

**ISPARTA İLİ VE İLÇELERİNDE ÇİĞ SÜTLERDE *Brucella abortus*'a KARŞI
OLUŞTURULAN ANTİKORLARIN ELİSA VE RİNG TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Barış SERTTAŞ
Yüksek Lisans Tezi

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ISPARTA 2006

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.....	3
3. MATERYAL VE METOT.....	17
4. BULGULAR.....	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
6. KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ÖZET

Isparta ili ve ilçelerinde çiğ sütlerde *Brucella abortus*'a karşı oluşturulan antikorların ELİSA ve Ring Testi ile Araştırılması

Bruselloz insan ve hayvanlarda görülen, *Brucella* cinsine ait mikroorganizmaların neden olduğu kronik, bulaşıcı ve subakut bir hastalıktır. *Brucella* etmeni ilk olarak 1887 yılında İngiliz hekim David Bruce tarafından tespit edildiği için Bruce'ye atfen *Brucella* denilmiştir.

Bu çalışmada ilk olarak Isparta merkez ve merkeze bağlı ilçelerden 500 adet süt örneği alınarak laboratuara getirilmiş laboratuarda Milk Ring Testi (MRT) ile tarama testi yapılarak pozitif ve negatif süt örnekleri tespit edilmiştir. MRT'de 500 süt örneğinden 281 (% 56.1) pozitif sonuç; 219 (53.9) süt örneği negatif sonuç vermiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise MRT ile tespit edilen pozitif ve negatif örnekler ELİSA yöntemi uygulanarak tekrar incelendi. MRT testinde negatif olan örnekler ELİSA yönteminde pozitif ; MRT de pozitif olan örneklerin ELİSA'da negatif olduğu tespit edilmiştir. ELİSA testinde ise 86 örnek pozitif çıkarken 414 örnek ise negatif olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda ELİSA testinin MRT testinden daha duyarlı ve daha doğru sonuçlar verdiği görülmüştür.

ANAHTAR KELİMELELER: *Brucella*, MRT , ELİSA

ABSTRACT**Detection of *Brucella abortus* antibodies in cow's milk of the Isparta area by Ring and ELISA**

Brucella is a chronic infectious illness which is caused by the microorganism that belongs to the *Brucella* genus and is seen in people and animals. Because the illness was found in 1887 by David Bruce it is dedicated to his name and it is named as *Brucella*.

In this search 500 bottles of milk were taken from Isparta and its towns. They were brought to laboratories and they passed a test which is named Milk Ring Test (MRT). The positive and negative examples were found.

In the second phase of the search the milk which was tested by MRT was controlled by the ELISA method. The results showed that the ones which were found to be positive by MRT were proved to be negative in ELISA and vice versa.

KEY WORDS: *Brucella*, MRT, ELISA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Antijenin farklı dilüsyon oranlarındaki OD değerleri.....	25
Şekil 4.2. Konjugatın (Protein G) farklı dilüsyonlardaki OD değerleri.....	26
Şekil 4.3. Negatif kontrol grupları dikkate alınarak hesaplanan cut-off değeri.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Fiziko kimyasal açısından inek sütünün bileşenleri ve bir litre sütteki miktarları	11
Çizelge 4.1. Örneklerin alındığı yerleşim birimleri ve örnek sayısı.....	22
Çizelge 4.2. Süt örneklerinde MRT sonuçlarının yerleşim yerlerine göre dağılımı.....	23
Çizelge 4.3. Kullanılan dilüsyonlara göre ELİSA uygulanan örneklerin pozitif ve negatif kontrollerinin OD değerleri.....	28
Çizelge 4.4. Analizi yapılan 500 inek sütü örneğinin yerleşim birimlerine göre dilüsyon oranlarına göre OD değerleri.....	29
Çizelge 4.5.Süt örneklerinde ELİSA sonuçlarının yerleşim birimlerine göre dağılımı.....	42

1. GİRİŞ

Bruselloz, insan ve hayvanlarda görülen, *Brucella* cinsine ait mikroorganizmaların neden olduğu kronik, bulaşıcı ve subakut bir hastalıktır. Koyun, keçi, domuz ve sığır gibi hayvanların genital organları ile memelerine yerleşerek, abort (yavru atımı), infertilite (kısırlık), mastitis (meme iltihabı), orşitis (erbezi iltihabı) ve artritis (eklem iltihabı) gibi komplikasyonlara neden olan, hemen hemen dünyanın büyük bir bölümünde ve özellikle de endemik yörelerde yaygın olarak görülen, büyük ekonomik kayıplara yol açan önemli bir zoonozdur. Bu hastalığa, Malta ateşi veya Malta humması, dalgalı ateş veya dalgalı humma, Akdeniz humması, yavru atma hastalığı, enfeksiyöz abortus, Bang hastalığı isimleri de verilmektedir (Fraser, 1991; Trujillo, vd., 1994; Fazlı, 2000; İzgür, 2000; Akritidis ve Pappas, 2001; Boschirolu, vd., 2001).

Etmen ilk kez 1887 yılında, İngiliz hekim David Bruce tarafından malta ateşi olarak ifade edilen hastalıktan ölen bir askerin dalağından izole edilmiştir (Corbel, 1997; Alexio, vd., 1999, Sözen, 2000). Bruce, bu mikroorganizmaya önce *Micrococcus melitensis* adını vermiş, fakat daha sonra onun adına *Brucella melitensis* denilmiştir. Mikroorganizma, 1905 yılında enfekte olmuş keçilerden izole edilmiş ve keçi sütü ile enfekte insanların serumlarında özgül antikorların varlığı saptanmıştır (Güllüce, 1993; Özsan,2000). Bang, sığırlarda yavru atma etmeninin küçük bir basil olduğunu tespit ederek buna *Bacillus abortus* ismini vermiştir (Özsan, 2000). Hutryra ve Marek, 1909 yılında Macaristan'da, Traum, 1914'de ABD'de domuzların yavru atımına neden olan bakteriyi izole ederek buna *Bacterium abortus suis* ismini vermişlerdir (Güllüce, 1993; Özsan, 2000). 1918 yılında, insanlarda malta hummasına neden olan etmen ile domuz ve sığırdarda yavru atımına neden olan etmenin aynı morfolojik ve serolojik yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Güllüce, 1993). Mayer ve Schaw 1920 yılında, abortus, suis ve melitensis gruplarını

birleştirerek, bu hastalığı ilk kez tespit eden bilim adamı David Bruce'in adına *Brucella*, yaptığı hastalığa da Brusellosis adını vermiştir.

Buddle ve Boyes, 1953 yılında Yeni Zelanda'da epididimitisli koçlardan *Brucella ovis*'i; Stoonner ve Lacman Utah'da ağaç ratlarından *Brucella neotoma*'yı; Carichael ve Bruner, 1968 yılında köpeklerden *Brucella canis*'i izole etmiştir (Güllüce, 1993; Özsan,2000). Preiz, 1902 yılında Macaristan'da; Zeller ve Zwick, 1910'da Almanya'da; Benfanti, 1912'de İtalya'da ve yine çeşitli dönemlerde gerçekteştirilen araştırmalarla da Avusturya, İsveç, Norveç, Hollanda, İsviçre ve diğer Avrupa ülkelerinde Brusellosis hastalığının varlığı saptanmıştır. Yurdumuzda bu etmenin tespitine yönelik ilk çalışmalar, 1915 yılında Kural ve Akalın'ın İstanbul'daki bir hastada, hastalığın tespiti amacıyla gerçekteştirmiş oldukları çalışmalarıyla başlamıştır. Daha sonra etmen, Berke tarafından 1931 yılında sığırlarda, Köylüoğlu ve Aktan tarafından da 1944 yılında Bandırma merinos çiftliğindeki koyunlarda tespit edilmiştir. Golem, 1943'de insan ve hayvanlarda etmenin varlığını serolojik olarak ortaya koymuştur. İstanbulluoğlu ve arkadaşları tarafından 1983 yılında *Brucella canis* etmeni köpeklerde serolojik olarak belirlenmiştir. İzgür ve arkadaşları ise 1988'de Ankara'da at Brusellosis dağılımının tespitine yönelik çalışmalar yapmışlardır (Güllüce, 1993).

2. KAYNAK BİLGİSİ

Brucella cinsi mikroorganizmalar, küçük, gram negatif, kısa çubuk veya kokobasil şekle sahip, hareketsiz, spor oluşturmeyan bakteriler olup, Parvobacteriaceae familyasında yer almaktadırlar. Bu cinse mensup mikroorganizmaların boyutları 0,5-0,7 x 0,6-1,5 µm civarında olup, flagella taşımazlar ve hücre içi parazitidirler. Genellikle kapsül oluşturmazlar. Ancak hastalıklı canlıdan yeni izole edilen smooth (S) karakterdeki kolonilerde, ince bir kapsülün bulunduğu ortaya konulmuştur (Fraser, 1991; Arda vd.,1992; Güllüce, 1993; Holt, vd., 1994; Kocabeyoğlu vd., 1994; Özsan, 2000; Levinson ve Jawetz, 1998; Al-Eissa ve Faap 1994).

Brucella cinsine ait mikroorganizmalar; aerofilik, karboksifilik ve oksidatifler. Uygun şartlar sağlandığı takdirde, karbonhidratlı ortamda çok az fermentatif reaksiyon gösterirler. Aside dirençli değildirler ve ekzotoksin oluşturmazlar. Besiyerlerine karaciğer ekstresi, kan, glikoz, serum veya protein katılması, üremeleri üzerine olumlu etki yapar.

Brucella cinsine ait türler genellikle 20-40°C arasında üremektedirler. Optimum üreme sıcaklığı 37°C civarındadır, 20°C de çok yavaş üreme gösterirler. Bu cinse mensup altı tür bulunmakla birlikte (*Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella neotomae*), 1994 yılında deniz memelilerinin erkeklerinde patojen olan yeni bir *Brucella* türü tespit edilmiş ve bu türe, *Brucella marin* adı verilmiştir (Güllüce, 1993; Singh, vd., 1998; Alexio, vd, 1999; İzgür, 2000; Özsan, 2000).

Brucella abortus temelde sığırları enfekte etmesine rağmen bufalo, deve, geyik, köpek, at, koyun ve insanlarda da enfeksiyona neden olmaktadır. Ağır gelişen bu mikroorganizma yavaşça yayılım gösterir ve yumuşak huylu enfeksiyonlara neden olur.

Etmenin 9 biyotipi bulunmakta olup, katalaz ve oksidaz pozitiflerdir. Gelişmeleri için özellikle ilk izolasyonlarında %10 oranında CO₂'e gereksinim duyarlar ve sülfür ihtiva eden protein ve amino asitlerden H₂S üretirler. Nitrati nitrite indirgerler. Genellikle bazik fuksin, metil viyole, pironin ve safranin bulunan, fakat tizonin bulunmayan uygun ortamlarda gelişirler (Fraser, 1991; Arda vd., 1992; Güllüce, 1993; Holt, vd., 1994; İzgür, 2000). *Brucella* yavaş ürer. Etmen izole edileceği zaman, koloni oluşumunu sağlayarak, dissosiasyonu sınırladığından dolayı, genellikle katı besiyerleri tercih edilir. Koloni oluşumu ancak 4. günden sonra görülmeye başlar. Oluşan koloniler; konveks, kenarları düzgün, 0,5 mm çapında olup, ışık üzerine vurduğunda, merkezde, mavimsi yeşil, gri renkte refleler oluşturur ve koloniler daha sonra matlaşır, dissosiye olmaya başlar (S tipi). R tipi koloniler ise S tipi kolonilere göre daha büyük çapta ve mat granüllü bir yüzeye sahiptir. M tipi kolonilerin ise antibiyotik ve kimyasal maddelerin etkileri sonucu oluşan L formları tarafından meydana getirildiği bildirilmiştir. *Brucella* sıvı besiyerlerinde yavaşça üreyerek, homojen bir bulanıklıkla birlikte dipte yumurta akı benzeri tortu oluşturur. R tipi koloniler ise tüp çalkalandığında granüller şeklinde ortamda dağılım gösterir (Fraser, 1991; Arda vd., 1992; Güllüce, 1993; Holt, vd., 1994; İzgür,2000).

Brucella antijenleri aglutinojenik, presipitojenik, opsojenik ve allerjik yapıda kompleks antijenlerdir. Kimyasal yapıları; polisakkarit, protein, lipid ve deoksiribonükleik asidin türlere göre değişik karışımlarından ibarettir (Güllüce, 1993). Birçok ülke, sığırlardan Brusellosisi başarılı bir şekilde eradike etmiş olmasına rağmen, ülkemizde hala önemini korumaktadır (Anon., 2001). Aynı etmen insan Brusellosisinin oluşumunda da önemli bir faktör olup, özellikle endemik bölgelerde, ciddi ekonomik ve sağlık problemlerine neden olmaktadır (Figuerola, vd, 1995; Rijpens, vd, 1996; Corbel, 1997; Samartino, vd, 1999; Cengiz, 2000; Boschioli, vd, 2001).

Hayvanlar arasında bulaşma genellikle fetus, fetal membranlar, yavru atan hayvanların vajinal akıntıları, amniyon sıvıları ve plasenta artıklarıyla olmaktadır. Bir atık çevreye 1.000-10.000 milyar bakteri saçmaktadır. Etmenin insanlarda düşüğe neden olduğuna

dair yeterince delil bulunmamaktadır (Fraser, 1991; Figueroa, vd., 1995; Cengiz, 2000; İzgür, 2000; Boschioli, vd., 2001). Etmen, pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin (yağ, krema, peynir vs.) alımının yanısıra, hayvanların yün ve kıllarıyla olan temasla da insanlara bulaşmaktadır. Bu nedenlerle, hayvan sahipleri, çobanlar, veteriner hekimler ve laboratuvar çalışanları yüksek oranda enfeksiyona yakalanma riski taşımaktadırlar (Altındış, 2001). Sığır, koyun ve keçilere uygulanan ve hayvanları etmenlere karşı korumak amacıyla yapılan *Brucella abortus* S19 ve *Brucella melitensis* Rev 1 aşılama esnasında iğnenin kırılmasıyla, numunenin hekimin üzerine sıçramasıyla bulaşma gerçekleşebileceği gibi, artropodlar, kemiriciler, vahşi hayvanlar ve özellikle de çoban köpekleriyle de insanlara bulaşma olmaktadır (Mathai, vd., 1996 ; Metin, 1996; Rijpens, vd., 1996; Al-Eissa ve Faap, 1994; Cengiz, 2000).

İnsanlar *Brucella* etmenlerini yiyecek olarak kullandıkları etlerden de almaktadır. Özellikle mezbahada çalışan işçiler ile çiğ et yeme alışkanlığı bulunan yörelerde yaşayan insanlar ve yeterince pişmemiş et ve et ürünlerini tüketenler, her zaman bulaşma riski taşımaktadır (Fraser, 1991; Arda vd., 1992; Cengiz, 2000; İzgür, 2000). İnsanlar etmeni, ağız yolu, deri teması, solunum, aşılama ve cinsi temas yoluyla almaktadırlar. Normalde etmenin sağlam deriden geçmesi mümkün değilken, ıslak deri bu geçişi kolaylaştırır. Sindirim sistemiyle alınan etmenin enfeksiyon oluşturabilmesi için *Brucella melitensis*'in 5000 adet olması yeterliyken, *Brucella abortus* ve *Brucella suis* için bu değer 106-107 olması gerekir. Solunumla etmenin alınması halinde *Brucella melitensis* için 1300, *Brucella abortus* ve *Brucella suis* için 100 bakteri alınması enfeksiyon için yeterlidir (Al-Eissa ve Faap, 1999; Fazlı, 2000; İzgür, 2000; Kıyan, 2000).

Brucella etmenlerinin tanısı; biyotiplendirme, oksidatif metabolizmada kullanılan substratlar ve boyaların bakteriyostatik etkisine bağlı olarak yapılan testler ile gerçekleştirilir. Bu etmenlerin duyarlılıklarının belirlenmesinde fajlar önemli bir etmendir. Bu amaçla Tbilisi (tb), Weybridge, Berkeley, Freneze, Izatnagur fajlarından yararlanılmaktadır.

R ve M tipi koloni oluşturan *Brucellalar* için ise R, R/O, R/C fajları kullanılmaktadır (Arda vd., 1992; Güllüce, 1993). Hayvanların *Brucella* enfeksiyonlarına karşı oluşturdıkları primer yanıtta, önce IgM antikor ve bunu takiben IgG antikor meydana gelir. Sekonder yanıtta ise, IgG antikor oluşur. IgM antikor miktarı, hastalığın ilk haftasında yükselir ve üçüncü aya geldiğinde en yüksek seviyeye ulaşır. IgG'nin miktarı ise, hastalığın üçüncü haftasından sonra artar. 6-8 haftada maksimum seviyeye ulaşır ve kronik vakalarda yüksek seviyede kalır. IgM aglutininleri, yeni enfekte olmuş sığırlarda bulunur (Güllüce.1993). S 19 ile aşıları hayvanların serumlarındaki IgM, IgG₁ ve IgG₂ antikorlarının oransal dağılımlarının, *Brucella abortus* ile enfekte olmuş sığırlarinkinden farklı olduğu bulunmuştur. Aşılamadan hemen sonra ilk ortaya çıkan ve 91 gün boyunca baskın halde kalan antikor, IgM' dir. Enfekte olmuş hayvanların serumlarında IgG₁ sınıfı antikor baskın durumdayken, IgM antikorları az miktarlarda bulunurlar. S 19 ile aşılanan sığır ve buzağların serumda oluşan antikorların büyük bölümünü IgM ve IgG₁ oluşturmaktadır. IgG₂'ler ise, az miktarda bulunmaktadır. IgG; termostabil, yavaş sedimentasyonlu, antikor aktivitesi merkaptotanol ile tahrip edilemeyen ve rivanol ile yavaş çöken, IgM ise; termolabil, hızlı sedimentasyonlu, aktivitesi merkaptotanol ile tahrip edilebilir ve rivanol ile hızlı çöken immunoglobulinlerdir (Arda vd., 1992; Güllüce, 1993). Pastörizasyon ısısında 10-15 dakikada ölen *Brucella* grubu bakteriler, dezenfektan ve antibiyotiklere karşı duyarlı olup, karanlık yerlerde, doku, süt veya uterus akıntıları içinde uzun süre canlı kalabilirler. Kokuşma sonu kısa zamanda ölürlür. Suda 35 gün, güneş görmeyen topraklarda ise, yaklaşık 70 gün kadar yaşayabilirler. Kültürleri buzlukta 3-6 ay kadar canlı kalabilir (Arda vd., 1992). *Brucella abortus*, hücre içine yerleşen ve orada çoğalma eğiliminde olan bir bakteridir. Vücuda alındıktan sonra bölgesel lenf yumrularına ve oradan da bir kaç gün içinde kan dolaşımına geçer. Kanda 2-3 hafta kalıp, lenf yumrularına, dalak, meme, gebe uterusu gibi organlar ile seyrek olarak da eklem, tendon kılıflarına yerleşerek, lezyonların oluşumuna neden olur. Enfekte olmuş süt hayvanlarının çoğu, etmeni sütleriyle yayarlar. Memelerde lokalize olarak, mastitis, supramamal lenf yumrularında büyüme ve sekonder etmenlerin katkısıyla da süt veriminde azalmaya neden olur. Sütte lökosit sayısında artma, klor oranında yükselme, şeker seviyesinde düşme, katalaz ve asit fosfataz oranında artma,

vitamin B2 ve C miktarları ile sütteki yağ oranında azalma ve sütün tadında tuzluluk görülür. Ayrıca enfekte hayvanlar, vajinal akıntılarıyla, normal doğum ve abortus suretiyle atılan yavru zarları ve ölü fetus ile etmeni etrafa yayarlar. *Brucellaların* inkübasyon süreleri, etmenin giriş yolu ve sayısına bağlı olarak 10-250 gün arasında değişir (AI-Eissa ve Faap, 1999; Arda vd.,1992; Güllüce, 1993; Metin, 1996; Tekeli, 2000). Hayvanları brucellosis enfeksiyonundan korumak için en önemli tedbir, hasta olan hayvanları sürüye sokmamaktır. Bunun için, hayvanlar sürekli olarak kontrol altında bulundurulmalı ve kontrolsüz olarak dışarıdan çift tırnaklı hayvan girişi önlenmelidir. Sürüde bulunan taşıyıcılar çeşitli teknikler kullanılarak teşhis edilmeli ve ayrılmalıdır. Serolojik olarak tespit edilen enfekte hayvanlar, eradike edildikten sonra, barınaklarda hijyenik koşullara uygun tedbirler alınmalıdır. Süt sağımı esnasında, enfeksiyonun bulaşma riski bulunduğundan, sağımı gerçekleştiren kişi, dezenfeksiyon kurallarına titizlikle uymalı ve hayvanlarla direkt temasta olan çoban, kesimhane işçileri, veteriner hekimler enfeksiyona karşı dikkatli olmalıdırlar. Bulaşmaya karşı hayvanları tamamen koruma altına almak için aşılama yapılmalıdır (Arda vd., 1992; Corbel,1997). Etmenin üremesinde ve izolasyonunda karşılaşılan güçlükler nedeniyle, brucellosis teşhisinde daha pratik olan ve eradikasyon programlarının temel unsurunu teşkil eden serolojik testlerden faydalanılmaktadır (Samartino, vd., 1999; Baysal, 2000). Teşhis, kontrol ve eradikasyon programlarında kullanılan başlıca serolojik testler şunlardır; Rose-Bengal Plate testi (RBPT), Serum Aglutinasyon Testi (SAT), Rivanol Testi (RT), Merkapto Ethanol Testi (MET), Coombs Testi (Antiglobulin Testi), Kompleman Fiksasyon Testi (CFT), Agar Jel İmmünodiffüzyon Testi (AJIDT), İndirekt Hemoliz Testi (IHT), Milk Ring Testi (MRT), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radio Immunassay (RIA). Bu serolojik yöntemler, kan serumu, süt ve süt serumu ile salgı ve sıvılar kullanılarak uygulanmaktadır (Ballows, vd., 1991; Güllüce, 1993; Mikolon, vd., 1998; Baysal, 2000; İzgür, 2000). İmmünoenzimatik reaksiyonların ilk temel prensipleri, 1971 yılında Engvall ve Perlmen adlı bilim adamlarının yapmış oldukları çalışmalarla ortaya konulmuştur (Szulowski, vd.,1999; Baysal, 2000; Paulo, vd., 2000; Şahin, 2000; Öngör vd.2001). *Brucella abortus'a* karşı oluşturulan antikorların tespiti amacıyla indirekt ELISA'nın kullanım çalışmalarına ise 1976 yılında

başlanmıştır (Güllüce, 1993; Gall, vd.,1998). Sığır brusellosisinin teşhisi amacıyla kullanılan bu yöntem, yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip olması, çok sayıda numunenin çalışılmasına imkan sağlaması ve ucuz olmasından dolayı çeşitli alanlarda tanı amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle de saha taramalarında büyük fayda sağlamaktadır. Bu yöntem diğer testlerden farklı olarak, tüm antikor izotiplerinin güvenilir bir şekilde tespitine imkan sağlamaktadır. (Sutherland,1984; Brock ve Madigan; 1991; Uzal, vd.,1996; Anguita, vd., 1997; Gall, vdl.,1998; Asbakk vd., 1999).

Deneyin temel prensibi, bir enzimle işaretli antiglobulin kullanarak, antijen ile birleşen antikorları tespit etmektir. Bu amaçla, antijen solid fazda olan 96 çukurlu Polyesteryn mikroyaytlara pasif olarak absorbe edilir. Polyesteryn platelerin yanısıra polyethylen plate, naylon boncuk ve nitroselüloz platelerin kullanıldığı çalışmalar da bildirilmiştir (Güllüce, 1993; Bilgehan, 1994). Antijen olarak; ısı ile öldürülmüş *Brucella abortus* strain19 strain1119-3'ün potasyum klorürdeki ekstresi (Thoen, vd., 1983,1995; Güllüce ve Leloğlu, 1996), sonikasyon antijeni, doğal hapten polisakkarit, sitosol antijeni, otoklav ekstraktı, santrifüj ekstraktı, smooth lipopolisakkarit (Diaz-Aparicio, 1994; Corbel, 1997; Abuharfeil ve Abo-Shehada,1998; Uzal vd., 2000) ve dış membran proteini kullanılmıştır. Substrat olarak; ABTS (2.2 azino-di-3-ethyl benthiozoline-6 sulfonate), 5-aminosalisilik asit, ortofenil-diamin (OPD), P-nitrofenil, O-tolidin-5-amino-2 hidroksibenzoik asit kullanılmaktadır (Güllüce. 1993). Konjugat olarak ise; Alkalın fosfataz, galaktosidaz, horseradish peroksidaz enzimlerinden biriyle işaretlenmiş rabbit antbovin (Thoen, vd., 1983), goat anti-bovine IgG (Güllüce, 1993) ile Protein G antiglobulinleri kullanılmaktadır.

Protein G, C ve G grubu streptokokların hücre duvarı yüzeyinden elde edilen, memeli monoklonal veya poliklonal antikorlarının (IgG) F_c kısımlarına bağlanabilen bir antiglobulindir. Bu proteinin sentezi G grubu streptokokların G genini taşıyan lambda fajının *E.coli*'yi enfekte etmesi sonucunda bu bakteri tarafından da gerçekleştirilebilir (Bjorck,vd .,1987; Falkenberg, vd., 1987).

Süt, dişi memeli hayvanların süt bezlerinde, doğurdukları yavrularını beslemek amacıyla türe bağlı olarak farklı zamanlarda salgıladıkları ve içinde bir yavrunun ihtiyaç duyduğu tüm temel besin maddelerini ihtiva eden, beyaz-krem renge sahip ,kendine has kokusu ve tadı olan besleyici, koruyucu özellik taşıyan bir sıvıdır. Sütün temel fonksiyonu yeni doğan yavrunun gelişebilmesi, yaşayabilmesi ve dış etkilere karşı kendini koruyabilmesini garanti altına almaktır. Bu nedenle kalsiyum, fosfor ve ribofilavin açısından önemli bir kaynak olan süt, beslenme fizyologları tarafından temel gıda maddesi olarak kabul edilmektedir. Sütün önemli bileşenlerinden olan laktoz, süt yağı, kazein, laktoglobulin ve laktalbumin ise sadece sütün yapısında bulunmaktadır. Sütün temel kullanım alanları oldukça geniş olup bunlardan başlıcaları; yeni doğmuş yavrunun beslenmesi, temel gıda maddesi olarak toplumun beslenmesi, süt mamullerinin yapılması, sütün temel bileşimini teşkil eden kazein ve laktoz gibi maddelerin üretimi ve yardımcı madde olarak bir çok gıda maddesi üretimidir (Metin, 1996). Mineral madde, protein ve vitamin bakımından zengin olan inek sütünün, fizikokimyasal özellikleri açısından bileşenleri ve bunların bir litre sütteki miktarları Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Metin,1996). Araştırmacılar sütün bileşenlerinin; hayvan ırkı, laktasyon, hayvanın yaşı, hayvanın sağlık durumu, mevsimin etkisi, sağım zamanı, sağım şekli, kullanılan yem, bakım ve hayvanın psikolojik durumu, gebelik durumu ile kızgınlık durumundan etkileneceğini ifade etmişlerdir (Metin, 1996). Sütün ihtiva ettiği bu organik ve inorganik maddeler nedeniyle, sütte patojen ve patojen olmayan mikroorganizmaların çoğalması ve dolayısıyla insanlar için tehlike oluşturması kaçınılmaz bir sonuçtur. Bu nedenle dünyada ve ülkemizde çiğ ve pastörize sütler için kalite kriterleri konulmuştur. Örneğin Türk Gıda Tüzüğüne göre (TS 1019) A grubu pastörize sütler cm^3 'ünde 20.000' den çok bakteri taşımamalı, 1cm^3 'ü koliform bakterisi, 0.5cm^3 'ü 0.05 mg fenol değerinden çok fosfataz aktivitesi göstermemeli, metalimsi, pişmiş ve okside olmuş yada tabii olmayan bir tat ve koku almamış olmalı ve tüketime sunuluncaya kadar 10^0C altında saklanmalıdır (Demirci ve Gündüz, 1994).

Süt kaynaklı hastalıklar, mikrobiyal özellikleri ve kontrol altına alınma yolları Çizelge 2.1.'de verilmektedir (Güllüce, 1988; Metin, 1996). Ülkemizde 1995'de 10.601.550, 1996'da 10.760.915, 1997'de 10.076.526 ve 1998'de ise 9.970.531 ton süt üretimi gerçekleştirilmiştir. Dünyadaki süt üretiminin yaklaşık %2.1'inin ülkemizde gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Anon., 2000., Boyazoglu ve Morand-Fehr, 2001).

Çizelge 2.1..Fiziko-Kimyasal Özellikler Açısından İnek Sütünün Bileşenleri

1.	Emülsiyon Halinde Olanlar	Miktar g/lt
1.1.	Trigliseridler	30-45 g
1.2.	Fosfolipidler Lesitin Kefalin Sifingomiyelin	0.3 g
1.3.	Steroller Kolesterol Lonosterol 7-Dehidrokolesterol	0.1 g
1.4.	Gliseritler Digliseritler Monogliseritler	0.15-0.22 g
1.5.	Yağda Eriyen Vitaminler Vitamin A Provitamin (Karoten) Vitamin D Vitamin E	0.1-0.5 mg 0.1-0.6 mg 0.4 µg 1.0 mg
1.6.	Serbest Yağ Asitleri	1mEg
2.	Kolloidal Dispersiyon Halinde Olanlar	
2.1.	Kazein α_s – Kazein β – Kazein κ – Kazein	28-32 g 10.3 g 9.1 g 3.9 g
2.2.	Albumin α – Laktalbumin Serumalbumini Laktoglobulin A Laktoglobulin B	1.3 g 0.4 g 3.5 g
2.3.	Globulin Euglobulin Pseudoglobulin Yağ globülü proteinleri	0.3 g 0.3 g 0.2 g
2.4.	Enzimler Katalaz Peroksidaz Ksantinoksidaz Fosfataz(alkali ve asit) Aldolaz Amilaz(α ve β) Lipaz(membran ve plazma lipazı) Proteaz	

3. Gerçek Çözelti Halinde Bulunanlar		
3.1.	Karbonhidratlar	47.0 – 48 g
	α - Laktoz – Hidrat	17.7 – 18 g
	β – Laktoz	29.3 – 30 g
	Glukoz	50 mg
	Galaktoz	20 mg
	Diğer Şekerler	iz
3.2.	Katyonlar	
	Kalsiyum(Ca^{++})	1.25 g
	Magnezyum(Mg^{++})	0.10 g
	Sodyum(Na^{+})	0.50 g
	Potasyum(K^{+})	1.50 g
3.3.	Anyonlar	
	Dihidrojenfosfatlar($\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$)	
	Hidrojenfosfat(HPO_4^{--})	2.10 g (PO_4^{---})
	Fosfat (PO_4^{---})	
	Sitrat(Sitrik asit olarak)	2.00 g
	Klor(Cl^{-})	1.00 g
	Hidrojenkarbonat(HCO_3^{-})	0.20 g
	Sülfat(SO_4^{--})	0.10 g
3.4.	Suda Çözünür Vitaminler	
	B1 Vitamini(Tiyamin)	0.4 mg
	B2 Vitamini(Riboflavin)	1.5 mg
	Niasin	0.2 – 1.2 mg
	B12 Vitamini	7.0 μg
	B6 Vitamini	0.7 mg
	Pantotenik asit	3.0 mg
	Folik asit	1.0 μg
	Biyotin	50 μg
	İnositol	180 mg
	C Vitamini	20 mg
	Diğer Bileşikler(Azot olarak hesaplanmıştır)	
3.4.	Amonyak	2 – 12 mg
	Aminoasitler	3.5 mg
	Üre	100 mg
	Kreatin ve Kreatinin	15 mg

Sütün bu kadar yoğun tüketilmesi ve zengin içeriği nedeniyle *Brucella* ve diğer birçok patojen bakterinin kaynağı olması, dünya ve ülkemizde farklı kaynaklı süt örneklerinde *Brucella* sıklığını konu alan araştırmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Bu araştırmalardan başlıcaları aşağıda özetlenmiştir.

Heck vd., (1980), ELİSA yönteminin sığır sütünde *Brucella abortus*'a karşı oluşturulan antikorları belirlemede uygun bir metot olduğunu bildirmişlerdir.

Kerkhof vd., (1990), Sütte IgG₁, IgG₂ ve IgA antikorlarını, MRT ve ELISA yöntemleriyle analiz etmişler ve sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Araştırma sonucunda, MRT ile %92,8 pozitif sonuç elde etmişlerdir. Nicoletti ve Tanya (1993), Brusellosisli ve S 19 ile aşıl原因 hayvanlardan sağlanan 828 serum üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, ELİSA yöntemleriyle bu ineklerin 278'inde *Brucella abortus* ve S 19 varlığını tespit ederek, bu yöntemin Cart'a göre duyarlı, fakat daha az özgül olduğunu belirlemişlerdir. Diaz-Aparicio vd (1994), konjugat olarak Protein G ve antijen olarak da smooth lipopolisakkarit (S-LPS), doğal haptel polisakkariti ve sitosolu kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada, 55 *Brucella melitensis* pozitif keçi serumu için duyarlılığın %100 olduğunu aşılı 20 keçi için özgüllüğün %75 olduğunu saptamışlardır. Mathai vd., (1996), yapmış oldukları çalışmalarında ELISA yönteminin, brusellosis teşhisinde standart aglutinasyon testine göre daha üstün bir metot olduğunu kaydetmiştir. Nielsen, vd, (1996), Kanada'daki enfekte olmamış sürülerden sağlamış oldukları 6232 adet süt örneği ile Arjantin ve Şili'de enfekte olmuş sürülerden sağladıkları 202 adet örnek üzerinde ELISA ile yapmış oldukları incelemeler sonucunda, Şili'deki enfekte sürülerden sağlanan örnekler için %95'lik güven sınırı içinde çalışıldığında duyarlılığın %95.2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içinde ki duyarlılığın %98.7 olduğunu tespit etmişlerdir.

Nielsen vd (1996), 15716 adet serum örneği üzerinde yapmış oldukları çalışmada 0,460'lık ayırım değerinde, indirekt ELISA yönteminin %100'lük duyarlılık ve %96'lık özgüllüğe sahip olduğunu, 0,607'lik ayırım değeri söz konusu olduğunda ise, bu değerlerin sırasıyla %100 ve %98.5 olduğunu bildirilmiştir. Uzal vd., (1996), monoklonal anti-IgG₁ enzim konjugatını kullanarak sığır brusellosisini, indirekt ELISA ile incelemişlerdir. Aşılanmamış negatif serum, aşılanmış negatif serum ve pozitif ineklerden alınan serumların kullanıldığı bu araştırma sonucunda, ELISA'nın özgüllüğünün aşılanmamış negatif serumlar için %99.2, aşılanmış negatifler için %99.6, pozitif serumlar için %99,5 olduğunu belirlemişlerdir.

Nunez- Torres vd., (1997), protein G konjugatını kullanarak yapmış oldukları çalışmalarında, 33 adet enfekte hayvan serumu ve 39 adet sağlam hayvan serumu kullanmışlar ve ELISA yönteminde duyarlılığın %97, özgüllüğün ise %84 olduğunu bulmuşlardır. Stojek (1997), *Brucella* türlerine karşı oluşturulan antikorları tespit etmek için ELISA yöntemini kullanmıştır. Yeni enfekte olmuş veya kronik hastalardan toplanan serumlar üzerinde yaptığı serolojik denemeler sonucunda, ELISA'nın, SAT, CFT ve 2-ME ve Coombs testlerine göre daha yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterdiği sonucuna varmıştır. Abuharfeil ve Abo-Shehada (1998), koyunlarda *Brucella melitensis* enfeksiyonunu tespitinde kullandıkları RBPT, CFT, ELISA yöntemlerini karşılaştırmışlar ve ELISA yönteminin diğer testlere oranla daha yüksek bir özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olduğunu bulmuşlardır. Bercovich vd., (1998), yapmış oldukları çalışma da ELISA yöntemini, SAT, CFT, RBPT, deri aşırı duyarlılık engelleme testi (SDTH) ile mukayese etmişlerdir. Bu amaçla 11.132 adet brusellosis ihtiva etmeyen koyun serumu üzerinde yaptıkları incelemede, SAT ve diğer serolojik testlerin kombinasyonu kullanıldığında, enfekte hayvanların %75-88'inin *Brucella* ihtiva ettiğini aynı hayvanlar ELISA ile incelendiklerinde ise bu oranın %97-100 olarak değiştiğini saptamışlardır. Diğer bir ifadeyle ELISA ile 11132 negatif koyun serumundan 17 (%0.2)'sinde pozitiflik bulmuşlar ve özgüllüğün %99.8 olduğunu kaydetmişlerdir. Singh vd.. (1998), Dot-ELISA tekniğinin, "keçilerde brusellosis teşhisinde kullanılabilecek en hızlı ve kullanışlı metot olduğunu ileri sürmüşlerdir. Vanzini vd.. (1998), 2119 adet süt örneği ile 527

serum örneği üzerinde ELİSA yöntemini kullanarak yapmış oldukları çalışmalarında. aynı anda çok sayıda örnekle çalışma imkanı sağlayan bu testin, diğer metotlara göre yüksek bir özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Asbakk vd.. (1999), Finlandiya'da brucellosis'e yakalanmadığı kliniksel ve epidemiyolojik olarak saptanan sürülerden aldıkları negatif 100 serum örneği ile Kanada'da enfekte sürülerden sağladıkları 37 adet Rengeyiği serumu örneği üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, pozitif olarak kabul edilen 37 serumdan 34'ünün pozitif, üçünün ise negatif olduğunu, duyarlılığın ve özgüllüğün ise sırasıyla %100 ve %97.1 olduğunu belirlemişlerdir. Issa ve Jamal (2000), brucellosisli çocuklar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada, çocukların %58.2'sinin pastörize olmamış süt ve süt ürünlerini tükettikleri için etmene yakalandıklarını tespit etmişlerdir. Paulo vd., (2000), domuz serumu üzerinde yapmış oldukları çalışmada, indirekt ELİSA yönteminin özgüllüğün %99.9 duyarlılığın ise %98.9 olduğunu tespit etmişlerdir.

Güllüce ve Leloğlu (1996), inek sütünde *Brucella abortus*'a karşı üretilen antikorları MRT ve ELISA yöntemleriyle analiz etmişlerdir. Bu çalışmada antijen olarak *Brucella abortus* strain 19'un ölü hücre süspansiyonu antijen olarak kullanılmıştır. İncelenen toplam 712 adet süt örneğinden, MRT ile 401 (%56.32), ELISA ile de 467 (%65.97) örneğin sera-pozitif olduğunu belirlemiştir. Öngör vd (2001), yavru atmış koyunlarda *Brucella melitensis*'e karşı oluşan antikorları, ELISA, SAT, 2-Merkapto Etanol Mikroaglutinasyon testi (2-ME-MAT), Dithiothreitol Mikroaglutinasyon Testi (DTT – MAT) RBPT, CFT ile saptamaya ve bu testlerin duyarlılığın ve özgüllüğünü tespit etmeye çalışmışlardır. Bu amaçla Elazığ ve çevresinde yavru atmış 36 koyunun yer aldığı sürüden alınan 500 adet kan serumunda, ELISA ile 103 (%20.6), RBPT ile 55 (%11), SAT ile 84 (%16.8), CFT ile 89 (%17.8), 2-ME-MAT ile 79 (%15) ve DDT-MAT ile 81 (%16.2) örnekte pozitiflik saptamışlardır. Bu değerleri istatistiksel olarak karşılaştırdıklarında, ELISA ile CFT, SAT, 2-ME-MAT ve DTT-MAT arasında istatistiksel farklılığın önemli olmadığını ($p > 0.05$), fakat ELISA ile RBPT sonuçları arasında önemli bir farklılığın olduğunu ($p < 0.001$) belirlemişler ve sonuçta ELISA'nın

duyarlılığının %97, özgülüğünün ise %96 olduğunu tespit etmişlerdir.

Yukarıda özetlemeye çalışılan literatür bilgilerinden de anlaşılacağı üzere, ülkemizde, sütte *Brucella* sıklığı konusunda yapılan araştırma sayısı oldukça azdır. Avrupa Birliğine üye olma sürecini yaşadığımız bu günlerde, diğer alanlarda olduğu gibi, süt kalitesi bakımından bazı standartlara ulaşmamızın (Boyazoglu ve Morand-Fehr, 2001) gereği de dikkate alınırsa konunun önemi daha iyi anlaşılacaktır. Bu süt kalitesi ve mikrobiyolojisi üzerindeki araştırmaların yeni teknikler kullanılarak çoğaltılmasıyla mümkün olacaktır. Bu araştırmada, Isparta yöresindeki çeşitli yerleşim birimlerinden alınan süt örneklerinde *Brucella abortus*'a karşı oluşturulan antikorların MRT ve ELİSA ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örneklerin Toplanması

Isparta merkez ve ilçelerine bağlı 10 yerleşim yerinden toplam 500 adet süt örneği alınmıştır. Örnekler tüpler içerisinde laboratuvara getirilmiş ve MRT ile değerlendirildikten sonra derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır.

3.1.2. Pozitif Ve Negatif Kontrol Süt Örnekleri

Pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılacak süt örnekleri ve *B.abortus* S 19 antijeni IOWA State Üniversitesi (ISU) *Brucella* ve *Mycobacterium* Laboratuvar'ından sağlanmıştır.

3.1.3. Milk Ring Test Antijeni

Süt örneklerinin Hematoxylen boyası ile boyanmış, Standart MRT antijeni kullanıldı. Bu antijen Refik Saydam Hıfzısıhha Araştırma Merkezinden sağlandı.

3.1.4. ELISA Antijeni

Antijen olarak, *Brucella abortus* S19'un potasyum klorürdeki ekstresi (KCl extract) kullanılmıştır (Thoen vd., 1995; Güllüce ve Leloğlu 1996). Antijen IOWA State Üniversitesi (ISU) *Brucella* ve *Mycobacterium* Laboratuvar'ından sağlanmıştır.

3.1.5. Konjugat

Konjugat olarak C ve G grubu streptokokların hücre duvarlarından izole edilen ve horseradish peroksidaz ile işaretlenmiş Protein G kullanılmıştır (Sigma).

3.1.6. Substrat

Antijen ve konjugat titreleri için substrat olarak sitrik asit içinde %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ilaveli ABTS (2,2-azino-di-3-ethyl benthiozalie-6 sulfanate) kullanılmıştır (1 plate için, 25 ml sitrik asit, 100 μ l H_2O_2 , 125 μ l ABTS) (Sigma).

3.1.7. Solusyon ve Tampon Sıvıları

Seyreltme Ortamı (Dilüent): 29 g NaCl, 2.3 g Na_2HPO_4 , 0.2 g NaH_2PO_4 ve 10 ml tween 80, 1000 ml distile su içerisinde karıştırılarak, pH' sı 7,5' e ayarlanmış ve konjugat sulandırımı için kullanılmıştır.

Sitrat Tamponlu: 10.5 g sitrik asit monohidrat, 1000 ml deiyonize su içinde karıştırılarak, pH'sı 5 N NaOH ile 4'e ayarlanmış ve otoklavda 20 dakika süreyle 120⁰C'de siterilize edilerek, 4⁰C'de saklanmıştır.

Fosfat Tampon Solusyonu (PBS): 8.2 g NaCl, 15.5 ml 0.5 M Na_2HPO_4 (1.1 g/15.5 ml) ve 5.5 ml 0.5 M NaH_2PO_4 (0.37 g/5.5ml), 1000 ml deiyonize su içinde eritilerek otoklavda sterilize edilmiştir.

Hidroflorik asit: Reaksiyonu durdurmak için pH'sı 3.3 olan 0.1 M hidroflorik asit solusyonu kullanılmıştır.

ELISA yıkama solusyonu: 29 g NaCl, 2.3 g Na_2HPO_4 , 0.2 g NaH_2PO_4 ve 5 ml tween 80, 1000 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmış ve pH'sı 7,5 'e ayarlanmıştır.

Carbodiimide (Sigma) : ELISA'da antijen bağlayıcısı olarak kullanılmıştır.

Amonyum Tamponu: 2,7 g NH_4Cl_2 , 500 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmış ve ELISA'da microplate yüzeyindeki aktif ve fazla yüklerin nötralizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Karbonat Tamponu: 10,6 g Na_2CO_3 , 1000 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanmış ve antijen dilüsyonları ile carbodiimide'in hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.8. Diğer Materyaller

Microplate'ler: ELISA'da 96 çukurlu, U tabanlı microplateler kullanılmıştır.

Optik okuyucu: ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi, ELISA okuyucuda (Teknika) 405 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1.Milk Ring Test (MRT)

MRT testi Alton ve arkadaşlarının bildirdiği yöntemine göre yapıldı. Süt örnekleri, süt ve krema kısmının tamamen karışması için homojenize edildi. Deney tüplerine 5 ml süt örnekleri konuldu ve üzerine 5 damla Ring test antijeninden damlatıldı. Tüpler tekrar çalkalanarak süt ve antijenin karıştırılması sağlandı ve 37 C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süt ve krema tabakasının renklerinin karşılaştırılması ile pozitif ve negatif örnekler tespit edildi. Krema halkası koyu kırmızı sütün rengi beyaz ise örnekler pozitif; krema halkası beyaz sütün rengi kırmızı ise örnekler negatif olarak kabul edildi.

3.2.2. Antijen Titrasyonunun Belirlenmesi

Brucella abortus S 19 suşundan hazırlanan antijen, karbonat tamponu (Na_2CO_3) içerisinde 1/25 sulandırımından başlayarak, iki katlı seyreltileri hazırlanmıştır. Daha sonra bu seyreltilerinden mikropate'in bütün çukurlarına 50 µl (0.05 ml) konulmuş ve üzerine karbonat tamponunda hazırlanan carbodiimide'dan 50 µl ilave edilmiştir. Plate, 42°C'de bir gece inkübe edildikten sonra, 3 kez ELISA yıkama solusyonu ile yıkanarak ters çevrilmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Kurutulan plate'in bütün çukurlarına 100 µl amonyum tamponundan konularak çalkalayıcı'da 8 dakika inkübe edilmiştir. 8 defa ELISA yıkama solusyonu ile yıkanarak kuruması için 30 dakika bekletilmiştir. Bilinen pozitif ve negatif örneklerden 50'şer µl plate'in çukurlarına konulup, parafilm ile kaplanarak 1 saat çalkalayıcı'da inkübasyona bırakılmıştır. Tekrar 8 defa ELISA yıkama; solusyonu ile yıkanıp, 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Plate'in bütün çukurlarına 50 ul konjugat ilave edilmiş ve parafilm ile kaplanarak çalkalayıcı'da 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ELISA yıkama solusyonu ile 8 kez yıkanarak 30 dakika bekletilmiştir. Son işlem olarak 100 µl substrat, plate'in tüm çukurlarına ilave

edilmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 0.1 M hidroflorik asit solusyonundan 100 µl ilave edildikten sonra 405 nm'de ELISA okuyucusunda optik olarak değerlendirilmiştir

3.2.3. Konjugat Titrasyonunun belirlenmesi

Her bir çukura 1/50 oranında sulandırılan antijenlerden 50 µl ve karbonat tamponu içinde hazırlanan carbodiimide 'den 50 µl konularak 42°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Plate 3 kez yıkanarak, 30 dakika bekletilmiştir. Bütün çukurlarına 100 µl amonyum tamponundan konularak 8 dakika inkübasyona bırakılmış ve 8 kez yıkanmıştır. Daha sonra plate soldan sağa doğru her bölümde 2 dikey sıra olacak şekilde

6 bölüme ayrılmıştır. Her bölümde yer alan ilk çukurlara, 1 negatif ve 1 pozitif süt örneği (50 µl) ile 50 µl dilüent ilave edilmiştir. Yukarıdan aşağıya doğru 2 katlı sulandırmaları yapılmıştır. 1 saat inkübe edilen plate, 8 kez yıkanarak 30 dakika kuruması için bekletilmiştir. Konjugat tüplerde 1/250'den 1/32.000'e kadar sulandırılmış ve her sulandırmadan 50µl alınarak, 6 bölmeye ayrılmış olan plate'in her bir bölmesine konulmuştur. 1 saat inkübasyon sonunda 8 kez yıkanarak, 30 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan substrattan her bir çukura 100 µl konularak, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra reaksiyon durdurulmuş ve sonuçlar optik okuyucuda değerlendirilmiştir.

3.2.4. Ayrım (Cut-off) Değerinin Belirlenmesi

Kontrol grubunun optik dansidite (OD) ortalamasına 2 SD (Standart Sapma) ilave edilerek hesaplanmıştır (Keskin, 1996).

3.2.5. ELISA'nın Uygulanması.

Thoen vd., (1983) ve Güllüce'nin (1993) bildirdiği yöntemle göre aşağıdaki şekilde yapılmıştır. **1-**Plate'in bütün çukurlarına, karbonat tamponu içinde hazırlanmış olan antijen ve carbodiimide çözeltilerinden 50'şer ul konulmuştur. **2-**Plate parafilm ile kaplanarak 42⁰C'de bir gece inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra 3 kez ELISA yıkama solusyonu ile yıkanarak kuruması için 30 dakika bekletilmiştir. **3-**Daha sonra plate yüzeyinde yer alan ve aktif halde bulunan fazla yükleri nötralize etmek için, amonyum tamponundan 100 µl konulmuş ve 8 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. **4-**Plate 8 kez yıkanıp 30 dakika bekletilmiştir. 50µl dilüent ilave edilen plate'in A ve E sırasındaki çukurlarına, şüpheli süt örneklerinden konulmuştur. İlk sıralardaki süt ve seyreltme tamponu, otomatik pipet ile karıştırılarak ikinci sıraya aktarılmıştır. Bu işlem H sırasına gelinceye kadar aynen uygulanmış ve son sıralarda kalan 50µl 'lik fazlalık atılmıştır. Böylece süt örneklerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 dilüsyonları elde edilmiştir. Parafilm ile kaplanan plate, 1 saat çalkalayıcıda karıştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra 8 defa

ELISA yıkama solüsyonu ile yıkanıp, 30 dakika oda sıcaklığında kuruması için bekletilmiştir. 1/4000 oranında hazırlanan konjugattan plate'in bütün çukurlarına 50'şer μ l konulmuştur. Parafilm ile kaplanan plate, 1 saat çalkalayıcıda çalkalanarak inkübe edilmiş ve 8 kez yıkanmıştır. Daha sonra ters çevirilip 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Sitrik asit ve H_2O_2 ile hazırlanan ABTS'den plate'in bütün çukurlarına 100 μ l konulmuş, oda sıcaklığında 1saat kadar inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 0.1 M hidroflorik asit solusyonundan 100 μ l ilave edilerek, ELISA okuyucusunda 405 nm'de adsorbansları okunmuştur. (Her numune iki paralel halinde çalışılmıştır.) Her plate çalışılırken, pozitif ve negatif referans kontroller kullanılmıştır.

4.BULGULAR

Çalışmada Isparta ili ve ilçelerinden 500 adet süt örneği toplanmıştır. Örnekler tüplere konularak laboratuara getirildi ve MRT ile değerlendirildi. Test sonucunda pozitif ve negatif örnekler tespit edildi. Örneklerin ilçelere göre dağılımı Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1.Örneklerin alındığı yerleşim birimleri ve örnek sayıları

Örneklerin toplandığı yer	Örnek sayısı
Merkez	13
Çünür	15
Sav	17
Direkli	15
Deregümü	13
Yakaören	13
Gönen	13
Güneykent	24
İğdeli	8
Uluborlu	42
Keçiborlu	27
Senir	29
Senirkent	30
Ortayazı	16
Atabey	25
İslamköy	11
Kuleönü	18
Eğirdir	31
Akpınar	13

Çizelge 4.1'in devamı

Gelendost	24
Yeşilköy	9
Yalvaç	26
Yukarı Tırtar	15
Şarkikaraağaç	27
Çiçekli	20

Milk Ring Testi Sonuçları

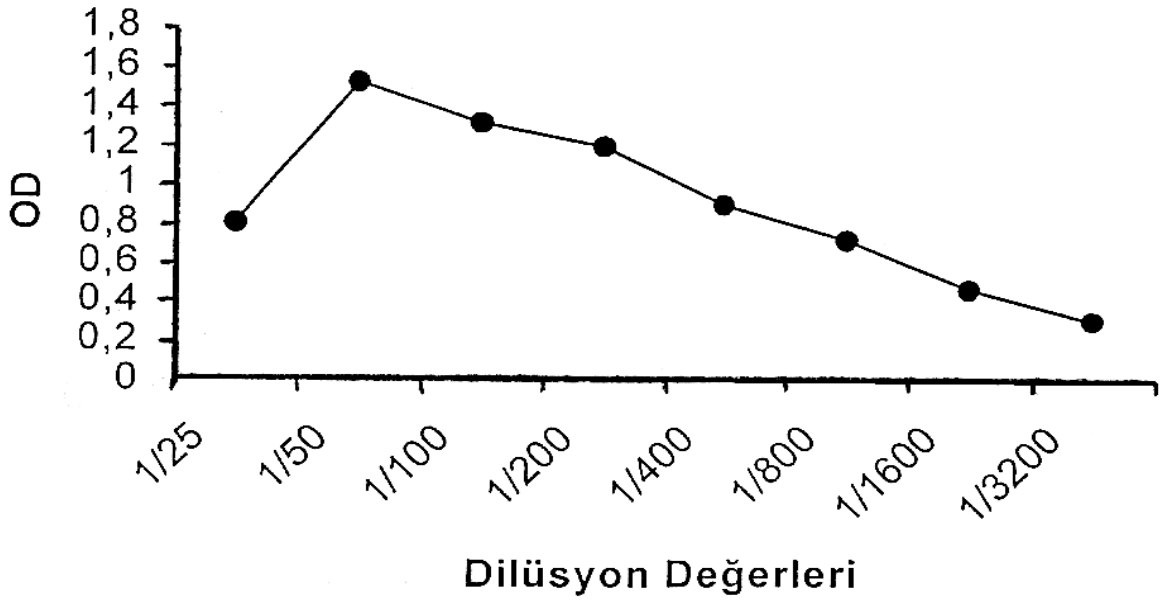
Çalışmada 500 süt örneği MRT ile değerlendirildi. Test sonucunda 281 (% 56.1) süt örneği pozitif , 219 süt örneği (% 53.9) süt örneği de negatif olarak belirlendi. Pozitif ve negatif örnek sayıları çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Süt örneklerinde MRT sonuçların yerleşim yerlerine göre dağılımı

Örneklerin Alındığı Yer ve Örnek Sayısı	Pozitif Örnekler	Negatif Örnekler
Merkez 13	5	8
Çünür mahallesi 15	4	11
Sav kasabası 17	7	10
Direkli Köyü 15	8	7
Deregüme Köyü 13	7	6
Yakören 13	8	5
Gönen 13	6	7
Güneykent Beldesi 24	10	14
Uluborlu 42	28	14
Keçiborlu 27	14	13
Senir 29	15	14
Senirkent 30	17	13
Ortayazı Köyü 16	10	6
Atabey 25	15	10
İslamköy 11	7	4
Kuleönü Beldesi 18	11	7
Gelendost 29	19	10
Yeşilköy 9	5	4
Yalvaç 26	17	9
Yukarı Tırtar Köyü 15	10	5
Şarkıkaraağaç 27	17	10
Çicekli Kasabası 20	12	8
Eğirdir 31	21	10
Akpınar köyü 13	8	5

4.1. Antijen Titrasyonu

Yapılan antijen titrasyonunda en yüksek OD değerinin görüldüğü, 1/50 oranı, antijen titresi olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).

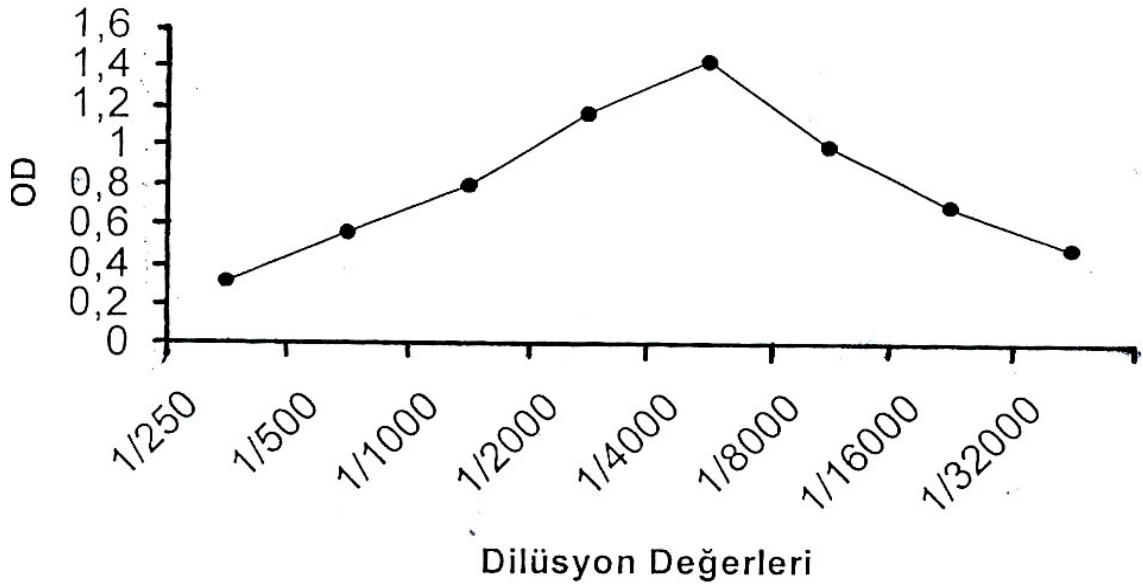


Şekil 4.1 Antijenin farklı dilüsyon oranlarındaki OD değerleri

Şekilde de görüldüğü gibi en yüksek OD değeri 1,524 ile 1/50'lik dilüsyonda elde edilmişken, en düşük OD değeri 0,304 ile 1/3200' lük dilüsyonda elde edilmiştir.

4.2. Konjugat Titrasyonu

1/50'lik dilüsyonda antijen kullanılarak gerçekleştirilen konjugat titrasyonunu belirleme çalışmasında en yüksek OD değeri gösteren dilüsyon oranı 1/4000 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2)

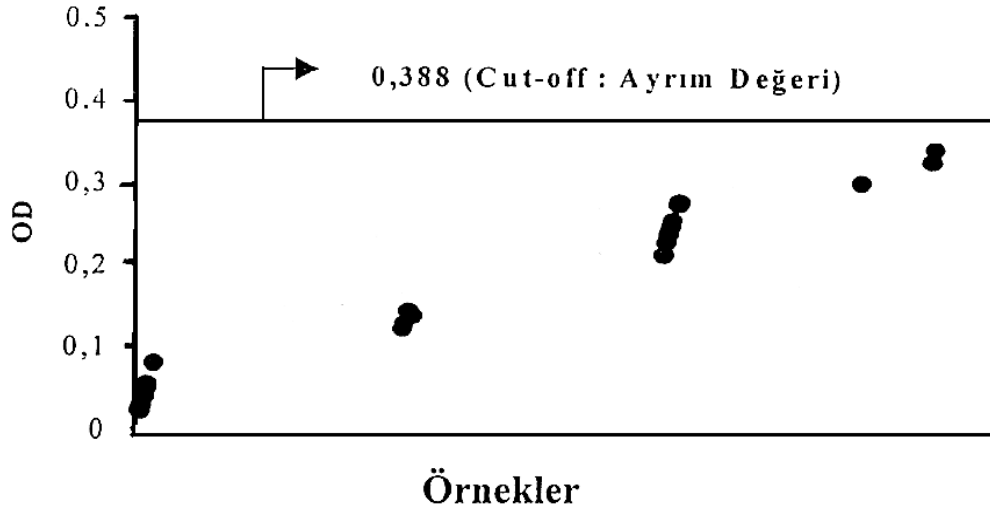


Şekil 4.2. Konjugatın (Protein G) farklı dilüsyonlarındaki OD değerleri,

En yüksek OD değeri 1.430 ile 1/4000'lik dilüsyonda elde edilmişken, en düşük OD değeri 0.320 ile 1/250'lik dilüsyonda elde edilmiştir.

4.3. Ayrım (Cut-off) Değeri

Negatif kontrol grupları esasa alınarak hesaplanan cutt-off değeri şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.3 Negatif kontrol grupları esas alınarak hesaplanan cut-off değeri

Cut-off değerleri, negatif kontrol grubu sütlerin OD değerlerinin ortalamalarına 2 SD (2×0.10291) ilavesiyle elde edilmiş ve 0.388 olarak bulunmuştur. Çalışma süresince, test edilen sütler için bu değer kriter olarak alınmıştır.

Çizelge 4.3. Kullanılan dilüsyonlara göre ELİSA uygulanan örneklerin pozitif ve negatif kontrollerinin OD değerleri

Dilüsyon Oranları	Pozitif Kontrol Sütlerin Ortalama Değerleri	Negatif Kontrol Sütlerin Ortalama Değerleri	Pozitif Sütlerin Ortalama OD Değerleri	Negatif Sütlerin Ortalama OD Değerleri
1/2	1.455	0.196	1.436	0.129
1/4	1.324	0.186	1.223	0.117
1/8	1.165	0.179	1.014	0.109
1/16	0.911	0.172	0.815	0.101

Pozitif kontrol olarak kullanılan süt örneklerinin ortalama OD değerleri; 1/2 dilüsyonda 1.455, 1/4 dilüsyonda 1.324, 1/8 dilüsyonda 1.165, 1/16 dilüsyonda 0.911, negatif kontrol süt örneklerinin ortalama OD değerleri de; 1/2 dilüsyonda 0.196, 1/4 dilüsyonda 0.186, 1/8 dilüsyonda 0.179, 1/16 dilüsyonda 0.172 olarak bulunmuştur. Analiz edilen süt örneklerinin ortalama OD değerleri; 1/2 dilüsyonda, 1.436, 1/4 dilüsyonda, 1.223, 1/8 dilüsyonda, 1.01, 1/16 dilüsyonda, 0.815, negatif sonuç veren 464 süt örneğinin ortalama OD değeri ise; 1/2 dilüsyonda, 0.129, 1/4 dilüsyonda, 0.117, 1/8 dilüsyonda, 0.109, 1/16 dilüsyonda, 0.10 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Analizi yapılan 500 inek sütü örneğinin yerleşim birimlerine göre ve dilüsyon oranlarına göre OD değerleri

	1/2	1/4	1/8	1/16	Alındığı yer
1	0.133	0.125	0.122	0.120	Merkez
2	0.141	0.134	0.130	0.126	Merkez
3	0.143	0.125	0.124	0.119	Merkez
4	0.156	0.137	0.126	0.124	Merkez
5	0.145	0.142	0.134	0.127	Merkez
6	0.143	0.129	0.122	0.121	Merkez
7	0.151	0.147	0.144	0.136	Merkez
8	0.126	0.125	0.124	0.118	Merkez
9	0.145	0.139	0.136	0.127	Merkez
10	0.130	0.128	0.120	0.117	Merkez
11	0.144	0.131	0.130	0.123	Merkez
12	0.125	0.121	0.121	0.117	Merkez
13	0.127	0.124	0.124	0.123	Merkez
14	0.127	0.127	0.123	0.118	Çünür
15	0.124	0.124	0.123	0.122	Çünür
17	0.143	0.136	0.131	0.121	Çünür
18	0.135	0.133	0.125	0.123	Çünür
19	0.137	0.135	0.129	0.124	Çünür
20	1.837	1.307	1.290	1.228	Çünür
21	1.495	1.438	1.347	1.244	Çünür
22	1.613	1.594	1.534	0.834	Çünür
23	1.390	1.296	1.045	0.704	Çünür
24	1.606	1.007	0.890	0.607	Çünür
25	0.132	0.128	0.125	0.124	Çünür
26	0.123	0.123	0.123	0.118	Çünür
27	0.146	0.127	0.126	0.125	Çünür
28	0.126	0.125	0.121	0.119	Çünür
29	0.137	0.127	0.126	0.123	Çünür
30	0.126	0.124	0.119	0.119	Sav
31	0.135	0.129	0.128	0.125	Sav
32	0.137	0.136	0.129	0.122	Sav
33	0.137	0.137	0.136	0.126	Sav
34	0.148	0.132	0.127	0.126	Sav
35	0.147	0.142	0.133	0.123	Sav
36	0.134	0.131	0.128	0.128	Sav

37	0.143	0.131	0.126	0.120	Sav
38	0.135	0.131	0.127	0.126	Sav
39	0.127	0.124	0.121	0.117	Sav
40	0.134	0.130	0.128	0.126	Sav
41	0.126	0.125	0.121	0.119	Sav
42	0.132	0.128	0.126	0.124	Sav
43	0.131	0.131	0.128	0.121	Sav
44	0.130	0.125	0.124	0.121	Sav
45	0.132	0.131	0.123	0.119	Sav
46	0.161	0.152	0.125	0.121	Sav
47	0.131	0.128	0.124	0.123	Direkli
48	0.112	0.109	0.105	0.101	Direkli
49	0.122	0.117	0.115	0.114	Direkli
50	1.810	1.576	1.230	1.069	Direkli
51	1.706	1.203	0.729	0.429	Direkli
52	1.421	0.907	0.500	0.407	Direkli
53	1.321	1.001	0.604	0.300	Direkli
54	1.841	1.204	0.700	0.420	Direkli
55	0.130	0.127	0.126	0.124	Direkli
56	0.228	0.223	0.223	0.226	Direkli
57	0.129	0.128	0.128	0.121	Direkli
58	0.131	0.129	0.128	0.123	Direkli
59	0.245	0.228	0.225	0.222	Direkli
60	0.132	0.129	0.127	0.119	Direkli
61	0.129	0.25	0.123	0.123	Direkli
62	0.124	0.113	0.112	0.103	Deregümü
63	0.115	0.113	0.110	0.104	Deregümü
64	0.127	0.121	0.113	0.109	Deregümü
65	0.154	0.113	0.110	0.107	Deregümü
66	0.118	0.116	0.115	0.115	Deregümü
67	0.143	0.125	0.120	0.113	Deregümü
68	0.118	0.116	0.113	0.109	Deregümü
69	0.131	0.114	0.108	0.108	Deregümü
70	0.117	0.113	0.113	0.105	Deregümü
71	0.112	0.110	0.106	0.105	Deregümü
72	0.113	0.113	0.108	0.106	Deregümü
73	0.133	0.115	0.108	0.104	Deregümü
74	0.115	0.114	0.110	0.109	Deregümü
75	0.111	0.108	0.108	0.105	Yakaören
76	0.113	0.109	0.107	0.104	Yakaören

77	0.124	0.122	0.120	0.118	Yakaören
78	0.121	0.118	0.117	0.115	Yakaören
79	0.021	0.019	0.018	0.017	Yakaören
80	1.611	1.003	0.909	0.590	Yakaören
81	1.827	1.204	0.804	0.609	Yakaören
82	1.390	1.294	1.196	0.831	Yakaören
83	1.471	1.256	0.706	0.670	Yakaören
84	1.541	1.170	0.930	0.670	Yakaören
85	0.062	0.045	0.033	0.024	Yakaören
86	0.032	0.031	0.031	0.028	Yakaören
87	0.063	0.039	0.037	0.027	Yakaören
88	0.062	0.039	0.028	0.028	Gönen
89	0.039	0.021	0.029	0.023	Gönen
90	0.052	0.034	0.033	0.032	Gönen
91	0.050	0.031	0.026	0.021	Gönen
92	0.051	0.039	0.038	0.038	Gönen
93	0.114	0.083	0.064	0.038	Gönen
94	0.044	0.042	0.031	0.029	Gönen
95	0.050	0.038	0.026	0.024	Gönen
96	0.056	0.046	0.045	0.042	Gönen
97	0.057	0.055	0.041	0.036	Gönen
98	0.055	0.042	0.024	0.027	Gönen
99	0.040	0.038	0.038	0.025	Gönen
100	0.063	0.043	0.040	0.033	Gönen
101	0.143	0.088	0.060	0.044	Güneykent
102	0.046	0.045	0.034	0.019	Güneykent
103	0.041	0.035	0.032	0.028	Güneykent
104	0.044	0.039	0.033	0.024	Güneykent
105	0.073	0.048	0.037	0.036	Güneykent
106	0.048	0.039	0.030	0.022	Güneykent
107	0.058	0.049	0.036	0.031	Güneykent
108	0.055	0.035	0.029	0.026	Güneykent
109	0.055	0.037	0.028	0.023	Güneykent
110	0.070	0.066	0.063	0.041	Güneykent
111	0.073	0.073	0.067	0.066	Güneykent
112	0.085	0.077	0.070	0.066	Güneykent
113	1.432	1.128	0.633	0.606	Güneykent
114	1.075	0.934	0.712	0.416	Güneykent
115	1.154	1.210	0.850	0.585	Güneykent
116	1.000	0.742	0.706	0.514	Güneykent

117	1.000	0.742	0.706	0.514	Güneykent
118	0.077	0.076	0.075	0.073	Güneykent
119	0.054	0.053	0.050	0.040	Güneykent
120	0.081	0.074	0.073	0.069	Güneykent
121	0.066	0.065	0.062	0.060	Güneykent
122	0.073	0.065	0.053	0.040	Güneykent
123	0.061	0.059	0.057	0.051	Güneykent
124	0.069	0.058	0.057	0.054	Güneykent
125	0.112	0.106	0.105	0.105	Güneykent
126	0.061	0.059	0.057	0.051	İğdeli
127	0.096	0.081	0.075	0.072	İğdeli
128	0.088	0.072	0.062	0.051	İğdeli
129	0.060	0.059	0.057	0.051	İğdeli
130	0.081	0.080	0.061	0.060	İğdeli
131	0.078	0.073	0.067	0.061	İğdeli
132	0.069	0.067	0.060	0.053	İğdeli
133	0.070	0.063	0.061	0.060	İğdeli
134	0.063	0.062	0.060	0.054	Uluborlu
135	0.052	0.046	0.044	0.039	Uluborlu
136	0.065	0.063	0.061	0.058	Uluborlu
137	0.061	0.058	0.052	0.050	Uluborlu
138	0.069	0.062	0.059	0.057	Uluborlu
139	0.056	0.051	0.047	0.041	Uluborlu
140	0.059	0.058	0.054	0.054	Uluborlu
141	0.052	0.049	0.047	0.041	Uluborlu
142	1.362	1.353	1.345	1.341	Uluborlu
143	1.470	1.459	1.422	1.367	Uluborlu
144	1.479	1.446	1.417	1.397	Uluborlu
145	1.480	1.470	1.462	1.462	Uluborlu
146	1.479	1.442	0.924	0.607	Uluborlu
147	0.065	0.064	0.062	0.051	Uluborlu
148	0.076	0.070	0.054	0.053	Uluborlu
149	0.079	0.066	0.062	0.058	Uluborlu
150	0.070	0.063	0.058	0.046	Uluborlu
151	0.074	0.068	0.061	0.060	Uluborlu
152	0.055	0.047	0.045	0.039	Uluborlu
153	0.055	0.042	0.039	0.031	Uluborlu
154	0.055	0.053	0.043	0.039	Uluborlu

155	0,062	0,051	0,049	0,037	Uluborlu
156	0,048	0,047	0,043	0,032	Uluborlu
157	0,056	0,049	0,046	0,022	Uluborlu
158	0,054	0,049	0,042	0,035	Uluborlu
159	0,053	0,049	0,048	0,045	Uluborlu
160	0,051	0,046	0,046	0,034	Uluborlu
161	0,057	0,057	0,054	0,052	Uluborlu
162	0,049	0,049	0,039	0,036	Uluborlu
163	0,050	0,050	0,044	0,036	Uluborlu
164	0,049	0,047	0,047	0,040	Uluborlu
165	0,051	0,043	0,042	0,039	Uluborlu
166	0,047	0,046	0,043	0,043	Uluborlu
167	0,055	0,048	0,044	0,043	Uluborlu
168	0,057	0,046	0,046	0,045	Uluborlu
169	0,050	0,040	0,039	0,038	Uluborlu
170	0,054	0,054	0,053	0,038	Uluborlu
171	0,045	0,044	0,042	0,033	Uluborlu
172	1,451	1,441	1,418	0,931	Uluborlu
173	0,966	0,8000	0,792	0,790	Uluborlu
174	0,897	0,796	0,794	0,761	Uluborlu
175	0,951	0,942	0,916	0,913	Uluborlu
176	0,823	0,814	0,789	0,738	Keçiborlu
177	0,051	0,050	0,044	0,032	Keçiborlu
178	0,040	0,035	0,035	0,034	Keçiborlu
179	0,045	0,043	0,039	0,032	Keçiborlu
180	0,048	0,040	0,038	0,036	Keçiborlu
181	0,046	0,045	0,042	0,036	Keçiborlu
182	0,046	0,044	0,043	0,041	Keçiborlu
183	0,046	0,040	0,040	0,038	Keçiborlu
184	0,041	0,041	0,040	0,037	Keçiborlu
185	0,043	0,040	0,040	0,036	Keçiborlu
186	0,046	0,044	0,040	0,038	Keçiborlu
187	0,144	0,141	0,139	0,137	Keçiborlu
188	0,147	0,147	0,144	0,141	Keçiborlu
189	0,050	0,042	0,040	0,036	Keçiborlu
190	0,048	0,046	0,044	0,042	Keçiborlu
191	0,055	0,049	0,043	0,038	Keçiborlu
192	0,039	0,053	0,048	0,040	Keçiborlu

193	0,055	0,052	0,041	0,041	Keçiborlu
194	0,050	0,047	0,044	0,039	Keçiborlu
195	0,040	0,036	0,036	0,034	Keçiborlu
196	0,046	0,042	0,042	0,035	Keçiborlu
197	0,051	0,049	0,044	0,044	Keçiborlu
198	0,043	0,041	0,038	0,026	Keçiborlu
199	0,051	0,051	0,048	0,044	Keçiborlu
200	0,055	0,051	0,045	0,038	Keçiborlu
201	0,727	0,695	0,667	0,643	Keçiborlu
202	0,751	0,738	0,735	0,735	Keçiborlu
203	0,738	0,736	0,722	0,644	Senir
204	1,324	1,212	0,865	0,533	Senir
205	1,654	1,124	0,923	0,563	Senir
206	0,055	0,052	0,044	0,043	Senir
207	0,048	0,046	0,040	0,036	Senir
208	0,047	0,046	0,044	0,043	Senir
209	0,055	0,050	0,046	0,043	Senir
210	0,045	0,044	0,042	0,037	Senir
211	0,060	0,055	0,048	0,045	Senir
212	0,053	0,037	0,036	0,036	Senir
213	0,054	0,051	0,049	0,039	Senir
214	0,331	0,306	0,305	0,302	Senir
215	0,331	0,306	0,305	0,302	Senir
216	0,215	0,211	0,197	0,195	Senir
217	0,256	0,218	0,196	0,190	Senir
218	0,201	0,198	0,182	0,171	Senir
219	0,205	0,181	0,178	0,163	Senir
220	0,239	0,230	0,198	0,143	Senir
221	0,205	0,195	0,192	0,175	Senir
222	0,234	0,190	0,188	0,157	Senir
223	0,213	0,207	0,196	0,174	Senir
224	0,159	0,166	0,151	0,148	Senir
225	0,208	0,197	0,179	0,176	Senir
226	0,239	0,187	0,162	0,155	Senir
227	0,240	0,215	0,176	0,170	Senir
228	0,256	0,201	0,191	0,179	Senir
229	0,229	0,179	0,176	0,168	Senir
230	0,233	0,231	0,221	0,194	Senir
231	0,219	0,181	0,159	0,150	Senir

232	0,255	0,216	0,208	0,189	Senirkent
233	1,695	1,580	1,509	1,009	Senirkent
234	1,801	1,407	1,291	1,070	Senirkent
235	0,192	0,178	0,163	1,060	Senirkent
236	0,255	0,233	0,232	0,177	Senirkent
237	0,198	0,167	0,154	0,134	Senirkent
238	0,247	0,214	0,212	0,207	Senirkent
239	0,247	0,245	0,241	0,210	Senirkent
240	0,383	0,363	0,334	0,313	Senirkent
241	0,229	0,200	0,168	0,153	Senirkent
242	0,276	0,222	0,212	0,178	Senirkent
243	0,894	0,859	0,831	0,825	Senirkent
244	1,652	1,502	0,968	0,881	Senirkent
245	0,845	0,818	0,798	0,781	Senirkent
246	0,928	0,826	0,544	0,466	Senirkent
247	2,012	1,984	1,803	1,488	Senirkent
248	0,199	0,175	0,158	0,145	Senirkent
249	0,233	0,200	0,192	0,135	Senirkent
250	0,231	0,229	0,218	0,212	Senirkent
251	0,304	0,275	0,271	0,221	Senirkent
252	0,226	0,221	0,203	0,174	Senirkent
253	0,270	0,253	0,229	0,205	Senirkent
254	0,234	0,216	0,202	0,196	Senirkent
255	0,233	0,202	0,166	0,154	Senirkent
256	0,234	0,233	0,224	0,207	Senirkent
257	0,262	0,187	0,180	0,151	Senirkent
258	0,224	0,194	0,187	0,179	Senirkent
259	0,237	0,210	0,189	0,169	Senirkent
260	0,242	0,222	0,202	0,168	Senirkent
261	0,194	0,189	0,178	0,162	Senirkent
262	0,201	0,191	0,187	0,185	Ortayazı
263	0,246	0,243	0,228	0,186	Ortayazı
264	0,267	0,219	0,196	0,188	Ortayazı
265	0,293	0,231	0,217	0,205	Ortayazı
266	0,058	0,048	0,041	0,034	Ortayazı
267	1,810	1,647	1,058	1,512	Ortayazı
268	1,999	1,937	1,857	1,489	Ortayazı
269	2,012	1,984	1,803	1,488	Ortayazı
270	0,257	0,216	0,216	0,208	Ortayazı
271	0,354	0,281	0,261	0,256	Ortayazı

272	0,069	0,065	0,053	0,051	Ortayazı
273	1,810	1,647	1,058	1,512	Ortayazı
274	1,999	1,937	1,857	1,489	Ortayazı
275	2,012	1,984	1,803	1,488	Ortayazı
276	0,257	0,216	0,216	0,208	Ortayazı
277	0,354	0,281	0,261	0,256	Ortayazı
278	0,273	0,268	0,218	0,195	Atabey
279	0,320	0,293	0,281	0,220	Atabey
280	0,262	0,207	0,205	0,191	Atabey
281	0,185	0,184	0,172	0,110	Atabey
282	0,105	0,097	0,093	0,092	Atabey
283	0,114	0,103	0,091	0,086	Atabey
284	0,088	0,084	0,080	0,080	Atabey
285	0,103	0,098	0,088	0,083	Atabey
286	0,115	0,103	0,102	0,091	Atabey
287	0,086	0,082	0,081	0,077	Atabey
288	0,091	0,089	0,088	0,086	Atabey
289	1,810	1,647	1,580	1,512	Atabey
290	1,999	1,937	1,857	1,489	Atabey
291	1,276	0,951	0,666	0,599	Atabey
292	1,220	1,140	0,840	0,470	Atabey
293	1,146	0,875	0,624	0,304	Atabey
294	0,092	0,089	0,086	0,081	Atabey
295	0,097	0,082	0,810	0,076	Atabey
296	0,092	0,083	0,082	0,079	Atabey
297	0,087	0,084	0,079	0,078	Atabey
298	0,094	0,093	0,092	0,088	Atabey
299	0,193	0,187	0,185	0,183	Atabey
300	0,186	0,182	0,174	0,172	Atabey
301	0,185	0,183	0,182	0,178	Atabey
302	0,194	0,187	0,186	0,183	Atabey
303	0,185	0,184	0,172	0,110	Atabey
304	0,152	0,134	0,133	0,123	Atabey
305	0,139	0,131	0,129	0,123	Atabey
306	0,162	0,139	0,137	0,127	Atabey
307	0,154	0,128	0,127	0,126	İslamköy
308	0,138	0,133	0,132	0,123	İslamköy
309	0,162	0,145	0,133	0,124	İslamköy

310	0,185	0,184	0,172	0,110	İslamköy
311	0,152	0,134	0,133	0,123	İslamköy
312	0,139	0,131	0,129	0,123	İslamköy
313	0,162	0,139	0,137	0,127	İslamköy
314	0,154	0,128	0,127	0,126	İslamköy
315	0,138	0,133	0,132	0,123	İslamköy
316	0,162	0,145	0,133	0,124	İslamköy
317	0,155	0,142	0,139	0,131	İslamköy
318	0,074	0,055	0,043	0,041	Kuleönü
319	0,069	0,063	0,055	0,043	Kuleönü
320	0,058	0,048	0,041	0,034	Kuleönü
321	0,041	0,036	0,036	0,035	Kuleönü
322	0,053	0,051	0,034	0,030	Kuleönü
323	0,046	0,038	0,032	0,025	Kuleönü
324	1,489	1,236	0,848	0,496	Kuleönü
325	1,807	1,574	1,382	1,251	Kuleönü
326	1,738	1,588	1,316	1,167	Kuleönü
327	1,390	1,333	1,330	1,350	Kuleönü
328	1,321	1,302	1,298	1,276	Kuleönü
329	0,054	0,050	0,048	0,034	Kuleönü
330	0,079	0,060	0,045	0,039	Kuleönü
331	0,050	0,042	0,039	0,026	Kuleönü
332	0,062	0,045	0,040	0,036	Kuleönü
333	0,057	0,053	0,053	0,039	Kuleönü
334	0,077	0,073	0,057	0,044	Kuleönü
335	0,008	0,076	0,070	0,056	Kuleönü
336	0,078	0,076	0,069	0,045	Eğirdir
337	0,083	0,063	0,057	0,056	Eğirdir
338	0,079	0,076	0,065	0,039	Eğirdir
339	0,089	0,072	0,068	0,063	Eğirdir
340	0,137	0,129	0,120	0,114	Eğirdir
341	0,122	0,120	0,120	0,117	Eğirdir
342	0,161	0,156	0,131	0,130	Eğirdir
343	0,123	0,122	0,122	0,115	Eğirdir
344	0,131	0,128	0,124	0,117	Eğirdir
345	0,184	0,166	0,137	0,126	Eğirdir
346	0,143	0,137	0,124	0,119	Eğirdir
347	0,143	0,137	0,126	0,125	Eğirdir
348	0,127	0,126	0,122	0,115	Eğirdir

349	0,127	0,126	0,122	0,115	Eğirdir
350	0,193	0,173	0,130	0,121	Eğirdir
351	0,170	0,144	0,143	0,128	Eğirdir
352	0,188	0,141	0,141	0,105	Eğirdir
353	0,173	0,140	0,138	0,134	Eğirdir
354	0,144	0,132	0,131	0,123	Eğirdir
355	1,357	1,221	0,964	0,741	Eğirdir
356	1,640	1,590	1,530	1,490	Eğirdir
357	1,780	1,410	0,940	0,740	Eğirdir
358	1,380	1,360	0,320	1,300	Eğirdir
359	1,340	1,270	1,240	1,200	Eğirdir
360	0,145	0,120	0,088	0,065	Eğirdir
361	0,096	0,069	0,064	0,053	Eğirdir
362	0,108	0,075	0,066	0,056	Eğirdir
363	0,088	0,076	0,069	0,052	Eğirdir
364	0,054	0,051	0,045	0,044	Eğirdir
365	0,102	0,073	0,070	0,065	Eğirdir
366	0,147	0,103	0,069	0,056	Eğirdir
367	0,094	0,082	0,062	0,057	Akpınar
368	0,142	0,094	0,078	0,066	Akpınar
369	0,084	0,083	0,061	0,057	Akpınar
370	0,068	0,058	0,052	0,049	Akpınar
371	0,089	0,074	0,063	0,054	Akpınar
372	0,096	0,066	0,059	0,059	Akpınar
373	0,091	0,076	0,061	0,059	Akpınar
374	0,070	0,056	0,050	0,050	Akpınar
375	0,106	0,078	0,060	0,051	Akpınar
376	0,082	0,074	0,062	0,061	Akpınar
377	0,095	0,069	0,053	0,050	Akpınar
378	0,057	0,051	0,048	0,043	Akpınar
379	1,429	1,375	1,367	1,354	Akpınar
380	1,407	1,393	1,327	1,309	Gelendost
381	1,393	1,367	1,335	1,311	Gelendost
382	1,651	1,526	0,834	0,686	Gelendost
383	1,545	1,280	0,801	0,760	Gelendost
384	0,117	0,098	0,082	0,062	Gelendost
385	0,077	0,051	0,040	0,040	Gelendost
386	0,063	0,061	0,058	0,052	Gelendost
387	0,080	0,058	0,057	0,054	Gelendost

388	0,080	0,058	0,057	0,054	Gelendost
389	0,069	0,061	0,058	0,053	Gelendost
390	0,154	0,090	0,084	0,075	Gelendost
391	0,082	0,071	0,062	0,054	Gelendost
392	0,074	0,046	0,034	0,032	Gelendost
393	0,090	0,087	0,071	0,061	Gelendost
394	0,102	0,081	0,069	0,063	Gelendost
395	0,084	0,085	0,066	0,166	Gelendost
396	0,176	0,160	0,158	0,146	Gelendost
397	0,176	0,173	0,170	0,155	Gelendost
398	0,173	0,166	0,158	0,107	Gelendost
399	0,178	0,165	0,154	0,130	Gelendost
400	0,199	0,176	0,173	0,108	Gelendost
401	0,198	0,195	0,185	0,168	Gelendost
402	0,171	0,164	0,156	0,155	Gelendost
403	0,184	0,183	0,170	0,168	Gelendost
404	0,096	0,084	0,069	0,068	Yeşilköy
405	0,073	0,066	0,059	0,044	Yeşilköy
406	0,119	0,090	0,073	0,062	Yeşilköy
407	1,090	0,920	0,860	0,620	Yeşilköy
408	0,940	0,900	0,820	0,530	Yeşilköy
409	1,550	1,230	1,130	0,920	Yeşilköy
410	1,362	1,190	1,188	1,179	Yeşilköy
441	1,891	1,204	0,907	0,603	Yeşilköy
412	1,407	1,080	0,807	0,506	Yeşilköy
413	0,150	0,138	0,126	0,124	Yalvaç
414	0,044	0,142	0,131	0,129	Yalvaç
415	0,183	0,164	0,138	0,114	Yalvaç
416	0,151	0,139	0,138	0,138	Yalvaç
417	0,150	0,131	0,126	0,121	Yalvaç
418	0,126	0,125	0,122	0,122	Yalvaç
419	0,126	0,124	0,123	0,121	Yalvaç
420	0,125	0,123	0,123	0,121	Yalvaç
421	0,125	0,122	0,121	0,119	Yalvaç
422	0,130	0,127	0,124	0,1200	Yalvaç
423	0,134	0,132	0,127	0,126	Yalvaç
424	0,127	0,126	0,126	0,125	Yalvaç
425	0,129	0,127	0,125	0,116	Yalvaç
426	0,126	0,123	0,120	0,119	Yalvaç

427	0,063	0,061	0,058	0,052	Yalvaç
428	0,080	0,058	0,057	0,054	Yalvaç
429	0,069	0,061	0,058	0,053	Yalvaç
430	0,154	0,090	0,084	0,075	Yalvaç
431	0,082	0,071	0,062	0,054	Yalvaç
432	0,074	0,046	0,034	0,032	Yalvaç
433	0,090	0,087	0,071	0,061	Yalvaç
434	0,102	0,081	0,069	0,063	Yalvaç
435	0,084	0,085	0,066	0,166	Yalvaç
436	0,176	0,160	0,158	0,146	Yalvaç
437	0,176	0,173	0,170	0,155	Yalvaç
438	0,173	0,166	0,158	0,107	Yalvaç
439	0,178	0,165	0,154	0,130	Yukarı Tırtar
440	0,199	0,176	0,173	0,108	Yukarı Tırtar
441	0,198	0,195	0,185	0,168	Yukarı Tırtar
442	0,171	0,164	0,156	0,155	Yukarı Tırtar
443	0,184	0,183	0,170	0,168	Yukarı Tırtar
444	0,096	0,084	0,069	0,068	Yukarı Tırtar
445	0,073	0,066	0,059	0,044	Yukarı Tırtar
446	0,119	0,090	0,073	0,062	Yukarı Tırtar
447	1,090	0,920	0,860	0,620	Yukarı Tırtar
448	0,940	0,900	0,820	0,530	Yukarı Tırtar
449	1,550	1,230	1,130	0,920	Yukarı Tırtar
450	1,362	1,190	1,188	1,179	Yukarı Tırtar
451	1,891	1,204	0,907	0,603	Yukarı Tırtar
452	1,407	1,080	0,807	0,506	Yukarı Tırtar
453	0,150	0,138	0,126	0,124	Yukarı Tırtar
454	0,044	0,142	0,131	0,129	Şarkıkaraağaç
455	0,183	0,164	0,138	0,114	Şarkıkaraağaç
456	0,151	0,139	0,138	0,138	Şarkıkaraağaç
457	0,150	0,131	0,126	0,121	Şarkıkaraağaç
458	0,126	0,125	0,122	0,122	Şarkıkaraağaç
459	0,126	0,124	0,123	0,121	Şarkıkaraağaç
460	0,125	0,123	0,123	0,121	Şarkıkaraağaç
461	0,125	0,122	0,121	0,119	Şarkıkaraağaç
462	0,130	0,127	0,124	0,1200	Şarkıkaraağaç
463	0,134	0,132	0,127	0,126	Şarkıkaraağaç
464	0,127	0,126	0,126	0,125	Şarkıkaraağaç
465	0,129	0,127	0,125	0,116	Şarkıkaraağaç

466	0,134	0,132	0,127	0,126	Şarkıkaraağaç
467	0,127	0,126	0,126	0,125	Şarkıkaraağaç
468	0,129	0,127	0,125	0,116	Şarkıkaraağaç
469	0,126	0,123	0,120	0,119	Şarkıkaraağaç
470	0,130	0,123	0,120	0,118	Şarkıkaraağaç
471	0,127	0,127	0,120	0,118	Şarkıkaraağaç
472	0,128	0,123	0,122	0,115	Şarkıkaraağaç
473	0,132	0,125	0,124	0,119	Şarkıkaraağaç
474	0,126	0,122	0,120	0,118	Şarkıkaraağaç
475	0,125	0,121	0,120	0,118	Şarkıkaraağaç
476	0,126	0,123	0,120	0,119	Şarkıkaraağaç
477	0,123	0,120	0,119	0,116	Şarkıkaraağaç
478	1,830	1,209	0,809	0,600	Şarkıkaraağaç
479	0,986	0,969	0,946	0,879	Şarkıkaraağaç
480	0,992	0,953	0,950	0,942	Şarkıkaraağaç
481	1,069	0,966	0,903	0,661	Çiçekli
482	1,229	1,144	0,828	0,667	Çiçekli
483	1,401	1,392	1,385	1,293	Çiçekli
484	0,129	0,125	0,122	0,120	Çiçekli
485	0,124	0,122	0,121	0,121	Çiçekli
486	0,126	0,122	0,120	0,119	Çiçekli
487	0,123	0,122	0,120	0,120	Çiçekli
488	0,122	0,120	0,119	0,117	Çiçekli
489	0,188	0,170	0,157	0,152	Çiçekli
490	0,177	0,169	0,161	0,154	Çiçekli
491	0,190	0,181	0,164	0,110	Çiçekli
492	0,128	0,084	0,067	0,066	Çiçekli
493	0,080	0,054	0,051	0,041	Çiçekli
494	0,083	0,064	0,044	0,044	Çiçekli
495	0,121	0,070	0,059	0,054	Çiçekli
496	0,087	0,060	0,059	0,056	Çiçekli
497	0,151	0,106	0,080	0,073	Çiçekli
498	0,097	0,088	0,078	0,064	Çiçekli
499	0,133	0,096	0,050	0,050	Çiçekli
500	0,187	0,171	0,148	0,147	Çiçekli

Bolt: ELİSA pozitif

Sonuçların değerlendirilmesinde 1/ 2seyreltme oranındaki OD 0. 388’ den büyük değerler pozitif, 0.388’den küçük değerler negatif olarak kabul edildirmiştir (Güllüce 1993)

Yerleşim yerlerine göre alınan örneklerin ELISA sonuçları Çizelge 4.5.'de özetlenmiştir. Maksimum pozitiflik değerleri, Yeşilköy, Yukarı Tırtar , Ortayazı ve Kuleönü köylerinde sırasıyla %22.7, %21.4, %21.4, %20.8 olarak, minimum pozitiflik değerleri ise, Akpınar, Senir ve Keçiborlu ilçesinde sırasıyla %7.1, %12.5, %13 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.5.. Süt örneklerinde ELISA sonuçlarının yerleşim birimlerine göre dağılımı

Köy	Örnek Sayısı	ELISA sonuçları	
		Pozitiflik	Negatiflik
Merkez	13	0	13
Çünür	15	5	10
Sav	17	0	17
Direkli	15	5	10
Deregümü	13	0	13
Yakaören	13	5	8
Gönen	13	0	13
Güneykent	24	5	21
İğdeli	8	0	8
Uluborlu	42	10	32
Keçiborlu	27	2	25
Senir	29	3	26
Senirkent	30	7	23
Ortayazı	16	6	10
Atabey	25	5	20

İslamköy	11	0	18
Kuleönü	18	5	13
Eğirdir	31	5	26
Akpınar	13	1	12
Gelendost	29	4	25
Yeşilköy	9	6	3
Yalvaç	26	0	26
Yukarı Tırtar	15	6	9
Şarkikaraağaç	27	3	24
Çiçekli	20	3	21
Toplam	500	86	414

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Brusellosis, hem dünyada hem de ülkemizde bir enfeksiyöz hastalık olarak önemini sürdürmektedir. Sığırlarda yavru atması, kısırılık ve süt veriminde azalmaya sebep olması nedeniyle büyük ekonomik kayıplara yol açan bu hastalığın insanlara da bulaşarak halk sağlığı açısından tehlike oluşturduğu bilinmektedir (Cengiz, 2000; Fazlı, 2000; Sümer vd., 2000; İyisan vd., 2001).

Gelişmiş ülkelerde bile tam olarak eradike edilemediği, fakat çok düşük düzeylere çekildiği göz önüne alınırsa, ülkemizde *Brusellosis* etmeninin çeşitli kaynaklardan izolasyon, teşhis ve sıklığı üzerindeki çalışmaların arttırılmasının gereği ortaya çıkacaktır. *Brusellosis* hastalığının yok edilebilmesi, ancak birçok unsuru içeren koordineli bir çalışma sonucu başarılabilir. Çalışmanın en önemli bölümünü hayvan hareketlerinin kontrolü ve münferit bir hasta hayvanın hemen belirlenmesi oluşturur. Bu programların başarıyla uygulanabilmesi her şeyden önce enfeksiyonun teşhisine bağlıdır. Enfeksiyonun teşhisinde etmenin izolasyon ve tanısı önemli olmasına karşın, materyal teminindeki güçlükler, etmen izolasyonunun zaman alıcı ve zor oluşu, dolaylı yöntemlerin daha fazla kullanılmasına yol açmıştır. *Brusellosis* teşhisinde çabuk, pratik ve kısa sürede çok sayıda materyalin çalışılmasına olanak sağlayan serolojik testler Serum Aglutinasyon Testi (SAT), Kompleman Fiksasyon Testi (CFT), Rivanol Testi (RT), Milk Ring Testi (MRT), Rose-Bengal Plate Testi (RBPT) ve Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılmaktadır (Thoen vd., 1979; Heck vd., 1980; Güllüce, 1993). ELISA'nın; Serolojik testlerle karşılaştırılabilmesi, immunoglobulin alt sınıfları ile çalışılabilmesi, erken enfekte hayvanların tespit edilebilmesi, çapraz reaksiyon olaylarının görülmemesi, bekletilmiş numunelerle çalışılabilmesi, çok sayıda numunelerle çalışılabilmesi ve özgüllüğün ve duyarlılığın çok yüksek olması gibi avantajları nedeniyle diğer serolojik testlere tercih edilen bir metot olduğu

belirtilmektedir (Heck vd., 1980; Batra vd., 1989; Mongini vd., 1990; Uzal vd., 1996; Shamelian, 2000).

Son yıllarda özellikle süt ve süt ürünlerinde *Brucella* antijen ve antikorlarının teşhisinde en çok kullanılan testler MRT ve ELISA dır. MRT'de rol oynayan aglutiniler, yağ globulinlerine bağlanmış glikoprotein yapısında olup, ısıya ve çalkalanmaya duyarlıdırlar. Bu yüzden MRT'de elde edilen yalancı pozitiflik ve negatifliğin en önemli nedeni kaymak tabakasında meydana gelen değişiktir. Çok az krema içeren ve hücre sayısı fazla olan donmuş, kaynatılmış, pastörize edilmiş veya ekşimiş sütler, MRT için uygun değildir. Esas olarak meme bezlerinde meydana gelen meme enfeksiyonu sonucu oluşan IgA antikorları, MRT oluşumunda daha aktiftir. IgG, özellikle IgG₁ yağ globulinlerine karşı daha az afiniteye sahiptir. MRT ile diğer serolojik testlerde aynı antikor grupları etkin olmadığından, MRT ile serolojik testlerin uyumsuzluğu bildirilmiştir.

MRT'nin çok sayıda inek sütünün bir arada bulunduğu tanklardan elde edilen süt örneklerinde, erken enfeksiyon antikorlarının (IgM'nin) gösterilmesinde yeterince duyarlı olmadığı bildirilmiştir. MRT'nin yukarıda bahsedilen olumsuz yönlerinden dolayı, ELISA yöntemi, süt ve süt ürünlerinde *Brucella* teşhisinde en tercih edilen metot haline gelmiştir (Thoen, 1979, 1983, 1994; Güllüce, 1993; Güllüce ve Leloğlu, 1996). İşte bu nedenlerle araştırmamızda süt örneklerinde MRT ile tarama testi yapılmış daha sonra ise *Brucella* antikorunu tayini için ELISA testi kullanılmıştır. Ancak yukarıda da belirtildiği gibi, çeşitli araştırmacılar ELISA'nın bu iki özellik bakımından diğer testlere oranla daha avantajlı olduğunu kaydetmektedirler (Uzal, vd., 1996; Vanzini vd., 1998). Üstelik bazı araştırmacılar, ELISA'ya ait özgül ve duyarlı değerlerinin cut-off değeriyle değiştiğini ifade etmektedirler (Nielsen vd., 1996).

Bu araştırmada *Brucella abortus* S 19 suşunun KCl ekstraktı antijen olarak kullanılmıştır. Daha önce yapılmış çeşitli araştırmalarda sonikasyona maruz bırakılmış hücreler (Nielsen vd., 1988) ve lipopolisakkarit yapılar (Baraker, 1981; Sutherland, 1984; Kadohira vd., 1997) kullanılsa da, süt ve süt ürünlerinde *Brucella* antikorlarının

tanısı amacıyla bunlardan daha çok bütün hücre komponentleri ve lipopolisakkarit yapıları içeren materyallerin tercih edildiği belirtilmiştir (Nielsen vd., 1988). Ancak son yıllarda tüm hücre komponentlerinin kullanıldığı çalışmalarda ELİSA'da non-spesifik reaksiyonların gözlendiği belirtilmiş ve özellikle düşük seyreltmeli süt örneklerinde bu durumun minimize edilmesi amacıyla hücrenin KCl ekstraktının kullanımı denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Thoen vd, 1995), Bu nedenle araştırmamızda *Brucella abortus* S 19 suşunun KCl ekstraktı antijen olarak tercih edilmiştir.

Araştırmamızda öncelikle antijenin optimal sonuç verdiği dilüsyon oranı tespit edilmeye çalışılmış ve bu amaçla 1/25-1/3200 oranlarındaki çeşitli seyreltme oranları denenerek, en uygun seyreltme oranının 1/50 olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bulgu, *Brucella abortus*'un KCl ekstraktını antijen olarak kullanan çeşitli araştırmacıların bulgularıyla (Thoen vd, 1995) paralellik arz etmektedir. Bu araştırmada ELISA, aynı süt örneğinin farklı dilüsyonları için (1/2; 1/4; 1/8; 1/16) ayrı ayrı yapılmıştır. Araştırmacılar ELISA sonuçlarının farklı dilüsyonlar kullanılarak değerlendirilmesi gerektiğini, örneklerin düşük dilüsyonlardaki pozitifliğinin aşılarmaya, yüksek dilüsyonlardaki pozitifliğin ise bir enfeksiyona bağlı olabileceğini belirtmektedirler (Thoen vd., 1995; Güllüce ve Leloğlu, 1996). Araştırmamızda aynı sütlerin farklı dilüsyonlarına ELISA uygulanması; bu nedenle gerçekleştirilmiş ve genellikle kuvvetli pozitiflik durumunun varlığı nedeniyle, 1/16'lık dilüsyonlar dışındaki diğer dilüsyonların hepsinde, pozitif örnekler arasında değişme görülmemiştir.

Süt ve süt örneklerinde ELISA testi çalışmalarında konjugat olarak çeşitli enzimlerle işaretlenmiş rabbit antibovine (Thoen vd, 1979, 1983, 1995), antibovine- IgG (Vanzini vd., 1988), goat antibovine IgG (Güllüce ve Leloğlu, 1996), mouse anti-bovine Ig:G (Nielsen vd, 1996), anti-sheep (H+L) IgG (Biancificori vd., 1996) ve Protein G (Diaz-Aparicio vd., 1994) kullanılmaktadır. Protein G, streptokokların hücre duvarı yüzeyinden izole edilen bir protein olup, immunoglobulinlerin F_C kısımlarına bağlanabilme özelliğindedir (Falkenberg, 1987; Bjorck, 1987). Bu çalışmada konjugat olarak Protein G

kullanılmıştır. Protein G'nin ELISA'da özgülüğü arttırdığı (DiazAporicio, 1994) daha kolay hazırlandığı ve daha ucuza mal edildiği bilinmektedir.

Üstelik, bu proteinin *Escherichia coli*'ye klonlanmasıyla biyoteknolojik olarak ve daha bol miktarlarda elde edilmesinin mümkün olacağı bildirilmiştir (Falkenberg, 1987; Bjorck, 1987).

Bu araştırma sonucunda incelenen süt örneklerinde pozitiflik oranı %17 olarak belirlenmiştir. Sütler üzerinde yapılan daha önceki araştırma sonuçları ile karşılaştırıldığında, bu oranın fazla yüksek olmadığını, hatta bazı gelişmiş ülkelerde belirlenen oranlardan daha düşük olduklarını görmekteyiz. Nitekim Heck vd., (1980), Amerika Birleşik Devletler'inde 20' si aşılınmış ve 40'ı aşılınmamış ineklerden elde edilen sütler üzerinde yapmış oldukları bir araştırmada pozitiflik oranının sırasıyla %93 ve %57 olduğunu, Thoen vd., (1995), Amerika Birleşik Devletler'inde 334 süt örneği üzerinde yaptıkları araştırmada pozitiflik oranının % 16 olduğunu, Bianciflori vd., (1996), İtalya'da 48 süt örneği üzerinde yaptıkları bir araştırma sonucunda pozitiflik oranının %60 olduğunu, Vanzini vd.; (1998), Arjantin'de 2671 süt örneği üzerinde yaptıkları çalışmada pozitiflik oranının %21 olduğunu kaydetmişlerdir. Ne yazık ki ülkemizde, sütlerde ELISA ile *Brucella* tespitine yönelik araştırmaların sayısı yok denecek kadar azdır. Güllüce ve Leloğlu, (1996), Kars yöresindeki 712 süt örneği üzerinde yapmış oldukları bir araştırma sonucunda pozitiflik oranının %51,5 olduğunu belirlemişlerdir. Çünkü hem ülkemizde, bu konu üzerinde yapılan araştırma sayısı, hem de çalışmamızda kullandığımız örnek sayısı ile örneklerin sadece belli bir bölgeye ait olması, böyle bir genelleme yapabilmemizi zorlaştırmaktadır.

Bu çeşit çalışmalarda, gıda ürünlerinde ya doğrudan antijenik yapılar veya antikorlar aranmaktadır. Birinci durumda gıdanın, ikinci durumda ise hayvanın enfeksiyon ajanı ile kontaminasyonu hakkında bilgi edinilmektedir. Bu araştırmada süt örneklerinde antikor aranmıştır. Dolayısıyla pozitif sonuçlar (%17), sütün elde edildiği hayvanların enfeksiyon ajanı ile enfekte edildiğini gösteren bulgulardır ve oldukça yüksek bir oranda

karşımıza çıkmaktadır. Çünkü ülkemizde brucellosis ile mücadele konusunda yapılan çalışmalar küçümsenmeyecek boyuttadır. Nitekim 1984 yılında brucellosis kontrolü ve eradikasyonu programı başlatılmış ve bu proje kapsamında 2010 yılına kadar 4-8 aylık bütün dişi buzağların *Brucella abortus* S 19 ile, koyun ve kuzuların ise *Brucella melitensis* REV I ile aşılması hedeflenmiştir. Projenin uygulanmaya geçirilmesini takip eden 1989 yılında sığır ve koyun brucellosis sero-prevalansı sırasıyla %3,56 ve %1,26 iken bu oranlar 1991 yılında %1,01 ve %1,83 olarak değişmiştir.

Ancak projenin yürütüldüğü yıllarda insan brucellosis vakalarında bir artış kaydedildiği görülmüştür. 1986'da 100.000'de 3,03 olan insan Brucellosis sıklığı, 1996'da 100.000 de 15,11'e yükselmiştir (Altındış, 2001; Anonymous, 2001). Araştırmacılar, bu durumun enfeksiyona yakalanma vakalarındaki artıştan ziyade, tarama çalışmalarının kalitesinin ve sayısının artmasına bağlı olduğunu belirtmektedirler (Anon, 1999). Bu nedenlerle, ister hayvanlar üzerinde, isterse gıdalar üzerinde yapılmış olsun, araştırmalardan elde edilen bulguların doğrudan karşılaştırılması, ancak araştırmaların yapıldığı ülkelerdeki tarama sayıları ve kaliteleri dikkate alındığında bir anlam ifade edecektir, yapılması gereken en doğru şey, ülkemizdeki bu çeşit çalışmaların sayı ve kalitesini arttırmaktır. Bu çalışmada her ne kadar bir indidans çalışması değilse de, bir fikir edinmek amacıyla, alınan numune sayılarının, köy ve hayvan sayılarının % 5'i ile % 10'u oranında olmasına dikkat edilmiştir. Numuneler belirli merkezlerden alınmış olmasına rağmen, yerleşim birimleri açısından test sonuçları oldukça yüksek bulunmuştur. Köylülerden alınan bilgilere göre yavru atan hayvanların olanaklar ölçüsünde satışa çıkarıldığı öğrenilmiş, bunun da enfekte hayvanların Isparta ili içinde ve il dışı hareket enfeksiyonu yoluyla yarattığı riski artırmaktadır.

KA YNAKLAR

- Abuharfeil, N., Abo - Shehada, M.N., 1998, A comparison between three serological tests for *Brucella melitensis* infection in sheep. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 22(2), 119-122.
- Akritidis, N., Pappas, G., 2001, Ascites caused by BruceIIosis: a report of two cases. Scand. J. Gastroenterol., 36(1), 110-112.
- AI-Eissa, Y.A., Faap, M.D., 1999, BruceIIosis, in Saudi Arabia: Past, Present and Future. Annals of Saudi Medicine, 19(5), 403-405.
- Alexio, M.J., Ferreira, M.L., Antunes, F., 1999, BruceIIosis. Acta. Med. Port., 12(12), 323-30.
- Altındış, M., 2001, Afyon bölgesi besicilerinde, kasaplarda, süt ürünleri toplayıcısı ve imalathanelerinde çalışanlarda bruselloz seropozitifliğı. Turkish Journal of infection, 15(1), 11-15.
- Anguita, G., Martin, R., Garcia, T., Morales, P., Haza, A.I., Gonzales, I., Sanz, B. and Hernandez, P.E., 1997, A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monuclonal antibody against bavine β -casein. Journal of food protection, 60(I), 64-66.

Anonymous, 1999, Human and Animal Brucellosis, Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries. Report of a WHO/MZCP Workshop Damascus (4-5 Mayıs 1998), Syrian Arab Republic, p10

Anonymous, 2000, VIII. Beş yıllık (2001-2005) kalkınma planı süt sanayii özel ihtisas alt komisyonu çalışması, 8-10.

Anonymous, 2001, Türkiye'de sığır ve koyunlarda brucellosis'in sero-epidemiolojisi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Araştırmaları 2000, Ankara, s 5-37.

Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö., 1992, Özel Mikrobiyoloji Epidemiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik Enfeksiyonlar. Atatürk Üniv. Kars Vet. Fak. Yayın., No.1, Erzurum, s197

Asbakk, K., Gall, D., and Stuen, S., 1999, A screening ELISA for brucellosis in reinder.J. Vet. Med., 46, 649-657.

Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, RO., Shadomy, H.J., 1991, Manual of Clinical Microbiology American Society for Microbiology Washington, (5nd ed.) p 457-462.

Batra, H.V., Chand, P., Ganju, L., Mukherjee, R., Sadana, J.R.,1989, Dot-Enzyme Linked Immunosorbent assay for the detection of antibodies in Bovine Brucellosis. Res. Vet. Sci., 46, 143-146.

Baysal, R., 2000, Brucellozun Laboratuvar Tanısı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 54-56.

- Bercovich, Z., Taaijke, R., 1990, Enzyme immunoassay using mouse monoclonal anti-bovine antibodies for the detection of *Brucella abortus* antibodies in cow milk. Zentralbl Veterinarmed, 37(10), 753-9.
- Biancifiori, F., Nannini, D., Di Matteo, A., and Belfiore, P., 1996, Assessment of an indirect ELISA in milk for the diagnosis of ovine brucellosis. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., 19(1), 17-24.
- Bilgehan, H., 1994, Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Barış Yayınları, İzmir, s 589.
- Bjorck, L., Kastern, W., Lindahl, G., Wideback, K., 1987, Streptococcal protein G, expressed by Streptococci or by *Escherichia coli*, has separate binding sites for human albumin and IgG. Mol. Immunol. 24(10), 1113-1122.
- Boschirolu, M-L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D., 2001, Brucellosis: a worldwide-zoonosis. Curr. Opin. Microbiol, 4, 58-64.
- Boyazoglu, J., Morand-Fehr, P., 2001, Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality a critical review. Small Ruminant Research, 40,1-11.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., 1991, Biology of Microorganism. New Jersey, (6nd ed.) p 452-454.
- Cengiz, A., 2000, Brucellozdan Korunma ve Tedavi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 57-67.

Corbel, M.J., 1997, Brucellosis; an overview. *Emerg. Infect. Dis.*, 3(2), 1-15.

Demirci, M., Gündüz, H., 1994, Süt Teknoloğunun El Kitabı. Hasad Yayıncılık, (ikinci baskı) s 144-146.

Diaz-Aparicio, E., Marin, C., Alonso-Urmeneta, B., Aragon, V., Perez-Ortiz, S., Pardo, M., Blasco, J.M., Diaz, R., Moriyon, I., 1994, Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J.Clin. Microbiol.*, 32 (5), 1159-1165.

Falkenberg, C., Bjorck, E.L., Akerstrom, B., Nilsson, S., 1987, Purification of streptococcal protein G expressed by *Escherichia coli* by high performance liquid affinity chromatography using immobilized immunoglobulin G and albumin. *Biomed Chromatogr.*, 2(5), 221-5.

Fazlı, A., 2000, Bruselloz'un Epidemiyolojisi .Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 30-36.

Figueroa, D.R., Rojas, R.L., Marcano, T.E.S., 1995, Brucellosis in pregnancy: course and perinatal results. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 63, 190-5.

Fraser, C.M., 1991, A Handbook of diagnosis, Therapy and Disease prevention and control for the veterinarian. Rahvey, N.J., USA, (7nd ed.) p 667-672

Gall, D., Coiling, A., Marina, O., Moreno, E., Nielsen, K., Perez, B. and Samartino, L., 1998, 'Enzyme Immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: a trial in Latin America. *Clin. Diagn Lab. Immunol.*, 5(5)654-661.

Güllüce, M., 1988, Bölgemiz sütlerinin bakteriyolojik ve antibiyotik yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Kars.

Güllüce, M.,1993, Kars ve Çevresinde Sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle (RBPT, SAT, MRT) saptanması ve sonuçların karşılaştırılması. Doktora Tezi, Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Kars.

Güllüce, M., Leloğlu, N., 1996, Detection of *Brucella abortus* antibodies in cows milk of the Kars area by ELISA and MRT. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 20,251-255.

Heck, F.C., Williams, J.O., Pruett, J, Sanders, R., Zink, D.L., 1980, Enzyme - linked immunosorbent assay for detectory antibodies to *Brucella abortus* in bovine milk and serum. Am. J. Vet. Res., 41 (12), 2082-4.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams& Wilkins, Baltimore, Maryland (9 nd ed.) p 71-174.

İzgür, M., 2000, Hayvancılık ve Brucellosis. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 68-78.

Kadohira, M., McDermott, J.J., Shoukri, M.M. and Kyule, M.N., 1997, Variations in prevalence of antibody to *brucella* in cattle by farm, area and district in Kenya. Epidemiol. Infect., 118,35-41.

- Kerkhofs, P., Botton, Y., Thiange, P., Dekeyser, P., Limet, J.N., 1990, Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk. *Vet. Microbiol.*,24(1), 73-80
- Keskin, O., 1996, Sığır tüberkülozis'inin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kıyan, M., 2000, Patogenez. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu,37-40.
- Kocabeyoğlu, Ö., Koşan, E., Öztürkeri, H., Emekdaş, G., Yılmaz, M., Durgun, E.T.,1994, Brucelloz tanısında çeşitli testlerin birlikte uygulaması ve sonuçların karşılaştırılması. *Türk Microbiyol Cem.Derg.*, 24,30-33.
- Levinson, W., Jawetz, E.,1998, 20.bölüm,beşinci baskı. *Medical Microbiology and Immunology*(çeviri). Barış Kitabevi, İstanbul, s 596.
- Mathai, E., Singhal, A., Verghese, S., Dlima, D., Ganesh, A, Thomas, K., Moses, P.,1996, Evaluation of an ELISA for the diagnosis of brucellosis. *Indian Journal of Medical Research*, 103,323-324.
- Metin, M., 1996, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi(1.Bölüm). E. Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları, No.33, İzmir, s 1-348

- Mikolon, AB., Gardner, I.A, Hietala, S.K., De Anda, J.H., Pestana, E.C., Hennager, S.G. and Edmondson, A.J., 1998, Evaluation of North American Antibody Detection Tests for diagnosis of brucellosis in Goats. J. Clin. Microbiol., 36(6), 1716-1722.
- Mongin, C., Fernandez, T., Turovetsky, A, Hajos, S.E., 1990, Comparative study of cell- immunoenzymatic methods for the estimation of IgG and IgM anti - *brucella* antibodies in the diagnosis of human brucellosis. J. Appl. Microbiol., 69, 86-91.
- Nicoletti, P., Tanya, V., 1993 Comparison of enzyme - labeled immunosorbent assay and particle concentration fluorescence immunoassay with standard serologic methods and bacteriologic culture for detection of *Brucella* sp infected cows in herds with brucellosis. J. Am. Vet. Med. Assoc., 202(12), 1975-7.
- Nielsen, K.H., Kelly, L., G311, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., Kelly, W., 1996, Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. Prev. Vet. Med., 26, 17-32.
- Nielsen, K., Smith, P., Gall, D., Perez, B., Cosmos, C., Mueller, P., Trottier, J., Cote, G., Boag, L., Bosse, J., 1996, Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in milk. Vet. Microbiol., 52(1-2), 165-173.
- Nielsen, K.H., Wright, P.F., Kelly, W.A and Cherwonogrodzky, J.H., 1988, A review of Enzyme Immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in Cattle. Vet. Immunol. Immunopathol., 18, 331-347.

- Nunez- Torrees, E.D., Diaz-Aparicio, E., Hernandez-Andrade, L., Trigo- Tavera, FJ., Suarez-Guemes, F., 1997, Sensitivity and spesifisity of an ELISA as ascreening test for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Rev. Latinom. Microbiol., 39(3-4),123-8.
- Öngör, H., Muz, A., Çetinkaya, B., 2001, Comparison of ELISA with other serological tests in the diagnosis of ovine brucellosis. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 25,21 26.
- Özsan, M., 2000 Bruselloz'un Tarihçe ve Etyolojisi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 21-29.
- Paulo, P.S., Vigliocco, A.M., Ramondino, R.F., Marticorena, D., Bissi, E., Briones, G., Gorchs,C., Gall, D., and Nielsen, K., 2000, Evaluation of primary binding assays for presumptive serodiagnosis of swine brucellosis in Argentina.Clin. Diagn. Lab. Immunol., 7(5),828-31.
- Rijpens, N.P., Jannes, G., Asbroeck, A.V., Rossau, R. and Hennan, L.M..F., 1996, Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S - 23S rRNA spacer probes. Appl. Environ. Microbiol., 62(5), 1683-1688.
- Samartino, L., Gall, D., Gregaret, R., Nielsen, K., 1999, Validation of Enzyme-Linked Immunosorbent. Assay for the diagnosis for bovine brucellosis. Vet.Microbiol., 70, 193-200.

Shamelian, S.O.A, 2000, Diagnosis and treatment of brucellosis. Neth. J. Med., 56,198-199.

Singh, S.V., Singh, N., Gupta, Y.K., Shankar, H., Vihan, V.S., Gupta Vinod, K., Tiwari, H.A, 1998, Seroprevalence of brucellosis in a few important Indian goat breeds. Small Ruminant Research, 30, 93-98.

Sözen, T.H., 2000, Brucellozda Çeşitli Sistem Bulguları, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 47-49.

Sutherland S.S., 1984/85, Evaluation of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in the detection of cattle infeksiyon with *Brucella abortus*. Vet. Microbiol., 10, 23-32.

Sümer, Z.,Sümer, H.,Poyraz, Ö.,2000, Eğerci Beldesi Erişkin Nüfusunda Bruselloz Seropozitifliği. Turkish Journal of Infection, 14(1),65-67.

Szulowski, K., Iwaniak, W., Pilaszek, J, Truszczynski, M., Chrobocinska, M., 1999, The ELISA for the examination of hare sera for *anti-Brucella* antibodies.Comperati ve Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 22(1),33-40.

Şahin, F., 2000, Moleküler teknikler kullanılarak mikroorganizmaların tanısı ve teşhisi (15-20 Mayıs 2000). II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji teknikleri Kursu, Atatürk Üniversitesi, Erzurum, 60-62.

Tekeli, E., 2000, Erişkin Brucellozda Çeşitli Sistem Bulguları, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu, 41-46.

- Thoen C.O., Pietz, D.E., Armbrust, A.L., Harrington, R., 1979, Enzyme immunoassay for detecting *Brucella* antibodies in cow's milk. J. clin. Microbiol., 10(2),222-5.
- Thoen, C.O., Bruner, J.A., Luchsinger, D.W., Pietz, D.E., 1983, Detection of *brucella* antibodies of different immunoglobulin classes in cow milk by enzyme linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 44(2), 306-8
- Thoen, C.O., Haas, C.A., Angus, R.D., Townsend, A.S., 1995, Evaluation of potassium chloride extract of *Brucella abortus* in an ELISA for detecting *Brucella* antibodies in bulk tank milk samples from cows. Vet. Microbiol.,45,185-189.
- Trujillo, I.Z., Zavala, A.N., Caceres, J.G., Miranda, C.Q., 1994, Brucellosis. Infect Dis.Clin. North. Am., 8(3), follow
- Uzal, F.A., Carraseo, A.E., Nielsen, K., Echaide, S., Cabrera, R.F., 1996, An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG₁ enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet. Microbiol., 52(1-2), 175-180.
- Uzal, F.A., Samartino, L., Schuring, G., Carraseo, A., Nielsen, K., Cabrese, R.F., and Taddeo, U.R., 2000, Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. Vet. Res. Commun., 24,143-151.
- Vanzini, V.R., Aguirre, N., Lugaresi, C. I., de Echaide, S.T., De Canavesia, V.G., Guglielmone, A.A., Marchesino, M.D., Nielsen, K., 1998, Evaluation of an direct ELISA for the diagnosis of the bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentina. Prev. Vet. Med., 36 (3), 211-7.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Barış Serttaş

Doğum yeri: Burdur

Doğum yılı: 20. 05.1979

Medeni hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1993- 1997 Burdur Anadolu Öğretmen Lisesi

Lisans : 1998- 2002 Ondokuz Mayıs Üniversitesi Amasya Eğitim Fakültesi Fen
Bilgisi Öğretmenliği

Yabancı Dil : İngilizce