



Brucella ovis*'in Serolojik Tanısı Amacıyla Farklı Antijenlerin Kullanıldığı Bir In House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Prototipinin Geliştirilmesi

Oktay KESKİN^{1,a}, Ahmet Murat SAYTEKİN^{1,b}, Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE^{1,c}, Osman Yaşar TEL^{1,d},
Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK^{1,e}

¹Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Şanlıurfa-TÜRKİYE
ORCID: ^a0000-0002-5977-7872; ^b0000-0001-7486-8054; ^c0000-0002-9842-3305; ^d0000-0001-7848-3899;
^e0000-0002-0377-2650

Corresponding author: Ahmet Murat SAYTEKİN; E-posta: ahmetmurat.saytekin@harran.edu.tr

How to cite: Keskin O, Saytekin AM, Güllü Yüce-tepe A, Tel OY, Erdenliğ Gürbilek S. *Brucella ovis*'in serolojik tanısı amacıyla farklı antijenlerin kullanıldığı bir in house enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) prototipinin geliştirilmesi. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2022; 19(3):168-174

Öz: Bu çalışmada, *Brucella ovis*'e karşı humoral yanıtın değerlendirilmesinde kullanılmak üzere, bu bakterinin farklı antijenik fraksiyonlarından hazırlanan antijenlerin karşılaştırılmasıyla bir Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) prototipinin geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla, dört farklı antijen (Hot salin ekstrakt, Rough Lipopolisakkarit, Faj lizat 1 ve Faj lizat 2), 84 koyun serum örneği ile test edildi. *Brucella ovis* açısından ELISA seropozitiflikleri, kullanılan antijenlere göre sırasıyla %14.3, %13.1, %10.7 ve %15.5 olarak saptandı. En yüksek pozitiflik oranı Faj lizat 2 ile elde edildi, ancak, *Brucella ovis*'e karşı oluşan antikorların ELISA ile belirlenmesi için kullanılan 4 farklı antijenin test sonuçları arasındaki farklılık, istatistiki açıdan önemsiz ($\chi^2=0.89$; $P>0.05$) bulundu. Sonuç olarak, gelecekteki çalışmalarda, Faj lizat 2 antijeni kullanılarak ELISA ile test edilen çok daha fazla serum örneği için elde edilen sonuçların, komplement fiksasyon testi ve agar jel immunodifüzyon testi gibi standart testler ve temin edilebilecek ticari kitlerin sonuçları ile karşılaştırılmasına ihtiyaç duyulacağı ve böylece in house ELISA prototipinin ticarileşme potansiyelinin daha sağlıklı olarak değerlendirilebileceği kanısına varıldı. Ayrıca, az sayıda serum örneğiyle elde edilen seropozitiflik oranı göz önünde bulundurulduğunda, Türkiye'nin farklı bölgelerini kapsayan daha fazla sayıda serum örneği ile geniş ölçekli bir serolojik çalışmanın yapılması ile ülkemizdeki gerçek hastalık durumunun ortaya çıkarılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Brucella ovis*, ELISA, koyun

Development of an In House Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Prototype Using Different Antigens for Serological Diagnosis of *Brucella ovis*

Abstract: In this study, it was aimed to develop an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) prototype to evaluate humoral immune response against *Brucella ovis* by using different antigenic fractions from bacteria comparatively. For this purpose, four different antigens, namely Hot saline extract, Rough Lipopolysaccharide, Phage lysate 1, and Phage lysate 2 were used to test 84 sheep serum samples in ELISA. Seropositivity rates were, 14.3%, 13.1%, 10.7%, and 15.5%, respectively. Although the highest seropositivity rate was obtained by using the Phage lysate 2 antigen, it did not reach the level of statistical significance ($\chi^2=0.89$; $P>0.05$) difference between these antigens. It was concluded that in future studies, there would be a need for comparing the results of more serum samples tested in ELISA using Phage lysate 2 with the results of standard serological tests such as complement fixation test and agar gel immunodiffusion test or available commercial ELISA kit. Thus, the potential possibility of commercialization of a new in-house ELISA prototype will be evaluated more realistically. Given the seropositivity rate of *Brucella ovis* infection obtained by using a small number of serum samples, a large-scale serological study with greater serum samples from different parts of Turkey will reveal the real disease situation in our country.

Keywords: *Brucella ovis*, ELISA, sheep

Giriş

Brucella ovis'in (*B. ovis*) neden olduğu hastalık, ilk olarak 1953 yılında Avustralya'da bildirilmiştir. O günden günümüze, hastalığın Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Güney Avrupa dahil olmak üzere, dünya üzerinde koyun yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede

bulduğu sanılmaktadır. *B. ovis*, koçlarda epididimitis, koyunlarda ise plasentitis ve abort ile kendini gösteren, sürüde fertilitenin ciddi bir şekilde azalmasına neden olan genital bir hastalık etkenidir. Hastalığın dünya genelinde bir yayılım gösterdiği düşünülmektedir (Blasco, 1990). Hastalığın ülkemizdeki varlığı, yapılan az sayıdaki serolojik çalışma ile ortaya konmuş ve ELISA ve Komplement fiksasyon testi (KFT) ile %3.3 ile %65.1 arasında değişen bir seropozitiflik saptansa da (Türütöğlü, 1992; Uçan ve Aras, 2007;

Geliş Tarihi/Submission Date : 26.01.2022

Kabul Tarihi/Accepted Date : 09.05.2022

*Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (HÜBAP) tarafından 19015 numara ile projelendirilerek desteklenmiştir.

Tel ve ark., 2016), *B. ovis* Türkiye'de 2018 yılına kadar hiç izole edilememiştir. Erdenliğ Gürbilek ve ark. (2018), *B. ovis*'in ülkemizdeki ilk izolasyonunu Suriye'den ülkemize gelen bir koçta gerçekleştirmişlerdir.

Dünyada ilk kez 1950'li yıllarda tanımlanan *B. ovis*, koyun yetiştiriciliğinin yapıldığı birçok ülkede koçlarda epididimitis ve koyunlarda ise plasentitis ve abortusa neden olmaktadır (Corbel, 1985). Klinik olarak infekte koçların sadece %50'sinin epididimitis tablosu göstermeleri ve aynı klinik tabloya neden olan başka diğer infeksiyöz ajanların da olması sebebiyle klinik teşhis, yeterince duyarlı bir teşhis yolu sayılmamaktadır (Blasco, 1990). Enfeksiyonun teşhisinde yapılan bakteriyolojik incelemeler daha güvenli sonuçlar vermesine rağmen izolasyon ve identifikasyonun güç ve zaman alıcı olması, etkenin üretilmesi için inkubasyon ortamına %5-10 CO₂ ilavesine ihtiyaç duyulması, etkenin semen ile her zaman çıkarılmaması gibi nedenlerle, epidemiyolojik çalışmalar genellikle serolojik testlere dayandırılmıştır (OIE, 2021). *B. ovis*, smooth *Brucella* türlerinden (*B. abortus* ve *B. melitensis*) farklı olarak hücre duvarında rough lipopolisakarit (R-LPS) yapısına sahiptir ve bu nedenle smooth *Brucella* suşları ile aglütinasyon temelli testler ile çapraz reaksiyon göstermemektedir (Moreno ve ark., 1984). Türütoğlu (1992), Konya ilinde, koçlarda bruselloz prevalansının serolojik metotlarla tespiti amacıyla yürüttüğü çalışmada, 425 adet kan serumu örneğinin, 44'ünün (%10.4) *B. ovis* antikorları yönünden pozitif, 381'inin (%89.6) negatif reaksiyon verdiğini bildirmiştir. Uçan ve Aras (2007), yaptıkları çalışmada Konya ve Sivas Bölgelerindeki koçlarda, *B. ovis* enfeksiyonunun yaygınlığını, Modifiye Mikro Pleyt Aglütinasyon Tekniği (MPAT) kullanarak belirlemek amacıyla, 35 ayrı sürüden 264 adet kan serumunu inceledikleri çalışmada, kan serumlarının 149'unu (%56.4) negatif ve 115'ini (%43.6) pozitif saptamışlardır. Tel ve ark. (2016), Şanlıurfa, Diyarbakır ve Mardin illerinden toplanan 183 kan serumunu, *B. canis* M (-) suşundan hazırlanan antijen ile test etmişler, i-ELISA ile *B. ovis* yönünden seropozitiflik oranını %3.3 olarak bulmuşlardır. Aynı serumlar ticari *B. ovis* ELISA kiti ile paralel çalışılmış ve aynı sonuçlar alınmıştır.

Hastalığın tanısı, klinik tanı, bakteri izolasyon ve identifikasyonu ve serolojik testlere bağlıdır. Klinik tanı, epididimitis ve orşitis oluşturan diğer hastalıklarla (infeksiyöz hastalık etkenleri, *B. melitensis*, *Actinobacillus seminis*, *Histophilus ovis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Chlamydomphila abortus* ve non-infeksiyöz travma orijinli spermatik granulom vb.) karıştığı için yeterince spesifik değildir. Diğer taraftan klinik muayenenin de yeterince duyarlı olmadığı söylenebilir. Çünkü infekte olan koçların %50'si herhangi bir klinik bulgu göstermemektedir. Kültür, güvenli olmasına rağmen güç ve zaman alıcıdır. Ayrıca, etkenin aralıklarla dışarı atılıyor olması, kültür duyarlılığını ciddi bir şekilde azaltmaktadır. Ayrıca bakteriyolojik testler, çok sayıda hayvanın test edilmesi gereken

durumlarda uygulanabilir değildir (OIE, 2021). Rutin teşhis için en çok başvurulan yöntemler, serolojik testler gibi indirekt yöntemlerdir. En yaygın kullanılan serolojik testler KFT, Agar jel immunodifüzyon (AGİD) ve ELISA'dır (Myers ve ark., 1972; Worthington ve ark., 1984; Cho ve ark., 1987). Hastalığın OIE tarafından kabul edilen resmi testi ise KFT'dir. Ancak bu test, oldukça komplike ve özel ekipman ve deneyimli personel gerektirmektedir. KFT'nin bir diğer dezavantajı da R-LPS antijenlerinin oluşturduğu anti komplementer aktivitedir (OIE, 2021). Dolayısıyla, hastalığın teşhisinde kolay ve hızlı bir tanı yönteminin geliştirilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır. Hastalığın indirekt ELISA ile teşhisi amacı ile araştırmacılar farklı antijenler kullanarak testin duyarlılık ve özgüllüğü konusunda çok sayıda çalışma yapmışlardır (Esteyn ve ark., 2002; Gall ve ark., 2003; Nielsen ve ark., 2007; Escobar ve ark., 2010).

Brucella enfeksiyonunun serolojik teşhisinde kullanılan antijenler, bakterinin çok çeşitli somatik ve yüzey bileşenlerini içermektedir. Non-smooth ve doğal olarak rough bir organizma olan *B. ovis*'in yüzey antijenleri ile *Brucella canis*, *Brucella abortus* 45/20, *Brucella melitensis* B115 gibi diğer Rough *Brucella* suşları ve *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas* spp. ve *Staphylococcus epidermidis* gibi R-LPS tabakalarının benzerlik gösterdiği diğer bakteri türlerinin mukoid suşlarına karşı gelişen antikorlar arasında heterospesifik reaksiyonların olduğu bilinmektedir (Myers ve ark., 1972; Corbel, 1985; Nielsen ve ark., 2004). Moreno ve ark. (1984), *B. ovis*, *B. canis*, *B. abortus* 45/20 ve *B. melitensis* B115 rough suşların R-LPS tabakalarını çıkarıp immunokimyasal analizlerini yapmışlar ve *B. ovis*'in R-LPS'lerinin immunodifüzyon testinde gösterdiği kısmi benzerlik ile *B. melitensis*, *B. abortus* ve *B. canis* R-LPS'lerinden ayrıldığını göstermişlerdir. *B. ovis*'in R-LPS'sine karşı oluşturulan immunserumun sadece homolog antijen ile aglütinasyon verdiği, diğer rough *Brucella* hücreleri ile aglütinasyon vermediğini saptamışlardır. Çalışmada kullanılan dört rough suşun LPS tabakalarının biyokimyasal analizinde en yüksek keodeoksioktonat ve glukozamin oranları *B. ovis*' te bulunurken, en yüksek yağ asitleri *B. melitensis* B115 te ve en yüksek glukoz oranı *B. abortus* 45/20 de bulunmuştur. Protein, *B. ovis* ve *B. canis* in R-LPS tabakasında hiç bulunmazken, diğer ikisinde eşit miktarda olmak üzere, smooth LPS tabakasının üçte biri oranında bulunmuştur. Zoha ve Carmicheal, (1982), *B. canis* M (-) suşunun daha az mukoid ve düşük patojeniteye sahip olduğunu ve serolojik çalışmalar için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Nielsen ve ark. (2004), *B. abortus* RB 51 suşundan elde edilen rough lipopolisakaritlerin *B. ovis*, *B. canis* ve *B. abortus* RB51 türlerine karşı ELISA için kullanılabilceğini belirtmiştir. Benzer olarak, *B. ovis*'in *B. canis* ile ortak antijenik bileşenler içerdiği

için *B. ovis*'ten hazırlanan antijenler ile yapılan ELISA'nın *B. canis* infeksiyonunu da saptayabileceği belirtilmektedir (Lopez ve ark., 2005). Barrouin-Melo ve ark. (2007), yaptıkları bir çalışmada ısıda eriyebilir tüm bakteri ekstraktını antijen olarak kullandıkları ELISA'da, duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %91 olarak bulmuşlardır.

Bu çalışmada da *B. ovis*'in farklı antijenik fraksiyonlarının kullanıldığı ELISA prototiplerinin referans pozitif ve negatif serum panelleri kullanılarak ve birbirileri ile kıyaslanarak indirekt tanı açısından değerlendirilmeleri amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Bakteriyel suş ve faj: Antijen hazırlanması için Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, kültür ve faj koleksiyonlarında mevcut olan *B. ovis* 63/290 ATCC referans suşu ile 1×10^4 Rutin test dilüsyonunda (RTD) *Brucella* R/C fajı kullanıldı.

Pozitif ve negatif serum örnekleri: OIE'nin Bruseloz için Referans merkezi, Hayvan ve Bitki sağlığı Ajansı (APHA), Weybridge İngiltere'den temin edildi. Ayrıca Türkiye'de ilk kez tarafımızdan *B. ovis* izole edilerek bildirim yapılan koçtan alınan serum da validasyon çalışmalarında gerçek pozitif serum olarak kullanıldı.

Test serum örnekleri: Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'na teşhis amaçlı getirilen 84 adet 2-5 yaş aralığında, İvesi ırkı koyunlara ait kan serumları kullanıldı.

ELISA antijenlerinin hazırlanması

Hot salin ekstrakt (HSE) antijeninin hazırlanması: *B. ovis* suşu, serum dektroz agara ekilerek saflık kontrolleri ve identifikasyonları, referans suşlara uygunluğu, konvansiyonel yöntemlerle yapılarak doğrulandı (Alton ve ark., 1988). Kültür özellikleri doğrulanmış suşların sıcak tuzlu suda ekstraksiyonları (STE-*B. ovis*) hazırlandı. Bu amaçla suşlara ait koloniler 50 ml steril PBS (pH 7.4) ile toplanarak elde edilen iki ayrı bakteri kültürü 60°C sıcaklıkta bulunan su banyosunda 1 saat tutulmak sureti ile öldürüldü. Antijen üretimi, Barrouin-Melo ve ark. (2007)'nin bildirdiği yöntemle göre yapıldı ve öldürülen kültürler 3500xg'de 10 dakika süre ile 10°C'nin altında santrifüj edildi, süpernatant atıldıktan sonra hücreler PBS (pH 7.4) ile süspanse edilerek aynı şekilde iki kez daha santrifüj edilip yıkandı. En son elde edilen pelet, 10 ml PBS ile sulandırıldıktan sonra 120°C de 1.5 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavlandı. Daha sonra hücreler 12000xg'de 20 dakika süre ile 4°C de santrifüj edilerek süpernatant toplandı ve küçük miktarlarda steril cryovial tüplere taksim edilerek -20°C de, daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

Rough Lipopolisakkarit (R-LPS) antijeninin hazırlanması: Bu amaçla, Yi ve Hackett (2000) tarafından bildirilen Tri-Reagent yöntemi, modifiye edilerek kullanıldı. Serum dektroz agarda üreyen *B. ovis* kolonileri agar yüzeyinden steril distile su ile toplandıktan sonra optik dansitesi $OD_{560nm}=1.0$ olarak ayarlandı. Toplanan kültürler, su banyosunda 80°C'de 30 dakika bekletilerek öldürüldü ve ölü bakteri süspanسیونu, +4°C'de, 3500 rpm' de santrifüj edilerek üstteki besiyeri uzaklaştırıldı, alttaki ölü bakteri peleti toplanarak her bir gram bakteri peleti için 2 ml Tri-reagent eklendi. Karışım oda sıcaklığında 10-15 dakika tam bir homojenizasyon için bekletilerek faz seperasyonu yaratmak için her bir gram bakteri peleti miktarında karışıma 200 µl kloroform eklendi. Süspanسیون vorteks kullanılarak hızlıca karıştırıldı ve 10 dakika daha inkübe edildi ve daha sonra 12000xg'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Böylece su ve organik fazlar ayrıldı. Su fazı yeni bir 1.5 ml lik santrifüj tüpüne transfer edildi. Organik fazın üstüne 100 µl distile su eklenecek karışım tekrar 12000xg'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Su fazı bir önceki su fazı ile kombine edilerek elde edilen bu Tri-reagent ile ekstrakte edilen LPS çözeltisi, -20°C de muhafaza edilen %95'lik etanol içinde hazırlanan 0.375 M magnezium klorid ile karıştırıldı ve bu karışım 12000xg'de 15 dakika santrifüj edilerek oluşan pelet, 200 µl distile su içinde süspanse edildi ve -20°C de daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere saklandı.

Faj lizat 1 (FL1) ve 2 (FL2) antijenlerinin hazırlanması: *B. ovis*'in, %10 serum içeren triptik soy broth besiyerinde, 24-48 saatlik log fazında üremiş kültürü, mililitresinde yaklaşık 2×10^8 KOB/ml olacak şekilde Mac Farland tüp no 3'e göre ayarlandı. Kültüre, 1×10^4 RTD R/C fajı, 1:50 (faj/bakteri) oranında ilave edildi. Faj ve kültür karışımı, 37°C de %5-10 CO₂ içeren ortamda, 6-7 saat tam bir lizis ve kısmi berraklık elde edilene kadar inkübe edildi (Saxena ve Raj, 2018). Bu süre sonunda kültür santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı faj lizat 1, alttaki pelet faj lizat 2 olarak isimlendirilerek saklandı.

ELISA: De Oliveira ve ark. (2011) tarafından bildirilen yöntem, modifiye edilerek uygulandı. Bu amaçla, izole edilen antijenlerin her biri ayrı ayrı pozitif ve negatif serumlar ve konjugat ile checkerboard analizi yapıldıktan sonra, en uygun antijen ve konjugat dilüsyon oranları belirlendi. Belirlenen antijenlerin dilüsyonları, karbonat-bikarbonat buffer (pH 9.6) ile yapılarak, 96 gözlü pleytin (NUNC, 269620, Denmark) her kuyucuğuna 100 µl olarak konuldu. Pleytler, %0.05 Tween ilaveli PBS (T-PBS) ile üç kez yıkandı ve ardından pleytlerin bloklanması amacı ile %5 süttezu, %0.05 Tween içeren PBS (BLOTTO) solüsyonu her bir kuyucuğa 350 µl konularak, pleytler oda ısısında iki saat süre ile bloklandı. Daha sonra T-PBS içinde 1/100 olarak dilüe edilen pozitif ve negatif kontrol ve test serumları, ilgili kuyucuklara 100 µl olarak konuldu. Pleytler oda ısısında bir saat süre ile bekletildi.

Yıkama işlemi yine üç kez uygulandıktan sonra HRPO ile işaretli rekombinant A/G konjugatı 1:10000 oranında T-PBS (Pierce 32490) içinde dilüe edilerek her kuyucuğa 100 µl olarak eklendi. Yıkama işlemlerinin ardından üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.1 M sitrat tamponu (pH 5.5) içinde 2 µg ortho-phenylenediamine ve %0.03 H₂O₂) ilave edildi. Pleytler oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 100 µl 4N H₂SO₄ ilave edilerek pleytler otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 490 nm'de absorbans değerleri okunarak kaydedildi. Negatif serum OD'lerini ortalamasına 3X standart deviasyon (SD) değeri eklenerek ELISA eşik değeri belirlendi.

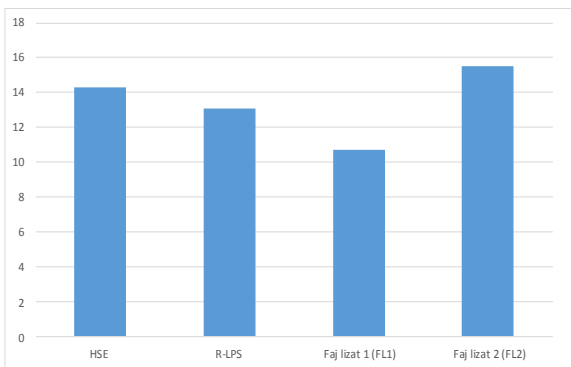
İstatistiksel analiz: Antijen grupları arasındaki pozitiflik oranları bakımından farklılığın önem kontrolleri Pearson χ^2 analizi ile değerlendirildi. Verilerin gösterimi için n (%) tanımlayıcı istatistikleri kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizleri, IBM SPSS Statistics V.20 istatistik paket programı ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P<0.05 alınarak belirlendi.

Bulgular

84 serum örneğinin farklı antijenler için vermiş olduğu ELISA sonuçları, Tablo 1 ve Şekil 1 de gösterilmektedir.

Tablo 1. In house ELISA'da kullanılan test antijenlerinin *B. ovis* antikolarını belirleme oranları

Antijen	ELISA pozitif n (%)	ELISA negatif n (%)	Toplam	P değeri
HSE	12 (14.3)	72 (85.7)	84	>0.05
R-LPS	11 (13.1)	73 (86.9)	84	
Faj lizat 1 (FL1)	9 (10.7)	75 (89.3)	84	
Faj lizat 2 (FL2)	13 (15.5)	71 (84.5)	84	



Şekil 1. *B. ovis* antikolarını saptamada kullanılan farklı antijenlerle elde edilen ELISA pozitiflik oranları (%).

ELISA'da dört farklı antijen ile alınan pozitiflik oranları karşılaştırıldığında, faj lizatı pelet kısmı (FL2) ile daha yüksek oranda pozitiflik elde edildiği görüldü. Ancak *B. ovis*'e karşı oluşan antikoların iELISA ile belirlen-

mesi için kullanılan dört farklı antijen arasındaki farklılık, istatistiki açıdan önemsiz ($\chi^2=0.89$; P>0.05) bulundu.

Tartışma ve Sonuç

B. ovis infeksiyonu, maalesef bildirim zorunlu bir hastalık değildir. Ayrıca bu hastalığın kontrolünde zorunlu bir süreyans da şart koşulmamıştır. Bu durum hastalıkla mücadeleyi zorlaştırmakta ve etkili kontrol önlemlerinin alınmasını engellemektedir. Etkili kontrol önlemlerinin başında ise hastalığın doğru şekilde teşhisinin yapılması gelmektedir. Ancak hastalığın serolojik teşhisinde kullanılan testler komplike olan ve çok sayıda örneğin işlenmesinde çok pratik olmayan KFT ve AGID testleridir. ELISA ise bu yöntemlere göre daha duyarlı ve özgül kabul edilmekte ve çok sayıda örneğin işlenmesine izin verebilecek pratiklikte bir yöntemdir. *B. ovis* infeksiyonlarının her ne kadar halk sağlığı açısından çok önem taşımadığı düşünülse de, büyük ekonomik kayıplara neden olmaları nedeniyle göz ardı edilmemesi gerektiğinden, araştırmacılar kolay uygulanması nedeniyle farklı antijenler kullanarak ELISA'nın duyarlık ve özgüllüğünü arttırmak için çok sayıda çalışma yapmışlardır (Estein ve ark., 2002; Gall ve ark., 2003; Nielsen ve ark., 2007; Escobar ve ark., 2010).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda *B. ovis*'in zoonotik etkisinin aydınlatılamaması ve bu zamana kadar insan vakalarından herhangi bir hastalık bildirimini yapılmamış olması, araştırmacılar arasında bu etkenin zoonotik özelliğinin olmadığı kanaatini oluşturmuştur. Ancak son yıllarda yapılan bir çalışmada etkenin hasta bir insandan izole edildiği ve bu izolasyonun, yapılan bir çalışma ile ilk kez raporlandığı bildirilmiştir (Zagelbaum ve ark., 2017). Bu durum geçmişteki algıya bir soru işareti getirmektedir. Böylece, etkenin potansiyel zoonotik bir ajan olması ihtimali, etken tanısının da önemini bir kat daha arttırmaktadır.

Nielsen ve ark. (2004), *B. abortus* RB 51 suşundan elde edilen rough lipopolisakkaritlerin *B. ovis*, *B. canis* ve *B. abortus* RB51 türlerinin ELISA ile tanısı amacıyla kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Benzer olarak, *B. ovis*'in *B. canis* ile ortak antijenler içerdiği sebebiyle *B. ovis*'ten hazırlanan antijenler ile yapılan ELISA'nın *B. canis* infeksiyonunu da saptayabileceği belirtilmektedir (Lopez ve ark., 2005). Lopez ve ark. (2006), *B. ovis*'e karşı oluşan antikolarla

rin koyun sütlerinde iELISA tekniği ile araştırılmasında, *B. ovis* ve *B. canis* antijenlerinin test antijeni olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, etkenlerin R-LPS yapılarını antijen olarak kullanarak serum ve süt örneklerini test etmişler, sonuçta spesifite ve sensitiviteyi %100 olarak hesaplamışlardır. Barrouin-Melo ve ark. (2007), yaptıkları bir çalışmada ısıda eriyebilir tüm bakteri ekstraktını antijen olarak kullandıkları ELISA için duyarlılığı %95 ve özgüllüğü %91 olarak bulmuşlardır. França ve ark. (2014), *B. ovis* infeksiyonlarını belirlemek için rekombinant bir proteini antijen olarak kullanmışlar ve böylece geliştirdikleri iELISA tekniğinin, %100 sensitivite ve %90.2 spesifite oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Chiarenza ve ark. (2017), beş çiftlikten toplanan 608 koç serumunda yaptıkları çalışmada, *B. ovis* antikoları açısından serumlarda %11.2 seropozitiflik bulmuşlardır. Yine Chiarenza ve ark. (2018), 163 çiftlikten 942 koç serum örneğinde ticari ELISA kiti ile %10.3 oranında *B. ovis* pozitifliği saptamışlardır. Savic ve ark. (2018), 2008-2009 yılları arasında koyun ve koç serum örneğinde yıllara göre %0 ile %19.3 arasında değişen, ortalama %0.89, 2014 ile 2018 yılları arasında ise farklı bölgelerde %0 ile %26 arasında değişen, ortalama %6.15 olarak seroprevalans belirlemişlerdir. Elderbrook ve ark. (2019), antijen olarak HSE kullandıkları ELISA ile hayvan bazında %0.53, sürü bazında ise %22.5 seropozitif sonuç elde etmişlerdir. Benzer olarak Elderbrook ve ark. (2020), 2.276 koyun serum örneğini iki farklı ELISA ile test etmişler ve %0.88 ve %1.10 oranında *B. ovis* antikoları açısından seropozitiflik saptamışlardır. Praud ve ark. (2012), 4599 koç serumunda paralel olarak ticari bir iELISA kiti ve KFT uygulayarak elde ettikleri sonuçlara göre ELISA tekniğinin yüksek duyarlılık ve kabul edilebilir özgüllüğe sahip olmasından dolayı kullanılabilirliğini bildirmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada, kullanılan dört farklı antijen ile iELISA tekniğinin tanısal değeri belirlendi. Farklı antijenler ile elde edilen sonuçlar arasındaki fark, istatistik açıdan önemsiz bulunmuş olup elde edilen %10.7 ile %15.5 arasındaki seropozitiflik oranları, araştırmacıların bildirdiği verilerle uyumludur. Her ne kadar antijenler arası fark önemsiz bulunsada en yüksek pozitiflik elde edilen FL2 antijeninin ELISA için kullanılabilirliği, geniş çaplı saha validasyonlarının ardından belirlenecektir. Ürünün ticari kit haline dönüştürülmesi için sonraki çalışmalarda, ürünün çok daha fazla serum örneği ile, standart yöntemler olan KFT, AGID ve halihazırda mevcut ticari kitlerle karşılaştırılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

B. ovis infeksiyonlarının her ne kadar halk sağlığı açısından çok önem taşımadığı düşünülse de, çiftliklerde neden olduğu atıklar ve ekonomik kayıplar nedeniyle ülke hayvancılığı açısından önemlidir. Türkiye'de *B. ovis* infeksiyonlarının ne sıklıkta görüldüğüne dair bir veri yoktur. Bugüne kadar yapılmış sınırlı

ve lokal çalışmalar, hastalığın ülkemizdeki gerçek durumunu ortaya çıkarmaktan oldukça uzaktır. Bu çalışmada, ELISA için antijen belirlenmesi öncelikli amaç olduğu için az sayıda serum test edilebilmiş ancak azımsanmayacak bir seropozitiflik saptanmıştır. Bu nedenle, hastalığın gerçek yaygınlığının belirlenmesinin gerekliliği düşünülmektedir. Bu amaç için de her bölgeden temin edilecek çok sayıda serumun çalışılması önem arz etmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlarla geliştirilecek ticari bir kit ile büyük öneme sahip epidemiyolojik veriler elde edilecek, ayrıca bulaşmanın azaltılmasıyla kayıpların önlenmesi, büyük ekonomik fayda sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Brucella canis*. In: Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique, 1988; pp. 169-74.
- Barrouin-Melo SM, Poester FP, Riberio MB, Alcantara AC, Aguiar PHP, Nascimento IL, Schaer RE, Nascimento RM, Freire SM. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. Res Vet Sci 2007; 83: 340-6.
- Blasco JM. *Brucella ovis*. Nielsen K, Duncan JR. eds. In: Animal Brucellosis. Florida: CRC Press, 1990; pp. 351-78.
- Chiarenza G, Villari S, Galluzzo P, Alfano M, Pilato V, Vicari D, Stancanelli A. Evaluation of *Brucella ovis* seroprevalance in Sicilian farms (Italy). Lucr. ştiinţ. - Inst. Agron. "Nicolae Bălcescu", Ser C Med vet 2017; 3: 16-9.
- Chiarenza G, Villari S, Galluzzo P, Brigano S, Alfano M, Tagliarini A, Pilato V, Guercio A, Stancanelli A. *Brucella ovis* presence in Sicilian farms (Italy). Int J Infect Dis 2018; 73: 385-6.
- Cho HJ, Nilo L. Diagnostic sensitivity, and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Can J Vet Res 1987; 51 (1): 99-103.
- Corbel MJ. Recent advance in the study of *Brucella* antigen and their serological cross reaction. The Vet Bull 1985; 55: 927-72.
- Elderbrook M, Schumaker B, Cornish T, Peck D, Sondgeroth K. Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. BMC Vet Res 2019; 15(246): 1-12.
- Elderbrook MJ, Schumaker BA, Ueti MW, Almeida MB, Vierea TSWJ, Vierea RFC, Sondgeroth KS. Comparison of 2 ELISAs for detecting exposure to *Brucella ovis*. J Vet Diagn 2020; 32(5): 700-5.

- Erdenliğ Gürbilek S, Keskin O, Tel OY. The first report of *Brucella ovis* infection in a ram in Turkey. İkinci Uluslararası Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 16-19 Ekim, 2018; Antalya-Türkiye.
- Escobar GI, Boeri EJ, Ayala SM, Lucero NE. The feasibility of using antigens prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. Rev Argent Microbiol 2010; 42: 35-40.
- Estein SM, Baldi PC, Bowden RA. Comparison of serological tests based on outer membrane or internal antigens for detecting antibodies to *Brucella ovis* in infected flocks. J Vet Diagn Invest 2002; 14: 407-11.
- França SA, Mol JPS, Costa EA, Silva APC, Xavier MN, Tsolis RM, Reis JKP, Paixão TA, Santos RL. Indirect ELISA for diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. Arq Bras Med Vet Zootec 2014; 66 (6): 1695-702.
- Gall D, Nielsen K, Vigliocco A, Smith P, Perez B, Rojas X, Robles C. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. Small Rumin Res 2003; 48: 173-9.
- Lopez G, Ayala SM, Escobar GI, Lucero NE. Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. Vet Microbiol 2005; 105: 181-7.
- Lopez G, Escobar GI, Ayala SM, Lucero NE. Detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep milk using *B. ovis* and *B. canis* antigen. Vet Microbiol 2006; 116: 232-8.
- Moreno E, Jones LM, Berman DT. Immunochemical characterization of Rough *Brucella* lipopolysaccharides. Infect Immun 1984; 43(3): 779-82.
- Myers DM, Jones LM, Varela-Diaz VM. Studies of antigen for complement fixation and gel diffusion test in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. Appl Microbiol 1972; 23 (5): 894-902.
- Nielsen K, Smith P, Conde S, Dragide Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, Mu-enks Q, Rojas X, Perez B, Samartino L, Silva P, Tollersrud T, Lolley M. Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence polarization assay. J Immunoass Immunoch 2004; 25 (2): 171-82.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Rojas X, Perez B, Conde S, Samartino L, Robles C. Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by indirect enzyme immunoassay. J Immunoass Immunoch 2007; 28: 243-50.
- OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021 Chapter 3.8.7. Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.07_OVINE_EPID.pdf; Accessed Date: 15.12. 2021.
- De Oliveira MZ, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, Barrouin-Melo SM. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Res Vet Sci 2011; 90(3): 425-31.
- Praud A, Champion JL, Corde Y, Drapeau A, Meyer L, Garin-Bastuji B. Assessment of the diagnostic sensitivity and specificity of an indirect ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. BMC Vet Res 2012; 8(68): 1-7.
- Saxena HM, Raj S. A novel immunotherapy of Brucellosis in cows monitored non invasively through a specific biomarker. PLoS Negl Trop Dis 2018; 12(4): e0006393.
- Savić S, Stošić MZ, Pušić I, Polaček V, Grgić Z, Marčić D, Dačić M, Bugarski D. Seroprevalence and spreading of *Brucella ovis* in South Bačka and Srem district. Vet Arh 2018; 11(2): 89-101.
- Tel OY, Gürbilek SE, Keskin O. The evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay using antigens prepared from *Brucella abortus* RB51 and *Brucella canis* M (-) variant strains for serologic diagnosis of *Brucella ovis* infection. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2016; 22(11): 63-7.
- Türütoğlu H. Detection of *Brucella ovis* infection in rams in the Konya region by microcomplement fixation tests. Veterinarium 1992; 3(2): 3-6.
- Uçan US, Aras Z. Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in rams from some flocks in the provinces Konya and Sivas. Eurasian J Vet Sci 2007; 23: 35-8.
- Worthington RW, Weddell W, Penrose ME. A comparison of three serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. N Z Vet J 1984; 32: 58-60.
- Yi, EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. Analyst Apr 2000; 125(4): 651-6.
- Zagelbaum NK, Sayegh GP, Vernatter JN. First case of *Brucella ovis* in human. New York Chapter ACP, Annual Scientific Meeting, Medical Student Clinical Vignette, Poster Presentation. June 3, 2017; New York-The USA.

Zoha SJ, Carmicheal LE. Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. Am J Vet Res 1982; 43: 171-4.

