

## Sığır Brusellozunun Teşhisi İçin Sütte İndirekt ELISA'nın Kullanımının Değerlendirilmesi\*

İbrahim Çadircı<sup>1,a</sup>, Sevil Erdenliğ Gürbilek<sup>2,b,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Tarım Orman İl Müdürlüğü, Gıda ve Yem Şubesi, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-0930-5076, <sup>b</sup>ORCID:0000-0002-0377-2650

Geliş Tarihi: 12.02.2020

Kabul Tarihi: 08.06.2020

**Özet:** Bu çalışmada sütte anti *Brucella* antikorlarını saptamak için bir indirekt süt ELISA prototipi geliştirilmesi amaçlandı. Daha önce *Brucella abortus* biyotip 3 izole edilen enfekte çiftliklerden alınarak Rose Bengal Pleyt testi (RBPT) ve komplement fiksasyon testi (KFT) ile test edilerek pozitif bulunan toplam 36 süt ve serum örneği ve *brucella* ari sürülerden alınan 45 adet süt ve serum örnekleri tanısal duyarlılık ve özgüllüğün saptanmasında receiver-operating characteristic (ROC) ile analiz edildiler. Bu analizin sonucunda yüzde pozitivite (PP) olarak ifade edilen eşik değeri değeri, %29.3 olarak alınmıştır. Buna göre testin duyarlılığı (sensitivite) %96.15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar (%80.36-99.9))] ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Sonuçlar, aynı hayvandan alınan süt ve serum sonuçları arasında korelasyon gösterdi. Süt ring testi (SRT), KFT ve RBPT sonuçlarına göre en yüksek oranda yanlış pozitif sonuç veren test oldu. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgular, indirekt süt ELISA prototipinin oldukça duyarlı ve özgül bir test olduğunu ve sütün mevcut olduğu durumlarda, hastalığın serolojik tanısı için süt sığırlarında stress yaratmadan kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Dolayısı ile süt örneklerinde ELISA'nın kullanımı ile süt sığırcılığı işletmelerinde bruselloz ile ilgili güvenilir ve sağlam veriler, ekonomik ve pratik olarak elde edilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella abortus*, Süt-ELISA, Sığır, SRT.

### Evaluation of Using ELISA in Milk for Diagnosis of Brucellosis in Cattle

**Abstract:** In this study, to develop an indirect milk ELISA prototype was aimed for the determination of anti *Brucella* antibodies in milk. Rose Bengal Plate Test (RBPT) and Complement fixation test (CFT) records of 36 serum and milk samples received earlier from the infected farms in which *B. abortus* biotype 3 had been isolated and identified and 45 milk and serum samples from brucellosis free herds were used for receiver-operating characteristic (ROC) analysis in determining diagnostic sensitivity and diagnostic specificity, respectively. According to the this analysis, cut off level stated as percent positivity (PP) was taken as 29.3%. Based on this value, the sensitivity of the test was determined as 96.15% with a 95% confidence interval (CI) [95% (80.36%-99.9%)] and a specificity of 95.65% [95% CI (85.16-99.47 %)]. Our results also showed correlation between antibody level in serum and milk received from the same animal. MRT showed the highest false positive results compared to CFT and RBPT results. As conclusion, our results indicated that the indirect milk ELISA prototype is a highly sensitive and specific test and it could be used without being invasive in dairy cattle for serologic diagnosis of brucellosis whenever milk available for this purpose. Therefore, reliable and robust data for brucellosis in dairy farms would be obtained practically and economically by using ELISA in milk samples in dairy farms.

**Keywords:** *Brucella abortus*, Milk-ELISA, Cattle, MRT.

### Giriş

Hayvanlarda büyük bir maddi kayba neden olan ve insanlarda da önemli bir zoonoz hastalık olan brusellozun indirekt teşhisinde çeşitli serolojik testler kullanılmaktadır. Bu testler bireyselden çok sürü tarama testleri olarak hastalığın teşhisinde en sık başvurulan yöntemleri oluşturmaktadır (Alton ve ark., 1988). Ancak brusellozun hastadaki her evresini, her epidemiyolojik durumda ve her hayvanda saptayacak tek bir serolojik test yoktur. Hastalığın serolojik teşhisinde OIE'nin önerdiği resmi testler olarak en çok Rose-Bengal Plate Testi (RBPT) ve Komplement Fiksasyon Testi (CFT) kullanılmaktadır. Bunun yanında aglutinasyon testleri, Coombs testi, ELISA, cELISA ve Floresans

Polarizasyon Testi (FPA) kullanılan diğer tekniklerdir (OIE, 2009). Bu testler için hayvanın kanının alınması gerekmektedir. Bu durum gerek hayvanda yarattığı stres ve gerekse maliyet giderleri açısından sütün yapılacak bir teste göre önemli dezavantajlar taşımaktadır. Bu nedenle sütün yapılacak serolojik testlerin serumdan yapılacak serolojik testlere göre önemli avantajları olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca sütteki ve serumdaki immunoglobulin seviyeleri arasında korelasyon bulunduğundan sütün içerdiği antikor seviyesi hayvanın serolojik tablosunu yansıtabilir (Ducrotoy ve ark., 2016; Sutra ve ark., 1986; Vanzini ve ark., 1998). Günümüzde gerek bireysel ve gerekse tank süt örneklerinde tarama

testi olarak süt ring testi (SRT) uygulanmaktadır. Ancak basit ve pratik bir test olan SRT'nin süt-ELISA'ya göre önemli dezavantajları vardır. Bunlar arasında, doğumdan hemen sonra ve laktasyonun sonuna doğru alınan sütlerde, mastitisli sütlerde, donmuş sütlerde kullanılamaması, testin duyarlık ve özgüllüğünün daha düşük olması sayılabilir. Ayrıca enfeksiyonun erken dönemlerinde yeterli duyarlılık göstermemesi ve etçi sığırlarda çok sınırlı bir kullanım alanı bulması diğer dezavantajlarıdır (Nicoletti, 1969; OIE, 2009).

Çok sayıda araştırmacı çeşitli antijenlerin kullanıldığı süt ve serumda uygulanan ELISA tabanlı çalışmalar yapmışlar ve ELISA'nın SRT ile saptanandan çok daha düşük titrede antikor saptadığını ve bu nedenle gerek bireysel ve gerekse tank sütlerinde iyi bir tarama testi olduğunu bildirmişlerdir (Thoen ve ark.1979; Boraker ve ark. 1981; Chand ve ark. 2005; Titarelli ve ark, 2011; Vanzini ve ark.,1998).

Bu çalışmada kan serumu ve süt içerdiği antikorlar yönünden karşılaştırıldığında, sütte uygulanacak ELISA prototipin serum ELISA ya karşı hayvanlarda güvenle kullanılabilir bir alternatif olup olmadığı değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Metot

**Bakteriyel suş ve referans serum ELISA antijeni:** Çalışmanın yapılması Harran Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.03.2015 Tarih ve 2015/07 nolu kararı ile uygun bulunmuştur. Çalışmada XXX Üniversitesi Veteriner Fakültesi Kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önceki çalışmalarda izole edilmiş ve *B. abortus* biyotip 3 olarak tanımlanan suş kullanıldı. Laboratuvarında geliştirilen ELISA (in house serum ELISA) için kullanılacak solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edildi

**Referans pozitif ve negatif süt ve serum örnekleri:** Yeni geliştirilen süt ELISA prototipi için ROC analizlerinin yapılmasında, pozitif ve negatif referans materyalleri kullanıldı. Bu amaçla, daha önce etkenin izole edildiği enfekte sığır sürüsünden alınan 36 adet serum ve süt örneği, pozitif referans süt (PRS) ve bruselloz yönünden ari sürülerden alınan 45 adet serum ve süt örneği ise negatif referans süt (NRS) olarak kullanıldı. Bu serum örneklerinin bilinen KFT ve RBPT sonuçları ROC analizinde testin duyarlık, özgüllük ve eşik değerinin saptanmasında kullanıldı.

**Test serum ve süt örnekleri:** Daha önce brusellozun görüldüğü (A, B, C, D) ve görülmediği (E ve F) olmak üzere toplam 6 ayrı sürüden alınan kan

ve süt örnekleri, geliştirilen süt ve serum ELISA, RBPT ve süt ring testi (SRT) ile test edildiler. Bu testlerde PRS ve NRS ve serum kontrolleri kullanıldı. F ve D sürülerinden sadece süt örnekleri alınırken diğer sürülerden aynı hayvandan hem süt ve hem de serum örnekleri alındı.

**Antijen Üretimi:** Bu amaçla Yi ve Hackett'in (2000) bildirmiş olduğu Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Bu yöntemle su ve organik fazlar ayrıldı. İçinde ekstrakte edilen ham LPS bulunan su fazı ayrı bir steril tüpte toplandı ve -20°C de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

Laboratuvarında geliştirilen (in house) serum ELISA için Animal and Plant Health Agency (APHA) Weybridge, İngiltere'den temin edilen solid faz antijeni (*Brucella* S-LPS antijeni) 1:6000 oranında ELISA kaplama solüsyonu ile sulandırılarak pleytlere kaplandı.

**Süt örneklerinden etken izolasyonu çalışmaları:** Süt örneklerinden etken izolasyonu için OIE Manuel'de (2009) bildirilen yöntem kullanıldı. Bu amaçla süt numuneleri, santrifüj edilerek üstteki krema ve alttaki tortudan selektif Farrel's mediyuma ekim yapıldı. Ayrıca bu numuneler ön zenginleştirmeğe alındılar ve örnekler negatif olarak kabul edilmeden önce %5-10 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 6 haftaya kadar inkübe edildiler.

**Serolojik testler:** Süt örneklerinin alındığı hayvanların kan serumları RBPT ve indirekt ELISA ile test edildiler. Tüm test süt örneklerine SRT ve indirekt süt ELISA uygulandı. RBPT ve SRT antijenleri Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü (PVKE)'nden temin edildi. Bu testlerin (RBPT ve SRT) uygulanması Alton ve ark.'nın (1988) belirttiği yöntemle göre yapıldı.

**İndirekt serum ve süt ELISA:** İndirekt ELISA, Vanzini ve ark.'nın (1998) bildirdiği yöntemle göre bazı modifikasyonlar yapılarak uygulandı. Serum ELISA solid faz antijeni 0.05 M sodyum karbonat (pH 9.6) içinde 1:6000 oranında sulandırıldı. Süt ELISA antijeni için ise test yeni geliştirildiği için kullanılacak antijen ve PRS ve NRS arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyon optimum antijen olarak seçildi. Her iki ELISA içinde seçilen antijen dilüsyonları 96 gözlü düz tabanlı maxisorp polistiren pleytlere (NUNC 692620) kaplandı. Daha sonra antijenle kaplanan pleytlar 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi ve %3 yağı alınmış süttozu içeren PBS solüsyonu ile 2 saat süre ile bloklandılar. Yıkama aşamasında pleytlar %0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) solüsyonu ile 4 kez yıkandılar. Serum ELISA'da primer antikor bağlanması aşamasında, her hayvan

**Tablo 1.** Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

A çiftliği (infekte)	M ELISA	SRT	S-ELISA	RBPT	Kültür
10	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-
1	-	+	-	-	-
<b>B çiftliği (infekte)</b>					
5	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	-
5	-	-	-	-	-
1	-	+	-	-	-
1	+	-	+	-	-
1	-	-	+	+	-
<b>C çiftliği (infekte)</b>					
9	-	-	-	-	-
1	-	+	+	+	-
<b>39 Toplam</b>	11 (%28.2)	13(%33.3)	13(%33.3)	12(%30.8)	5(%12.8)
<b>E çiftliği (non infekte)</b>					
13	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-
<b>17</b>	0	4(%23.5)	0	0	0

**Tablo 2.** Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması

D çiftliği (infekte)	Milk ELISA	SRT	Kültür
3	-	+	-
4	+	+	-
2	+	+	+
1	-	-	+
1	+	-	-
7	-	-	-
<b>17</b>	7 (%41.2)	9 (%52.9)	3 (%17.6)
<b>F çiftliği (non infekte)</b>			
7	-	+	-
8	-	-	-
<b>15</b>	0	7 (% 46.6)	0

türü için kullanılacak pozitif ve negatif kontrol serumlarının her birinden ikişer kez olmak üzere %1 süt tozu içeren PBS/T solüsyonu içinde 1: 50 oranında hazırlanmış olan dilüsyonlarından pleytlerin her bir kuyucuğuna 100 µl olarak konuldu. Süt ELISA için ise NRS, PRS ve test süt örneklerinden 100 µl olarak her numune için ikişer kez olmak üzere pleyte konuldu. İnkübasyon ve yıkama aşamalarından sonra horse-radishperoxidase (HRPO) ile işaretlenmiş A/G recombinant proteini (Pierce 32490) belirlenen dilüsyonda %1 süt tozu içeren PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 4 kez PBS/T ile yıkandı ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10 ila 15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edildi. Pleytlerin otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okundu. Serum ELISA'nın sonuçlarının belirtilmesi aşağıda tanımlandığı gibi yapıldı.

Yüzdeler pozitivite (Percent positivity PP) hesaplanmasında, test örneğinin optik dansitesinden ortalama negatif serum optik dansitesi çıkarıldı. Elde edilen değer, ortalama pozitif serum kontrolü ve ortalama negatif serum kontrolü optik dansiteleri arasındaki farka bölündü. Sonuç 100 ile çarpıldığında PP bulunmuş oldu. Süt ELISA'nın duyarlılığı ve özgüllüğü, referens pozitif ve negatif serumların KFT ve RBPT sonuçlarına göre yapılan ROC analizinin sonucunda belirlenen eşik değerine göre yapıldı.

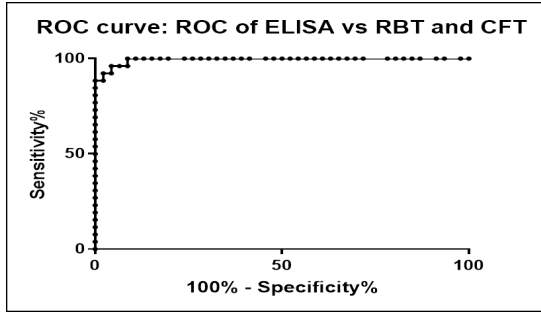
### İstatiksel analiz

ROC analizi, %95 güven eşiğindeki güvenlik aralıkları, tanısal duyarlık ve özgüllük Medcalc software programı kullanılarak yapıldı (Schoonjans ve ark., 1995).

### Bulgular

Çalışmada elde edilen sonuçlara göre duyarlılık (sensitivite), %96,15 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar

(%80.36-99.9]) ve özgüllük (spesifisite) %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırlar (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) %29.3 PP olarak belirlendi (Şekil 1).



Şekil 1. RBPT ve KFT sonuçları baz alınarak yapılan milk ELISA ROC analizi sonuçları. Area under curve (AUC=0.9941)

Aynı hayvandan serum ve süt alınan işletmelerdeki serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 1.de gösterildi. Buna göre enfekte A, B, C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12.8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA (%33,3) ile alınırken bunu, RBPT (%30.8) ve süt ELISA (%28.2) izledi. Enfekte olmayan F çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuçlar verdi. Sadece %23.5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. (Tablo 1)

Sadece süt alınan iki çiftlikte serolojik testlerin ve kültür sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 2.de gösterildi. Buna göre enfekte D çiftliğinde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%17.6). En fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken, bunu süt ELISA (%41.2) izledi. Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdi. Ancak SRT ile %46.6 oranında pozitif sonuç alındı.

## Tartışma ve Sonuç

Brusellozun teşhisinde bakteriyel izolasyon ve identifikasyon altın standart ve en spesifik yöntem olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu yöntemin, çok sayıda örneğin teşhisi için pratik olmaması, zaman alıcı olması, deneyimli personele ihtiyaç göstermesi ve aynı zamanda uygulayıcı için riskli olması nedeniyle brusellozun teşhisinde serolojik yöntemler geniş çaplı olarak kullanılmaktadır (Alton ve ark.,1988; Corbel, 1989).

Serum ve süt örnekleri iyi birer antikor kaynağı oldukları için bu örneklerde çok sayıda serolojik test uygulanmaktadır. Süt örneklerinde *B. abortus* için antikor aramaya yönelik testlerin başında süt ring testi gelmektedir. Süt sığırcılığı işletmelerinde süt, hayvandan alınmasının daha kolay olması, hayvanda stres yaratmaması ve daha az masraflı olması, tek

bir testin çok sayıda hayvanın test sonuçlarını temsil etmesi (tank süt örnekleri gibi), nedenleri ile serolojik yoklamalarda sık kullanılan bir örnek olarak kabul edilmekte ve bu nedenlerle SRT *Brucella* ile enfekte sığır sürülerinin teşhisinde geniş çaplı olarak yıllardır kullanılmakta olan pratik bir tarama testidir (Alton ve ark., 1988; Ducrotoy ve ark., 2016; Kerkhofs ve ark., 1986). Ancak SRT, özellikle büyük sürülerden alınan tank süt örneklerinde ve erken enfeksiyonların tanısında yeterli duyarlılık gösterememekte, mastitisli, donmuş, doğumdan hemen sonra, laktasyon periyodunun sonuna doğru alınan örneklerde kullanılmamaktadır. Ayrıca mastitisli sütlerde ve kolostrumda yalancı pozitif reaksiyonlar verebilmektedir. Bunun yanında, milk ELISA'nın SRT'den çok daha hassas ve spesifik olduğu bildirilmektedir (Chand ve ark., 2005; OIE, 2009; Sutra ve ark., 1986).

Çalışmamızda bu nedenlerden dolayı, SRT deki dezavantajları taşımayan bir süt ELISA prototipi geliştirildi. Farklı antijenlerin kullanıldığı çok sayıda süt ELISA çalışması bildirilmiştir. Bu çalışmalarda araştırmacılar tüm hücre antijeni, bakterinin LPS tabakası ya da ham LPS gibi farklı antijenler kullanarak farklı duyarlılık ve özgüllükte ELISA formatları geliştirmişlerdir (Thoen ve ark.,1979; Titarelli ve ark., 2011).

Çalışmada antijen olarak *B. abortus* biyotip 3 suşunun ham LPS tabakası antijen olarak kullanıldı. Ham LPS tabakası gerek S-LPS ve gerekse dış membran proteinlerini içerdiği için (Ducrotoy ve ark., 2016) sadece saf LPS tabakasına göre daha fazla hedef epitop taşıyacağı ve dolayısı ile daha duyarlı olacağı düşünüldü. Çalışmada geliştirilen süt ELISA'nın tanısallık duyarlılık ve özgüllüğünü saptamak amacıyla kullanılan referans materyaller kullanılarak yapılan ROC analizi ile testin tanısallık duyarlılık ve özgüllüğü sırası ile %96.15 [%95 (güven eşiğindeki sınırları (%80.36-99.9))] ve %95.65 [%95 (güven eşiğindeki sınırları (%85.16-99.47))] olarak saptandı. Bu değerlere göre eşik değeri (cut-off) %29.3 PP olarak belirlendi (Şekil 1).

Romero ve ark.'nın (1995) geliştirdiği süt ELISA için özgüllüğü %100 ve duyarlılığı %98.2 olarak bulmuşlardır. Biancifiore ve ark. (1996), *Brucella* ari sürüden elde ettikleri süt örnekleri ile yaptıkları süt ELISA'da özgüllüğü %100 ancak RBPT ve KFT'ye göre süt ELISA'nın duyarlılığını sırası ile %65 ve %83 olarak bulmuşlardır. Bizim bulduğumuz özgüllük değerleri bu araştırmacıların biraz düşük olmakla beraber duyarlılık oranımız bu araştırmacıların bulgularına göre oldukça yüksek bulunmuştur. Chand ve ark. (2005) koyunlarda süt-ELISA'nın bruselloz ari sürüdeki özgüllüğü %100 ve enfekte sürülerde duyarlılığı ve pozitif prediktif değeri sırasıyla %96.11 ve %94.28 olarak tespit etmişlerdir.

Bulduğumuz duyarlılık bu araştırmacıların elde ettiği düzeyle benzer bulunmuştur.

Nielsen ve ark. (1996) Şili'deki enfekte sürülerden sağlanan örnekler için %95'lik güven eşiği sınırlarında milk ELISA'nına duyarlılığın %95.2 olduğunu, Arjantin'deki sürülerden sağlanan örnekler için ise, aynı güven sınırı içindeki duyarlılığın %98.7 olduğunu tespit etmişlerdir. Vanzini ve ark. (1998) süt ELISA'nın eşik değerini %36 yüzdeler seropozitivite (PP) seçerek, duyarlılığını %99.6 ve özgüllüğünü % 95.1 olarak bulmuşlar ve indirekt süt ELISA'nın yüksek duyarlılık ve özgüllük gösteren ve aynı anda çok sayıda örnekle çalışma imkânı sağlayan bir test olduğu sonucuna varmışlardır. Titarelli ve ark. (2011) manda sütlerindeki *brucella* antikorlarını saptamak üzere geliştirdikleri süt ELISA'da *B. abortus* biovar 1 in izole edildiği 3 ayrı enfekte sürüden topladıkları 30 pozitif süt örneği ve 100 negatif serum kullanarak geliştirdikleri testin duyarlılığını %100 (CI, %90.8-%100) ve özgüllüğünü %98 (CI, %93-%99.4) olarak saptamışlardır Çalışmamızda elde ettiğimiz duyarlılık ve özgüllük sonuçları bu araştırmacıların sonuçları ile de benzerlik göstermektedir.

Kolostrum ve süt aynı serum gibi enfekte ve aşıllı hayvanlarda Smooth *brucella* spp. ye karşı IgM, IgG ve IgA içermektedir. IgG1 ruminant sütündeki en dominant antikor olup kolostrumdaki toplam antikorun %70-80'ini içermektedir. Bunu sırası ile IgM, IgA ve IgG2 izlemektedir. Sütteki çoğu IgA lokal olarak memede üretilmesine karşın süt ve kolostrumdaki IgG1'in çoğunluğu süte direkt olarak serumdan transfer edilmektedir. Kalan kısmı ise diğer Ig izotopları ile birlikte lokal olarak meme bezinde üretilmektedir (Sutra, 1986). Dolayısıyla süt, serum ve kolostrumdaki antikorların birbirleri ile korelasyon göstereceği kabul edilmektedir. Sığır serumu ve süt arasında antikorların ilişkili seviyelerde olduğunu gösteren çok sayıda yayın bulunmaktadır (Chand, 2005; Ducrotoy ve ark., 2016; Sutra, 1986). Süt örneklerine uygulanan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü serum örneklerine uygulananlarla benzer bulunduğundan, sütçü sığırlarda süt örneklerinin test edilmesi seruma göre daha ekonomik bir alternatif sağlamıştır. Sütteki immunoglobulin konsantrasyonu serum seviyeleri ile korelasyon gösterdiğinden süütün içerdiği antikor seviyesi hayvanın serolojik tablosunu yansıtacaktır (Ducrotoy ve ark., 2016; Kenyon ve Jenness, 1958; OIE, 2009). Bu olaydan yola çıkarak çalışmamızda ikisi enfekte olmayan ve 6'sı enfekte toplam 6 ayrı işletmeden süt ve kan örnekleri alınarak bunlarda SRT, RBPT, süt ve serum ELISA yapılmış ve sonuçlarda yukarıda bahsedilen korelasyon aranmıştır.

Buna göre sadece süt örneği alınan enfekte D çiftliğinde 3 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve

identifiye edildi (%17.6). Milk ELISA için bulunan %29.3 PP eşik değeri dikkate alındı. Sonuçlara göre en fazla pozitif sonuç SRT (%52.9) ile alınırken bunu %41.2 ile süt ELISA izlemiştir. Bu sonuçlar kültürün en az duyarlı ve SRT nin özgüllük ve duyarlılığının düşük olduğunu bildiren literatürlerle uyumludur (Alton ve ark., 1988; Corbel, 1989; OIE, 2009). Enfekte olmayan E çiftliğinde izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuçlar verdi. Sadece %46.6 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Enfekte olmayan bir sürüde süt ELISA'nın hiçbir pozitiflik göstermemesi testin özgüllüğünün yüksek olduğunu göstermektedir. SRT ise çapraz reaksiyonlarda, mastitisli ya da herhangi bir şekilde bozulmuş sütlerde yanlış pozitifleri oldukça sık gösteren bir test olduğundan alınan bu değer normal kabul edilmiştir. Enfekte D çiftliğinden bir hayvan süt ELISA ve SRT ile negatif reaksiyon vermiş ancak bu hayvandan *B. abortus* biyotip 3 izole edilmiştir. Literatürlerde negatif seroloji gösterip kültür pozitif hayvanların nadir olarak görüldüğünden bahsedilmektedir (Corbel, 1989; Ducrotoy ve ark., 2016). Bu nedenle kültür ile serolojinin beraber yürütülmesinin teşhisin güvenilirliğini artıracığı düşünülmüştür (Tablo 1).

Aynı hayvandan hem serum ve hem de süt örnekleri alınan enfekte A, B, C çiftliklerinde toplam 5 adet *B. abortus* biyotip 3 izole ve identifiye edildi (%12.8). En fazla pozitif sonuç SRT ve serum ELISA (%33.3) ile alınırken bunu ve takiben RBPT (%30.8) ve süt ELISA (%28.2) izledi. Alınan sonuçlar yukarıdaki paragrafta açıklanan nedenler ile beklenen sonuçlar olmakla birlikte süt ELISA yüzde pozitifite (%PP) değerlerinin serum ELISA'dan daha düşük çıkması kandaki antikor düzeyinin normalde daha yüksek olmasına bağlanabilir. B ve C çiftliklerine birer hayvanın süt ELISA ile negatif verip serum ELISA ile pozitif vermesinin mantıklı bir izahı olmamasına karşın henüz çok erken bir enfeksiyonun buna neden olabileceği düşünülmüştür. Enfekte olmayan F çiftliğinde olduğu gibi E çiftliğinde de beklediği üzere izolasyon yapılmadı ve tüm serumlar süt ELISA ile negatif sonuç verdi. Sadece %23.5 oranında SRT ile pozitif sonuç alındı. Test işletmelerinden izole edilen toplam 8 *B. abortus* biyotip 3'ün 7 tanesinin izole edildiği hayvanlardan alınan kan ve serumun kullanılan tüm serolojik testlerde pozitif yanıt vermesi, kültürün düşük duyarlılığı yanında son derece spesifik bir test olduğunu da beklediği üzere göstermiştir.

Çalışmanın sonucunda geliştirilmesi hedeflenen duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir süt ELISA prototipi geliştirildi. Bu prototipte konjugat olarak her hayvan türü için spesifik enzimle işaretlenmiş konjugat yerine, antikorlarının Fc bölgesine bağlanan enzimle işaretli A/G proteini kullanıldığından, bu testin ileride diğer türlerde de

kullanılma potansiyeli araştırılacaktır. Geliştirilen bu testin süt sığırcılığı işletmelerinde brusellosiz tanısında ve takibinde non invaziv bir tarzda hastalığın teşhisi kolay ve pratik ve daha ekonomik olarak yapılabilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuçta zoonoz karakterdeki bu hastalığın süt sığırcılığı işletmelerdeki durumu hakkında sağlıklı veriler elde edilmiş olacaktır.

Sonuçta burada sunulan bulgular ışığında sütün mevcut olduğu durumlarda sütte indirekt ELISA'nın hayvanı travmatize etmeksizin brusellozun serolojik teşhisinde kullanılabilecek son derece değerli bir alternatif olduğu kanısına varılmıştır.

### Teşekkür

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 15144 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM, 1988: Bacteriological methods. In: "Techniques the Brucellosis Laboratory". INRA, Paris, France.
- Biancifiori F, Nannini D, Di Matteo A, Belfiore P, 1996: Assesment of an Indirekt ELISA in milk for the diagnosis of ovine brucellosis. *Com Immun Microbiol Infect Dis*, 19(1), 17-24.
- Broker DK, Stinebring WR, Kunkel JR, 1981: BrucELISA: an Enzyme-Antibody Immunoassay for detection of Brucella abortus Antibodies in milk: Correlation with the Brucella Ring Test and with Shedding of Viable Organism. *J Clin Microbiol*, 14(4), 396-403.
- Chand P, Rajpurohit BS, Malhotra AK, Poonia JS, 2005: Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. *Vet Microbiol*, 108(3-4), 305-11.
- Corbel MJ, 1989: Microbiology of the genus Brucella. In "Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects", Ed; Young EJ, Corbel MJ, CRC Press, Inc., Boca Raton, USA
- Ducrotoy MJ, Conde-Alvarez R, Blasco JM, Moriyon I, 2016: A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol and Immunopathol*, 171, 81-102.
- Kenyon AJ, and Jenness R, 1958: Effects of proteins on agglutination of fat globules. *J. Dairy Sci*, 41, 716.
- Kerkhofs P, Botton Y, Thiange P, Dekeyser P, Limet N, 1990: Diagnosis of Bovine Brucellosis by Enzyme Immunoassay of milk. *Vet Microbiol*, 24, 73-80.
- Nicoletti P, 1969: Further evaluation of serologic test procedures used to diagnose brucellosis. *Am J Vet Res*, 30, 1811-1816.
- 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. *VetMicrobiol*, 52(1-2), 165-173.
- OIE, 2009: Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines. Bovine Brucellosis Chapter (2.4.3). Third edition, Office International of Epizooties, Paris, France.
- Romero C, Pardo M, Grillo MS, Diaz R, 1995: Evaluation of PCR and Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples For Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. *J Clin Microbiol* 33, 3.
- Schoonjans F, Zalata A, Depuydt C, Comhaire F, 1995: MedCalc: A new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed*, 48, 257-262
- Sutra L, Caffin JP, Dupray G, 1986: Role of Milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. *Vet Microbiol*, 12, 359-366.
- Titarelli M, Bonfini B, De Massis F, Giovannini A, Scacchia M, 2011: Standardisation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of brucella antibodies in milk from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Italy. *Veterinaria Italiana*, 47(1), 59-64.
- Thoen CO, Pietz DE, Armbrust AL, Harrington R, 1979: Enzyme Immunoassay for Detecting Brucella antibodies in Cow's Milk. *J Clin Microbiol*, 10(2), 222-225.
- Vanzini VR, Aguirre N, Lugaesi CI, de Echaide ST, De Canavesia VG, Guglielmone AA, Marchesino MD, Nielsen K, 1998: Evaluation of an direct ELISA for the diagnosis of the bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentine. *Prev Vet Med*, 36 (3), 211-7.
- Yi EC, Hackett M, 2000: Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram negative bacteria. *Analyst*, 125(4), 651-656.

\*Bu araştırma makalesi, "Sığır brusellozunun teşhisi için sütte indirekt ELISA'nın kullanımının değerlendirilmesi" isimli yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Çalışma için izin belgesi XXX Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

\*\*Yazışma Adresi: Sevil Erdenliğ Gürbilek  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji AD,  
Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: erdenlig@harran.edu.tr