis* ve *B. abortus*'un neden olduğu infeksiyonların sığır ve küçük ruminantlarda yüksek insidensle seyrettiği ve sığır ve develerdeki *B. melitensis* yaygınlığının arttığı gözlenmiştir (20,48).

Brucellosisin ekonomik ve zoonotik önemi bakımından endemik bölgelerde küçük ruminantlar için kontrol stratejisi önemlidir. Zoonotik hastalıklara karşı kontrol programı kapsamında izleme programı oluşturulmalı ve program hayvanlara ait sahadan tüm bilgileri içermelidir. Hastalığın prevalansını ortaya koyarak hastalığı kontrol altına almak için takip sistemi hazırlanmalıdır (3). Zoonotik infeksiyonların kontrolünde amaç, hayvan popülasyonunda hastalığın insidensi ve prevalansını kabul edilebilir seviyeye çekmek böylece hastalığın insan sağlığı ve bölgenin ekonomisine olan olumsuz etkisini minimum seviyeye indirmektir (49). Toplanan verilerle, takip sisteminin durumu, etkinliği, uygunluğu ve verimliliği sürekli değerlendirmelidir. Zoonoz hastalıklara karşı uygulanan programlarda kesim yapılması nedeni ile fazla sayıda hayvan kaybı olacağı için ekonomik yönden önemlidir. Takip programı oluşturup finansal kaynaklar düzenledikten sonra uzun süreli politika olarak genç hayvanların aşılması, test ve kesim ile kombine edilmelidir (3, 50). Kontrol programlarını bir pilot proje ile bir bölgede uyguladıktan sonra yaygın bir eradikasyon programına genişletmenin daha uygun olacağı bildirilmektedir (51).

Brucellosisin kontrol programları için uygulanacak stratejiler;

1. İmmünizasyon ile hastalığın sınırlandırılması,
2. İnfekte hayvanların test ve kesimi ile brucellosis' den ari sürü ve bölge haline getirilmesi,
3. Hayvanlar arasındaki yayılım önlenmesi ve brucellosisten ari sürü ve bölgelerin izlenmesi olarak üç ana başlık altında toplanmaktadır.

1- Hayvanların immunizasyonu ile hayvan popülasyonu içinde infeksiyonun insidensinin ve prevalansının düşürülmesi amaçlanır. Hayvanların aşılması ile sürüler infeksiyona karşı dirençli hale getirilmiş olur. Eradikasyon programına genç ruminantların aşılması ile uzun süreli immun yanıt meydana getirilir. Bu uygulamayı 5-7 yıl süreli ergin hayvanların da içinde bulunduğu sürü aşılması izlemelidir. Sürü aşılması, gebe hayvan dışındaki diğer hayvanları brucellosis' e karşı bağışık kılmak için, özellikle hastalığın yüksek prevalansda görüldüğü bölge veya sürülerde yapılmalıdır. Böylece insan ve

hayvan sağlığı ile hayvansal ürünlerdeki risk minimuma indirilmiş olur (3). Moğolistan’ da 2000 yılından beri uygulanan aşılama programında tüm ergin hayvanların 6 yıl için iki kez aşılması ve 10 yıl süre ile bir yaşın altındaki tüm gençlerin aşılması yapılmaktadır. Bu program kapsamında 2002 yılı itibari ile koyunlardaki hastalığın prevalansı % 0,4 ve sığırlarda ise % 0,8 olarak bildirilmiştir (52). Genellikle hastalığın prevalansı % 5 üzerinde ise genç ve ergin hayvanlarda genel aşılama yapılması önerilmiştir.

2- Takip eden uygulama, test ve kesimi içeren eradikasyon programıdır. Program uygulanırken survey ve hayvan hareketlerinin sınırlandırılması yapılmalıdır (3). Hastalığın prevalansı % 1-5 arasında ve eğer finansal kaynaklarda yeterli ise genç hayvanlarda aşılama, test ve kesim bir arada yapılması önerilmektedir. Prevalans % 1 altında ise kısa süreli program sadece test ve kesim olmalıdır. Hastalığın kontrolündeki genel uygulama, aşılama ile hayvan popülasyonundaki hastalığın insidensinin ve prevalansının sınırlandırılması ve eradikasyon sırasında hastalığın söndürülerek ortadan kaldırılmasıdır.

3-Hastalığın hayvanlar arasında yayılımının önlenmesi, brucellosisten ari sürü ve bölgelerin izlenmesi için ari bölgelere hayvan giriş çıkışlarının sınırlandırması büyük önem taşımaktadır. Hayvan sürülerinde referans testlerle arilik belgelenmelidir. Sadece sertifikalı hayvanların girişlerine izin verilmelidir. Çeşitli kampanyalarla brucellosisten ari olan yerlerde destekleme yapılması olumlu sonuçlar vermektedir. Final döneminde ise zorunlu eradikasyon gerekli olmaktadır.

Eradikasyon programları çeşitli hayvan çiftlikleri, coğrafik bölgeler, finansman, teknik ve personel kaynakları, hastalığın prevalansı gibi tüm faktörler göz önünde bulundurularak planlanmalıdır. Çiftçiler kontrol programının bütün avantajları hakkında ve özellikle hastalığın eradikasyonun kendileri ve hayvanların sağlığı açısından önemi ve ekonomik yararları hakkında bilgilendirilmelidir (3, 49, 52).

Dünyadaki yaygınlığı ve büyük sosyo-ekonomik etkisine rağmen brucellosis için ancak 20. yüzyılın ikinci yarısında kontrol ve eradikasyon programları uygulanabilmiştir (53). Paraguay’ da 1978 yılında Ulusal Brucellosis Kontrol ve Eradikasyon Programı organize edilmiştir. Program 3-8 aylık buzağılara *B. abortus* S19 aşısı uygulaması, standart brucella testleri, pozitif hayvanların identifikasyonu, çiftliklerde “*Brucella*’ dan arilik durumu” istenmesi ve hayvan hareketlerinin kontrolü başlıklarında yapılmıştır. Sığırlara 1999 yılında RB51 aşısının uygulanması için alınan karar ile aşının üretimine ve ithal edilmesine izin verilerek programları yeniden düzenlenmiştir. Ülkede 1987 yılında 503 çiftlikten 15,553 baş süt sığırı için *Brucella*’ dan arilik sertifikası var iken, 1998 yılında bu 1740 çiftlikten 22,020 baş hayvan sayısına ulaşmıştır. Program uygulanırken:

1. Besi çiftliklerinde: aşılama ve hayvan hareketlerinin kontrolü,
2. Süt çiftliklerinde: prevalansı % 3 altındaki sürülerde hasta hayvanların kesilmesi, % 3 üzerindeki prevalansda hasta hayvanların kesilmesi ve aşılama yapılması,
3. Süt hayvanlarında *Brucella*' dan Arılık Sürü Sertifikasının yaygınlaştırılması amaçlanmıştır.

Bu düzenlemeler ile sürülerdeki negatif hayvan sayısı 1979' da % 33,1' den 2000 yılında % 92,1 yükselmiştir. Şüpheli hayvan sayısı aynı yıllar arası % 32,5 den % 1,4 düşmüştür. 1979 yılında sığırlardaki *B. abortus*' un prevalansı % 34,4 düzeylerinde iken 2000 yılında % 3,15 düzeyine gerilemiştir (54).

Portekiz' de *B. melitensis* enfeksiyonuna karşı koruma ve eradikasyon programı için ilk uygulama 1971 yılında FAO/WHO uzman komitesinin tavsiyesi üzerine *B. melitensis* Rev. 1 aşısı ithal edilerek başlamış ve devlet çiftliklerindeki keçiler aşılanmıştır. Ülkenin Avrupa Birliğine girişine kadar aşılama çalışmaları sistematik olarak yapılmamıştır. Avrupa Birliğinin 1991 yılında finansı ile 3 yıllık periyod ile küçük ruminant eradikasyon programı hazırlanmış ve prevalansı % 2' den fazla olan sürülerde 3-6 aylık genç hayvanların aşılanması planlanmıştır. Bu sürülerde test ve kesim yeteri düzeyde yapılamadığı için 1996 yılında hastalık oranında artış gözlenmiştir. 1999 yılında yüksek insidensle seyreden hastalık için aşılama programı ile birlikte eradikasyon programına test ve kesim eklenerek yeniden yapılandırılmıştır. Ülkedeki durum 2000 yılında Avrupa Birliği Gıda Veteriner Ofisi tarafından incelenmiş ve en az 5 yıl süre ile genç hayvan aşılamasının yapılması için destek verilmiştir. Aynı yıl Portekiz' de Tras-os-Montes bölgesinde hastalık prevalansı % 8,9 ve sürü prevalansı % 43' e ulaşmış ve uygulanan program ile hastalık prevalansı % 6,24 ve sürü prevalansı % 34,95 oranına inmiştir (55-57).

Cezayir' de 1984 yılında koyun-keçi brucellosis' i yüksek oranda abortlarla kendini göstermiştir. Batı Wilayas bölgesinde 1986-1989 yılları arasında sero-pozitiflik koyunda % 2,2 ve keçilerde ise % 12, sürü prevalansı koyunlarda % 43,5 ve keçilerde ise % 42' ye ulaşmıştır. Aynı dönemde 600' den fazla insanda brucellosis vakası bildirilmiştir. Ülkede 1995 yılında hayvanlara test ve kesim uygulaması yapılmış fakat başarılı olmamıştır. Sadece 3 yıllık periyot ile uygulanmak üzere sürü aşılaması uygulamaya konulmuştur.

Tunus' da 1991 yılında keçi sürülerinde brucellosis prevalansı % 61 ve koyun sürülerinde ise % 30 olarak bulunmuştur. İnfekte sürülerde % 15-20 oranında abort gözlenmiştir. Bu dönemde 400' den fazla insan vakası bildirilmiş ve % 85 oranında hastalık kaynağı olarak çiğ süt ve süt ürünleri sorumlu tutulmuştur. Tüm sürülerde yaşa

bakılmaksızın *B.melitensis* Rev. 1 aşısı ile konjuktival yolla sürü aşılması yapılmış ve 1991 yılında hastalığın yayılması durdurulmuştur.

İran' da brucellosis kontrol programı 1983 yılında başlatılmıştır. Koyun ve keçi sürüleri iki gruba ayrılmış birinci gruba sürü sistemi uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamada serolojik taramalar RBPT (Rose Bengal Plate Test) ve SAT (Serum Aglütinasyon Testi) testleri ile yapılmış, hastalık taşımayan hayvanlara küpe takılmış ve pozitif hayvanların sahiplerine bedeli ödenerek kesime gönderilmiştir. Programda ayrıca genç hayvanların *B.melitensis* Rev. 1 aşısı ile aşılması yapılmıştır. 1983-1996 yılları arasında test ve kesim ile infeksiyonun oranı % 3,2' den % 0,5' e kadar inmiştir. İkinci grup hayvanlara büyük sürü sistemi uygulaması yapılmıştır. Bu uygulamada genç hayvanlar aşılanmış, fakat sero-pozitif hayvanlar sürüden çıkarılmamıştır. Her 5 yılda bir programın değerlendirilmesi yapılarak devam edilmiştir. Sürüdeki sero-pozitiflik 1994 yılında % 3' den % 2,2' ye inmiştir (2).

Fransa Provence-Alpes-Cote d'Azur (PACA) bölgesinde 1972 yılında brucellosis' in koyun sürülerindeki prevalansı % 100 olarak bulunmuş ve *B. melitensis* H38 aşısı ile eradikasyon programına başlanmıştır. Programa 1981 yılına kadar devam edilmiştir. 1981-1989 yılları arasında 100,000 doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı sistematik olarak genç koyunlara uygulanmıştır. Genç hayvanların aşılması ile beraber 18 aylıktan büyük ergin hayvanlara serolojik tarama ile sero-pozitif hayvanların bedelleri ödenerek kesimi yapılmıştır. *B.melitensis* Rev. 1 aşısı 1989-1994 yılları arasında subkutan yolla uygulanmış, 1995 yılından itibaren ise aşının konjuktival yolla uygulamasına geçilmiştir. Program kapsamında 20 yılın üzerinde süre ile 1,5 milyondan fazla genç koyun aşılanmış ve *B. melitensis* infeksiyonu kontrol altına alınmıştır. Brucellosis' in neden olduğu abortlar 1981 yılında % 40 seviyesinde iken 1989 yılında % 5' den düşük seviyeye indirilmiştir. Uygulanan program ile sürü prevalansı 1972-1988 yılları arasında % 60 seviyesine inmiştir. Koyunlardaki prevalans 1972 yılında % 40' dan, 1988 yılında % 3 ve en son 1995 yılında % 0,3' e düşmüştür (58).

Yunanistan' da koyun ve keçilerdeki brucellosis eradikasyon programına 1975 yılında başlanmıştır. Program 3-6 aylık genç hayvanların *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile ( $1 \times 10^9$  bakteri/ml ) dozunda subkutan aşılama yapılmıştır. Ülkede programının yerleşmesi 1992-1994 yılları arasında gerçekleşmiştir. Brucellosis' e bağlı abort oranı 15 yıl süren eradikasyon programı sonu hastalık prevalansı koyunlarda % 3,4 ve keçilerde % 2,7 seviyesine indiği bildirilmiştir. Yunanistan adalarında genç hayvanlara uygulanan aşılama programı 1993-1995 yılları arası durdurularak test ve kesim aşamasına geçilmiştir. 1998

yılı sonunda genç ve ergin koyun ile keçilerde *B.melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival yolla  $1 \times 10^9$  bakteri/ml uygulanmasına başlatılmıştır. Bu bölgelerde program 2004 yılı başına kadar 99,808 sürüde 10,013,722 baş hayvan aşılanarak tamamlanmıştır. Hastalık sürülerde endemiler şeklinde görülmüş, kesim ve test sistemi tam olarak uygulanamadığından insan ve hayvanlarda hastalığın insidensinin ve prevalansının yeniden artığı bildirilmiştir (59).

Hastalıkla ilgili olarak yapılacak kontrol programında aşılama hedefleri süreye bağlı olarak 3 kategoride ele alınmaktadır. Bunlar;

1-Uzun süreli (15-20 yıl); insan ve hayvanlarda hastalığın elimine edilmesi.

2-Orta vadede (8-12 yıl); insan ve hayvanlarda hastalığın aşılama ile düşük seviyelere kadar indirilmesi.

3-Kısa süreli (6-12 ay); bölgesel ve ülkesel programın koordine ve formüle edilmesi olarak açıklanmıştır (48).

Brucellosis' in bölgesel temelde yapılacak çalışmalarla epidemiyolojik verilerinin izlenmesi hastalığın kontrol programlarının oluşturulmasında büyük önem taşımaktadır. Ülkemizde koyun *Brucella* eradikasyon ve kontrol programı, 1952 yılında devlet çiftliklerinde test ile reaktör hayvanların saptanması ve kesime sevk edilmesi ile başlamıştır. Brucellosis' e karşı aşılama ile daha iyi sonuç alınacağı anlaşılmış ve 1968 yılında devlet çiftlikleri ile bazı özel çiftliklerde *B.melitensis* Rev. 1 ile genç ve ergin koyun ve keçilerde *Brucella* aşılama programı başlatılmıştır. Brucellosis' e bağlı abortlar 1968 yılında % 7,3 düzeyinde iken 1969 yılında % 0,57 seviyesine düşmüştür. Devam eden yıllarda ise oran sifıra yakın bir seviyeye ulaşmış buna karşın kuzulama oranında % 15- 25 artış gözlenmiştir. Özel çiftliklerin aşılanması 1974 yılında başlamış ve ilk 5 yıllık süre içinde 1,5 milyon koyun ve keçi aşılanması yapılmıştır. 1983 yılında 26 yıllık Ulusal Brucellosis Kontrol ve Eradikasyon Projesi başlatılmıştır. Hastalığın görüldüğü sürülerde ergin dişi koyun ve keçilerin azaltılmış doz *B.melitensis* Rev. 1 aşısı ile ( $5-10 \times 10^4$  bakteri/ml) aşılama programına 1991 yılında pilot bölge olarak Trakya' da başlanmıştır ve uygulanan program ile 884,000 adet dişi koyun ve keçi aşılanması yapılmıştır. 1995 yılı sonunda toplam 3,900,700 milyon dişi koyun ve keçi ( $5- 10 \times 10^4$  bakteri/ml) dozunda aşılanmıştır. Bu programda 1983-1995 yılı arasında 63,550,000 doz genç *B.melitensis* Rev.1 aşısı, 3,900,700 doz ergin *B.melitensis* Rev.1 aşısı uygulanmıştır (17).

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı 2006 yılı için *Brucella* aşılama programında 1,532,495 adet genç koyun-keçi aşılanması ve 1,370,258 adet ergin koyun-keçi aşılanması programlanmıştır (60). Bakanlığın 2006 verilerine göre koyun brucellosis' in prevalansı % 1' in üzerinde

olan 36 ilimiz, sığır brucellosis prevalansı % 1' in üzerinde olan 22 ilimiz bulunmaktadır (61). OIE verilerine göre ülkemizdeki brucellosis' in yıllara göre durumu Tablo-4' de verilmiştir. Brucellosis vakalarının son yıllarda dikkat çekici oranda arttığı görülmektedir (62).

Tablo-4 Ülkemizde yıllara göre koyun-keçi brucellosis' in durumu\*

Yıllar	Vaka	Hasta	Ölüm	İmha	Kesim	Aşılama
1996	52	506	165			2,438,292
1997	26	264	102			2,769,354
1998	35	389	36		20	2,331,000
1999	32	178	117	2		2,353,000
2000	60	1161	336	1		
2001	71	842	269	15		2,753,894
2002	78	778	317		233	1,799,553
2003	90	947	204		145	2,172,037
2004	143	1980	343		1667	174,312

\*OIE web sitesinin hastalıklara ait bilgi tabanından (HANDISTATUS II) alınmıştır.

Ülkemizde Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü (KKGM) Hayvan Sağlık Zabıtasına göre; koyunlarda son 5 yılda hastalık çıkan yerler ile prevalansı % 1'in üzerinde olan illerde 3-8 aylık dişi-erkek kuzu ve oğlakların tümüne tam doz genç *B.melitensis* Rev.1 aşısı uygulanmaktadır. Hastalık çıkan yerlerde sağlıklı koyun ve keçilerde ergin *B.melitensis* Rev.1 aşısının uygulanması ve 12 ay sonra aşılamanın tekrar edilmesi zorunlu kılınmıştır. Ülkemizde koyun ve keçilerdeki brucella aşılama çalışmalarında;

a- 8 aylığa kadar olan genç koyun ve keçilerde genç *B.melitensis* Rev.1 aşısının 1-3x 10<sup>9</sup> bakteri/ml dozunda subkutan yol ile,

b- 8 aylıktan büyük koyun ve keçilerde ergin *B.melitensis* Rev. 1 aşısının 5-10x 10<sup>4</sup> bakteri/ml dozunda subkutan verilmesi olmak üzere iki farklı dozda uygulaması bulunmaktadır (60).

Eradikasyon çalışmalarında başarısız olunmasında kaliteli aşı ve uygun aşılama

yöntemleri önemli iki faktördür. Uygulama için güvenli ve uygun aşı seçilmelidir (63). Canlı attenué *B. melitensis* Rev.1 aşısı ile yeterli immunizasyon sağlanmasına karşın, aşılanmış hayvanların uzun süreli sero-pozitif kalması nedeni ile infeksiyonun tanısında serolojik testlerin kullanımını kısıtlamaktadır (64). Serolojik testler; eradikasyon programında hastalık taşıyan hayvanların taranması sırasında önemli olmaktadır (65). Klasik S formundaki aşılardan (*B.abortus* S19 ve *B. melitensis* Rev. 1) eradikasyon programında yarattığı bu soruna karşı yeni alternatif aşı çalışmaları yapılmıştır (57, 66-69). İnaktif aşı çalışmalarında genç ve ergin koyun ve keçiler için *B.melitensis*-53H38 ve benzerleri bakterilerden hazırlanan aşılarından yeterli immünite elde edilememiştir. *B. melitensis* H38 aşısı; smooth formunda ve formaldehit ile inaktive edilerek mineral yağ adjuvantlı formda hazırlanmıştır. Brucellosis nedeni abortlara karşı koruma sağlamıştır ama istenmeyen lokal reaksiyonlar meydana gelmiştir. Canlı attenué *B.melitensis* Rev. 1 aşısı ile kıyaslandığı zaman yetersiz immünite meydana geldiği ve rapel uygulanması gerektiği bildirilmiştir (51, 63, 65, 70-72). İnaktif aşı çalışmalarında *B. abortus* 45/20 aşısı dışındakilerin kullanımını aşının maliyeti, yetersiz immünite ve serolojik problem nedenlerinden dolayı sınırlı olmuştur. *Brucella* spp.' nin farklı antijenik fraksiyonlarına ait ekstraksiyonları adjuvantlar ile birleştirilerek aşı çalışmaları yapılmıştır (71, 73, 111). Yapılan denemeler; ölü hücre, dış membran proteinleri (OMP) (71, 74-79), erimeyen hot SDS hücre zarı ekstraktları (80), *Brucella*' nin eriyen antijenleri, kimyasallarla modifiye *Brucella* proteinleri, S ve R karakterde LPS (81-83), rekombinant Cu-Zn süperoksit dismutase (16) ve sentetik peptid uygulamaları laboratuvar hayvanlarında denenmiş ancak etkinlik ve immünite yönünden çok azı başarılı olmuştur. Eradikasyon programlarında *B.abortus* S19 aşılması sonucu meydana gelen aglutine edici antikorların uzun süre kan serumunda 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 denemeler ile S formuna dönme eğilimi olması ve stabil kalmadığı gözlenmiştir. Saha uygulamalarında bu özelliğinden dolayı tercih edilmemektedir (71, 84, 85).

Yeni *B. melitensis* aşılı canlı veya subzellüler aşı olarak isimlendirilen *B.abortus* RB51 ve *rfbK* aşılı ile keçiler üzerindeki yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunduğu bildirilmiştir (86, 87). *B.abortus* RB51 aşısı *B. abortus* 2308' in rifamisine dirençli mutant türüdür (46, 88). *B. abortus* RB51 ile fare üzerinde yapılan çalışmalarda *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* ve *B. ovis*' e karşı koruyuculuğu ortaya konulmuştur (71). *B. abortus*



RB51 ve *rfbK* aşılarının sığırlarda serolojik taramaya engel olmadığı ve abort meydana getirmediği bildirilmiştir (26, 89, 90). Debagues ve arkadaşları *B. abortus* RB51 aşısının koyunlar üzerindeki çalışmasında tek doz aşılama yapılması durumunda yeterli immunité meydana getirmediği daha fazla saha çalışması gerektiği bildirmektedirler (91). Cloecaert ve arkadaşları *B. abortus* RB51 aşısı ile keçiler üzerinde yapılan çalışmada *B. melitensis* infeksiyonuna karşı koruduğu fakat bir aşılama programı ile deneme çalışması yapılması gerektiğini ortaya koymuşlardır (71). *B. abortus* RB51 aşısının etkinliği ile ilgili sorular hala devam etmektedir (65, 86). *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 (92, 71). Brucellosis' e karşı hayvanlarda etkili koruma sağlamadığı için *B. abortus* 45/20 ve *B. melitensis*-53H38 gibi aşuların kullanımı bırakılmıştır. Koruyucu immunitéyi sağlayan epitoplara ve adjuvantlara ile ilgili yeni bilgiler inaktif veya subcellüler aşı çalışmalarını artırsa da canlı attenué *B. melitensis* Rev.1 aşısı ile kıyaslandığında yeterli immunitéye sahip olmadığını göstermiştir (65).

Çin' de canlı aşı çalışmalarında *B. suis*' in mukoid türeindeki "M aşısı", *B. abortus*' un mukoid türeli olan 104-M aşısı, *B. suis*2, *B. canis* ve *B. melitensis* Rev.1 aşuları ile sığır, koyun, keçi, geyik ve domuzlarda oral aşılama çalışmaları yapılmış yeterli aşı etkinliği sonuçları alınmamıştır (71, 72). Oral aşılama ile yapılan denemelerde öncelikle düşük virulens de aşı seçilerek çevre kontaminasyonun engellenmesi ve uygulama sırasında vermek istenen dozun çok iyi ayarlanmasının gerektiği bildirilmiştir (93). Diğer yandan aşının oral uygulama yolu ile verilmesi sırasında hayvanların yüksek doz aşı alabileceği ortaya konulmuştur. Aşının su içinde uygulaması sırasında bazı hayvanlar tarafından yeterli oranda alınmadığı için gerekli immunizasyonun meydana gelmediği ortaya konulmuştur (94, 95).

DNA aşuları ile intrasellüler patojen olan *Brucella*' ya karşı immünitenin sınırlı oranda da olsa sağlandığı bildirilmiştir (96). DNA aşılarının kullanımına yönelik koyunlar üzerinde yapılacak denemelerle, aşı etkinliğinin saha çalışmaları ile ortaya konulması gerekliliği ortaya konulmuştur (97, 98, 99). İleri düzeyde koruyucu antijenlerin kodlanıp yeni DNA aşılarında kullanılması ile yapılacak denemelerde aşuların etkinliğinin daha açık hale geleceği bildirilmiştir (71, 96, 100, 101).

Yeni jenerasyon inaktif aşular, DNA tabanlı veya canlı aşular hedef türler için geliştirilse de, 1957 yılında virulent suş 6056' nın iki aşamalı mutasyonu sonucu Elberg ve Herzberg tarafından geliştirilen *B. melitensis* Rev. 1 aşısı günümüzde koyun ve keçilerde

en etkili aşı olarak halen kabul edilen ve yaygın olarak kullanılan aşıdır (102-104).

Buna karşın aşının subkutan uygulaması ile sistematik yan etki olan abort ve aşuya bağlı uzun süreli sero-pozitiflik riskleri bulunmaktadır. Bu risklere çözüm olarak son yıllarda aşının azaltılmış dozu ile konjuktival uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (105).

*B.melitensis* Rev.1 aşısı konjuktival yol ile verildiğinde aşı suşunun kolonizasyonu kranial lenfoid nodüllerinde sınırlı kalmakta ve subkutan uygulanan *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile elde edilen düzeyde immunité oluşmaktadır (105). İspanya’ da gebe koyun ve keçiler üzerinde uygulanan *B.melitensis* Rev.1 aşı çalışmasında, standart doz ( $1 \times 10^9$  bakteri/ml) aşı uygulamasına kıyasla azaltılmış doz aşı uygulaması ( $1 \times 10^8$  bakteri/ml) ile koyunlarda daha az oranda abort meydana geldiği, keçilerde ise abort gözlenmediği bildirilmiştir. Buna karşın araştırmacılar gebe koyunlar üzerinde  $10^6$ - $10^7$  bakteri/ml doz aralığındaki azaltılmış doz aşı uygulamalarının güvenli olmadığını belirtmişlerdir. Azaltılmış doz aşının konjuktival uygulama yolunun subkutan uygulama yoluna göre abort riskini azaltmadığı ve koruyucu düzeyde bağışıklık oluşturmadığı bildirilmiştir (63). Delgado ve arkadaşları (105) koyunlarda yaş ve gebelik durumuna göre, farklı yollar ile uygulanan *B.melitensis* Rev.1 azaltılmış doz aşısına karşı oluşan serolojik yanıtı incelemişlerdir. Çalışmada; 12 aylıktan küçük koyunlar, 12-36 aylık arası ve 36 aydan büyük koyunlar olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. Her grup kendi arasında üç ayrı alt gruba ayrılarak, birinci gruba  $2-3 \times 10^6$  bakteri/ml dozunda *B.melitensis* Rev.1 aşısı subkutan yol ile uygulanmıştır. İkinci grup aynı dozda konjuktival yol ile aşılanmış, üçüncü grup kontrol grubu olarak bırakılmıştır. 12-36 aylık ergin hayvanlar gebe ve gebe olmayan olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Aşılamadan sonra 4, 8, 12, 24. ve 36. haftalarda kanları alınarak RBPT, CF ve ELISA ile kontrol edilmiştir. Gebelik döneminde konjuktival yolla aşılanan hayvanların antikor titre sonuçları subkutan aşılananlara oranla düşük bulunmuştur. Konjuktival yolla aşı uygulanan 12 aylıktan küçük genç hayvanların antikor titre sonuçları ergin hayvanlardan düşük saptanmış ancak koruyucu düzeyde olduğu bulunmuştur. 12 ay ile 36 ay arası hayvanların sonuçları da benzer bulunmuştur. Subkutan yolla aşılanan hayvanlarda aşının çok hızlı bir şekilde yayıldığı ve genaralize infeksiyon meydana getirdiği, diğer taraftan konjuktival uygulama yolu ile aşılanan hayvanlarda aşı suşunun kranial lenf yumrusunda lokalize olması nedeni aşılamadan sonra meydana gelen serolojik yanıtın kısa süreli ve daha düşük düzeyde olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada farklı saha şartları ile farklı uygulama yollarının ortaya

konulmasının gerektiği bildirilmiştir. Konjuktival uygulama yolu ile aşılama periferik etkiler sınırlıdır. Gebe hayvanlarda *B. melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival uygulaması ile abort meydana gelmediği veya çok düşük oranda olduğu bildirilmiştir. Konjuktival aşılama sonrasında hastalık taramasına yönelik serolojik testler 4-6 ay sonra uygulanabilmektedir. Konjuktival aşılamanın gebe hayvanlar, aşılama yapan uygulayıcılar ve çevre için güvenli olduğu ayrıca uygulamada kolay ve pratik olması nedeni ile kısa sürede uygulanabildiği bildirilmektedir. Kontrol programlarında test ve kesim aşamasında konjuktival aşılamanın kullanılabilmesi belirtilmiştir (13, 94, 105-107).

Brucellosis eradikasyon programlarında yer alan aşılama ilk uygulama, *B. melitensis* infeksiyonuna karşı 3-5 aylık genç dişi koyun ve keçilerin standart doz *B. melitensis* Rev.1 ( $1 \times 10^9$  bakteri/ml) aşısı ile subkutan aşılanmasıdır. Verger ve arkadaşları (5) 4 aylık gebe koyunlarda  $1 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda konjuktival *B. melitensis* Rev.1 aşısı ile 3 çiftlikte, 1039 adet gebe koyuna  $1 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda konjuktival *B. melitensis* Rev.1 aşısı uygulamışlar ve abort görülmediğini bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca gebe koyunlara gebelik döneminin ortasında  $1 \times 10^8$  bakteri/ml dozunda konjuktival aşılama yapılmış ve  $1 \times 10^9$  bakteri/ml dozunda konjuktival yolu ile aynı etkinliği gösterdiği ve gebe hayvanlarda güvenli olarak kullanılabilmesi ortaya konulmuştur. Blasco' nun (107) gebeliğin son dönemindeki koyunlarda *B. melitensis* Rev. 1 aşısı ile konjuktival yolla aşılandığında aşı süşunun sütle atılmadığını bildirmiştir. Standart doz *B. melitensis* Rev. 1 aşısının ergin gebe hayvanlarda abort oluşumu üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, azaltılmış doz olarak  $10^5$ - $10^7$  bakteri/ml doz aralığındaki uygulamaların gebe hayvanlarda abort meydana getirmeden güvenli doz olarak kullanılabilmesini bildirmiştir. İspanya' da yapılan eradikasyon programında azaltılmış doz ( $1 \times 10^4$  bakteri/ml) *B. melitensis* Rev. 1 aşısı ile ergin gebe hayvanlara subkutan aşılanmıştır ve abort gözlenmemiştir. Konjuktival *B. melitensis* Rev.1 aşısı; gebeliğin son dönemindeki koyun ve keçilerde aşı kaynaklı abort oranının minimum seviyede olduğu, laktasyon döneminde aşı süşunun sütle atılmadığı ve aşılanma sırasındaki uygulama kolaylığı ile 3 önemli özelliği bildirilmektedir (63).

Brucellosis' in eradikasyonunda başarılı olmak için hastalığın epidemiyolojik olarak taranması ve varlığının ortaya konulmasının yanı sıra hastalık riskinin görüldüğü bölgelerde hastalığa duyarlı hayvanların aşılanması ve koruyucu bağışıklık oluşturularak dirençli sürülerin oluşturulması büyük önem taşımaktadır. Hastalığın eradike edilebilmesi için aşılanma programının etkin bir şekilde uygulanması büyük önem taşımaktadır. Son

yıllarda gündemde olan azaltılmış doz *B. melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival yol ile uygulanması; aşının uygulama kolaylığı, gebe hayvanlarda aşı kaynaklı abortlarda güvenle kullanılması, aşı kaynaklı seropozitifliğin kısa olması gibi avantajlara sahiptir. Bu çalışmada ülkemizde koyun-keçi brucellosis' ine karşı korumada subkutan aşılamaaya alternatif olarak konjuktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B. melitensis* Rev.1 aşısının etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### GEREÇ

**1. *B. melitensis* Rev 1 Aşısı:** Üretim tarihi 2006 olup, 2006/2 seri no' lu; Liyofilize standart doz *B. melitensis* Rev 1 Aşısı, Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

**2. Standart Patojen Suş:** Patojen *B. melitensis* H38 (ATCC 23456) epruvasyon suşu Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

**3. Kobay:** 160 adet, 350-400 gr, Konvasiyonel üretilen Albino Guinea Pig (kobay), Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

#### 4. Besiyerleri:

**4.1 Gliserin Dekstroz Agar (GDA):** *B. melitensis* Rev. 1 aşısının sayımı, patojen suşun üretilmesi ve dalaklardan *Brucella* 'nın izolasyonu amacı ile GDA, *Brucella* Agar (Fluka-Sigma-Aldrich, 18795, Germany)' in final konsantrasyonunda % 2 Gliserin (Merck, K25433793, Germany), % 1 Dekstroz (Lab, M MC013-A, UK) , % 2-5 Steril At Serumu (Biochrom, AG S9135, Germany) içerecek şekilde hazırlandı.

Steril At Serumu, 56°C'de 30 dakika inaktive edildi. Gliserin ve dekstroz 0,25 µm membran enjektör filtreden (1520012, Orange Scientific) geçirilerek sterilize edildi.

**4.2 Benzilpenicillin içeren GDA:** Dalaklardan *Brucella* spp.'nin izolasyonu amacı ile GDA' a penisillin (Oxoid, A59558, UK) 5 IU/ml içerecek şekilde katılarak hazırlandı.

**4.3 Kanlı Agar:** Dalaklardan *Brucella* spp.'nin izolasyonu amacı ile kanlı agar (Oxoid, CM0055, UK) final konsantrasyonunda % 5 defibrine koyun kanı içerecek şekilde hazırlandı.

**4.4 Serum Dekstroz Agar (SDA):** Denemeye alınan kobayların dalaklarından, *Brucella*'nın izolasyonu amacı ile Tryptic soy agar (Fluka- Sigma-Aldrich, 22092, Germany) hazırlanıp otoklavda steril edildi ve pH 7.5 ayarlandı. Besiyeri 56<sup>0</sup>C' ye soğutuldu ve içerisine son konsantrasyonu % 5-10 olacak şekilde steril at serumu ve son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde steril dekstroz solusyonu ilave edildi. Sıcaklığı 50<sup>0</sup>C 'ye düşürüldükten sonra besiyerine Polymixin B 2,5mg/l, Bacitracin 12,5mg/l, Cycloheximide 50mg/l, Nalidixic acid 2,5mg/l, Nystatin 50mg/l, Vancomycin 10mg/l ilave edildi.

**5. Otomatik Pipetler:** 0,5-10µl, 20-200µl, 100-1000µl (Eppendorf)

**6. Vorteks:** Cat, 740116, Germany

**7. Karbondioksitli Etüv:** Heraeus, BBK6220, Germany

**8. Etüv:** Heraeus,B12, Germany

**9.Laminair Flow Cabinet:** Heraeus, HS12

**10. Hassas Terazi:** Cat, 7400116

**11. Kobay Bakım Ünitesi:** Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü İzolatör Binası

## YÖNTEM

**Kobayların Bakımı:** Çalışma Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsünde izolatör binasında yapıldı. Denemede kullanılan kobaylar deneme süresince kalacağı yere uyum sağlamaları amacı ile 15 gün öncesinden getirildi ve uyum göstermeleri sağlandı. Kobayların araştırma süresince uygun aydınlatma ve havalandırma koşullarını taşıyan bölmelerde hareket özgürlüğü olacak şekilde; yiyecek ve suyu verildi. Yemler kapalı kaplarda kolayca alınabilecek ve idrar ile dışkı bulaşmasını asgari düzeye tutacak şekilde konuldu. Yem; ad libitum yolla tüm hayvanların yemi alması temin edildi. Hayvanlara içilebilir, kontaminasyon riski taşımayan içme suyu verildi. Sulukların temizliği ve uygunluğu günlük olarak kontrol edildi. Yeteri sayıda suluk yerleştirildi. Hayvanların altına talaş serildi ve altlıklar hayvanların kuru ve temiz kalmasını sağlayacak sıklıkta atılarak temizlikle değiştirildi. Her numunenin alımı sırasında steril petripler kullanıldı ve bekletilmeden laboratuvara getirilerek analize alındı. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından 30.06.2006 tarih ve 6 nolu kararı ile izin alınmıştır.

**1. *B.melitensis* Rev. 1 Aşısının Hazırlanması:** Liyofilize standart doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ( $1-3 \times 10^9$  bakteri/ml) 10 ml steril FTS içerisinde sulandırıldı ve 9 ml FTS içeren 9 adet steril tüp ile 10 katlı dilusyonu yapılarak son üç dilusyondan ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) üçer adet GDA besiyerine ekimleri yapıldı. Besiyerleri  $37^{\circ}\text{C}$ ' lik % 5-10  $\text{CO}_2$  içeren etüvde en az 72-96 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde koloni sayımı ile aşının mililitresinde bulunan bakteri sayısı kontrol edildi (108).

**1.1. Azaltılmış Doz *B.melitensis* Rev. 1 Aşısının Hazırlanması:** Liyofilize Standart doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ( $1-3 \times 10^9$  bakteri/ml)' nin  $10^{-5}$ ' den 1 ml alınarak tahmini doz ayarlaması yapıldı.

**1.2. Ergin Doz *B.melitensis* Rev. 1 Aşısının Hazırlanması:** Liyofilize Standart doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ( $1-3 \times 10^9$  bakteri/ml)' nın  $10^{-5}$ ' den 0,7 ml alınarak tahmini doz ayarlaması yapıldı.

**2. Standart Patojen Suşun Hazırlanması:** GDA 750ml olarak hazırlandı ve 3 adet 250 cc' lik steril şişeye bölünüp yatık agar olarak hazırlandı. Besiyeri 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ ' lik % 5-10  $\text{CO}_2$  etüvde inkübasyona bırakılarak sterilite kontrolü yapıldı. Laminar flow kabin içinde Liyofilize *B.melitensis* H38 suşunun flakonu açıldı ve içinde 3 ml steril FTS bulunan steril tüp içinde sulandırıldı. Yatık agar olarak hazırlanan 250 cc' lik şişelere 1' er ml olarak suş bölündü ve şişeler % 5-10  $\text{CO}_2$  içeren ortamda en az 72-96 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda besiyerlerinde üreyen bakteriler 5 ml steril Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) ile yatık agarın yüzeyinden toplandı.  $\text{Log}_{10}$  tabanına göre  $10^{-1}$ 'den  $10^{-18}$ ' e kadar dilusyonları hazırlandı. Tüm dilusyonlardan üçer adet GDA' ya 100µl olarak inokule edildi. Besiyerleri  $37^{\circ}\text{C}$ ' lik % 5-10  $\text{CO}_2$  içeren etüvde en az 72-96 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonunda petrilere koloni sayımı yapıldı. Epruvasyon öncesi GDA besiyerine tekrar ekim yapılarak koloni sayısı kontrol edildi (Tablo-5).

Tablo-5 Liyofilize *B.melitensis* H38 suşunun koloni sayısının belirlenme takvimi

Liyofilize Patojen <i>Brucella</i> H38 suşunun açılması ve GDA' ya ekim	14.09.2006
Bakterilerin besiyerinden toplanması ve sayım için ekim	19.09.2006
Bakteri sayımı	25.09.2006
Epruvasyon öncesi GDA besi yerine yeniden ekim	02.10.2006
Suşun sayımı ve epruvasyon	06.10.2006

### 3. Çalışma Grupları:

#### 3.1. Zararsızlık Testleri:

##### 3.1.a. Yetişkin Kobaylarda:

Konjunktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının zararsızlık kontrolü amacıyla aşağıda oluşturulan gruplara 1/10' luk dilusyonları kullanıldı. Deneme ve kontrol grubundaki kobayların 10 gün sonra otopsileri yapıldı.

1.grup (20 adet ): Azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile konjuktival aşılama yapıldı.

2.grup (20 adet ): Ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile subkutan aşılama yapıldı.

3.grup (10 adet ): Kontrol grubu (aşılama yapılmadı )

### **3.1.b. Gebe Kobaylarda:**

Gebe kobaylara konjuktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının zararsızlık kontrolü için, kontrollü olarak gebe bırakılan, 3 haftalık gebe kobaylara; aşağıda bildirilen gruplardaki kobaylara aşuların 1/10' luk dilusyonu uygulandı.

1.grup (20 adet): Gebe kobaylara azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile konjuktival aşılama.

2.grup (20 adet): Gebe kobaylara Ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile subkutan aşılama.

3.grup (10 adet): Gebe kobaylara Ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile konjuktival aşılama.

4. grup (10 adet): Kontrol grubu ( aşılama yapılmadı)

### **3.2. Bağışıklık Testleri:**

#### **3.2.1 Yetişkin kobaylarda bağışıklık kontrolü:**

Konjuktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev. 1 aşısının bağışıklık kontrolü amacıyla aşağıda oluşturulan gruplara aşuların 1/15' lik dilusyonu uygulandı.

1.grup (20 adet ): Azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile konjuktival aşılama

2.grup (20 adet ): Ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı ile subkutan aşılama

3.grup (10 adet ): Kontrol grubu ( aşılama yapılmadı )

### **4. Değerlendirme Kriterleri:**

#### **4.1. Zararsızlık Testleri:**

##### **4.1.a. Yetişkin kobaylarda Zararsızlık Testleri:**

1. Denemede kullanılan kobaylar servikal dislokasyon ile öldürüldü ve dalakları aseptik koşullarda alındı ve tartıldı.

2. Gram dalakdaki koloni sayısı hesaplandı.

3. *Brucella* taşıyan dalak yüzdesi hesaplandı.



4. Ortalama dalak ağırlığı x 100 / vücut ağırlığı formülü ile dalak indeksi hesaplandı. Yetişkin kobaylarda zararsızlık testinde elde edilen tüm veriler Tablo-6' e göre yorumlandı (108).

Deneme ve kontrol grubunda bulunan kobaylar servikal dislokasyon ile aseptik şartlarda öldürüldü. Steril makas ve pens yardımı ile dalaklar steril cam petrilere alındı. Dalaklar hassas terazide tartıldı ve toplam hacim 5 ml olacak şekilde steril FTS ile süspansiyon edildi. Steril cam havan ile ezilerek log<sub>10</sub> tabanına göre 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> dilüsyonları yapıldı. Her dilüsyondan 3 farklı besiyerine (GDA, benzilpenicilin'li GDA ve SDA ) ve her birinden 3'er adet petri olmak üzere ekimleri yapıldı. Ekim yapılan petri 37<sup>0</sup>C' lik % 5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde en az 72-96 saat süreyle inkübe edilerek gram dalaktaki ortalama koloni sayısı hesaplandı. Ayrıca dalak ağırlığı x 100 / vücut ağırlığı formülüne göre dalak ağırlığı indeksi hesaplandı (108).

Tablo-6 Kobaylarda aşı ve virulent suşa bağlı reaksiyon tablosu

	Aşı suşu	Virulent suş
Dalak ağırlığı	Yaklaşık 1 gr.	>2gr
Brucella taşıyan dalak yüzdesi	<%50	>%50
Gram dalakta ortalama koloni	<100	>1000
Dalak ağırlığı indeksi	Yaklaşık 0,15	>0,2

İstatistiksel değerlendirme: yetişkin kobaylarda incelenen aşuların zararsızlık kontrolünde elde edilen dalak ağırlığı ve dalak ağırlığı indeksi sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi ayrıca Ki-kare testi ve t testi ile yapıldı.

**4.1.b. Gebe kobaylarda Zararsızlık Testleri:** Deneme ve kontrol grubundaki gebe kobaylar aşılamadan sonra gebelik süresi boyunca (60-62 gün) abort yönünden izlendi. Gebelik süresi sonunda kobaylar sakrifiye edilerek öldürüldü ve uterusları patolojik değişiklikler yönünden incelendi (109).

#### 4.2. Bağışıklık testleri:

Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının koruyucu etkisinin incelenmesi amacı ile; konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev 1 aşısı ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev 1 aşısı uygulanan deneme grubu ve aşısız kontrol grubu kobaylar aşılamadan 6 hafta sonra *B.melitensis* H38 patojen suş ile  $5 \times 10^3$  bakteri/ml dozunda subkutan yolla eprüve edildi. Eprüvasyondan sonra 3. ve 6. haftalarda aşılı ve kontrol grubu kobaylar servikal dislokasyonla öldürölerek dalak ağırlığı ve dalaklardaki *Brucella* spp. kolonizasyonu aşağıda açıklandığı şekilde incelendi (110).

1. Denemede kullanılan kobayların dalakları aseptik koşullarda alındı ve hassas terazide tartıldı.

2. Gram dalaktaki koloni sayısı hesaplandı. Bu amaçla dalaklar toplam hacim 5 ml olacak şekilde steril FTS ile süspanse edildi. Steril cam havan ile ezildi.  $\log_{10}$  tabanına göre  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  dilusyonları yapıldı ve hazırlanan dilusyonların 3 farklı besiyeri kullanılarak (GDA, benzilpenicilin’li GDA ve SDA ) ekimleri yapıldı. Her bir dilüsyon için 3’er adet petri kullanıldı. Ekim yapılan petriler  $37^{\circ}\text{C}$ ’ lik % 5-10  $\text{CO}_2$  içeren ortamda en az 72-96 saat süreyle inkübe edildi.

3.İstatistiksel değerlendirme: Yetişkin kobaylarda incelenen bağışıklık kontrolünde elde edilen dalak ağırlığı ve dalaklardaki *Brucella* spp. kolonizasyonu sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi Dunnet testi ile değerlendirildi.

#### 4.3. Bakteriyolojik İzleme:

Bakteriyolojik sağılımmın izlenmesi için; 3.1.a grubunda yer alan yetişkin kobayların aşılamadan sonra 10 gün boyunca her gün; 3.1.b grubunda yer alan gebe kobaylarda ise 21 gün boyunca hergün, gebelik süresi (60-62 gün) sonuna kadar haftalık olarak ağız ve vajinal svabları alındı.

Bakteriyel izolasyon için Kanlı agar, GDA ve SDA kullanıldı. Besiyerlerinden 2’ şer adet kullanıldı. Petrilerin yarısı aerob koşullarda  $37^{\circ}\text{C}$ ’ lik etüvde, diğer yarısı  $37^{\circ}\text{C}$ ’ lik % 5-10  $\text{CO}_2$  içeren koşullarda 4-5 gün süreyle inkubasyona bırakıldı. İzolasyon sonrası üreyen koloniler morfolojileri yönünden değerlendirilmek amacı ile Gram boyama ve Ziehl/Neelsen (Stamp’s) boyama metotları ile boyandı.

## BULGULAR

**1. *B.melitensis* Rev.1 aşısının hazırlanması:** GDA besiyerine ekimi yapılan ve inkubasyona bırakılan liyofilize standart doz *B.melitensis* Rev.1 ( $1-3 \times 10^9$  bakteri/ml) aşısının koloni sayımı yapıldı ve standart aşının  $1,5 \times 10^9$  bakteri/ml olarak hesaplandı.

**a. Azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının dozunun ayarlanması:** Sayımı yapılan standart doz *B.melitensis* Rev.1' in  $10^{-5}$ ' den alınan 1 ml aşı sulandırmasında  $1,5 \times 10^5$  bakteri/ml içerdiği bulundu.

**b. Ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının dozunun ayarlanması:** Sayımı yapılan standart doz *B.melitensis* Rev.1' in  $10^{-5}$ ' den alınan 0,7 ml aşı sulandırmasında  $1 \times 10^5$  bakteri/ml içerdiği bulundu.

**2. Standart patojen suşun hazırlanması:** Eprüvasyondan 3 hafta önce açılan standart patojen *B.melitensis* H38 suşunun  $\log_{10}$  tabanına göre  $10^{-1}$ - $10^{-18}$ ' e kadar dilüsyonları yapıldı. *B.melitensis* H38 suşunun sayısı  $45 \times 10^{-21}$  bakteri/ml olarak saptandı. Eprüvasyon öncesi koloni sayısının kontrolü tekrar yapıldı ve sayıda azalma olmadığı belirlendi. Eprüvasyon amacı ile bağışıklı testi grubunda yer alan kobaylara *B.melitensis* H38 suşunun  $10^{-17}$  dilüsyonundan 1 ml ( $5 \times 10^3$  bakteri/ml) subkutan uygulandı.

### 3. Zararsızlık Testleri:

#### 3.1.a. Yetişkin kobaylarda zararsızlık test sonuçları:

1. Denemede kullanılan kobayların dalaklarının tartım sonuçları Tablo-7' de verilmiştir. Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının uygulandığı ve otopsi yapılan 20 adet kobaya ait dalak ağırlığının ortalaması 0,556 gr olarak bulundu. Subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının uygulandığı ve otopsi yapılan 20 adet kobayın dalak ağırlığının ortalaması 0,590 gr olarak belirlendi. Kontrol grubu olarak teste alınan 10 adet aşısız kobayın dalak ağırlık ortalaması 0,543 gr olarak saptandı. Tablo-6' ya göre değerlendirildiğinde deneme gruplarında yer alan konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının virulent karakterde olmadığı ortaya konulmuş oldu.
2. Deneme gruplarının dalaklarından aşı suşu izole edilmemesi nedeni ile Tablo-6' ya göre yorumlandığında, *Brucella* taşıyan dalak yüzdesi % 50' in altında olduğu için konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1' in ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1' in aşı suşu karakteri taşıdığı saptandı.

3. Ortalama dalak ağırlığı Tablo-7' e göre hesaplandı ve dalak ağırlığı vücut ağırlığına oranlanarak dalak ağırlığı indeksi bulundu (Tablo-8). Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 deneme grubunda dalak ağırlığı indeksi 0,16 olarak bulundu ve kontrol grubu indeksi ile kıyaslandığında birbirine yakın ve Tablo-6' ya göre 0,2' nin altında olduğu saptandı. Subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 deneme grubunda dalak ağırlığı indeksi 0,17 olarak bulundu ve bu sayının kontrol grubuna yakın ve Tablo-6' ya göre 0,2' nin altında olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde deneme grubundaki aşılardan virulent karakterde olmadığı saptandı.

4. Deneme ve kontrol grubundaki kobayların dalaklarının hiçbirinde *Brucella* spp. izolasyonu yapılmadı. Deneme gruplarındaki kobayların dalaklarında *Brucella* spp. ürememesi nedeni ile; Tablo-6' e göre gram dalaktaki ortalama koloni sayısının 100' ün altında olması sonucunda konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1' in aşı suşu karakterine sahip olduğu ortaya konuldu.

5. İstatistiksel değerlendirme: Dalak ağırlığı ve dalak ağırlığı indeksi sonuçları Ki-kare testi ve t testi ile yorumlandı. Konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev. 1 uygulanan grupların dalak ağırlıkları ve dalak ağırlığı indeksi sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında ( $p < 0.05$ ) önemli bir fark olmadığı saptandı Tablo-9.

Tablo-7 Zararsızlık testindeki deneme ve kontrol grubu kobaylarda dalak ağırlıkları

Kobay No	Dalak ağırlığı (gr)		
	1.Konjuktival azaltılmış doz <i>B.melitensis</i> Rev.1	2. Subkutan ergin doz <i>B.melitensis</i> Rev. 1	3.Kontrol grubu (aşısız)
1	0,579	0,560	0,531
2	0,596	0,610	0,540
3	0,510	0,631	0,560
4	0,523	0,558	0,545
5	0,542	0,544	0,530
6	0,563	0,520	0,610
7	0,568	0,615	0,522
8	0,524	0,622	0,533
9	0,569	0,614	0,521
10	0,589	0,528	0,540
11	0,524	0,563	
12	0,612	0,532	
13	0,567	0,540	
14	0,562	0,545	
15	0,582	0,563	
16	0,580	0,620	
17	0,560	0,710	
18	0,520	0,640	
19	0,541	0,650	
20	0,523	0,641	
Ortalama	0,556	0,590	0,543

Tablo-8 Zararsızlık testindeki deneme ve kontrol grubu kobaylarda dalak ağırlığı indeksi

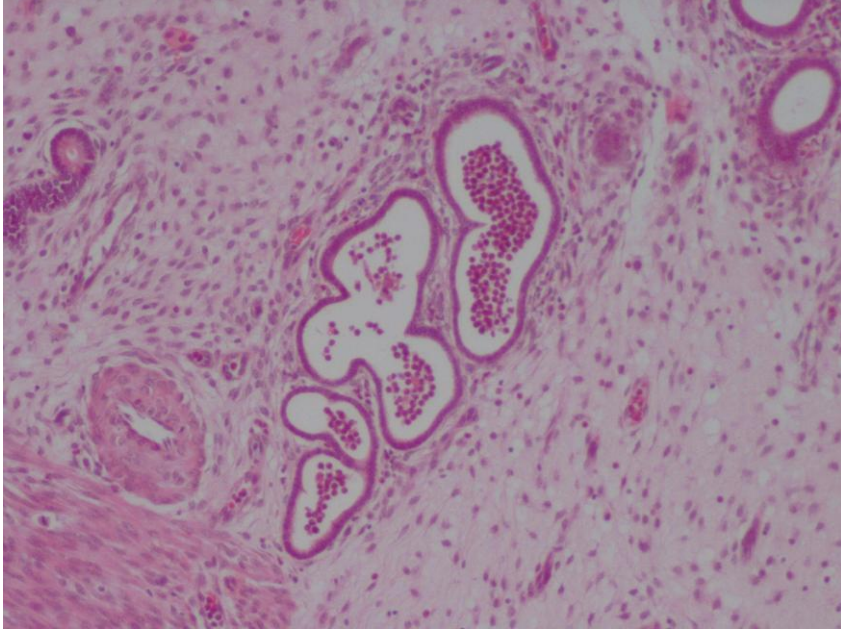
	1. Konjuktival azaltılmış doz <i>B.melitensis</i> Rev.1	2. Subkutan ergin doz <i>B.melitensis</i> Rev. 1	3.Kontrol grubu aşısız
Ortalama dalak ağırlığı	0,556	0,590	0,543
Dalak ağırlığı indeksi	0,16	0,17	0,15

Tablo-9 Konjuktival azaltılmış doz *B. melitensis* Rev. 1 aşısının zararsızlık testi istatistik değerlendirmesi

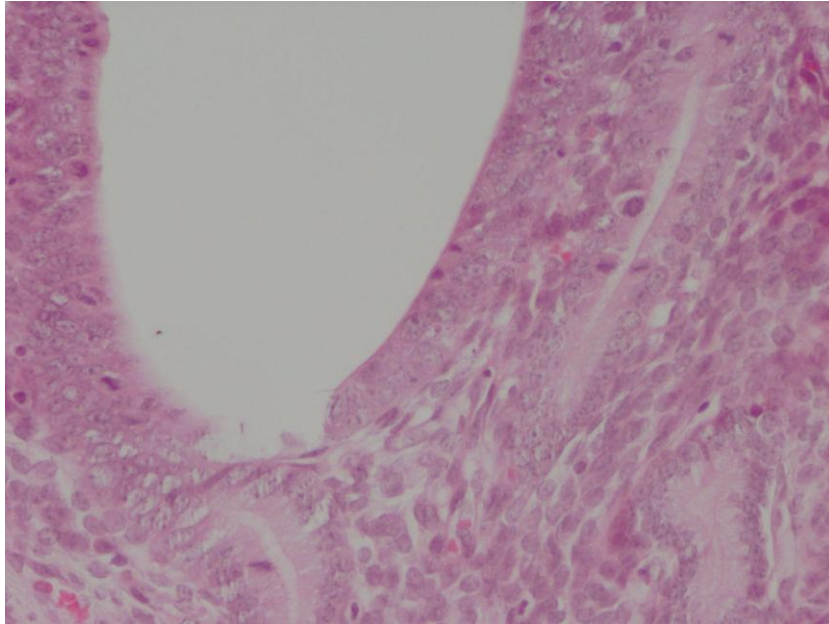
	<b>Konjuktival azaltılmış doz <i>B.melitensis</i> Rev.1</b>	<b>Subkutan ergin doz <i>B.melitensis</i> Rev.1</b>	<b>Kontrol</b>
Dalak Ağırlığı	0.556±0.298*	0.590±0.423*	0.543±0.261*
Dalak Ağırlık indeksi	0.16±0.09*	0.17±0.01*	0.15±0.06*

\* Ki kare ve t testlerine (P<0.05) göre gruplar arasında fark gözlenmedi.

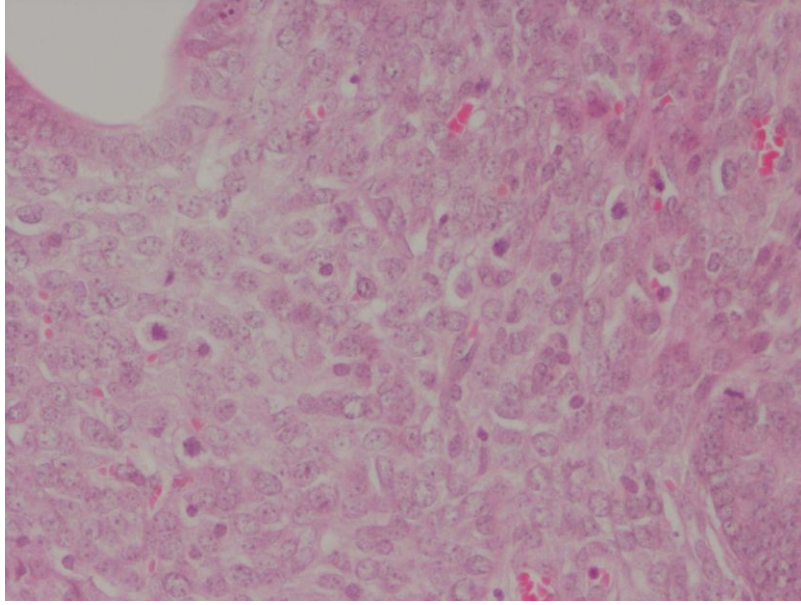
**3.1.b. Gebe kobaylarda zararsızlık sonuçları:** Gebe kobaylarda zararsızlık kontrolü için yapılan çalışmada, deneme ve kontrol grubunda yer alan gebe kobayların gebelik süresi boyunca abort yapmadığı gözlendi. Gebelik dönemi bitiminde deneme ve kontrol grubu kobaylardan alınan 32 adet uterusu aşının patolojik yönden etkisi incelendi. Histopatolojik inceleme sonucunda; kontrol grubunda; kanama, konjesyon, lamina epitelyaliste hiperplazik değişiklik, lamina epitelyaliste mitoz artışı, propria mukozada mononükleer hücre infiltrasyonu ve propria mukozada nötrofil lökosit infiltrasyonu hafif derecede, bez lümenlerinde dilatasyon, bez lümenlerinde nötrofil lökosit varlığı ise orta derecede görülmüştür. Diğer yandan her üç deneme grubunda gözlenen patolojik bulgular; endometrium bezlerinde kistik genişleme, kistik bezlerin lümeninde nötrofil lökosit infiltrasyonu, endometriyum mukozasında çoğunluğunu makrofajların oluşturduğu perivaskuler mononükleer hücre infiltrasyonu, hiperemi, kanama, epitel ve stromal hücrelerdeki mitotik indekste artış, stromal fibroblastlarda şekil değişimi, epitel hücrelerde hiperplazi olarak saptanmıştır (Şekil- 1, 2, 3, 4, 5, 6). Lezyonlar genellikle hafif veya orta şiddette izlenmiştir (Tablo-10).



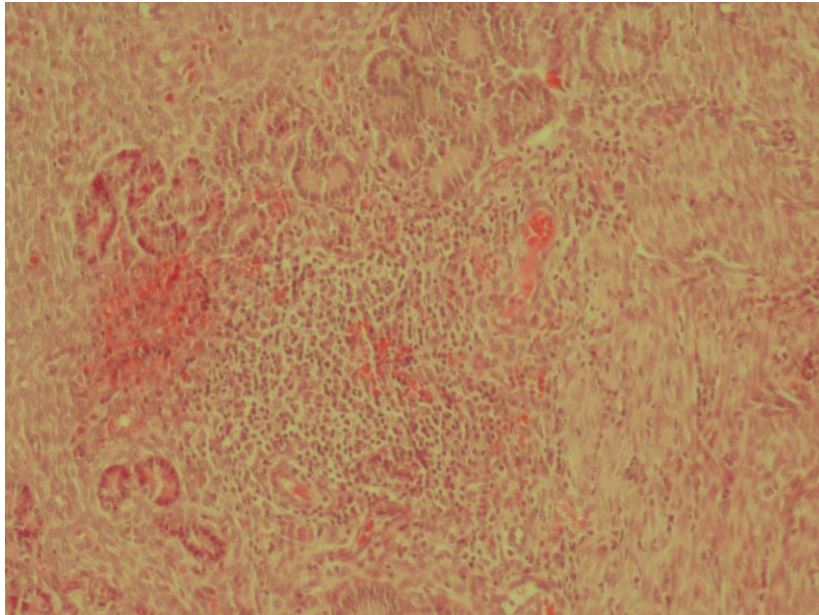
Şekil-1 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; kistik bezler ve lümenlerinde nötrofiller, x10 büyütme



Şekil-2 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; lamina epithelialis ve bez epitellerinde mitotik figürler, x20 büyütme

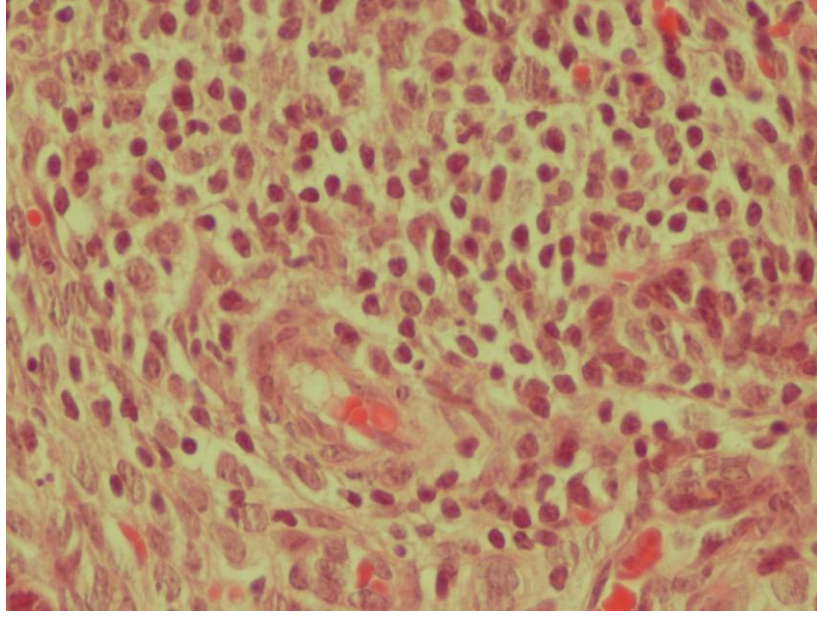


Şekil-3 Konjunktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; stromada mitozlar, x20 büyütme

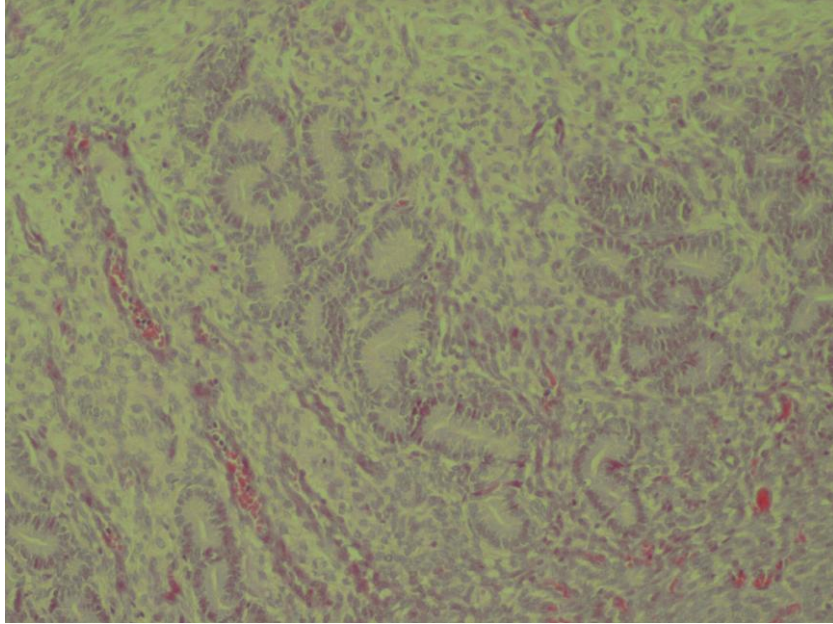


Şekil-4 Subkutan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; mononükleer hücre infiltrasyonu, x10 büyütme





Şekil-5 Subkutan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; makrofajların yakından görünümü, x40 büyütme



Şekil-6 Subkutan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 uygulanan kobaylarda; uterus bezleri normal görünüm, x10 büyütme

Tablo-10 Gebe kobaylarda doğum sonrası uterusda gözlenen lezyonlar ve gruplarda rastlanma oranları

Lezyon	Lezyon Şiddeti	Lezyon Görülen Hayvan Sayısı			
		Konjuktival azaltılmış doz <i>B.melitensis</i> Rev.1 N=12	Subkutan ergin doz <i>B.melitensis</i> Rev.1 N=10	Konjuktival ergin doz <i>B.melitensis</i> Rev.1 N=4	Kontrol grubu N=6
Kanama	Hafif	-	2	1	2
	Orta	1	-	2	-
Konjesyon	Hafif	-	-	-	4
	Orta	2	4	6	
Lamina epitelyaliste hiperplazik değişim	Hafif	2	4	3	1
	Orta	-	1	-	-
Lamina epitelyaliste mitoz artışı	Hafif	-	1	-	1
	Orta	-	1	1	-
Stromal fibroblastlarda Şekil değişimi	Hafif	1	-	-	-
	Orta	-	1	3	-
Stromal fibroblastlarda mitoz artışı	Hafif	1	1	-	-
	Orta	1	-	2	-
Bez epitellerinde hiperplazik değişim	Hafif	-	4	-	-
	Orta	-	-	-	-
Bez lumenlerinde dilatasyon	Hafif	1	2	3	-
	Orta	-	1	2	3
Bez lumenlerinde nötrofil lökosit varlığı	Hafif	-	2	3	-
	Orta	-	1	1	3
Propria mukozada mononükleer hücre infiltrasyonu	Hafif	2	3	3	3
	Orta	-	1	2	-
Propria mukozada nötrofil lökosit infiltrasyonu	Hafif	1	-	1	1
	Orta	-	-	-	-

#### 4. Bağışıklık testleri :

##### 4.1 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının koruyucu etkisinin incelenme sonuçları:

###### 4.1 Dalak ağırlığı:

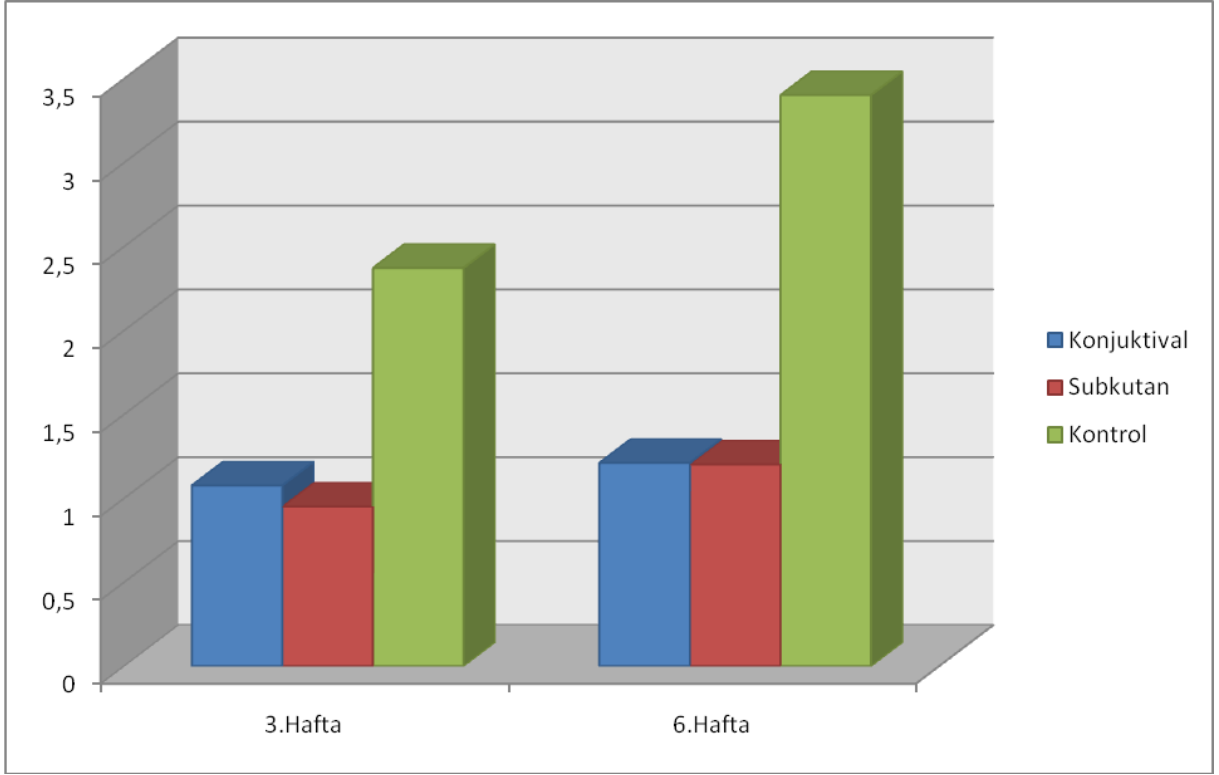
Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev 1 aşısının uygulandığı kobaylarda *B.melitensis* H38 ile epruvasyondan sonra 3. ve 6. haftalarda ortalama dalak ağırlığı sırası ile 1.077 ve 1.211 gram iken subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev 1 aşısı uygulanan kobaylarda ise 0.951 ve 1.202 gram olarak saptandı. Diğer yandan kontrol grubunda ise aynı haftalarda 2.373 ve 3.403 gram olarak bulundu (şekil-7).

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde; konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B. melitensis* Rev.1aşısı uygulanan grupların dalak ağırlığı ile kontrol grubu karşılaştırıldığında gruplar arasındaki farkın Dunnet testine göre ( $P<0.03$ ) nemli olduğu saptandı Tablo-11.

###### 4.2 Dalakta *Brucella* spp. kolonizasyonu:

Konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev. 1aşısı uygulanan kobaylarda, *B.melitensis* H38 ile epruvasyondan sonra, tüm dalaktaki *Brucella* spp. kolonizasyonu 3. ve 6. haftalarda 0.86 CFU/ dalak olarak saptadı. Diğer yandan kontrol grubundaki kobaylarda ise aynı haftalarda sırası ile 2.31 ve 2.38 CFU/dalak olarak saptandı (şekil-8).

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B. melitensis* Rev.1aşısı uygulanan gruplardaki *Brucella* spp. dalak kolonizasyonu ile kontrol grubu arasındaki farkın epruvasyondan sonra 3. ve 6. haftalarda karşılaştırıldığında Dunnet testine göre ( $P<0.03$ ) nemli olduğu saptandı Tablo-12.

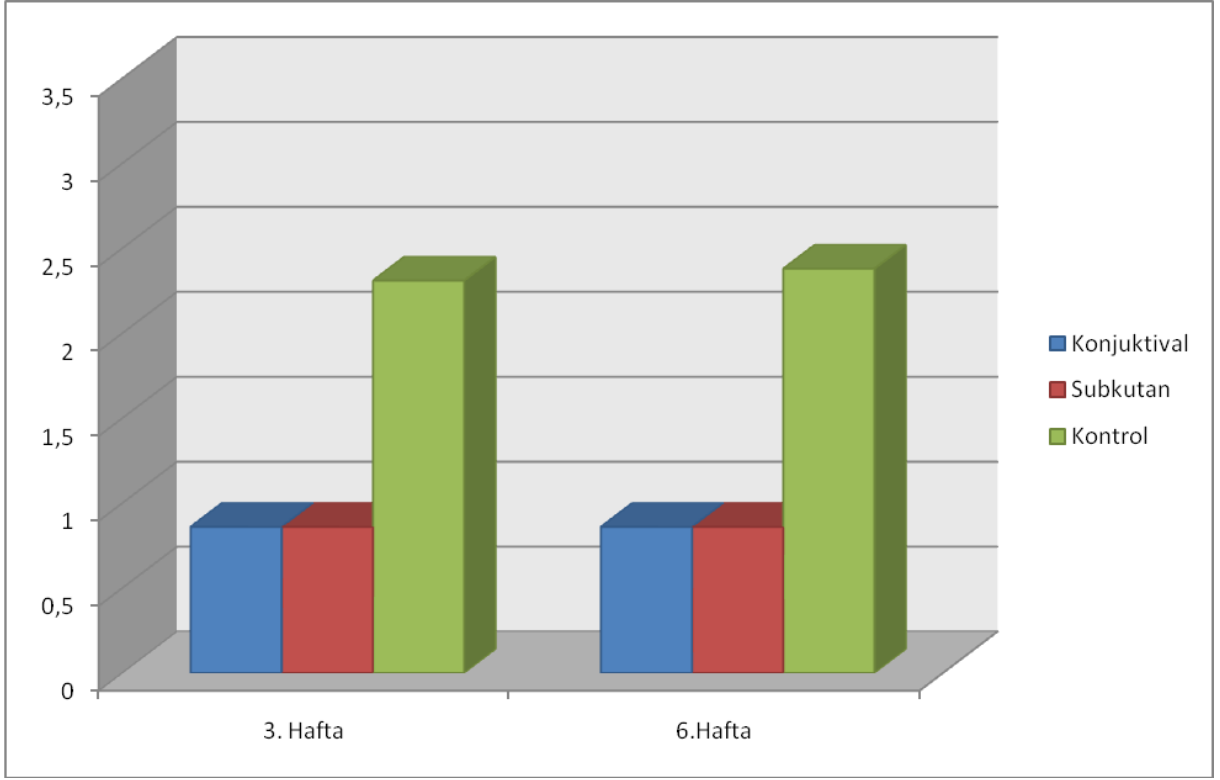


Şekil-7 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* aşısının koruyucu etkisi (dalak ağırlığı)

Tablo-11 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının koruyucu etkisi (dalak ağırlığı)

Haftalar	Ağırlık (gram) Konjuktival	Ağırlık (gram) Subkutan	Ağırlık (gram) Kontrol
3.	1.077±0.032 *	0.951±0.049 *	2.373±0.027*
6.	1.211±0.081*	1.202±0.103*	3.403±0.273*

\*Dunnet testine (P<0.03) göre deneme ve kontrol grubu arasında fark görüldü.



Şekil-8 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* aşısının koruyucu etkisi (dalakta *Brucella* spp. kolonizasyonu)

Tablo-12 Konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının koruyucu etkisi (dalakta *Brucella* spp. kolonizasyonu)

Haftalar	Log CFU/dalak Konjuktival	Log CFU/dalak Subkutan	Log CFU/dalak Kontrol
3.	0.86±0.00 *	0.86±0.00 *	2.31±0.176*
6.	0.86±0.00 *	0.86±0.00 *	2.38±0.014*

\*Dunnet testine (P<0.03) göre deneme ve kontrol grubu arasında fark görüldü.

### **5. Bakteriyolojik izleme:**

1. Yetişkin kobaylarda yapılan 10 gün boyunca aşının suşu saçılımının kontrolü için bakteriyolojik izleme yapıldı. Alınan ağız ve vajinal svaplardan kanlı agar, GDA ve SDA' a yapılan ekimlerde izolasyon yapılmadı.
2. Gebe kobaylarda yapılan aşının suşu saçılımının kontrolü için 21 gün boyunca her gün, daha sonraki günlerde haftalık olarak gebelik süresi boyunca (60-62 gün) bakteriyolojik izleme yapıldı. Alınan ağız ve vajinal svaplardan kanlı agar, GDA ve SDA' a yapılan ekimlerde patojen etken izole edilemedi.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Sığır ve koyun brucellosisi tüm dünyada yaygın olarak görülen infeksiyonların başında gelmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde *B.abortus* orjinli sığır brucellosis' in eradikasyonu için klasik test-kesim uygulamaları yapılmakla birlikte, *B.melitensis* orjinli koyun-keçi brucellosisinin eradikasyonu için aşılama büyük önem taşımaktadır. *B. melitensis* Rev.1 aşısı tüm dünyada ve ülkemizde koyun ve keçi brucellosisine karşı korumada yaygın olarak kullanılmaktadır (65). Ancak aşı standart dozda subkutan yolla uygulandığında iki önemli dezavantaja sahiptir. Bunlardan biri uzun süreli serolojik yanıt oluşumudur ve bu durum aşı ve infekte hayvanların ayırımında problemlere neden olmaktadır. Diğer önemli dezavantajı ise gebelik periyodunda uygulandığında gebe koyun ve keçilerde atıklara neden olmasıdır (111). Diğer yandan büyük sürülerde subkutan aşılamanın manipülasyon zorluğu ve uygulamalarda risk taşıması nedeni ile aşılama çalışmalarında olumsuz sonuçlarla karşılaşmaktadır.

*B.melitensis* Rev.1 aşısı uygulamalarında karşılaşılan bu problemlere çözüm olarak aşının farklı dozlarda ve farklı yollardan uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı uygulamaları gündeme gelmiş ve aşılama kampanyaları başlatılmıştır. Bu uygulamalar sonucunda azaltılmış doz aşının güvenli olup olmamasının, aşının üretildiği laboratuvarlara göre değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Buna rağmen Rev.1 aşılarında azaltılmış doz uygulamaları günümüzde “Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis” tarafından resmi olarak önerilmektedir (63). *B.melitensis* Rev.1 aşısının risklerini azaltmak amacı ile ayrıca son yıllarda subkutan aşı yerine konjunktival yol ile aşılamının etkinliği incelenmektedir. Çalışmamızda bu gelişmeler dikkate alınarak, ülkemizdeki subkutan ve ergin brucella aşılama yöntemlerine alternatif olarak konjunktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

*B.melitensis* Rev.1 ve *B.abortus* S19 aşılarının etkinlik ve kalite kontrollerini incelemek amacı ile yapılan deneysel çalışmalarda, aşılama zararsızlık ve bağışıklık olmak üzere başlıca iki kriter yönünden değerlendirilmektedir. Zararsızlık çalışmalarında aşılama; virulent veya aşı suşu karakterinde olup olmadığı ortaya konulmaktadır. (62, 108). Fensterbank ve arkadaşları tarafından (112) konjunktival yol ile keçilere uygulanan *B.melitensis* Rev.1 aşısının etkinliğinin incelendiği çalışmada; konjunktival yolla uygulanan aşının güvenilir olduğu,

koyun ve keçi brucellosisinden korunmada subkutan aşılamalara alternatif aşılama yöntemi olabileceği vurgulanmıştır. *B.melitensis* Rev.1 aşısının incelenmesinde hedef hayvan koyun ve keçi olmakla birlikte çalışmanın kontrollü şekilde yapılabilmesi ve ekonomik yönden uygun olması nedeni ile fare ve kobay gibi deney hayvanları da kullanılmaktadır (30). Buna karşın koyun ve keçi dışındaki diğer deney hayvanlarında *B.melitensis* Rev.1 aşısının incelenmesine yönelik deneysel çalışmalar çok az sayıdadır. Çalışmamızda konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının ergin hayvanlarda zararsızlık yönünden incelenmesinde, ergin kobaylarda aşı  $1,5 \times 10^5$  bakteri/ml dozunda uygulanmıştır. Bunun yanı sıra subkutan yol ile ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı  $1 \times 10^5$  bakteri/ml dozunda yetişkin kobaylara uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda konjuktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının, dalak ağırlığı, Brucella taşıyan dalak yüzdesi, gram dalakta ortalama koloni ve dalak indeksi kriterleri yönünden virulent suş karakteri taşımadığı saptanmıştır. Bu bulgular değerlendirildiğinde söz konusu aşının ergin hayvanlarda zararsızlık yönünden güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Brucella aşılarının gebe hayvanlara uygulanması aşılardan dozu, uygulama yolu ve hayvanlarda gebeliğin dönemine bağlı olarak abort riski taşımaktadır (63). Brucella etkenlerinin gebe hayvanlarda uterusu afinitesinden dolayı; brucella aşılarının zararsızlık kontrolünde gebe hayvanlardaki etkilerinin incelenmesi önem taşımaktadır (113). Bu amaçla aşılama yapılan gebe hayvanlarda abort olup olmamasının izlenmesi ve aşı suşunun uterusdaki etkilerinin ortaya konulması gerekmektedir. *B.melitensis* Rev.1 aşısının gebe koyunlarda subkutan ve konjuktival yolla karşılaştırmalı olarak incelendiği bir çalışmada, konjuktival yolla aşılamadan daha az oranda abortlara neden olduğu, ancak standart dozla yapılan aşılamada abort ve vücuttan saçılımın tamamen ortadan kalkmadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada abortların aşılamadan yaklaşık 40-60 gün sonra meydana geldiği ve abort riskinin gebeliğin dönemi ile direkt ilişkili olduğu vurgulanmıştır (114). Zundel ve arkadaşları (115)  $1 \times 10^8$  doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival yolla uygulandığında standart doza oranla daha az aborta neden olduğunu, gebeliğin orta döneminde standart dozla konjuktival aşılamadan koyun ve keçilerde % 70' in üzerinde aborta neden olduğunu bildirilmiştir. Diğer yandan gebe koyunlarda  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  dozlarında yapılan konjuktival *B.melitensis* Rev.1 aşısının atıklara neden olduğu bildirilmiştir (63). Falade (116) tarafından yapılan bir çalışmada, gebeliğin ileri dönemindeki keçilere *B.melitensis* Rev.1 aşısı  $10^9$  bakteri/ml dozunda subkutan yolla uygulanmıştır. Gebe keçilere ileri gebelik durumunda



standart dozda uygulanan Rev.1 aşısının abort meydana getirmediği, doğumların normal meydana geldiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda konjuktival yolla uygulanan azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının gebe kobaylardaki etkisi incelendi. Ayrıca ergin doz *B.melitensis* Rev.1' in gebe kobaylardaki subkutan ve konjuktival uygulama yolu ile etkisi değerlendirildi. Bu amaçla gebe kobaylar gebeliklerinin yaklaşık 21. günü aşılarak gebelik süresi boyunca (60-62 gün) abort yönünden izlendi ve deneme süresi sonunda kobayların uterusları patolojik yönden incelendi. Çalışmanın sonunda aşı ve kontrol grubundaki kobayların gebelik süresi boyunca abort yapmadığı ve gebelik süresi sonunda normal doğum yaptığı gözlemlendi. Deneysel çalışma süresi boyunca aşı ve kontrol grubundaki kobaylarda ölümler gözlemlendi. Ölen hayvanların iç organlarından yapılan bakteriyolojik incelemede *Brucella* spp. izole edilmedi. Gebelik süresi sonunda; aşı ve kontrol kobayların uteruslarında yapılan histopatolojik incelemede; endometrium tabakasında kistik endometrial hiperplazinin başlangıç aşaması olarak kabul edilebilecek hafif hiperplastik değişiklikler ve hafif yangısal bulgular saptandı. Ancak bu bulguların kobaylarda aborta neden olacak düzeyde olmadığı görüşüne varıldı. Aşı ve kontrol gruba ait bulgular karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık saptanmadı. Çalışmada kobaylara gebeliğin erken döneminde azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival yolla uygulanmasının abort oluşumu üzerinde etkisi olmadığına ve gebe hayvanlarda güvenle kullanılabileceği sonucuna varıldı. *B.melitensis* Rev.1 aşısının gebe hayvanlarda farklı doz ve farklı yolla uygulamalarında saha koşullarında ve deneysel çalışmalarda farklı sonuçlar alınmaktadır. Bu farklılıkların çalışmalarda kullanılan aşuların farklı laboratuvarlarda üretilmesinden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (63).

*B.melitensis* Rev.1 aşularının koruyucu etkisini incelemek amacı ile aşı ve kontrol hayvanlara patojen suş ile (*B.melitensis* H38) epruvasyon yapılmakta ve gerek koyun-keçi gibi hedef hayvanlarda gerekse deney hayvanlarında aşının immunojenitesi saptanmaktadır. Verger ve arkadaşları (94) tarafından yapılan bir deneysel çalışmada, *B.suis* S2 ile *B.melitensis* Rev.1 canlı aşularının gebe koyunlardaki koruyucu etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar 4 aylık koyunları  $1 \times 10^9$  cfu doz Rev.1 aşısı ile konjuktival yolla aşılamışlar, birinci ya da ikinci gebelik periyodunun orta döneminde (76. gün) ise  $5 \times 10^7$  cfu dozunda patojen suş *B.melitensis* H38 ile epruve etmişlerdir. Deneme süresi sonunda konjuktival yolla uygulanan standart doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının gebe koyunlarda abort oluşturmadığı, doğumdan sonraki günlerde aşı etkeninin vajinal akıntılarda ve süt örneklerinde bulunmadığı saptanmış ve bu sonuçlara

dayanarak aşının gebe koyunları *B.melitensis* infeksiyonuna karşı koruduğu bildirilmiştir. Bosseray ve arkadaşları (102) tarafından Brucella aşılarının deney hayvanlarında reziduel virulensi ve immunojenitesini saptanmasına yönelik geliştirilen teknikler ile bu alanda birçok araştırma yapılmasına olanak sağlanmıştır. Bu kapsamda özellikle son yıllarda *B.melitensis* Rev.1 aşısına alternatif olarak geliştirilen subunit ve mutant aşılardan etkinlikleri incelenmektedir (78, 117-120). İspanya’ da 1984-1985 yılları arasında beş farklı laboratuvar tarafından üretilen *B.melitensis* Rev.1 aşıları deney hayvanı modeli kullanılarak incelenmiştir. Bu aşılardan immunojenite değerleri açısından önemli farklılıklar taşıdığı saptanmıştır (102). Diğer yandan, deney hayvanı modeli kullanılarak yapılan çalışma sonuçları ile koyunlarda saha koşullarında yapılan çalışma sonuçları arasında yakın ilişki bulunmaktadır (63). Çalışmamızda *B.melitensis* Rev.1 aşısının immunojenitesinin incelenmesi amacı ile konjunktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşılması yapılan ergin kobaylar aşılardan 6 hafta sonra *B.melitensis* H38 ile eprüve edildi. Eprüvasyondan sonraki 3. ve 6. haftalarda öldürülen kobayların dalak ağırlıkları ve dalaklarındaki *Brucella* spp. kolonizasyonu incelendi. Deneme süresi sonunda yapılan değerlendirmede konjunktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz aşı uygulanan grup ile kontrol grubu arasında hem dalak ağırlığı hem de dalaktaki *Brucella* spp. kolonizasyonu yönünden farkın istatistiksel olarak ( $P<0.03$ ) önemli olduğu saptandı. Her iki aşı grubu kendi içinde karşılaştırıldığında sonuçların birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlendi. Bu veriler değerlendirildiğinde gerek konjunktival azaltılmış doz gerekse subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının Brucella eprüvasyonuna karşı koruyucu özellik taşıdığı saptandı.

Brucella aşılarının immunojenitesinin varlığının yanı sıra oluşan immunitenin süresi de önem taşımaktadır. *B.suis* strain 2 veya *B.abortus* RB51 aşıları farelerde aşılardan 30 gün sonra yapılan eprüvasyonda koruyucu özelliğe sahip olmakla beraber aynı aşılardan koyunlar için koruyucu özellikte olmadığı bildirilmiştir. Diğer yandan *B.suis* strain 2 ile aşılardan fareler aşılardan 45 gün sonra *B.melitensis* H38 ile yapılan eprüvasyona karşı korunurken, aşılardan 150 gün sonra yapılan eprüvasyona karşı korunmamaktadır (121). Çalışmamızda kobayların azaltılmış doz konjunktival ve ergin doz subkutan *B.melitensis* Rev.1 aşı uygulamalarından 6 hafta sonra yapılan *B.melitensis* H38 eprüvasyonuna karşı korunduğu saptandı.

Brucella aşılarının güvenilirliğinin değerlendirilmesinde aşı etkenlerinin vücut ekskresyonları ile saçılımının izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Laktasyondaki koyunların

*B. melitensis* Rev.1 ile aşılması sonucu, koyunların sütleri ile aşı suşu farklı oranlarda atılmaktadır (114). Ancak konjuktival yolla aşılana koyunlarda *B. melitensis* Rev.1' in sütle saçılımının olmadığı bildirilmektedir (63). Zundel ve arkadaşları (115), koyunlara gebelik periyodunun orta döneminde konjuktival *B. melitensis* Rev.1 aşısı uygulamışlardır. Aşılamadan sonraki günlerde göz, burun ve yanak mukozasından alınan svap örneklerinde düşük oranda Rev 1 suşu izole edilirken, aşılamadan sonraki 7-15. günlerde izolasyonun yapılmadığı bildirilmiştir. Çalışmamızda konjuktival azaltılmış doz ve subkutan ergin doz *B. melitensis* Rev.1 aşısı uygulanan yetişkin kobayların 10 gün süre ile alınan ağız ve vajinal svap örnekleri bakteriyolojik olarak incelendi ve aşı suşu izole edilmedi. Gebe kobaylarda da konjuktival azaltılmış ve ergin doz *B. melitensis* Rev.1 aşısı ve subkutan ergin doz *B. melitensis* Rev.1 aşısı uygulanan deneme gruplarında gebelik süresi boyunca alınan ağız ve vajinal svap örneklerinden *Brucella* spp. izole edilmedi. *B. melitensis* Rev.1 aşısının vücut ekskretlerinden saçılımı yönünde farklı sonuçlar alınmakla birlikte (17, 105, 115, 122), çalışmamızda farklı doz ve yolla yapılan *B. melitensis* Rev.1 aşılamalarından sonra aşı etkeninin vücuttan atılım riskinin bulunmadığı saptandı.

Ülkemizde koyun ve keçilerin brucellosis infeksiyonuna karşı aşılamaalarda halen kullanılmakta olan subkutan ergin doz *B.melitensis* Rev.1 aşısı zaman zaman gerek hayvanlar için gerekse aşı uygulayıcıları için risk faktörleri taşımaktadır. *B. melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival azaltılmış doz uygulamalarına yönelik çalışmalar yapılmış olsa da her ülke bazında üretilen aşılaların incelenmesi ve ülke koşullarında uygulanabilirliğinin ortaya konulması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında Türkiye' de üretilen *B. melitensis* Rev.1 aşısının konjuktival yol ve azaltılmış doz uygulamalarının zararsızlık ve bağışıklık özellikleri kobaylarda deneysel çalışma ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; konjuktival azaltılmış doz *B.melitensis* Rev.1 aşısının gerek zararsızlık gerekse bağışıklık açısından mevcut aşıya alternatif olabileceği ve koyun keçi aşılamaalarında saha çalışmaları ile desteklendiğinde güvenle kullanılabiliceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. BANAI M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Veterinary Microbiology*, 90: 497–519, 2002.
2. BENKIRANE A. Ovine and caprine Brucellosis: World Distribution and Control / Eradication Strategies in West Asia / North Africa Region. *Small Ruminant Research*, 62: 19-25, 2006.
3. Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*). European Commission, 2001.
4. PLOMMET M. Live vaccines: virulence, immunogenicity/protection and safety: Historical, theoretical and practical considerations applied to the *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev.1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
5. VERGER JM. Efficacy and advantages of the Rev. 1 conjunctival vaccine against *B. melitensis* infection, as evaluated in standard controlled conditions. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
6. ANONİM. Tarım Bakanlığı Kayıtları 2007, [http://www.tarim.gov.tr/uretim/istatistikler/uretim\\_istatistikleri/hayvansal\\_uretim/dunya/hayvan\\_sayisi.htm](http://www.tarim.gov.tr/uretim/istatistikler/uretim_istatistikleri/hayvansal_uretim/dunya/hayvan_sayisi.htm)
7. ANONİM. Devlet İstatistik Enstitüsü ve Devlet İstatistik Kurumu Kayıtları 2007, <http://www.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>
8. AYDIN N. Brucella Enfeksiyonları. Editörler: ARDA M, MINBAY A, AYDIN N, AKAY O, IZGUR M, LELOGLU N, KAHRAMAN M, ILGAZ A, DIKER S. Özel Mikrobiyoloji epidemiyoloji, bakteriyel ve mikotik enfeksiyonlar. 4.baskı, Medisan Yayınları, Ankara, sayfa 110-124, 1999.
9. ELFAKI MG, AL-HOKAIL AA, NAKEEB SM, AL-RABIAH FA. Evaluation of culture, tube agglutination, and PCR methods for diagnosis of Brucellosis in humans, *Medical Science Monitor*, 11(11): MT69-74, 2005.
10. YETKİN MA, BULUT C, ERDİNÇ FŞ, ORAL B, TULEK N. Evaluation of the clinical presentations in neurobrucellosis. *International Journal of Infectious Diseases*, 2006.
11. LETTER TO THE EDITOR, A case of intracranial abscess due to *Brucella melitensis*. *International Journal of Infectious Diseases*, 8, 379—381, 2004.
12. MORENO E, MORIYO I. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1): 1–3, 2002.
13. BENKIRANE A. Opening adress. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
14. PERRY QL. *Brucella melitensis*: The evaluation of a putative hemagglutinin gene's effect on virulence in the caprine model. Louisiana State University, May 2007.
15. 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, Feb. 1968.
16. BAE JE. Generation of baculovirus-*Brucella abortus* heat shock protein recombinants; mice immune responses against the recombinants, and *B. abortus* superoxide dismutase and I7/I12 recombinant proteins. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1999.
17. UYSAL Y. Field experience with Rev. 1 vaccine in Turkey. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.

18. ŞAHİN T, YILDIZ A. Hatay yöresindeki koyun ve keçilerde Brusellozisin seroprevalansının araştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 20 (5): 331 – 335, 2006.
19. 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.
20. CORBEL MJ. Brucellosis an overview. 1.st International Conference on Emerging Zoonoses Jarussalem, 3,(2), 213-221, 1997.
21. An analysis of the disease risks, other than scrapie, associated with the importation of ovine and caprine semen and embryos from Canada, the United States of America and member states of the European Union. Final report, Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia, August 2000.
22. SMITS HL, KADRI SM. Brucellosis in India: a deceptive infectious disease Indian Journal Medical Research, 122: 375-384, 2005.
23. OLLI-GOIG JE, CANELA-SOLER J. An outbreak of *Brucella melitensis* infection by airborne transmission among laboratory workers. American Journal Public Health, 77: 335-338, 1987.
24. ARDA M, MİMBAY A, LELOĞLU N, AYDIN N, KAHRAMAN M, AKAY Ö, ILGAZ A, İZGÜR M, DİKER KS. Özel mikrobiyoloji, 4. baskı, Medisan Yayınevi Ltd. Şirketi, Ankara, sayfa 110-124, 1997.
25. ANONİM. Manual of standart for diagnostic tests and vaccines, OIE Technical Report Series, 5th edition, Paris 2004, Chapter 2.4.2. Caprine and Ovine Brucellosis [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a\\_00069.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_00069.htm)
26. The development of new / improved Brucellosis vaccines report of WHO meeting. Geneva, Switzerland, 11-12 December 1997.
27. ALAVI-SHOUSHTARI SM, ZEINALI A. Responses of female labs to Rev.1 (Brucellosis) vaccination, Preventive Veterinary Medicine, 21: 289-297, 1995.
28. SOMOS E, PAPADOPULOS G, Akdeniz ve arap yarımadası ülkelerinde Brusellozisin halihazır durumu. Uluslararası Brusellozis Sempozyumu. 18-20 Ekim 1988, Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 65-68, 1989.
29. MIRANDA RT, GIMENO AE, RODRIGUEZ TF, JAVIER de ARRIBAL J, OLMO DG, SOLERA J. Acute cholecystitis caused by *Brucella melitensis*: case report and review. The British Infection Society, 77-78, 2001.
30. ALTON GG. *Brucella melitensis*, 1887 to 1987, Editors: NIELSEN K, DUNCAN JR. Animal Brucellosis, Chapter 16, CRC Pres, Boston, USA, Page 379-382, 1990.
31. NICOLLETTI P. A short history of brucellosis. Veterinary Microbiology, 90: 5-9, 2002.
32. HASHEMI SH, KERAMAT F, RANJBAR M, MAMANI M, FARZAM A, JAMAL-OMIDI S. Osteoarticular complications of brucellosis in Hamedan, an endemic area in the west of Iran. International Journal of Infectious Diseases, 2007.
33. BÖHM O. Caprine-Ovine brucellosis in Istria and the Slovenian littoral in the middle of the 20th century diagnostics, eradication and prevention of disease. Slovenia Veterinary Research, 40 (3/4): 139-79, 2003.
34. SMITS HL, CUTLER SJ. Contributions of biotechnology to the control and prevention of Brucellosis in Africa. African Journal of Biotechnology, Vol: 3(12) 631-636, December 2004.
35. MCDERMOTT JJ, ARIMI SM. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. Veterinary Microbiology, 90: 111–134, 2002.
36. SAMARTINO LE. Brucellosis in Argentina. Veterinary Microbiology, 90: 71-80, 2002.

37. ESCHENBRENNER M, WAGNER MA, HORN TA, KRAYCER JA, MUJER CV, HAGIUS S, ELZER P, DELVECCHIO VG. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain, 16M. *Journal of Bacteriology*, 184: 4962–4970, Sept. 2002.
38. 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: 21-75, 2000.
39. SPERRY JF, ROBERTSON DC. Inhibition of growth by erythritol catabolism in *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, 124: 391-397, 1975.
40. GIVENS MD. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, 2006.
41. HOOVER DL, FRIEDLANDER AM. Medical aspects of chemical and biological warfare: Brucellosis Chap. 25, page: 513-518, 2001.
42. Import risk analysis unprocessed fibre of sheep and goats, Ministry of Agriculture and Forestry, Wellington, New Zealand, November 1998.
43. BOSCHIROLI ML, FOULONGNE V, O’CALLAGHAN D. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 58–64, 2001.
44. YILMAZ M, OZARAS R, MERT A, OZTURK R, TABAK F. Abducent nerve palsy during treatment of Brucellosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 105: 218- 220, 2003.
45. TRIFILETTI RR, RESTIVO DA, PAVONE P, GIUFFRIDA S, PARANO E. Diabetes insipidus in neurobrucellosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 102: 163–165, 2000.
46. 54th Annual Brucellosis Research Conference, St. Louis, Missouri, November 10 -11, 2001.
47. SAN MIGUEL P, FERN’ANDEZ G, VASALLO FJ, HORTAS M, LORENZO JR, RODR’IGUEZ I, ORTIZ-REY JA, ANT’ON I. Neurobrucellosis mimicking cerebral tumor: case report and literature review. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 108: 404–406, 2006.
48. FAO, WHO, OIE. Guidelines for a regional Brucellosis control programme for Middle East, Amman, JORDAN, 14-17 February 1993.
49. MINAS A. Control and eradication of small ruminants. *Small Ruminants Research*, 62: 101-107, 2006.
50. POUILLOT R, LESCOAT PH, GARIN-BASTUJI B, REPIQUET D, TERRIER P, GERBIER G, BEÂNÉT JJ, SANA M. Risk factors for false-positive serological reactions for bovine brucellosis in SaoÑne-et-Loire (France). *Preventive Veterinary Medicine*, 35: 165-179, 1998.
51. ALTON GG. *Brucella melitensis*, Editors: NIELSEN K, DUNCAN JR. *Animal Brucellosis*, Chapter 17, CRC Pres, Boston, USA, Page: 383-409, 1990.
52. ZINSSTAG J, ROTH F, ORKHON D, CHIMED-OCHIR G, NANSALMAA M, KOLAR J, VOUNATSOU P. A model of animal- human Brucellosis transmission in Mongolia. *Preventive Veterinary Medicine*, 69: 77-95, 2005.
53. DURAN-FERRER M, LEON L, NIELSEN K, CAPORALE V, MENDOZA J, OSUNA A, PERALES A, SMITH P, DE-FRUTOS C, GOMEZ-MARTIN B, LUCAS A, CHICO R, DELGADO OD, ESCABIAS JC, ARROGANTE L, DIAZ-PARRA R, GARRIDO F. Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*, 100: 219-231, 2004.

54. BAUMGARTEN D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. *Veterinary Microbiology*, 90: 63-69, 2002.
55. Task force meeting of the “Sheep&Goat Brucellosis” sub-group, Portugal, Faro, 21-22 October 2004.
56. GODFROID J, KASBOHRER A. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty- first century. *Veterinary Microbiology*, 90: 135-145, 2002.
57. NETO F, VAZ Y. Conjunctival Rev. 1 vaccination of adult sheep and goats in Tras-os-Montes, Portugal. *Epidemiologie et Sante Animale*, 42: 99-107, 2002.
58. CORNILLE Y. The Rev.1 vaccination plan for sheep in the Provence-Alpes-Cote d’Azur (PACA) Area A prerequisite for a successful readication of *Brucella melitensis*. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev. 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
59. MINAS A, MINAS M, STOURNARA A, TSELEPIDIS S. The “effects” of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Preventive Veterinary Medicine*, 64: 41–47, 2004.
60. Hayvan Hastalık ve Zararlıları Mücadele Programı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2005.
61. Hayvan Hastalık ve Zararlıları Mücadele Programı. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 2007.
62. ANONİM. <http://www.oie.int/> Erişim Tarihi: 20.03.2007.
63. 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.
64. BANAI M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Veterinary Microbiology*, 90: 497–519, 2002.
65. BLASCO JM. Existing and future vaccines against Brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 62: 33-37, 2006.
66. GUILLOTEAU LA, LAROUCAU K, OLIVIER M, GRILLO MJ, MARIN CM, VERGER JM, BLASCO JM. Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, 24: 3461–3468, 2006.
67. KAHL-MCDONAGH MM, ELZER PH, HAGIUS SD, WALKER JV, PERRY QL, SEABURY CM, DEN HARTIGH AB, TSOLIS RM, L. ADAMS LG, DAVIS DS, FICHT TA. Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, 24: 5169–5177, 2006.
68. KAHL-MCDONAGH MM, FICHT TA. Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infection and Immunity*, p. 4048–4057, 2006.
69. BANAI M, ADAMS LG, FREY M, PUGH R, FICHT TA. The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin binding proteins (PBPs) in pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 90: 263-279, 2002.
70. ELBERG SS, FAUNCE K. Immunization against *Brucella* infection VI. immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. Department of Bacteriology, University of California, Berkeley, California, 1956.
71. 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.
72. DEQIU S, DONGLOU X, JIMING Y. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology*, 90: 165–182, 2002.

73. ESTEVAN M, GAMAZOA C, GRILL MJ, GARC'IA del BARRIO G, BLASCO JM, IRACHE JM. Experiments on a sub-unit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine*, 24: 4179–4187, 2006.
74. GUILLOTEAU LA, LAROUCAU K, VIZCAINO N, JACQUES I, DUBRAY G. Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c Mice, *Vaccine*, 17: 353-361, 1999.
75. EDMONDS MD, CLOECKAERT A, HAGIUS SD, SAMARTINO LE, FULTON WT, WALKER JV, ENRIGHT FM, BOOTH NJ, ELZER PH. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis*  $\Delta$  omp25 deletion mutant. *Research in Veterinary Science*, 72: 235-239, 2002.
76. BOWDNA RA, ESTEINA SM, ZYGMUNTB MS, DUBRAYB G, CLOECKAERTB A. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and Infection*, 2: 481–488, 2000.
77. ESTEIN SM, CHEVES PC, FIORENTINO MA, CASSATARO J, PAOLICCHI FA, BOWDEN RA. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Veterinary Microbiology* 102: 203–213, 2004.
78. CLOECKAERT A, JACQUES I, GRILLÓ MJ, MAR'IN CM, GRAYON M, BLASCO JM, VERGER JM. Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine*, 22: 2827–2835, 2004.
79. VIZCAINO N, KITTELBERGER R, CLOECKAERT A, MAR'IN CM, FERNA'NDEZ-LAGO L. Minor nucleotide substitutions in the *omp31* Gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infection And Immunity*, page: 7020–7028, 2001.
80. ADONE R, CIUCHINI F. *Brucella abortus* RB51 and hot saline extract from *Brucella ovis* as antigens in a complement fixation test used to detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, page: 119–122, 2001.
81. LAPAQUE N, MORIYON I, MORENO E, GORVEL JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Microbiology*, 8: 60–66, 2005.
82. FELEDER C, BLATTEIS CM. The role of the spleen in the febrile response induced by endotoxin in guinea pigs. *Journal of Thermal Biology*, 31: 220–228, 2006.
83. CL. LAURENT T, MERTENS P, DIERICK JF, LETESSON JJ, LAMBERT C, DE BOLLE X. Functional, molecular and structural characterisation of five anti-*Brucella* LPS mAb. *Molecular Immunology*, 40: 1237–1247, 2004.
84. MAHAJAN NK, KULSHRESHTHA RC, MALIK G, DAHIYA JP. Immunogenicity of major cell surface protein(s) of *Brucella melitensis* Rev 1. *Veterinary Research Communications*, 29: 189-199, 2005.
85. FICHT TA. Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Veterinary Microbiology*, 90: 311-315, 2002.
86. DIAZ-APARICIO E, HERNANDEZ L, and SUAREZ-GUEMES F. Protection against Brucellosis in goats, five years after vaccination with reduced dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Tropical Animal Health and Production*, 36(2): 117-121, 2004.
87. MORIYON I, GRILLO MJ, MONREAL D, GONZALEZ D, MARIN C, LOPEZ-GONI 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.



88. VEMULAPALLI TH. Genetic and immunological analyses of A *Brucella abortus* protein exhibiting Lectin-like properties. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2000.
89. ARELLANO-REYNOSO B, D'IAZ-APARICIO E, LEAL-HERNÁNDEZ M, HERNÁNDEZ L, GORVEL JP. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. *Veterinary Microbiology*, 98: 307–312, 2004.
90. HAMDY MER, EL-GIBALY SM, MONTASSER AM. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. *Veterinary Microbiology*, 88: 85–94, 2002.
91. JIMENEZ DE BAGUES MP, ELZER PH, JONES SM, BLASCO JM, ENRIGHT FM, SCHURIG GG, WINTER AJ. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infection and Immunity*, 62: 4990-4996, 1994.
92. MOLIN LH. Evaluation of rough *Brucella* strains as vaccines for brucellosis and pseudorabies in swine. Louisiana State University, December 2004.
93. Report of WHO working group meeting on oral/conjunctival Brucellosis strain 2 vaccine. WHO, Rome, 1991.
94. VERGER JM, GRAYON M, ZUNDEL E, LECHOPIER P, OLIVIER-BERNARDIN V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 13: 191-196, 1995.
95. MURILLO M, GONZI MM, IRACHE JM, ARANGO MA, BLASCO JM, GAMAZO C. Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *Journal of Controlled Release*, 85: 237–246, 2002.
96. COMMANDERA NJ, SPENCER SA, WREN BW, MacMILLAN AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine*, 25: 43–54, 2007.
97. COMMANDER NJ, SPENCER SA, WREN B, MacMILLAN AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine*, 2006.
98. DING XZ, BHATTACHARJEE A, NIKOLICH MP, PAULSEN IT, MYERS G, SESHADRI R, HOOVER DL. Cloning, expression, and purification of *Brucella suis* outer membrane proteins. *Protein Expression and Purification*, 40: 134–141, 2005.
99. ESTEIN SM, CASSATARO J, VIZCAINO N, ZYGMUNT MS, CLOECKAERT A, BOWDEN RA. The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes and Infection*, 5: 85–93, 2003.
100. BANAI M, ADAMS LG, DANGOTT LJ, FREY M, FICHT TA. *Brucella* attenuation and relevance to vaccine properties. *Small Ruminant Research* 45: 129–137, 2002.
101. RAJASHEKARA G, GLOVER DA, BANAI M, O'CALLAGHAN D, SPLITTER GA. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (*virB4*), GR024 (*galE*), and GR026 (BMEI1090-BMEI1091) confer protection in mice. *Infection And Immunity*, Page: 2925–2936, May 2006.
102. BOSSERAY N. *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.

103. LINDLER LE, HADFIELD TL, TALL BD, SNELLINGS NJ, RUBIN FA, VAN DE VERG LL, HOOVER D, WARREN RL. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human Brucellosis. *Infection and Immunity*, page: 2490–2499, 1996.
104. CLOECKAERT A, GRAYON M, GREPINET O. An IS711 Element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, p. 835–839, 2000.
105. DELGADO S, FERNANDEZ M, CARMENES P. Influence of age and stage of gestation on serological response to subcutaneous or conjunctival *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccination in ewes. *Small Ruminants*, 19: 63-68, 1996.
106. STOURNARA A, MINAS A, BOURTZI-CHATZOPOULOU E, STACK J, KOPTOPOULOS G, PETRIDOU E, SARRIS K. Assessment of serological response of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev-1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*. *Veterinary Microbiology*, 2006.
107. BLASCO JM. The use of Rev. 1 in adult vaccination programmes in small ruminants in Spain. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev 1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
108. ALTON GG, JONES LM, ANGUS RD, VERGERD M. Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA, France, 1988.
109. HAZIROĞLU R, MİLLİ ÜH. Veteriner patoloji II. Cilt, Tamer Matbası, Yayıncılık Ltd. Şirketi, Ankara, sayfa 477-482, 1998.
110. BRITISH PHARMACOPEI. London, Page:163, 1985.
111. BOSSERAY N. Brucella infection and immunity in placenta. *Research in Microbiology*, 138(1): 110-113, 1987.
112. FENSTERBANK R, VERGER JM, GRAYON M. Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev 1. *Annals of Veterinary Research*, 18, 397-403, 1987.
113. BOSSERAY N. Colonization of mouse placentas by *Brucella abortus* inoculated during pregnancy. *British Journal of Experimental Pathology*, 61, 361-368, 1980.
114. JIMENEZ DE BAGUES MP, MARIN CM, BARBERAN M, and BLASCO JM. Responses of ewes to *B.melitensis* Rev 1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann. Rech. Vet.*, 20: 205-213, 1989.
115. ZUNDEL E, VERGER JM, GRAYON M, MICHEL R. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: safety and serological responses. *Annals of Veterinary Research*, 23, 177-188, 1992.
116. FALADE S. Studies on *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine in goats. *Zentralbl Veterinarmed B*, 28: 749-458, 1981.
117. BHATTACHARJEE AK, IZADJOO MJ, ZOLLINGER WD, NIKOLICH MP, HOOVER DL. Comparison of protective efficacy of subcutaneous versus intranasal immunization of mice with a *Brucella melitensis* lipopolysaccharide subunit vaccine. *Infection and Immunity*, 74(10), 5820–5825, 2006.
118. HOOVER DL, CRAWFORD RM, VAN DE VERG LL, IZADJOO MJ, BHATTACHARJEE AK, PARANAVITANA CM, WARREN RL, NIKOLICH MP, HADFIELD TL. Protection of mice against Brucellosis by vaccination with *Brucella melitensis* WR201 (16M $\Delta$ purEK). *Infection and Immunity*, 67(11), 5877-5884, 1999.

119. CASSATARO J, VELIKOVSKY CA, BARRERA S, ESTAIN SM, BRUNO L, BOWDEN R, PASQUEVICH KA, FOSSATÌ CA, GIAMBARTOLOMEI GH. A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B.melitensis* and *B.ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infection and Immunity*,73(10), 6537-6546, 2005.
120. TIBOR A, JACQUES I, GUILLOTEAU L, VERGER JM, GRAYON M, WANSARD V, and LETESSON JJ. Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice. *Infection and Immunity*,66(11),5561-5564, 1998.
121. JIMENEZ DE BAGUES MP, GRILLO MJ. Experience on the mouse model for the control of Spanish Rev.1 vaccines. FAO/WHO/OIE Round table on the use of Rev.1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA Alfort, France, 21-22 September 1995.
122. ERDEM R, WILLIAMS CF, STABLEFORTH AW. *Brucella melitensis* Rev 1 aşısı immunité süresi ikinci gebelik eprüvasyonu. *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2(2), 1969.

## ÖZGEÇMİŞ

14.10.1973 tarihinde Kahramanmaraş' da doğdum. İlkokul öğrenimimi Payas Fahrettin Altay İlkokulu'nda, ortaokul öğrenimimi Mut Lisesinde, lise öğrenimimi ise Abdülkadir Paksoy Kız Lisesinde tamamladım. 1990 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde eğitime başladım ve 1995 yılında mezun oldum. 2003 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitime başladım. Özel sektörde ve Milli Eğitim Bakanlığında çalıştıktan sonra, 2001 yılından itibaren Tarım ve Köyişleri Bakanlığına bağlı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde görev yapmaktayım.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması ve yazımı aşamasında bana yol gösterip, zaman ayıran, yardım ve desteklerini esirgemeyen, danışman hocam Prof. Dr. Sayın Aysin ŞEN' e, tezimde histopatolojik incelemeleri yapan Prof. Dr. Sayın Deniz MISIRLIOĞLU' na ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, tezimin deneysel aşamasında bana yardımlarını esirgemeyen Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdür Sayın Necdet AKKOCA' a, Enstitü Müdür Yardımcımız Hasan AKTAR, Dr. Öznur YAZICIOĞLU, Dr. A.Zeki YILMAZ, Vahap ADIGÜZEL, Kadir KOÇ ve Ali Kemal KOÇAK ve çalışma arkadaşlarıma en derin sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman her koşulda yanımda olan değerli aileme, Nefise, Selçuk, Güney, İsom, Gülten ve Yasemin' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.