

Türkiyede izole edilen Brucella suşlarının İdantifikasyonları

MESADET DOĞUER

Yetiştirme Hastalıkları
Lâboratuvarı Şefi

Çalışmalara iştirak edenler :

Mütehassis **Nuri Yücel** ve Asistan **Necati Ünlüleblebici**

Ö N S Ö Z

Brucellosis, Brucella namı altında toplanan bir gurup mikrop-
ların insan da dahil olmak üzere, hemen bütün hayvanlarda husu-
le getirdikleri, bulaşıcı ve kronik bir enfeksiyondur.

Brucella cinsine dahil organizmlerin henüz münakaşalı olan bir
ikisi (Br. bronchiseptica ve tularensis) müstesna, üç klasik nev'i
(Br. abortus, melitensis ve suis) olduğu malûmdur. Son seneler için-
de bunlara iki nev'in (Br. ovis ve neotoma) daha ilâve edildiği bil-
dirilmektedir.

Brucella abortusun birinci derecedeki rezervarı sığırlar, Br. me-
litensisin keçi ve koyunlar, Br. suis'in ise domuz'ardır. Bununla be-
raber herbir nev'i Brucella aynı zamanda hem insanlar ve hemen
hemen bütün hayvanlar için patogendir.

İnsan sağlığı ve hayvan yetiştiriciliği bakımından bu hastalık-
la yapılacak mücadelede, seyretmekte olan enfeksiyon âmilinin ti-
pinin tâyini hastalığın filyasyonunu tesbit bakımından lüzumludur.
Serolojik ve bioşimik testlerde göstermiş oldukları çok yakın ben-
zerlik sebebiyle, Brucella cinsine dahil nevilerin idantifikasyonları
bakteriolojide senelerdenberi bir problem teşkil etmekte, bu husus-
ta bir çok denemeler yapılmaktadır. Bugün için bazı standard me-
todlar tesbit edilmiş vaziyettedir. Bilindiği üzere neviler arasında
tam karakteristik evsaf göstermeyen, atipik suşlara da rastlanmak-
tadır. İdantifikasyonda asıl güçlüğü sebep olan bu intermedier tip-
lerin, hastalığın orijini ve intişariyle yakın bir münasebeti olduğu
muhakkaktır.

Türkiye'de çok eskidenberi mevcut ve halen de yaygın bir halde bulunan bu hastalığın eradikasyonunda muvaffak olabilmek için lüzumlu şart ve faktörler arasında, önce memleketimizdeki Brucella tiplerinin tesbiti icap etmektedir. Dr. Erdöl (8)'ün Brucella hakkındaki neşriyatında bir bilgi mevcutsa da Brucella tiplerinin tesbiti hususunda bugüne kadar yapılmış geniş bir araştırmaya rasıyamadık.

Lâboratuvar kayıtlarımıza göre son sene'ler içinde 94 adet Brucella suşu izole etmiş bulunuyoruz. Herhangi bir güçlüğe sebebiyet vermemek için denemelerimize bunlardan 33 adedini, kontrol suşu olarak ta İngiltere'den ve Yeni Zelânda'dan getirttiğimiz 4 suşu dahil etmiş bulunuyoruz. Mesaide, standard metodların tatbikiyle yerli suşlarımızın idantifikasyonlarından elde edilen neticelerden ve literatür bilgisinden bahsedilmiştir.

G İ R İ Ş

Brucella cinsine dahil organizmler, Determinative Bakteriolojide, Eubacteriales'in Parvobacteriaceae Rahn familyasına dahildirler. Bu cinsin hareketsiz olan üç nevi Br. abortus, Br. melitensis ve Br. suis'tir. Hareketli olan ise Br. bronchiseptica'dır. Bacterium tularense, aynı familyanın Pasteurella cinsine dahil edilmiş (2) bazı kitaplarda ise Brucella gurubu içinde Br. suis'den evvel üçüncü organizm olarak mütalâa edilmiştir. (25).

Mcfarland 1952 de koçlarda görülen epeditimitis vakalarından bir organizm izole ettiğini, 1953 de Buddle ve Boyes bu organizmin Brucellanın bir varyetesi olduğunu bildirmişlerdir. Hall 1953 de yine epeditimitis vakalarından ayırdığı organizmlere «Brucella like» Brucella benzeri organizmler demiştir. New Zealand'daki araştırmacılar bu organizmin kültürlerinin zerkiyle koyunlarda sıkıt, koçlarda ise epeditimitis husule getirmişlerdir. 1956 da Buddle bunları Brucella'nın yeni bir nev'i olarak tavsif etmiş ve Br. ovis adını vermiştir. Brucella ovis'in, New Zealand ve Avusturalya'da, koyunlarda sıkıtlara, koçlarda da epeditimitise sebep olduğu ve sperma mayiinde dejenerasyon tevhit ettiği bildirilmektedir (18). Br. ovis'e dahil organizmler, morfolojik ve boyanma karakterleri, kültürel ve bioşimik vasıfları, lâboratuvar hayvanlarına olan patogeniteleri ve tevhit ettikleri hastalıkları bakımından Brucella cinsine dahil nevilere benzemektedirler. Fakat bu nev'e dahil suşlar, ilk izolasyonlarında CO₂ e ihtiyaç gösterirler, boyalara olan hassasiyetleri bakımından Br. suis'e benzerlersede onun gibi alelâde boya konsantrasyonlarında ba-

sic fuksinle inhibe edilmezler ve hidrojen sülfid intişar ettirmezler, ürease aktiviteleri az veya hiç yoktur, Carbomate testinde ise Br. melitensis gibi netice verirler, Non - smooth şekilden başka safhalarda asla müşahade edilmemişlerdir ve diğer Brucella nevelerinin non - smooth (kaba koloni) safhalariyle yakın münasebetleri vardır. Muayene edilen 27 suşun hepsinde üç antijenik faktör tesbit edilmiştir. Buddle, Avusturalya ve Yeni Zelânda suşlarının, diğer brucella nevelerinden farklı ve aynı zamanda stabil karakterde olmaları sebebiyle ayrı bir nev'i olarak mütalâa edilmelerini bildirmiştir (24).

1957 de Stoenner ve Lackman orman sıçanlarından, klasik nevelerden bazı cephelerden farklı karakterde 5 suş izole ederek bunları Br. neotoma (lepida) namı altında bildirmişlerdir. Bu suşlar, morfolojik ve koloni karakterleri, antijenik reaksiyonları, biosimik vasıfları bakımından Brucella'ya benzemekte, bazı şekerlere (glucose, levulose, xlose, arabinose, galactose) orta derecede vurmakta fakat gaz husule getirmemektedirler. Basic fuksin ve tiyoninle inhibe edilirler ve kobaylardan ziyade fareler için patogendirler (23). Cameron ve Meyer (6) Br. neotomanın Brucella gurubuna dahil organizmlere benzediğini teyid etmişler fakat oksidatif metabolizmanın bu tip'erde değişik olduğunu bildirmişlerdir.

Brucella neveleri arasında bugüne kadar bir çok farklar tesbit edilmiş olmakla beraber neveler ve nevelere dahil suşlar arasında da sabit o'mıyan bazı farkların mevcut olduğu yapılan çalışmalarda daima müşahade edilmektedir. Bu karakterler hakkında, yine literatüre istinaden, aşağıda bilgi verilmiştir.

Huddleson (11) Br. melitensisin büyüklük ve şeklinin kültürün eskilik ve yeniliğine aynı zamanda üredığı vasatın terkibine tâbi olduğunu, muayyen bazı melitensis suşlarının devamlı olarak coccoid formda kaldıklarını bazılarının ise basiller şekiller gösterdiklerini, Br. abortusunda bazen coccoid şekilleri olmakla beraber, umumiyetle kısa çubuklar halinde görüldüklerini, Br. suis'in ise basil şeklinde olduğunu bildirmiştir. Br. abortus'un basiller şekline meitensisten daha çok rastlandığını, Br. melitensiste ise coccoid formların daha çok görüldüğü (13), Huddleson'ın brucellanın bir kapsülü bulunduğunu ve bu olmayınca mikrobun patogenitesinin de mevcut olmadığını bildirdiğini, uterus exudatından yapılan preparatlarda Brucella organizmlerinin aglutine olmuş gibi kesif bir kütle halinde görüldüklerini (10), melitensisin abortusa nazaran daha coccal formda olduğu (25), melitensis suşlarının pek çoğunun

predominant olarak coccoid formda, diğerlerinin ise coco - basil şeklinde. abortus'un ise umumiyetle kısa çubuklar halinde olduğu bildirilmektedir (23).

Danimarka porcine suşlarının kültürlerde çok güçlkle ürettiği abortus ve melitensisin orta derecede bir üreme gösterdikleri, Amerikan suis suşlarının ise en kolay çoğaldığı fakat aynı tipin muhtelif suşlarının değişiklik göstermeleri sebebiyle bu vasfın diferansiyasyon için kullanılmadığı (25), ve yine Amerikan suis suşlarının ve Br. abortus'un umumiyetle Br. melitensis ve Danimarka suis suşlarından daha mebzul ürettiği bildirilmiştir (23).

Bilindiği üzere Br. abortus üremek için carbon di oxide ihtiyacıdır. Bu olmazsa çoğalamaz. Br. melitensis hem açıkta hemde CO₂ de üreyebilir. Amerikan ve Danimarka tipi suis suşları CO₂ ye asgarî miktarda tâbidirler. CO₂ ilâve edildiğinde suisin üremesi hızlanmaz hatta onu inhibe bile eder. CO₂ nin bu suşlar üzerinde nasıl bir tesiri olduğu katiyetle bilinmemekteyse de vasatın H - ion konsantrasyonunu değiştirdiği veya hücre cidarından geçerek hücre içindeki H - ion kesafetinde, yahutta oxidation - reduction potansiyelinde bir değişiklik meydana getirdiği ve belkide mikrobun metabolizmasında bir rol oynadığı zannedilmektedir (25). Stab'eforth (24) yeni izole edilen suşların kültür pasajlarına başlamadan evvel CO₂e olan ihtiyacının kontrol edilmesini, aksi halde müteaddit pasajlarda bu gaza olan ihtiyaçlarının kalmıyabileceğini, H₂S testlerinin de ilk pasajlarda tatbikini ve her denemede bilinmiyen suşlarla birlikte standard suşlarında kontrol maksadiyle, tecrübelerine dahil edimesini tavsiye etmektedir.

Bilindiği üzere, Brucella gurubu mikroplar kanlı agarda hemoliz meydana getirmemektedirler. Bununla beraber Br. melitensisin hemolitik karakterde bazı suşları olduğu bildirilmektedir (25).

Üç nevi Brucellanın antijenik yapıları birbirlerine yakındır. Bu üç tip de iki antijeni (M ve A) havidir. Böyle olmakla beraber M antijeni melitensisinde A antijeni ise Br. abortusda fazladır. Wundt, A ve M antijenlerinin, tipik ve intermedier Brucella suşlarındaki nisbetlerini kantitatif olarak tesbit ve mukayese ettiğini, bu iki antijenin miktarı olarak münasebetlerinin tip hususiyeti olarak göründüğünü bildirmiş, elde edilen buluşların, suşların serolojikman tiplendirilmesindeki ve mono - spesifik teşhis serumlarının istihsalindeki önemini belirtmiştir. Brucella nevlerinin antijenik yapıları, agglutinin - absorpsion testleri ve spesifik serumların hazırlanması hususunda bugüne kadar pek çok çalışmalar yapılmış ve neti-

cede mono - spesifik serum testleri, differansiasyonda en önemli bir tefrik metodu olarak kabul edilmiş bulunmaktadır.

Brucella gurubu mikropların exotoksinleri yoktur. Fakat virulan Br. abortus kültüründen farelere intraperitonal olarak verildiğinde bir iki gün içinde hayvanları öldürdüğü ve 56 cantigrad derecede 20 dakikada ısıtılmakla toxinin harap olduğu bildirilmektedir (25).

Tip tâyininde en mühim hususlardan biri de suşların smooth safhada olmalarıdır. Bu hususta da yapılmış pek çok mesai olmakla beraber en pratik olanı acriflavin testidir. Bendtsen (1) suşların idantifikasyonu üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, Pampananın usulünün modifiye edilmiş şeklini bildirmektedir. 0.1 cc. Brucella suspansiyonunu, 1 cc. % 1 lik euflavin veya acriflavin solusyonu ile karıştırılıp 37 derecede 5 saat müddetle inkubasyona terkettikten sonra agglutinationdaki gibi bir çöküntü husule gelirse kültürün Rough şekline döndüğünü ve idantifikasyon testlerinde yanlış netice vereceğinden bu gibi suşların kullanılmamasını bildirmiştir.

Topley ve Wilson (25) tuzl usudaki kültür suspansiyonlarının 2 saat kaynatılmasıyla (thermo - agglutination testi) ve 1/500 veya 1/1000 lik acriflavin solusyonlarında 37 derecede inkubasyona bırakmakla dissosiye olmuş kolonilerin tefrikinin yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Glucosa vurma testiyle Brucella suşlarının tefriki ilk defa Mc. Alpine ve Slametz tarafından tatbik edildiği, sığır orijinli suşların glycozu % 4 den daha az, insan ve domuz orijinli olanları ise, melitensis gibi % 4 - 1 arasında vürdugu, sonradan bu testin bir çok araştırmacılar tarafından tecrübe edildiği bildirilmiştir (11).

H₂S testleri hakkında ilk ve geniş bilgi Huddleson tarafından verilmiştir. Br. abortus ve Br. suis suşları vasatlarda bolca H₂S husule getirdikleri halde, melitensis ve para melitensisin az veya hiç husule getirmedikleri bildirilmiştir. Huddleson'nın metodu : Acetate de plombun sıcak distile suda % 10 mahlûlü hazırlanıp iyi cins süzgeç kâğıdına emdirilir, kurutulur, ufak şeritler halinde kesilir, ağzı kapalı steril şişeler içinde muhafaza edilir. Dana karaciğeri enfüzyonundan hazırlanan yatık jelozu havi tüplere muayenesi yapılacak suş'lar ekilir ve pamukla tüp arasına bu ufak şeritlerden bir adet konup 24 saat etüvde üremeğe terk edilir. Ertesi gün şerit çıkarılıp numaralanır ve tekrar yeni bir kâğıt konur, bu işe dört gün

müddetle devam edilir, bu müddet hitamında dört kâğıdın ucunda husule gelmiş olan siyahlanma tesbit edilir, suş dört gün müddetle H₂S intişar ettirmişse Br. suis (Amerikan), 2 gün karartmışsa Br. Abortus hiç karartmamışsa veya pek az bir şey varsa Br. melitensis gurubuna dahil edilir (11). Stableforth (24) H₂S produksiyonunun hem kontrol edilen suşa hemde vasatın ihtiva ettiği sülfürün miktarına ve cinsine tâbi olduğunu bildirmiştir. H₂S produksiyonunun meydana gelişi vasatın ihtiva ettiği sülfür mürekkebatının cinsine ve vasattaki miktarına bağlı olduğundan kullanılan vasatın ve tatbik edilecek metodun ehemmiyeti olduğu, bu maksatla karaciğerli ve patatesli agarın en iyi bulunduğu, 48 saatlik genç kültürlerden yatık jelozun üzerine mikrobun bolca yaydırılmasını % 10 luk acetate de plomb'a emdirilmiş kâğıtların kullanılmasını, bu kâğıtların ıslak olmamasını, siyahlanmanın her gün kontrol edilmesini eğer kararına mevcutsa tüplere her gün yeni bir kâğıdın yerleştirilmesini, melitensis'in hiç veya pek az, abortusun orta derecede olmak üzere iki veya daha fazla gün, Danimarka varyetesi müstesna suis suşlarının ise umumiyetle dört veya beş gün müddetle kâğıtları siyahlandırdıkları bildirilmiştir (27). H₂S husule getirme vasfı, bu üç tipin tefrikinde en önemli kriter olduğu, yeni izole edilmiş Br. abortus ve Amerikan suis suşlarının dört gün müddetle H₂S intişar ettirdikleri, halbuki Br. melitensis suşlarının ilk 24 saat içinde ya pek az veyahutta hiç vermedikleri, Danimarka (Thomsen) suis suşlarının hiç H₂S husule getirmediği bildirilmiştir (25).

Zobell ve Meyer'in Brucellanın nitrat ve nitrit reduksiyonu üzerinde yaptıkları tecrübelerden tatminkâr neticeler aldıkları (11), Brucella nev'ine ait yıkanmış organizmleri glutamic acitle inkubasyona bıraktıklarında Br. abortusla, melitensisin buna vurdukları, suisin ise vurmadığı metabolizma neticelerinin chromatography ile tesbit edildiği, diğer organizmlere nazaran Brucella cinsine dahil mikropların nisbeten yüksek konsantrasyonda urease anzimine malik oldukları (4), brucella cinsine dahil nevilerin tefriki için qualitatif nitrat reduksiyonu ve nitrit toxicite testleri üzerinde yapılan bir araştırmada her üç nev'i Brucellanın da nitrat ve nitritleri irca ettiği fakat reduksiyon nisbetinde mühim farklar olduğu, alınacak neticelerin sadece nevilere bağlı olmadığı, test vasatındaki reduktand maddenin kesafet ve tabiatına aynı zamanda ekilen mikrop miktarına ve inkubasyon müddetine de tâbi olduğu (20), üç nev'in metabolik aktiviteleri üzerinde yapılan bir başka denemede Br. suisin oksidatif ve sentetik kabiliyeti bakımından diğer iki neviden ehemmiyetli surette farklı olduğu, Br. abortusla melitensis ara-

sında ise bu bakımlardan daha az fark bulunduğu, yine bu cins dahil organizmlerin anzim farkları dolayısıyla Br. suisin glutamik aside vurmadığı bildirilmiştir (5).

Katalase teşekkülünün Br. suisle en kuvvetli, Br. abortusla en zayıf olduğu (25), Br. suisin peroxidase reaksiyonu ile tefriki için yapılan çalışmada 1 ml. standardize edilmiş Br. suis suspansiyonuna % 5 lik pyrogallol solusyonundan 0.25 ml. ilâve edilmesiyle husule gelen siyahlanma ve köpürmenin positif reaksiyon olarak kabul edildiği, suisden başka 48 adet Brucella suşunda böyle bir reaksiyonun husule gelmediği bildirilmiştir (9).

Stableforth (24), Renouxnun 1952 de bildirmiş olduğu Carbo-mate (D.E.D.T.C.) testinin çok enteresan olduğunu fakat Brucella nevelerinin tefrikinde kullanılan klasik metodlar arasına henüz dahil edilemeyeceğini bildirmiştir.

Huddleson, Brucella cinsine dahil üç nev'in klasifikasyonunda en kıymetli tefrik metodunun boyalarda üremeleri esasına dayandığını, thionin ve basich fuchsinin differansiyal tesiriyle suşların idantifiye edilebileceklerini, bu testlerde tryptosolu agar kullandığını ve boyaların % 1 lik stock solusyonlarını iki ayda bir defa taze olarak hazırlandığını her iki boya için nihai konsantrasyonun 1/100000 olduğunu, boya solusyonlarının 20 dakika kadar Benmari şeklinde kaynatıldığını ve sıcakken iyice çalkalandıktan sonra erimiş agara ilâve edildiğini, 48 veya 72 saatlik taze kültürlerden yapılan kesif suspansiyonlardan (steril buyyon veya tuzlu su içinde hazırlanmış) bir öze kadar alınarak Petrilere ekildiğini eğer mikrop çok kesif bir halde vasata sürülmüşse veya iyice yaydırılmamışsa kesif kısımlarda az da olsa bir üremenin müşahede edilebileceğini, 72 saat etüvde bırakıldıktan sonra muayene edilen Petrilerde: Br. abortus'un thioninli, Br. suisin fuchsinli vasatlarda üremediğini, Br. melitensisin ise ilk ikisine nazaran daha az olmak üzere her iki boyalı vasatda da ürediğini bildirmiştir (11). Bendtsen (1) 1952 de, Picket ve lâboratuvar arkadaşlarının, bakterilerin antibiotiklere karşı resistanslarını tâyinde kullanılan metodda olduğu gibi, Brucellanın tiplendirilmesinde de kullanmış oldukları boyalı tabletleri lâboratuvarının rutin testeri arasında tatbik etmektedir. Beher tablet 9 mm. kutrunda ve 1 mm. kalınlıktadır. Hepsinin renkleri değişiktir ve vasatın içine nüfuz ettikten sonra da renklerini muhafaza etmektedirler. Denemelerinde 5 cins tablet kullanmaktadır. Basich fuchsin ve thionin tabletlerinin her biri 2 mg. boya ihtiva etmektedir. Methyle viole 2 B (0.5 mg.), Pyronin B (0.25 mg.), sodium di-

ethylthiocarbamate NDDTC tabletlerinin her biri (1 mg.) NDDTC ihtiva eder. 0.1 ml. Brucella suspansiyonu (Tahminen 1 cc. suspansiyon 10^{10} Brucella bakterisi ihtiva eder) Petrinin merkezi kısmına damlatılır ve oradan bütün agarın sathına dikkatlice yayılır. Bu yayış nekadar mütecanis olursa tabletin etrafında husule gelen inhibisyon halkası da (Zone) o derece muntazam olmaktadır. Tablet bir pensle tutularak kültür yaydırılmış olan petrinin merkezine yerleştirildikten sonra petri 37 dereceli santigradda 3 - 5 gün inkubasyona bırakılır. Bu müddetin hitamında, tabletlerin etrafında husule gelen mikropsuz sahanın kutru ölçülür ve milimetre olarak kaydedilir. Bendsen, bu denemesinde dört karakteristik Brucella suşu ile birlikte, Danimarkada yabancı tavşanlardan izole edilen Br. suis Thomsen tipi suşları tecrübeye dahil etmiştir. Tavşan orijinli olan bu suşların ilk generasyonda aerobik olarak ürediklerini, üreaz aktivitelerinin mevcut olduğunu fakat H_2S husule getirmediğini ve bu sebepten Br. suis Thomsen tipine ait olduklarını ve bu denemelerden alınan neticelere göre Brucella organizmleri için Albimi agarın, Tryptose agardan daha iyi olduğunu bildirmiştir. Brucella melitensisin thioninde, basich fuchsinde, methyle violede ve pyroninde ürediği, Br. abortus'un thioninde üremeyip diğer üç boyalı vasatda ürediği, Br. suis'in ise thioninde üreyip methyle vilole, fuchsine ve pironinde üremediği, bütün bu hususiyetlerin üç Brucella tipinin umumî karakterleri olduğu, aynı tipin muhtelif suşlarının bu bakımdan bazı değişiklikler gösterdikleri, melitensisin bazı suşlarının thionin, methyle viole ve pyronin platlarında çok zayıf ürediği Br. abortusun Southern Rhodesia suşlarının diğer menşeli Br. abortus suşlarından thionine karşı daha fazla mukavim oldukları, Danimarka orijinli olanların ise bütün boyalara karşı Amerikan suis suşlarından daha hassas buldukları bildirilmiştir (25). Jones (15), thionin erimesindeki güçlük bakımından, solusyonları hazırlanırken önce birkaç mililitre kadar alkolde veya sıcak suda eritilmesini tavsiye etmekte ve 1948 de Cruickshank'ın 1/600 nisbetinde thionin, 1/200 nisbetinde de basich fuchsine solusyonlarına emdirilmiş süzgeç kâğıtlarından hazırlanan şeritleri karaciğerli agarı havi platlara koyarak, 1952 de Picket'in Albimi agarda boya tabletleri kullanarak inhibisyon denemeleri yaptıklarını bildirmiştir. Meyer ve Cameron (16) suşların tefriki için yapmış oldukları geniş bir çalışmada thionin ve basich fuchsine iki çeşit konsantrasyonunu kullanmışlar Br. Suis'e dahil bütün suşlar, Brucella cinsine dahil diğer nevilere nazaran beş misli kesif boyalı vasatlarda üremişlerdir. Br. abortus suşlarının thionin de ürememeleri tabii ise de melitensis suşları her iki miktarda boyayı havi vasatlarda da ürememiştir.

Bundan başka, nevilere ve bu nevilere dahil tiplerin amino acide ve carbon hidratlardaki (L- arginine, L- asparagine, DL- citrulline, L- glutamine acid, L- Lysine, DL- Ornithine, L- arabinose, D- galactose, D- ribose) oksidatif metabolizmaları üzerinde de çalışarak ellerindeki suşları guruplandırmışlardır : Birinci gurup abortus tipine 544 No. lu abortus ile S. 19 suşları dahildir. Bu iki suş boyalarda üreme ve metabolizmaları dolayısıyla bu nevin karakteristik tipleri sayılmaktadır. Bu guruba dahil suşlar fuchsini az olan vasatlarda üremişler ve ++ lik kadar da H₂S husule getirmişlerdir. Br. abortusun ikinci gurubuna iki suş girmiştir, bu iki değişik karakterdeki abortus suşları, ne thioninde ne de fuchsinde üremiş fakat ++ lik kadar H₂S vermişlerdir. Fakat amino acide ve carbon hidratlara olan metabolik karakterleri birinci guruba dahil abortus suşlarına benzemektedir. Üçüncü tip abortus suşlarına 7 suş dahi edilmiştir. Bunlar thionin ve fuchsini az vasatlarda üretmişlerse de ikinci yani daha fazla boyayı havi vasatlarda ürememişlerdir. H₂S produksiyonları da karışıktır. Suşların bir kısmı vermiş bir kısmı ise hiç vermemiştir. Bu gurubtaki suşların metabolik karakterleri de ilk iki gurubtan biraz farklıdır. Altı Br. melitensis suşu ise bir ve ikinci gurub abortus tipleri ile, suis suşlarından farklı iselerde, boyalarda üreme hususiyetleri sebebiyle, abortus suşlarının üçüncü tiplerine benzemektedirler ve hiç H₂S vermemişlerdir. Bununla beraber bu iki gurubun metabolik karakterleri de birbirlerine müşabihtir. Metabolik farklar göstermeleri sebebiyle suis suşlarını da üç grupta toplamışlardır. Bu suşların hepsi bütün abortus tiplerinden (I, II, III) ve hem de melitensis suşlarından her bakımdan farklıdır! ar. Bundan başka iki adet suşuda diğer bütün suşlardan çok farklı evsafda bulduklarından bu üç klâsik neviden hiçbirine dahil edememişlerdir. Br. neotomae diye ayrı bir gurup olarak mütalâa edilmiş olan bu iki suş, iki boyada da hiç ürememiş ve birinci gurub abortuslar gibi ++++ lik H₂S vermişlerdir. Buna mukabil amino asit metabolizmasında gösterdikleri karakter ise, abortus ve melitensise benzemekte suise ise hiç benzememektedir. Carbonhidrat metabolizmasındaki karakterleri ise suis'e benzemektedir. Bütün bu denemelerden anlaşılmuştur ki, Brucella cinsine dahil organizmler bariz bir şekilde homojendirler, nevilere biolojik vasıfları birbirlerine çok yakındır ve bu sebepten bunları birbirlerinden kat'i olarak ayıracak metodlar bulmak için bugüne kadar araştırmacılar çeşitli mesailer yapmak zorunda kalmışlardır denilmektedir. Stableforth (24), boya inhibisyon testlerinde, optimum boya konsantrasyonunun kullanılan vasatın ve boyanın cinsine bağlı olduğunu, kontrol edilecek kültürün boyalı vasatlardan alınmamasının

ıcap ettiğini, thionin ve basic fuchsinin bu iş için en uygun boyalar olduğunu bildirmiştir. Janus green (1 : 80000) ve Erythromycin (15 mikrogram/ml.) de üreme kabiliyetlerine göre 1086 adet smooth evsafta Brucella suşunun dört guruba ayrıldığı fakat bu klâsifikasyon metodundan alınan neticelerin thionin - basic fuchsin testlerinde alınan neticelere uymadığı ve her iki metodun da subjektif olduğu bildirilmiştir (22).

1936 da Pünschel difteri basillerinin tefriki için ürease aktivitesine dayanan bir metod bulmuştur. 1949 da da BAUER bu metoda benzeyen bir metodu Brucella organizmlerinin tefrikinden kullanmıştır. Bauer'in yapmış olduğu bu tecrübe sonra Hoyer tarafından tamamlanmıştır. Bendtsen (1) 1954 de Brucella tiplerinin tefriki maksadiyle yaptığı bir çalışmada Bauer ve Hoyer vasat ve metodunun biraz modifiye edilmiş şeklini kullanmıştır. Bauer vasatı : 1/8 molar sodium fosfat solusyonunda ürea % 5 nisbetinde eritilir. n/1 hydrochloric acide ile vasat PH = 4.0 a ayarlanır ve endikatör olarak % 0.0015 nisbetinde phenol ret ilâve edilir. Vasat 1 cc. miktarında ufak tüplere tevzi edilir. Bir suş için üç tüp kullanılır. Brucella suspansiyonundan bu tüplere 0.1, 0.3, 0.5 cc miktarında ilâve edilir ve etüve kaldırılır, 15 - 30 dakika fasıla'arla kontrol edilir. Bu reaksiyon sadece Brucellanın tipine tâbi olmayıp aynı zamanda vasata ilâve edilen germ miktarına bağlı olduğundan bakteri suspansiyonlarını üç muhtelif miktar'arda denemiştir. Brucellanın bütün tiplerinin nitratları nitrite çevirdikleri, Suis'in üreyi, abortustan daha kuvvetli hidrolize ettiği, bazı melitensis suşları abortus suşları gibi üreyi yavaş hidrolize ederse de üreaz aktivitesi bakımından melitensis'in, suis'e yaklaşmakta o'duğu bildirilmiştir (25). Jones (15) hemen bütün Brucella suşlarının ürease aktivitelerinin mevcut olduğunu, sadece nevilleler arasında üreden amonyak teşkil etme nisbetinin ehemmiyetli surette farklı olduğunu, Br. suis'in en çabuk bir kaç dakika içinde vasatı pembeleştirdiğini, Br. abortus'un ise daha yavaş aktivitede olduğunu, Br. melitensis suşlarının bu test de çeşitli neticeler verdiğini bildirmiş ve yazısında Christensen'in ve Bauer'in vasatlarından geniş bilgi vermiştir. Phenol red endikatörü kullanarak 36 adet smooth evsafta suşun ürease aktivitesi üzerinde çalıştığını, diğer araştırmacıların almış oldukları sonuçlara uygun neticeler elde edildiği ve Danimarka suis'ine dahil suşların aktivitelerinin Amerikan suis'inin aktivitesinden daha az bulunduğunu bildirmiştir (9). Stableforth (24), ürease testinden alınacak neticelerin, kullanılan metoda bağlı olduğunu, bu test'in kıymetinin daah ziyade Br. abortus ve suisin tefriki bakımından bir kıymeti olacağını,

Melitensisin bu testde çok çeşitli neticeler verdiğini, bu gibi deneylerde daima kontrol suşlarının da tecrübelerine dahil edilmesini, standard suşların Weybridge enstitüsünden istenmesini bildirmiştir.

Parnas ve arkadaşları 1958 de *Brucella abortus*'un eski kültürlerinden 14 adet *Brucella* bakteriofajı elde etmiş ve bunların 1956 da Rusya'da gübreden ayrılan orijinal *Brucella* fajlarıyla mukayeselerini yapmıştır. Fajlar yuvarlak, 60 - 80 milimikron kadar, elementer cisimciklerdir. *Br. abortus* kültürleri fajlarla eridiği halde, *Br. suis*, *Br. melitensis* ve Atipik *Br. abortus* kültürleri lize olmamaktadır. Bu müşahedeler diğer araştırmacılar (Stinebring ve Brown 1959) (van Drimmelen 1959) tarafından da teyit edilmiştir. İngiltere Weybridge Enstitüsünden Dr. Morgan Phagelarla yaptığı bir çalışmada, serumlu dextrose agarda 24 - 36 saat üremiş olan *Brucella* kültürlerinin bafırlı tuzlu suda suspansiyonunu yaptıktan sonra bunlardan birer öze, sathı iyice kurutulmuş serumlu dextrose agarı havi petrilere ektikten sonra phage'in 10^{-3} dilisyonundan 0.02 ml. olmak üzere kültürün üzerine damlattığını ve 24 - 48 saat inkubasyonda bıraktıktan sonra neticelerin okunduğunu, Wilson 2 tipide dahil *suis* kültürlerinin dört tanesinden maada bütün *Brucella abortus* kültürlerinin eridiğini, üzerinde çalışılan 33 *Brucella melitensis* kültüründen 24 adedinin fage preparationu ile lize olduğunu, bu *melitensis* suşlarının Büyük Britanya'da ve ekserisinin de sığır sütlerinden izole edildiğini bildirmiştir. Diğer bir denemede fage preparationunun 544 No. lu *Brucella abortus* ve Büyük Britanyada izole edilmiş olan *Br. melitensis* H suşlarıyla titre edildiğini, hülâsa olarak bütün *Br. abortus* suşlarının ve bütün British *Br. melitensis* suşlarının phage solusyonuyla lize edildiğini, fakat ne klâsik evsiftaki Akdeniz *Brucella melitensis* nede Amerikan *Brucella* suşlarını eritemediğini, elektron mikroskopta, 250.000 defa büyütülmede phage'in altı köşeli (hexagonal) bir başa ve 65 m. u kütürde 14 m.u. uzunlukta kısa bir kuyruğa sahip olduğunu bildirmiştir (17).

Brucellaların bütün varyetlerinin, ufak lâboratuvar hayvanları ve maymunlar için patogen ve kobaylarında içlerinde en hasas lâboratuvar hayvanı olduklarını, *Br. melitensis* ve Amerikan *suis* tiplerinin, *Br. abortus* ve *suis*'in Danimarka varyetesinden daha fazla virulan bulunduğu bildirilmiştir (23). Her üç *Brucella* organizmalarının lâboratuvar hayvanları için çeşitli derecede patogen ve kobaylarında en hasas oldukları ve rough yani paramelitensis, para *abortus* ve para *suis*'in kobaylar için avirulan bulunduğu (25), *Br. melitensis*in, *Br. suis* gibi kobaylar için *Br. abortus*dan daha pato-

gen olduğu bazıları arasında bu farkları nevirin tefrikin de kullandıkları bildirilmiştir (13).

Br. melitensis gibi Amerikan suis tipinin de inekleri enfekte edebildiği ve sütle mikropların itrah edildiği, tabii şartlar altında melitensisin keçi ve koyunlar için patogen olduğu, sıkıta müterafık akut bir hastalık tevlit ederse de ekseriya cronik seyrettiği ve ancak süt, kan ve idrarın bakteriyolojik muayenesiyle meydana çıkarıldığı veyahutta deri testleriyle anlaşıldığı, keçi ve koyunların çok enfekte olduğu mıntika ve ahırlarda ineklerin de enfekte olabilecekleri, sıkıtlar görülmesede sütleriyle ekseri mikrop saçtıkları (25), Brucellanın muhtelif hayvan nevirine olan patogenitelerine göre klasifiye edilebilecekleri, Br. melitensisle tabii olarak enfekte olmuş bir inekten elde edilen sütle beslenen iki gebe keçiden birinin sıkıt yaptığı, fakat her ikisinin iç organlarından Br. melitensis üretildiği, başka gebe keçinin ise abortus organizmlerini ihtiva eden inek sütü ile beslendiği halde enfekte olamadığı sığırlardan izole edilen ve melitensisin biosimik, serolojik hususiyet'lerine sahip Brucella şuşlarının keçiler için patogen olduğu bildirilmiştir (3).

Br. suis'in sebep olduğu enfeksiyonlara her yaştaki domuzların hassas olduğu halde, buzağuların abortus'a yüksek derecede mukavim oldukları keza ineklerde, sıkıtlar umumiyetle gebeliğin 5 - 7 nci ayları arasında vukua geldiği halde domuzlarda gebeliğin ilk safhasında olduğu, abortusun sığırlarda tevlit ettiği uterus enfeksiyonunda, üç hafta kadar sonra genital organlardan mikrop izolasyonu nadir olduğu halde domuzlarda uterus enfeksiyon'larının uzun zaman devam ettiği (13), Br. suis'in her iki varyetesinin de domuzlar için patogenik olduğu ve bazen sıkıtlar da tevlit ettiği bildirilmiştir (25).

Her üç tip, insanlar için patogensede bugüne kadarki müşahedelere göre melitensis'in insanlar için diğer'lerine nazaran en fazla, Amerikan suis tipinin orta derecede, Br. abortus tipinin ise en az patogen bulunduğu, Danimarka suis tipinin abortusdan daha az patojenitede olduğu ve henüz insanlarda hastalık yaptığına dair bir kayda tesadüf edilmediği, Br. abortus'un atları, köpekleri daha ender olmak üzerede koyun ve keçileri enfekte ettiği, Amerikada bu tipler kuşlarında çok enfekte buldukları bildirilmiştir (25).

Brucella şuşlarının izole edildikleri hayvan nevine göre melitensis, abortus, suis diye klasifiye edilebilecekleri fikri ileri sürülmekte, keçi, koyun, sığır ve insanlardan yeni izole edilmiş olan şuşların hususiyetleri mukayese edildiğinde, insanlardan ayrılanların tipik olmamakla beraber meliteisise, koyun ve keçilerden ayrılanların

abortus'a benzedikleri bildirilmiştir (7). Meyer ve Zobell'in 444 Brucella kültürününün bioşimik karakteri üzerinde yapmış oldukları bir araştırma neticesinde, suis'in, abortusla melitensis arasında değişen, bazen birine bazen de diğerine benzeyen bir karaktere sahip, transitional bir tip olduğu neticesine varmışlardır (16). Domuz Brucellosisi üzerinde yapılmış olan mesailerden çıkan neticelere göre Br. suis'in melitensis ve abortusdan neşet ettiğinin muhtemel olduğu fikri ileri sürülmektedir (12). Literatüre istinaden, Brucella nevelerinin ne lâboratuvarlarda yapılacak patogenite testlerine ne de tevlit ettikleri enfeksiyonlara ve izole edildikleri hayvan nevelerine göre klasifiye edilemeyecekleri, nevelerin hangi ana tipten çıktığı meselesinin de tefrikde yardımcı olamayacağı bildirilmektedir.

Bu güne kadar yapılan neşriyatdan anlaşıldığına göre bir nev'e dahil suşlar arasında da bazı değişik hususiyetler mevcuttur. Buna biraz da suşların dünya yüzünde muhtelif mıntikalara yayılış'arı sebep gösterilmektedir. Meselâ Malta adasından ayrılmış olan melitensis suşu, Fransa'nın cenubunda nayrılan melitensis suşundan keza Danimarka'da tesbit edilen suisi suşu, Amerika suis'inden farklı bulunmuştur.

Stableforth (24). Br. abortus'un bütün memleketlerde, Br. melitensis'in Akdeniz memleketlerinde, Lâtin Amerika ve Amerika Birleşik Devletlerinin ve Rusya'nın cenubunda, Orta şarkın bazı memleketlerinde keçilerde, yine Rusya'nın muayyen bazı muntakalarında, merkezî Avrupa'da tesbit edildiğini, Cenubî Amerika'da koyunlarda bulunamamış olmasına mukabil keçilerde mevcut olduğunu, bazı Akdeniz memleketlerinde, U.S.A.'nın bazı eyâletlerinde sığırlarda ve yine U.S.A.'nın bazı kısımlarında domuzlardan da Br. melitensis izole edildiğini, Br. suis'in Lâtin Amerika'da, U.S.A. da ve bazı Avrupa devletlerinde tesbit edildiğini, Avrupa'da Br. suis'e yabancı tavşan'arın rezervar olduğu tahmin edildiğini bildirmiştir.

Suşlar üzerinde yapılan çalışmalardan bugüne kadar pek çok çeşitli tipler meydana çıkarıldığı malûmdur. Bir kısım suşlar klâsik nevelerin hususiyetlerinden; meselâ birinin serolojik karakterine benzerken diğerinin bioşimik karakterine benzemektedir: Abortus'un bioşimik ve kültürel karakterine benzeyen suşlar, melitensis'in serolojik karakterine sahiptirler. Bir başka memleketde de melitensisin bioşimik karakterinde ve abortusun serolojik karakterinde suşlar elde edilmiştir. Renoux, bu ikincilere Br. intermedia demiştir. Bunlar Fransada, İtalya'da, Tunus'da bulunmuştur. Birinciler

ise Plestin, Büyük Britanya, Hindistan, Fransa ve U.S.A. da elde edilmiştir. Keza Japonya'da bütün boyalara karşı hassas olupda diğer bakımlardan Br. abortus'a benzeyen suşlar tesbit edilmiş, bunlara Br. abortus type 2 (Wilson) denmiştir. Huddleson ve White'ın 1954 deki teklifleriyle thionine karşı resistan olupta CO₂ sis üreyen abortus suşlarında bulunmuş, Huddleson bunlara Br. abortus (Van den schaaf) denmesini teklif etmiştir. Diğer taraftan melitensis gibi olup da ehemmiyetli miktarda H₂S intişar ettiren ve ilk izolasyonlarında CO₂ de ihtiyaç gösteren suşlarda mevcuttur. Keza abortus'a benzeyipte izolasyon için CO₂ e ihtiyaç göstermemiş suşlarda Fransa'da bulunmuştur. Ender olarak her iki abortus ve melitensis monospesifik serumlarıyla reaksiyon veren suşlar da vardır. Bazı araştırmacılar Brucella gurubunu Br. Brucei, thomseni, Lizbonnei, intermedia, Wilsonii, Br. ovis, Br. tularensis diye nevilere bölmüşlerdir. Br. brucei'nin, melitensis, abortus, Amerikan tipi suis varyetleridir. Thomseni Danimarka tipi suistir, yazar İngiltere'de ayrılan melitensis suşlarının biosimik ve serolojik karakterlerinin tipik melitensis karakterinde olmalarına rağmen insanlar için patojen olmadıklarını, hasta hayvanlardan elde edilen sütün çığ olarak içilmesi halinde bile enfeksiyonun meydana gelmediğini, keza Danimarka suisinin de merkezi Avrupa'da ve Bulgaristan'da insanlar için patojen olmadığını bildirmiştir (24). Pickette ve arkadaşları (19) yapmış oldukları bir mesaide, Amerika, Afrika, Asya ve Avrupa'da insan ve hayvanlardan izole edilmiş suşların Acriflavin testlerinden sonra smooth safhada bulunan 232 suşun boylara (thionin, B. fuchsin, pyroin, crystal viole, azur A, ve safranin O) olan hassasiyetleri, ürease aktiviteleri, H₂S produksiyonları, Carbomate tablerlerine olan hassasiyetleri bakımından kontrolleri yapıldığında : 214 suş'un malûm üç nevi Brucella grubunda topladıklarını, 5 suş hem boyalara hemde carbomat'a çok hassas bulduğundan bunların idantifikasyonları için serolejik muayeneye ihtiyaç hasıl olduğunu, 3 suşun boyalara hassasiyetleri ve biosimik testlerde melitensis'e benzedikleri halde serolojik olarak abortus gibi reaksiyon verdiklerini, bazı nadir istisnalarıyla, carbomate ve ürease testlerinin Brucella suşlarının idantifikasyonları için elverişli olduğunu Azur ve safraninin de boya testlerine ilâvesini faydalı bulduklarını bildirmişlerdir. Renoux (21), antijenik yapıları, metabalik ihtiyaçları, ve kimyevi terkipleri bakımından halen kabul edilmiş vaziyette olan Brucella nevileri arasında kalitatif farklar bulmanın bugün için mümkün olmaması, herhangi bir Brucella nevine dahil organizmlerin, hassas olan herhangi bir hayvanı enfekte edebilmesi, monospesifik serum testlerinden alınan neti-

ce'lerin bioşimik testlere her zaman tetabuk etmemesi, Brucella organizmlerinin çabuk karakter değişiklikleri göstermeleri ve bunların basit mutasyonel değişikliklerden ibaret olması, umumiyetle kabul edilmiş olan testlerin 64 farklı idantifikasyon numunesine malik olması, suşlarda kendiliğinden (spontaneous) bazı değişikliklerin de müşahade edilmesi bazı suşların hakikatte müşabih karakterde oldukları halde laboratuvarlara ve yazarın şahsi düşüncesine göre farklı isimlerde tesmiye edilmeleri neticesinde pratik ve ilmî bakımlardan enteresan bir tarafları olmayan pek çok adette Brucella nevilerinin meydana gelmesi sebebiyle Brucella organizmlerinin klasifikasyonunda karışıklığı önlemek maksadıyla ilk tasnifde (Evans, Meyer) olduğu gibi daha açık ve basit bir tasnifi teklif etmekte ve neticede bütün Brucella nevilerini sadece bir nev'in biotipleri olarak bildirmekte, suşların Huddleson'un bioşimik testleriyle ve monospesifik serumlarla idantifiye edilmelerini ve herhangi yeni bulunmuş olan bir testin bu testlerle dikkatli olarak mukayese edilmesini, ve bu esasa göre Brucella cinsine (Meyer ve Swaw) sadece bir nevin, Br. melitensisin dahil edilmesini, farklı karakterde olan her suşun bir varyeteden ibaret olacağını bildirmektedir.

D E N E Y L E R İ M İ Z M A T E R Y A L

DENEMEYE DAHİL EDİLEN SUŞLAR. Laboratuvarımızın resmi kayıtlarına göre son seneler içinde, muhtelif hara, İnekhane, Devlet üretme çiftlikleri ve Veteriner müdürlüklerinden gönderilen sığır, koyun, manda ve keçilere ait cenin merazi maddeleriyle sütlerin Brucellosis bakımından yapılan bakteriyolojik muayenelerinde 94 adet Brucella suşu izole etmiş bulunuyoruz. Bir karışıklığa meydan vermemek için araştırmalarımıza önce 33 yerli suşu dahil ettik. Bunlardan başka İngiltere Weybridge Enstitüsünden getirilen Br. abortus 544 (Weybridge), Br. melitensis 16 M (Beltsville), Br. suis 1330 (Minneapolis) ile New Zealand, Wellington Walleceville Research istasyonundan M. B. Buddle tarafından gönderilen Br. Ovis suşu olmak üzere 4 adet standard suşu da kontrol suşu olarak kullandık.

VASATLAR: Liyofilize suşların üretilmesinde, S ve R kolonilerinin tefrikinde, suşların pasajlarında, boyalı vasatların yapılmasında patates enfüzyonlu, gliserinli, dextroslu jeloz ile % 10 serumlu Nutrient agar, Ürease aktivitesinin kontrolunda ise Bauer'in vasatı kullanılmıştır.

BOYALAR : FAO/WHO Brucellosis Experler Komitesinin bildirmiş olduğu NF 58 sertifika numaralı basic fuchsin ile N T 16 sertifika numaralı thionin boyaları kullanılmış ve bunların % 0,1 lik stok solusyonlarından vasat'ara nihaî konsantrasyon 1/25000 olacak şekilde ilâve edilmiştir.

- a) FAO/WHO Brucellosis Experler Komitesinin, (Mayıs 1951, 14 - 37, Mayıs 1953. 24 - 67, ve 1958 tarih 148 numaralı üç raporunda yazılı olan metotlarla (27),
- b) Huddleson (11),
- c) Stableforth (24),
- d) Bendsen (1), a ait literatürde bildirilen metodlar tatbik edilmiştir.

M E T O D

BRUCELLA SUŞLARININ LİYOFİLİZASYONU

Patates enfüzyonlu dextrozlu ve glyserinli agarda idame edilmekte olan suşların 48 saatlik taze kültürlerinin, kaymağa alınmış steril süt içinde yapılan kesif solusyonlarından uzun iğneli enjektörlerle, her bir suş için 10 - 15 ampule 0.1 miktarında tevzi edilmiştir. Suş numaraları ampullerin orta kısımlarına, çini mürekkebi ile yazıldıktan sonra Edward'ın ufak model liyofilizasyon cihazında kurutulmuştur. Aradan 5 sene geçmiş olmasına rağmen suşlar canlılıklarını muhafaza etmektedirler.

D İ S İ S S O S İ A S Y O N K O N T R O L L A R I

LİYOFİLİZE SUŞLARIN EKİMLERİ VE SMOOTH KOLONİLERİN SEÇİLMESİ : Tip tâyininde en mühm hususlardan birinin kontrol edilecek suşların smooth safhada olmaları icap ettiğinden, her bir ampül muhtevisi steril fizyolojik su ile sulandırıldıktan sonra patates enfüzyonlu dextrozlu ve glyserinli agarı (P.D.G.) havi yatık jelozlara ekimleri yapılmıştır. İki gün etüvde üremeğe bırakılan bu suşların tekrar fizyolojik suda kesif olmayacak şekilde suspansiyoları hazırlandıktan sonra P.D.G. li agarı havi petrilere seyrek düşecek şekilde yayılıp desikatör içinde yani % 10 CO₂ muvacehesinde veya doğrudan doğruya atüve kaldırılmıştır. 3 - 5 gün sonra petrilere stereoskopik mikroskopta, 45 derecelik meyilli ışık altında muayene edilerek koloniler arasında S evsafını gösterenler yatık agara çekilmiştir.

ACRIFLAVİN VE THERMO-AGGLUTINATION TESTLERİ

Kullandığımız acriflavin (B.P. PO. 1687) Avlon - Emp. Chem. Manchester, firmasına aittir. Bundan 1/500 ve 1/1000 lik distile su içinde iki solusyon hazırlanmış ve her bir suşun Mcferland 2 ye göre ayarlanan tuzlu su solusyonlarından ikişer agglutination tüpüne 1 cc. ayrıca birer tanede vasat tüplerine 2 cc. olmak üzere tevzi edilmiştir. 1 cc. mirop solusyonunu havi iki ufak agglutination tüpünden birine 1/500 lük diğerine 1/1000 lik acriflavin solusyonlarından 1 cc. miktarında ilâve edilip iyice çalkalandıktan sonra etüve kaldırılmış 6 saatlik müddet içinde yarımşar saat fasılalarla tüpler kontrol edilmiştir. Bu esnada, 2 cc. miktarında mikrop suspansiyonu tevzi edilmiş olan vasat tüpleri Benmari şeklinde iki saat müddetle kaynatılmıştır. (R) kolonilerinden yapılan kültürler hem acriflavin hemde thermo - agglutination testlerinde aglutine olmuşlar, S evsafındakilerde ise bu hal görülmemiştir. Seri usulle acriflavin testi : % 0.1 lik acriflavin solusyonundan bir lâm üzerine bir damla damlatılır. Petrideki kolonilerden öze ile bir miktar germ alınarak bu damla içinde ezilir ve agglutination'un teşekkülü kontrol edilir. Seri usul tüp usulüne yardımcı olmuştur. Petrilere yayılarak S kolonileri seçilmiş olan 33 suştan ancak 5 tanesinde isabet edilememiş; bu 5 suşun üçü dördüncü saat nihayetinde; ikisi altıncı saatte iki farklı acriflavin solusyonu ile aglutine olmuşlar, diğer 28 suş'a ait kültürler smooth kolonilerden alındıkları için ne acriflavin nede thermo agglutination testlerinde aglutine olmamışlardır. S ve R kolonilerinin tefriklerinde malûm şartlar yanında Petrideki vasatın kalınlığının, petri camının renk ve kalitesinin de rolü olduğu müşahede edilmiştir. Tekrar yapılan ekimlerde 4 suşun S kolonileri seçilebilmişse de izolasyon tarihi eski olan 38 No.lu suş'un S kolonilerini ayırmak mümkün olmadığından kobay inokulasyonu yapılmış ve 35 gün sonra kobayın iç organlarından yapılan kültürlerden S kolonileri kolaylıkla tefrik edilebilmiştir.

Her iki farklı acriflavin solusyonlarıyla, Thermo - agglutination testlerinden alınan neticeler birbirine tetabuk etmiş, iki solusyonda da agglutination reaksiyonuna benzer çöküntü hemen aynı saat de hüsule gelmiştir.

SUŞLARIN CARBONDİOXİDE OLAN İHTİYAÇLARI

Bu deneme, suşlar ilk izole edildikleri zaman yapılmıştır. Brucella kolonileri, cenin marazi maddelerinden ekilen Petrilere iki

adet yatık agara çekilip bir tanesi CO₂ muvacehesinde diğeri açık olarak etüve kaldırılarak bu gaza olan ihtiyaçları kontrol edilmiştir. Gaz, CO₂ bombasından volumetrik olarak (Huddleson'ın kitabından) desikatörlere sevk edilmektedir. CO₂ kontrolü olarak ufak bir tüp içinde aşağıda terkibi bildirilen mahlülü koymaktayız. Mahlül, Weybridge Enstitüsünde hazırlanmış olan konsantre haldeki numuneye uygundur.

Hazırlanması: 100 cc. destile suya % 0.5 lik alkolde erimiş Bromthimol blue dan 2 cc., sodium bicarbonattan 0.1 gram ilâve edilip eritilir. Kesif olan bu ana mahlül 5 defa sulandırılarak kullanılır. Bilindiği üzere Br. abortus üreyebilmek için bu gaza muhtaçtır. Br. melitensis iki şekilde de üreyebilir. Suis'in üremesinel bu gazın mâni olduğu dahi bildirilmektedir. Yeni suş olan Br. ovis de abortus gibi üreyebilmek için CO₂ ihtiyacındadır. Denemeleri yaptığımız esnada yerli suşların 32 si CO₂ siz üreyebilmiş sadece 13 No. lu suş ürememiştir. Kontrol suşlarının üçüde CO₂ e ihtiyaç göstermemişlerse de Br. abortus 544 açıkta pek az üreyebilmiş, kültürler desikatöre aktarılınca bol miktarda üreme elde edilmiştir.

U R E A S E A K T İ V İ T E T E S T İ

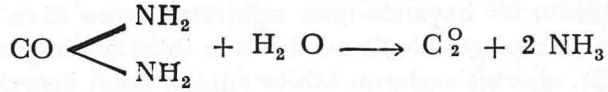
BAUER VASATININ YAPILIŞI: Bir erlenmayer içinde 1000 cc. distile suya 15.1 gram NA H₂ PO₄, 2 H₂O ilâve edilip eritilir. Fenol redin (Phenal sulfhonephthalein) % 0.2 lik solusyonundan bu mahlüle 7.5 cc. ilâve edilir ve 50 gram üre konur. Fenol red solusyonu distile su ve N/20 NAOH ile hazırlanmıştır. Erlenmayerde altın sarısı renginde görünen mahlülün Ph'sı 4 n HCL ile 5 den 4'e düşürülür. Zeisz süzgecinden süzülür, steril ufak tüplere 1 cc. miktarında tevzii edilir ve tüplerin ağzı mantarlanır.

UREASE TESTİNİN YAPILIŞI

a) Dr. Bendtsen tekniğine göre: 48 saatlik genç kültürlerin Mc ferland II'e göre solusyonları hazırlandıktan sonra, her bir suş için 1 cc. Bauer vasatını havi 3 aglutinasyon tüpüne 0.1,0.3,0.5 cc. miktarlarında ilâve edilip 37 C. derece etüve kaldırılıp yarım saat fasıla ile kontrol edilmiştir.

b) FAO/WHO Brucellosis Experler komitesinin ikinci raporunda bildirilen tekniğe göre: 48 saatlik genç kültürlerden bir öze (2 mm. kutrunda) germ alınarak 1 cc. Bauer vasatını havi ufak tüplerde ezildikten sonra etüve kaldırılmış ve her 15 dakikada bir kontrol edilmiştir.

Brucella organizmleri azimlerini vasıtasıyla, vasattaki üreyi hidrolize ederek iki molekül amonyakla bir molekül carbon di oxide meydana getirmektedir.



Bu suretle asit olan vasat amonyağın teşekkülü ile kalevileşmekte, vasata ilâve edilmiş olan Fenol red endikatörü de bu farkı, vasatın rengini yavaş yavaş sarıdan pembeye ve amonyağın teşekkülü fazlaştıkça koyu pembeye (rubi) çevirmesiyle belli etmektedir. Acriflavin testinde olduğu gibi bu testte de sabahleyin kabil olduğu kadar erken saatlerde başlanmış, ancak bu suretle 8 saat müddetle devamlı olarak tüplerdeki renk değişmesini tâkip etmemiz mümkün olabilmıştır. Son kontrol, saat 18 de yapılmış gece tâkip edilmemiştir. Bu sebepten cetvelde menfi diye gösterilenler 8 saat içinde renk değişikliği göstermeyen suşlardır. Ertesi sabah bir kısmını etüvde kızarmış bulduksada saati tesbit edilemediğinden tabloda menfi gösterilmiştir. Bilindiği üzere Br. abortus suşları üreyi en geç, suis en çabuk, melitensis ise ikisi ortası bir hızda parçalamaktadır. Bu test aynı gün, aynı vasatda tatbik edildiği halde tabloda da görüleceği üzere bir tipe dahil suşlar birbirine yakın saatlerde üreye vurmaları icap ederken çeşitli dakikalarda vasatı kırmızılaştırmışlardır. Bu farkların görülmesine sebep, vasata öze ile ilâve edilen germ miktarının sabit olmayışındandır. Bütün suşlar önce Dr. Bendtsen'in lâboratuvarında gördüğümüz şekilde, iki defada Br. Exp. Komitesinin raporunda bildirildiği gibi denemeye tâbi tutulmuştur. İlk iki tecrübeye tüpleri etüve kaldırdığımızdan iyi netice alamamıştık. Son yapılan denemede Bauer vasıtasını havi tüplere mikrop ilâvesinden sonra bütün tüpler 37 C. derecedeki Benmariye konmuş ve bu suretle daha iyi netice alınmıştır. Bilindiği üzere urease aktivite testinde melitensis suşları sabit bir vasıf göstermeyip farklı neticeler vermektedirler. Bu test, daha ziyade Br. abortusla Br. suisin tefriki bakımından bir değer taşımaktadır. Neticeler tabloda dakika olarak gösterilmiştir.

BOYA İNHİBİSYON TESTLERİ

STOK BOYA MAHLÜLLERİNİN HAZIRLANMASI. Bruc. EXP. Komitesinin bildirdiği şekilde NF 58 sertifika numaralı basic fuchsin ile NT 16 Cer. numaralı thionin den 100 cc. stok solusyonlar ha-

zırlanmıştır. Fuksinin distile suda eritilmesinde bir zorlukla karşılaşmadıysada tiyoninin soğuk destile suda erimesi mümkün olmamış, gözle fark edilemeyecek kadar ufak boya zerrelere kaldığından boyalı vasat denemelerinden önce iyi neticeler alamamıştık. Bunu müteakip, tiyonin bir havanda iyice ezildikten sonra 25 cc. etil alkol ilâve edilmiş ve sonrada distile su ile 100'e iblâğ edilmiştir. Bu stok mahlûlden, Br. abortus suşlarını inhibe edecek fakat değerlerini üretecek en kesif boya solusyonunu tesbit maksadiyle 1/8000 den 1/24000'e kadar ikişerbin aralıkla 9 muhtelif nihai konsantrasyonda tioninli agar vasatları hazırlanmış ve 4 kontrol suşu ile birlikte 33 yerli Brucella suşu bunlara yeniden ekilmişse de tatminkâr bir netice elde edilememiştir. Bundan sonra yine havanda ezilmiş olan boyanın üzerine kaynar derecede sıcak distile su dökülmüş ve mahlûl bir şişeye aktarıldıktan sonra benmari şeklinde bir saat müddetle kaynatılmış ve en iyi netice bu tarzda hazırlanmış olan stok tiyonin mahlûlünden alınmıştır.

KÜLTÜRLERİN PETRİLERDEKİ BOYALI VASATLARA EKİMLERİ : a) Her suşun 48 saatlik kültüründen Mcferland II'e göre hazırlanan solusyonlarından bir öze dolusu alınarak 6 paralel çizgi halinde agarın sathına sürülmüştür. b) 2 mm.lik bir öze ile doğrudan genç kültürlerden bir miktar germ alınarak yine çizgiler halinde boyalı vasatlara yaydırılmıştır.

Bu iki tarz ekimden birbirine benzer neticeler alınmışsa da kültürün daha kesif isabet edeceği ilk çizgilerde az da olsa bir üreme görülebileceğinden, suşların Mcferland II'e göre hazırlanan suspansiyonlarından alınacak olursa daha emin neticeler elde edileceği tabiidir.

Bilindiği gibi Br. abortus yalnız fuksinli, Br. suis yalnız tiyoninli vasatlarda üremekte, Br. melitensis ise her iki boyada inhibe etmemektedir. Br. ovisin ise bu bakımdan Br. suis'e benzer karakterde olduğu, fakat basic fuksinle, alelâde boya konsantrasyonlarında inhibe edilmediği bildirilmektedir. Bizim denemelerimizde Br. ovis her iki boyada da üremiştir. Bu testden elde edilen sonuçlar tabloda bildirilmiş, inhibe edilen suşlar (—) işaretle gösterilmiştir.

H İ D R O J E N S Ü L F İ D İ N T İ Ş A R I

H₂S testinin tiplerin tefrikinde en önemli kriter olduğu bilinmektedir. Bütün suşların genç kültürlerinden yatık vasatlara çekilerek pamukla tüp arasına acetatlı [(CH₃COO)₂Pb] kâğıt şe-

ritler (Merck's) Reagenzien Lead acetat paper) konmuş, her gün kâğıt'ar değiştirilmek suretiyle dört gün müddetle denemeye devam edilmiştir. Bilindiği üzere Br. milletensis ya pek az siyahlık husule getirir yahutta hiç getirmes. Br. abortus orta derecede 2 veya 3 gün siyahlık yapar. Amerikan suis tipi suşlar 4 veya 5 gün müddetle kâğıtları iyice karartırlar. Br. suis tipinin Danimarka varyantı ise H₂S intişar ettirmez. Tab'oda da kaydedildiği gibi izolasyon tarihi eski olan suşlar izole edildikleri zaman bu teste tâbi tutulmamış olduklarından bazı abortus suşları bu vasıflarını kaybetmişlerdir. 1959 senesinden itibaren ayrılanların ise hemen izolasyonlarını müteakip H₂S denemeleri yapılmıştır.

STANDARD MONO-SPEŞİFİK SERUMLARLA SUŞLARIN AGLUTİNASYON TESTLERİ

Mono - Spesifik serum testleri de klasifikasyonda en mühim bir tefrik metodu olarak kabul edilmiştir. Suşlar, İngiltere Weybridge Lâboratuvarından getirilen Standard mono - Spesifik abortus ve melitensis serumlariye serî ve batî aglutinasyona tâbi tutulmuşlardır.

SERİ AGLUTİNASYON TESTİ: Temiz bir lâma 1/5 nisbetinde dilüe edilmiş S. MO.Spe. serumlardan birer damla, kontrol maksadiyle de bir damla 1/5 nisbetinde sulandırılmış menfi serum damlatılır. Taze suşlardan bir öze miktarında alınan kültür, her seferinde ayrı olarak bu üç serum damlasında ezilir. Serumlar evvelce sulandırılmış olduğundan kültürün ayrıca fizyolojik su içinde ezişmesine ihtiyaç yoktur. Bir dakika içinde teşekkül eden agglutination siyah bir fon üzerinde tetkik edilir.

BATİ AGLUTİNATION TESTİ: Her bir suş için Standard mono - spesifik Br. abortus ve melitensis serumlarının 1/5 den 1/80'e kadar dilisyonları yapıldıktan sonra, kültürlerin Brown 4'e göre asitfenikli tuzlu su ile hazırlanan suspansiyonlarından 0.5 miktarında bunlara ilâve edilip 37° C de 18 saat bırakılmıştır. Mikrop ilâvesinden sonra dilisyon nisbetleri 1/10 - 1/160 olmuştur. Suşlar her iki S. mono - spesefik serumlarla denenirken, her agglutination serisine spontan agglutinationun kontrolu maksadiyle 0.5 cc. asitfenikli tuzlu su ve 0.5 cc. kültür solusyonunu havi bir tüp ilâve edilir. Malûm olduğu üzere tipik karakterli suşlar kendi antiserumlariyle agglutination vermete, diğes tipin serümü ile ilk hadlerde bile agglutine olmamaktadırlar. Intermedier suşlar ise homolog antiserumlariyle ugglutine olmadıkları halde heterelog serumla agglutine olmaktadır.

T A R T I Ő M A

Bioşimik, kültürel ve serolojik olarak karakterlerini tesbite çalışdığımız 33 suş'un muayenelerinden alınan neticeler cetvelde gösterilmiştir. Boya inhibisyon testlerinde, Dr. Stableforth'un ve WHO/FAO Brucellosis Experler Kamitesinin de bildirdiği gibi suşların tefrikinde en iyi boyaların thionin ve basic fuchsinden ibaret olduğu, denemelere çeşitli boyaların dahil edilmesinin iş hacmini artıracığı buna mukabil fazla bir yardımda olmayacağı kanaatindeyiz. Stok solusyonların iki ay gibi kısa bir zamanda yenilenmesinin icap etmesi ve yapılması zaruri olan pek çok çeşitli vasatlar arasında sık sık boyalı vasat hazırlanmasındaki zorluklar dolayısıyla lâboratuvarlarımızda da boya tabletlerinin kullanılmasının, tablet boya tedariki mümkün olmadığı takdirde kontrolü yapılacak suşların muayyen kesafette suspansiyonları hazırlandıktan sonra boyalı vasatlara çizgiler halinde sürülmesinin daha emin bir tarz olduğu muhakkaktır. Boyalarla inhibe edilen suşlar tabloda (—) işaretleriyle gösterilmiştir. Bilindiği gibi her iki boya da Br. melitensis inhibe etmemekte, buna mukabil Br. suis ancak thioninli, Br. abortus fuchsini vasatlarda üreyebilmektedir. Boyaların Brucella organizmlerini öldürmediği sadece onların çoğalmalarına mâni olduğu malûmdur.

H₂S produksiyonunu tesbit maksadiyle, kullanılan acetatlı şeritlerin her gün değiştirilip yenisini koymanın iki mahzuru olduğu fikrindeyiz. Birincisi Dr. Bedtsen'ında bildirdiği gibi tüpün 4 defa açılmasıyla bir miktar H₂S gazının zayi olacağı, ikinci mahzuru açıp kapama esnasında tüpün kontamine olması ihtimalidir. Bu sebepten her suş için dört yatık vasatın kullanılmasını ve bunlara konacak acetatlı kâğıtların her gün birinden alınarak suş defterindeki yerine yapıştırılmasını daha uygun bulmaktayız.

Bilindiği üzere, Brucella organizmleri umumiyetle cocobasil şeklindedirler. Hernekadar pasajlarla formlarında bir değişme olmaksaysada kendi müşahedelerimize göre ilk izole edildiklerinde Br. melitensis, Br. abortusdan umumiyetle daha kısadır. Bununla beraber sabit olmanın bu ufak farkla suşların tiplendirilmesinin mümkün olmayacağı aşikârdır.

Literatür bilgisine istinaden Brucella organizmlerinin tecrübe hayvanlarına olan patogeniteleriyle kati olarak klassifiye edilemeyeceklerinden denemelerimize kobay inokulasyonlarını dahil etmedik.

Cetvelde görüleceği üzere üç standard karakterdeki kontrol suşu ile *Br. ovis* suşu bizim denemelerimizde de kendilerine has karakterlerini göstermişlerdir. Yerli 33 suşdan 16'sı hem bioşimik vasıfları hemde mono - spesifik serumlarla verdikleri reaksiyon bakımından tipik *Br. abortus* evsafındadır ve hepsi, muhtelif tarihlerde, inek ceninlerinden izole edilmişlerdir. Bu suşların karakterleri *Br. abortus* kontrol suşunununkine tamamen uymaktadır.

Bandırma merinos çiftliğine ait bir koyun cenininden ayrılmış olan 42 No.lu bir suş ilk izole edildiğinde CO₂'e ihtiyaç göstermemiş, bir gün H₂S husule getirmiş, her iki vasatta da üreyebilmiş ve hem monospesifik abortus hemde melitensis serumlarıyla müsbet reaksiyon vermiştir. Stableforth (24), ender olmakla beraber böyle suşların bulunduğunu bildirmiştir.

Bu tiplerden başka 4 suş intermedier evsafıdır. Bunlardan 33 ve 44 No.lu iki a/m intermedier olan suşlar ilk izolasyonlarında CO₂'e ihtiyaç göstermiş oldukları halde monospesifik abortus serumu ile menfi melitensis serumu ile müsbet reaksiyon vermişler ve sadece basic fuksinli vasatta üreyebilmişlerdir. Biri pek az diğeri ise hiç H₂S intişar ettirmemiştir. Her ne kadar H₂S kontrolleri ilk izole edildikleri zaman yapılmamışsa da tipik abortus karakterinde olan suşların bazıları bu evsaflarını eski tarihli olmalarına rağmen kaybetmemişlerdir. Meselâ 44 No.lu tipik abortus suşu 28. pasajda olduğu halde 4 gün müddetle H₂S husule getirebilmiştir. Bu iki a/m intermedier suşdan biri inek sütünden diğeri ise inek cenininden ayrılmıştır. Biri koyun sütünden (51) diğeri koyun cenininde (8) olmak üzere iki adet m/a intermedier karakterindeki suşlar ilk izole edildiklerinde CO₂'e ihtiyaç göstermedikleri halde homolog olan antimelitensis serumu ile hiç aglutine olmamışlar heterolog olan abortus antiserumu ile aglutine olmuşlardır. Bu iki suş aynı zamanda her iki boyalı vasatta da üremiş biri hiç H₂S vermemiş diğeri ancak bir gün vermiş, 51 No.lu suş üreyi hiç parçalamadığı halde 8 No.lu suş 80 dakikada Bauer vasatını kızartmıştır. Bunlar Renoux'nun *Br. Intermedia* diye isimlendirdiği tipe benzemektedirler.

Bunlardan başka atipik evsaf gösteren 13 adet suş ilk izole edildiklerinde CO₂ siz üredikleri halde mono - spesifik abortus serumu ile yüksek hadlere kadar aglutine olmuşlar, monospesifik melitensis serumu ile ancak aşağı serum dilisyonlarında (1/20, 1/40, 1/80) reaksiyon verebilmişlerdir. Bunlardan 84 No.lu inek cenininden, 77 No.lusu koyun sütünden diğer 11 adedi de koyun ceninlerinden izole edilmiştir.

Br. ovis suşu her iki standard mono - spesifik serumlada reaksiyon vermemiştir.

Üreyi hidrolize etmek bakımından Br. suisin en kuvvetli aktiviteye sahip olduğu, Br. abortusun zayıf, Br. melitensisin ise ikisi arasında yani orta derecede bir aktivite gösterdiği, bazı melitensus suşlarının Br. abortus'a bazılarında Br. suis'e benzerlik gösterdikleri Br. ovis'in ise üreyi hiç veya pek az parçaladığı bildirilmektedir. Bizim denemelerimizde kontrol suşlarından Br. suis 30 dakikada vasatın rengini kızartmıştır. 16 tipik Br. abortus suşundan 10'u 5 - 8 saat içinde, 1 tanesi 235 dakikada üreyi parçalamış, 5 suş ise 8 saat içinde Bauer vasatında bir renk değişikliği meydana getirmemişlerdir. a/m intermedier iki Brucella suşundan biri 80, diğeri 235 dakikada üreyi parçalamasını tamamlayabilmişlerdir. Bilindiği gibi melitensis suşları bu test de çeşitli netice'ler vermekte bazıları Br. abortus'a bazıları Br. suis'e yaklaşmaktadırlar. Bütün suşlar için aynı vasat aynı günde kullanıldığı halde aynı tipe dahil suşların farklı neticeler vermesinin sebebi yukarıda da bildirildiği gibi Bauer vasatını havi tüplere ilâve edilen mikrop adedinin aynı miktarda olmamasındandır. Kontrolu yapılacak suşların genç kültürlerinden muayyen kesafette suspansiyonlar hazırlandıktan sonra bunlardan yine muayyen miktarda alınarak Bauer vasatına ilâvesiyle ancak doğru netice elde edilebilecektir. Bununla beraber tabloda da görüleceği üzere denemelerimizde tipik veya a/m intermedier evsafında abortus suşlarının urease aktivitelerinin umumiyetle yavaş olması m/a intermedier suşlarından birinin üreyi 80 dakikada diğlerinin hiç parçalamaması, bu iki nev'in bilinen karakterlerinden farklı bir netice elde edilmemiş demektir. Literatür bilgisine istinaden görülüyorki Brucella nevilerinin tefriki için yeni çeşitli metodlar bulunup tatbik edildikçe atipik suşlarında çoğaldığı anlaşılmaktadır. En iyi netice veren ve tatbiki en kolay olan bazı standard metodların rutin test olarak kabul edilmesi ve Brucellosisin teşhisiyle meşgul olan bütün laboratuvarlarda bu testlerin tatbiki i'le ilerde zuhuru muhtemel karışıklıkların önlenebileceği kanaatindeyiz.

Ö Z E T

1 — Laboratuvar kayıtlarımıza göre, son seneler içinde inek, koyun, keçi ve manda ceninleriyle, inek ve koyun sütlerinden olmak üzere 94 adet Brucella suşu izole etmiş bulunuyoruz. Denemelerimize bunlardan 33'ünü dahil ettik. Kontrol suşu olarak da Br. abortus 544

(Weybridge), Br. melitensis 16 M (Beltsville), Br. suis 1330 (Minneapolis) ile Br. ovis (New Zealand - Buddle) suşlarını kullandık.

2 — İzolasyon tarihleri eski olan suşlar denemelere başlamadan evve liyoflize edilmiş olarak muhafaza edilmekteydiler. Kreması alınmış, steril süt içinde liyofilize edilmiş olan bu suşlar 5 sene müddetle canlılıklarını muhafaza etmişlerdir. Müteakip seneler içinde de canlılık kontrollerına devam edilecektir.

3 — (R) ve (S) kolonilerinin tefriki maksadiyle kullanılmış olan iki farklı (1/500, 1/1000) acriflavin solusyonu ile Thermo-aglutinasyon testlerinden aynı neticeler elde edilmiş, 33 suş'un yapılan kontrol'arında bu iki test tamamen birbirine tetabuk etmiştir.

4 — 94 adet suşun izolasyonları esnasındaki müşahadelerimize göre ilk izole edildiklerinde Br. melitensis, Br. abortus'dan umumiyetle daha kısadır.

5 — Suşların CO₂e olan ihtiyaçları tabloda (+) işaretiyle gösterilmiştir. Bu kontroller ilk izole edildiklerinde yapılmıştır. 13 No. lu suş müstesna denemelerin yapıldığı sırada üç kontrol suşu da dahil olmak üzere bütün suşlar CO₂e ihtiyaç göstermeden üremişlerdir. Br abortus 544 kontrol suşu ise açıkta pek az üreyebilmiş desikatörde ise bol kültür elde edilmiştir.

6 — Eski tarihli Brucella suşlarının H₂S kontrolleri bu mesaiye baş'adığımız zamanda yapılmışsa da yeni tarihli suşlar bu bakımdan ilk izole edildiklerinde kontrol edilmişlerdir. Bu testin her gün yeni bir kâğıt ilâvesi şeklinde yapılmayıp teste tâbi tutulacak suşdan 4 yatık jeloza pasaj edilip bunlara konan acetatlı kâğıtların her gün birinden alınması, tüplerin açılıp kapanması esnasında H₂S gazının ziyanını önlemek bakımından daha uygun bulunmuştur.

7 — Kontrol suşları gibi yerli suşlar da boyalı vasatlarda yapılan denemelerde kendilerine has olan karakterleri göstermişlerse de Br. ovis her iki boyanın 1/25000 konsantrasyonunda inhibe olmamıştır. Thioninle yapılacak stok solusyonlarda boyanın havanda iyice ezilmesinden sonra distile su ilâvesiyle Benmari şeklinde kaynatılmasından iyi neticeler alınmıştır. Boyalar tarafından inhibe edilen suşların hizasında (—) işareti vardır.

8 — Suşların Urease aktivite kontrollerından alınan neticeler tabloda dakika olarak gösterilmiştir. Bunlar bir deneme devresi (8 saat) içinde elde edilen reaksiyonlardır. Bu müddet içinde üreyi parçalayamayanlar (—) işaretiyle gösterilmiştir. Kontrol suşla-

rından, Br. abortus ve Br. melitensis bu denememizde kendilerine has karakterleri hemen, hemen göstermişlerdir. Tabloda da görüleceği üzere tipik, yerli Br. abortus suşlarının ürease aktiviteleri umumiyetle yavaş diğerlerinin ise mütehavvildir. Urease vasatının hazırlanmasında ve metodun tatbikinde yapılacak ufak bir hata neticeyi çok fazla inhiraf ettirebileceğinden bu teste büyük bir itina gösterilmesi icap etmektedir. Bu sebeple Bauer vasatına mikrobun muayyen kesafetteki suspansiyonundan yine muayyen miktarda ilâvesinin ve boya inhibisyon testlerinde tablet boyalarının kullanılmasının, tedariki mümkün olmadığı taktirde, suşların muayyen kesafette suspansiyonları yapıldıktan sonra boyalı vasatlara çizgiler halinde sürülmesinin daha uygun olacağı neticesine varılmıştır.

9 — Tabloda görüleceği üzere, Biosimik, kültürel, ve serolojik olarak karakterlerini tesbit ettiğimiz 33 yerli Brucella suşundan 16'sı tipik Br. abortus. 2'si a/m, diğer ikisi m/a olmak üzere 4 adet suş intermedier karakterde bulunmuştur. Bunlardan başka 13 suş ise atipik olarak vasıflandırılmıştır.

10 — Bugüne kadar Türkiye'de Brucella suis nev'ine dahil bir suş izole edildiği hususunda bir kayda rastlanmadığı gibi bu araştırmamızda da ne Br. suis ne de Br. ovis karakterinde bir suş tesbit edilmemiştir.

Enstitümüzün ilmî terakkisi hususunda samimî gayretlerini heran müşahade etmekte olduğumuz Sayın Müdürüm Dr. Fikri Çizmen'e, bu mesainin devamı müddetince göstermiş olduğu müzaharetten dolayı çok minnettarım. Laboratuvarımızın günlük işleri arasına sığdırmağa çalıştığımız bu araştırmamızın tamamlanması için bütün gayret ve hüsnüniyetleriyle bana yardımcı olan kıymetli laboratuvar arkadaşlarıma da bu vesileyle teşekkür etmeği bir borç bilmekteyim. Bakterioloji enstitülerine intisap edecek genç meslektaşlarımıza örnek olacak bir feragatla çalışan Asistanımız Necati Ünlüleblebici'nin bu araştırma esnasında bir laboratuvar intanı neticesi Brucella enfeksiyonu geçirdiğini de bu arada teessürle bildiririm.

**TYPE DIFFERENTIATION OF BRUCELLA STRAINS
ISOLATED IN TURKEY
S U M M A R Y**

1. According to our laboratory entries of last years, a total of 94 Brucella strains have been isolated from sheep, goat, water buffalo, and cow foetuses as well as from cow and sheep milk. We have made use of 33 of these in our tests, and as checking control strains we have adopted Br. abortus 544 (Weybridge) and Br.

melitensis 16 M (Beltsville), Br. suis 1330 (Minneapolis) and Br. ovis (New Zealand). This work had been done by us for the first time in Turkey.

2. Strains with old isolation dates were being kept in a lyophilized condition before the starting of tests. These strains which were kept in decreamentized and sterilized milk kept their vitality for 5 consecutive years. Checks on their vitality will also continue in the years to come.
3. Similar results have been obtained by Thermo-agglutination tests with two different Acriflavin solutions, used for the purpose of separating (*R*) and (*S*) colonies, and at checks on 33 strains these two tests completely agreed with each other.
4. According to our observations during the isolations of 94 strains, Br. melitensis is shorter than of Br. abortus when first isolated.
5. Needs for CO₂ of strains have been marked (+) on the Table and controls have been carried out at the first dates of strains' isolations. With the exception of strain No. 13, all strains were being subjected to growth without the need for CO₂. Although three of the classic strains were growing Br. abortus 544 could not grow in the open, but gave a fine culture when put in jar containing 10 % added CO₂.
6. H₂S tests of old-isolated strains were carried out at the time we were starting tests and checks, of the newly isolated strains for H₂S, were carried out when first isolated. It was deemed proper in order not to waste H₂S gas during the opening and closing of the tubes- not to add a new paper every day, but to subculture to the four slope agars from the tube to be subjected to test and take from one of these everyday the acetate papers which were to be added to these 4 slope agars.
7. Control and native strains have displayed their peculiar characteristics at tests in media containing dyes. Br. ovis could not be inhibited at 1/25000 concentrations of both dyes. In stock solutions formed by Tionine good results were obtained when the dye was Benmari boiled in added distilled water, after having been finely ground in a mortar. Strains inhibited by dyes were marked (—).
8. Results of urease activity controls of strains were indicated on the Table in minutes. These are reactions obtained within a test period of 8 hours. Those, who could not utilize the urea are marked (—).

Although Br. suis, Br. abortus, and Br. melitensis of tests strains have almost fully displayed their peculiar characteristics. As

it is to be seen from the Table, urease activities of typical or intermediary native *Br. abortus* strains are generally slow, whereas those of *melitensis* strains are variable. In fact, these result are characteristics of these species. Extreme care should be taken in the preparation of Bauer's medium as well as in the carrying out of this test, since even a small mistake will change the result. Thus, it was found out that the safest method would be to add to the Bauer's medium a certain amount of the germs from its suspension at a certain concentration, and the use, for dye inhibition tests, of tablet dyes.

9. As it is to be seen again from the Table, 16 of 33 native *Brucella* strains, whose characters we have determined through cultural, biochemical and serological tests, were found typical *Br. abortus*. We have also found 2 a/m, 2 m/a intermedia and 13 Atypical strains.
10. In this research of ours :
No report of either *Br. suis* or *Br. ovis* isolation in Turkey has been encountered with, and We did not come across any of these two strains in our tests.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — **Bendtsen, Herluf (1954).**
«On the differentiation of *Brucella* Bacteria» Statens Veterinaere Serum Laboratorium 303 Copenhagen - Denmark.
- 2 — **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1948).**
- 3 — **Börger, K. and Karsten, F. (1960).**
«Differentiation of *Brucella abortus* and *Br. melitensis* by pathogenicity tests in pregnant goats.» The Vet. Büll. Vol, 30 No. 7 July, 1960.
- 4 — **Cameron, H. S. ve arkadaşları (1952).**
«Comparative metabolic studies on the genus *Brucella*». Jour. of Bact. Vol. 64 No. 5.
- 5 — **Cameron, H. S. ve Margaret E. Meyer (1954).**
«Comparative metabolic studies on the genus *Brucella*». Journal of Bact. Volume. 67 No. 1.
- 6 — **Cameron, H. S. ve Meyer, M. E. (1958).**
«Metabolic studies on *Brucella neotomae*». Jour. Bact. 76, The Vet. Bull. Vol. 29, No. 6 June, 1959.
- 7 — **Drimmelen, G. C. (1960).**
«Preliminary report on *Brucella* types isolated in South Africa.» Vet. Bull. Vol. 30, No. 8 August, 1960.
- 8 — **Erdöl, Z. A. (1950).**
«Türkiye'de Brucelloz. Etlik Enstitüsünde son on beş yıllık teşhis çalışmaları. Etlik aglutinasyon testinin hazırlanma tekniği. Çeşitli teşhis taamülleri hakkında mütalâalar.» Türk Vet. Hek. Dern. Dergisi Sayı : 49 - 50 Ekim - Kasım, 1950.

- 9 — Gaiger ve Davies Veterinary Pathology and Bacteriology (1955).
- 10 — Geissler, A. (1959).
«Importance of ureasé activity in Brucella.» The Vet. Bül. Vol. 30 No. 4 April, 1960.
- 11 — Huddleson, F. (1943).
«Brucellosis in man and animals.» Neu York.
- 12 — Karsten, F. (1960).
«Brucella suis as a mutant of Brucella melitensis.» The Vet. Bull. Vol. 30, No. 7 July, 1960.
- 13 — Kelsner, R. A. and Schoening, H. W. (1948).
Manual of Veterinary Bacteriology.
- 14 — Kremery, V. (1959).
«Utilization of peroxidase activity of Brucella for quick typing of Brucella suis.» The Vet. Bull. Vol. 30, 6 June, 1960.
- 15 — Jones M. L. (1958).
«Bacteriological methods used in the study of Brucellosis.» W. H. O./Bruc/187, 24 April, 1958.
- 16 — Margaret, E. Meyer and Cameron, H. S. (1959).
«Comparative metabolism of species and types of organisms within the genus Brucella.» Journal of Bacteriology Vol. 78 No. 1 July, 1959.
- 17 — Morgan, B. (1960).
«Brucella Bacteriophage». Central Vet. Lab. Weybridge, England. Cento seminar on Brucellosis, Pendik-Istanbul. Annexe H, To, EC/9/AG/D3.
- 18 — Newson's Sheep Diseases (1958). B.
- 19 — Pickett, M. J. ve arkadaşları (1953).
«Speciation within the genus Brucella. Evulation of differential Dyc, Biochemical, and Serological Tests.»
Journal of Bacteriology Volume. 66, No. 2 August, 1953.
- 20 — Pickett, M. J. ve Nelson, E. L. (1954).
«Nitrate reduction and Nitrite Toxicity tests» Journal of Bacteriology volume. 68, No. 1.
- 21 — Renoux, G. (1958).
«La Notion D'Espace Dans, Le genre Brucella.» Extrait Des Annales de L'Institut Pasteur Febries 1958, Tome. 94.
- 22 — Renoux, G. (1960).
«New bacteriostatic tests for differentiating Brucella strains.» The Vet. Bull. Vol. 30, No. 9 September, 1960.
- 23 — Stableforth, A. W. and Galloway, I.A. (1959).
«Infections Diseases of Animals. Diseases Due to Bacteria.» Volume. I Butterworths Scientific Publications - London.
- 24 — Stableforth, A. W. (1960).
«Species of Brucella and their general distribution.» Central Vet. Lab. Weybridge, England. Cento seminar on Brucellosis, Pendik-Istanbul.
- 25 — Topley and Wilson's (1957).
«Principles of Bacteriology and immunity.» Volume. I.
- 26 — Wundt, W. (1959).
«Antigenic structure of strains of intermediate types of the Brucella group.» The Vet. Bull. Vol. 30, No. 8 August, 1960.
- 27 — Joint FAO/Who, Expert, Committee on Brucellosis (1951, 1953, 1958) 37, 67, 148 numaralı üç rapor.

Yerli Brucella suşlarının kültürel, biyomik ve serolojik testlerinden elde edilen neticeleri gösterir tablodur.

Suş No.	Marazi madde gönderen müessesese	Orijin	İzolasyon tarihi	Pasaj adedi	İlk izole edildiği andaki CO ₂ ihtiyacı	H ₂ S İntişarı (Saat)				Boyalı vasatlarda ü r e m e		Ureaz aktivitesi (Dakika olarak)	Mono Spesifik serumlarla Agglutination		Suşun tipi
						24	48	72	96	Thionin	Fuchsin		Melitensis	Abortus	
Kontrol Suşları	Br. Abortus 544 K (Weybridge)				+	+	+	-	-	-	+	310	-	+	Brucella Abortus Melitensis Suis Ovis
	Br. Melitensis 16 M (Beltsville)				-	-	-	-	-	+	+	480	+	-	
	Br Suis 1330 (Minneapolis)				-	+	+	+	+	+	-	15	-	+	
	Br. Ovis (Dr. Buddle) Newzealand				-	-	-	-	-	+	+	30	-	-	
33	Ank. Orman Çiftliği	İnek Sütü	951 Kasım	40	+	-	-	-	-	-	+	80	+	-	a/m intermedier
38	İnanlı İnek hanesi	İnek cenini	23. 9.52	26	+	+	-	-	-	-	+	410	-	+	Br. Abortus
39	Çukurova Harası	» »	30. 9.52	28	+	-	-	-	-	-	+	410	-	+	Br. Abortus
40	İnanlı İnek hanesi	» »	10.10.52	25	+	-	-	-	-	-	+	385	-	+	Br. Abortus
42	Merinos Çiftliği	» »	21.11.52	31	-	+	-	-	-	+	+	-	+ 80	+ 80	Br. melitensis benjeri (Atipik)
43	Merinos Çiftliği	Koyun »	51.11.52	26	-	-	-	-	-	+	+	-	+ 40	+ 640	» »
44	Orman çiftliği	İnek »	5.12.52	24	+	+	-	-	-	-	+	235	+	-	a/m intermedier
46	Orman çiftliği	» »	8.12.52	28	+	+	+	+	+	-	+	410	-	+	Br. Abortus
48	Merinos Çiftliği	Koyun »	11.12.52	29	-	+	-	-	-	+	+	-	+ 20	+ 160	Br. melitensis benjeri (Atipik)
51	» »	» sütü	25,12,52	24	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	m/a intermedier
54	Çukurova Harası	İnek cenini	20. 1.53	24	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	Br. Abortus
57	Bala D. Ü. Çiftliği	Koyun »	4. 2.53	27	-	+	-	-	-	+	+	80	+ 40	+ 320	Br. melitensis benjeri (Atipik)

58	Balâ D. Ü. Çiftliği	Koyun »	4. 2.53	27	—	—	—	—	—	+	÷	135	+ 80	+ 320	Br. melitensis benjeri (Atipik)
62	Orman Çiftliği	İnek »	20. 2.53	22	+	+	+	+	+	—	+	325	—	+	Br. Abortus
67	Orman Çiftliği	İnek »	25. 2.53	22	+	+	+	+	+	—	+	405	—	+	Br. Abortus
77	Karacabey Harası	Koyun Sütü	11. 6.53	23	—	+	—	—	—	+	+	—	+ 20	+ 320	Br. melitensis benjeri (Atipik)
84	Kumkale İnek hanesi	İnek cenini	21. 1.54	14	—	+	—	—	—	+	+	—	+ 40	+ 320	» »
85	Çukurova Harası	İnek »	25. 1.54	14	+	+	—	—	—	—	+	235	—	+	Br. Abortus
88	Erzurum Vet.	Koyun »	12. 2.54	17	—	—	—	—	—	+	+	—	+ 40	+ 320	Br. melitensis benjeri (Atipik)
94	Merinos Çiftliği	Koyun »	7.12.54	14	—	+	—	—	—	+	+	—	+ 40	+ 320	» »
1	Orman Çiftliği	İnek »	11. 7.59	5	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	Br. Abortus
2	Orman Çiftliği	» »	15. 8.59	3	+	+	+	—	—	—	+	370	—	+	Br. Abortus
3	Ank. Orman Çiftliği	» »	30. 9.59	3	+	—	—	—	—	—	+	—	—	+	Br. Abortus
4	Orman Çiftliği	» »	1.10.59	3	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	Br. Abortus
5	Orman Çiftliği	» »	1.10.59	3	+	+	+	+	+	—	+	—	—	+	Br. Abortus
6	Orman Çiftliği	» »	17.10.59	2	+	+	—	—	—	—	+	—	—	+	Br. Abortus
7	Orman Çiftliği	» »	20.11.59	3	+	+	—	—	—	—	+	360	—	+	Br. Abortus
8	Lalahan yetiştirme ve deneme çiftliği	Koyun »	20. 1.60	2	—	—	—	—	—	+	+	80	—	+	m/a Inter-medier
9	» »	» »	24. 2.65	3	—	—	—	—	—	+	+	30	+ 40	+ 320	Br. melitensis benjeri (Atipik)
10	» »	» »	24. 2.60	3	—	+	—	—	—	—	+	105	+ 40	+ 320	» »
11	Balâ D.Ü. Çiftliği	» »	10. 3.60	2	—	—	—	—	—	+	+	150	+ 40	+ 320	Br. melitensis benzeri (Atipik)
12	Lalahan Yetiştirme Çiftliği	» »	17. 3.60	2	—	—	—	—	—	+	+	15	+ 40	+ 640	Br. melitensis benzeri (Atipik)
13	Orman çiftliği	İnek cenini	13. 7.60	3	+	+	+	+	+	—	+	480	—	+	Br. Abortus

Bütün denemeler suşların tabloda gösterilen pasaj adetlerinde yapılmıştır.

TYPE - DIFFERENTIAL TEST

Strain Number	Establishment which sent the affected material	Origin of strain	Date of isolation	subculture Number (*)	CO ₂ Requirement (* *)	H ₂ S Production Hours :				Growth in the presence of :		Urease Production (***) minute :	Agglutination with monospecific sera		Species or Variant
						24	48	72	96	Thionin	Basic fuchsin		Abortus	Melitensis	
Control strains	Br. Abortus 544 (Weybridge)				+	+	+	-	-	-	+	310	+	-	Br. Abortus
	Br. Melitensis 16 M (Beltsville)				-	-	-	-	-	+	+	480	-	+	Br. Melitensis
	Br. Suis 1330 (Minneapolis)				-	+	+	+	+	+	-	15	+	-	Br. suis
	Br. Ovis (Dr. Budle) (New Zealand)				+	-	-	-	-	+	-	30	-	-	Br. Ovis
33	Ankara Orman farm	Cow milk	November 1951	40	+	-	-	-	-	-	+	80	-	+	a/m intermedier
38	Inanli Cov breeding Farm	Cow fetus	September 1952	26	+	+	-	-	-	-	+	410	+	-	Br. Abortus
39	Çukurova State-farm.	Cow fetus	September 1952	28	+	-	-	-	-	-	+	410	+	-	Br. Abortus
40	Inanli Cow breeding Farm	Cow fetus	October 1952	25	+	-	-	-	-	-	+	385	+	-	Br. Abortus
42	Bandırma Merino-Farm.	Sheep fetus	November 1952	31	-	+	-	-	-	+	+	-	+ 80	+ 80	Like Br. melitensis (Atypical)
43	Bandırma Merino-Farm.	Sheep fetus	November 1952	26	-	-	-	-	-	+	+	-	+ 640	+ 40	» »
44	Ankara Orman- Farm.	Cow fetus	December 1952	24	+	+	-	-	-	-	+	235	-	+	a/m intermedier
46	Ankara Orman- Farm.	Cow fetus	December 1952	28	+	+	+	+	+	-	+	410	+	-	Br. Abortus
48	Bandırma Merino-Farm.	Sheep fetus	December 1952	29	-	+	-	-	-	+	+	-	+ 160	+ 20	Like Br. melitensis (Atypical)
51	Bandırma Merino-Farm.	Sheep fetus	December 1952	24	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	m/a intermedier

54	Çukurova State farm.	Cow fetus	January 1953	24	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Br. Abortus
57	Balâ Sheep farm.	Sheep fetus	February 1953	27	-	+	-	-	-	+	+	80	+320	+ 40	Like Br. melitensis (Atypical)
58	Balâ Sheep farm.	Sheep fetus	February 1953	27	-	+	-	-	-	+	+	135	+320	+ 80	» »
62	Ankara Orman farm.	Cow fetus	February 1953	22	+	+	+	+	+	-	+	325	+	-	Br. Abortus
67	Ankara Orman farm.	Cow fetus	February 1953	22	+	+	+	+	+	-	+	405	+	-	Br. Abortus
77	Karacabey State farm.	Sheep milk	June 1953	28	-	+	-	-	-	+	+	-	+320	+ 20	Like Br. melitensis (Atypical)
84	Kumkale Cow-breeding	Cow fetus	January, 1954	14	-	+	-	-	-	+	+	-	+320	+ 40	» »
85	Çukurova State farm.	Cow fetus	January 1954	14	+	+	-	-	-	-	+	235	+	-	Br. Abortus
88	Erzurum Sheep-breeding	Sheep fetus	February 1954	17	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	m/a intermedier
94	Bandırma Merino farm	Sheep fetus	December 1954	14	-	+	-	-	-	+	+	-	+320	+ 40	Like Br. melitensis (Atypical)
1	Ankara Orman farm.	Cow fetus	July 1959	5	+	+	+	-	-	-	+	-	+320	+ 40	» »
2	Ankara Orman farm.	Cow fetus	August 1959	3	+	+	+	-	-	-	+	370	+	-	Br. Abortus
3	Ankara Orman farm	Cow fetus	September 1959	3	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	Br. Abortus
4	Ankara Orman farm	Cow fetus	October 1959	3	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	Br. Abortus
5	Ankara Orman farm	Cow fetus	October 1959	3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	Br. Abortus
6	Ankara Orman farm	Cow fetus	October 1959	2	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	Br. Abortus
7	Ankara Orman farm	Cow fetus	November 1959	3	+	+	-	-	-	-	+	360	+	-	Br. abortus
8	Lalahan Breeding farm	Sheep fetus	January 1960	2	-	-	-	-	-	+	+	80	+	-	m/a intermedier
9	Lalahan Breeding farm	Sheep fetus	February 1960	3	-	-	-	-	-	+	+	30	+320	+ 40	Like Br. melitensis (Atypical)
10	Lalahan Breeding farm	Sheep fetus	February 1960	3	-	+	-	-	-	+	+	105	+320	+ 40	» »

TYPE - DIFFERENTIAL TEST

Strain Number	Establishment which sent the affected material	Origin of strain	Date of isolation	subculture Number (*)	CO ₂ Requirement (***)	H ₂ S Production Hours				Growth in the presence of:		Urease Production (***) minute	Agglutination with monospecific sera		Species or Variant
						24	48	72	96	Thionin	Basic fuchsin		Abortus	Melitensis	
11	Bâlâ Sheep farm	Sheep fetus	March 1960	2	-	-	-	-	-	+	+	150	+ 320	+ 40	Like Br. melitensis (Atypical)
12	Lalahan Breeding farm	Sheep fetus	March 1960	2	-	-	-	-	-	+	+	15	+ 640	+ 40	» »
13	Ankara Orman farm	Cow fetus	July 1960	3	+	+	+	+	+	-	+	430	+	-	Br. abortus

CO₂ Requirement = (+)

Blackening of lead acetate paper = (+)

No blackening of lead acetate paper = (-)

Growth in the presence of thionin and Basic fuchsin

Inhibition = (+)

Agglutination with monospecific sera (+)

The standard types and our laboratory strains were in the smooth phase before they were subjected to differentiation tests.

* All of these tests were carried out the number of subcultures indicated for each strain on the table.

** CO₂ requirement at the time of their first isolation.

*** The medium was prepared according to Bauer's method.