

SIĞIR BRUCELLOSIS'İNİN SERUM AGLUTINASYON, KOMPLEMENT FIKZASYON VE İMMUNOCOMB TESTLERİYLE TEŞHİSİ

THE DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS WITH SERUM AGGLUTINATION, COMPLEMENT FIXATION AND IMMUNOCOB TESTS

*Hakan YARDIMCI **

*Ömer ESENDAL **

*Nejat AYDIN **

ÖZET

Bu çalışmada, sığırlarda brucella infeksiyonuna karşı oluşan spesifik antikorların ortaya konulmasında rutin olarak kullanılan Serum Aglutinasyon (SAT) ve Komplement Fikzasyon (CFT) testlerinin yanısıra enzim immunoassay prensibi ile çalışan ticari immunocomb test (IC) kitinin rutin uygulamaya dahil edilip edilemeyeceği araştırıldı.

Abort yapmış veya brucella şüpheli 68 sığırın kan serumları SAT, CFT ve IC testleri ile değerlendirildi. Sırasıyla, 38 (%56), 28 (%41) ve 38 (%56) pozitif serum belirlendi. Buna göre, pozitifleri belirlemede IC=SAT>CFT sırası elde edildi.

Sığır brucellosis'nin serolojik teşhisinde, değişik antikor grupları (IgM, IgG) ile çalışan konvansiyonel testler (SAT, CFT, vs) yanısıra immunocomb gibi duyarlı, pratik, çabuk ve saha koşullarında da yararlanılabilen bir testin de kullanılmasının, infeksiyonun teşhisinde yararlı olacağı sonucuna varıldı.

SUMMARY

In this study, the use, efficacy and reliability of the commercial ImmunoComb test kit, which works according to the enzyme immunoassay principle, together with other serological tests such as SAT and CFT in the detection of specific antibodies against bovine brucellosis were investigated.

A total of 68 bovine sera obtained from brucellosis suspected as well as

*A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

aborted cattle were examined with SAT,CFT and IC.38 (56%), 28 (41%) and 38 (56%) sera were proved to be positive, respectively. Therefore, IC=SAT>CFT result was obtained in the detection of specific antibodies.

As a result, the use of IC, which is a sensitive, practical and rapid method, together with other conventional tests working with different antibody groups (IgM,IgG) such as SAT and CFT, was proved to be beneficial in the diagnosis of the infection.

GİRİŞ

Brucellosis, genellikle, dişi hayvanlarda (sığır, koyun, keçi, domuz, vs) genital organlara yerleşerek yavru atımına, infertiliteye ve mastitise, erkeklerde de orşitise neden olan kronik seyirli, bulaşıcı ve nekrotik yangısel bozukluklarla karakterize olan zoonotik bir enfeksiyondur.

Sığır brucellosis'nin etkeni çoğunlukla Brucella abortus ve bazen de Brucella melitensis'tir. Antijenik olarak ortak köponentlere sahip her iki etken de Gram negatif, hareketsiz ve sporsuz bakterilerdir (10). Hastalık dünyanın hemen bütün ülkelerinde görülmektedir. Özellikle, yavru atmalarından dolayı meydana gelen ekonomik kayıplar çok fazladır (5).

Gerek hayvan ve gerekse insanlarda brucellosis'de görülen ve atipik bir özellik gösteren klinik belirtiler enfeksiyonu tanımak için yeterli olmadığından hastalığın teşhisi direkt ve indirekt metodlarla yapılır. Etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu kesin teşhis için önemli ise de çok sayıda hayvan söz konusu olduğu zaman kültürel metodların uygulanması pratik olmaktan çıkar. Ayrıca, birçok nedenden dolayı infekte hayvanlardan her zaman için etken izole edilmeyebilir. Bu nedenlerle, brucellosis'in kontrol ve eradikasyon programlarının çoğu sistematik serolojik testlerle (SAT,CFT,ELISA,rose bengal, plate test, vs.) reaktör hayvanların belirlenmesi ve ayıklanması esasına dayanır (13).

Sığır brucellosisinin tanısında kullanılan konvansiyonel testlerden SAT ve CFT farklı immunglobulin sınıfları ile çalıştıklarından (SAT-IgM,IgG2 ve CFT-IgG1,IgM), dolayısıyla, spesifik bir immunglobulin sınıfını saptayamadıklarından, yanlış pozitif veya negatif reaksiyonlar (prozon fenomeni, hemoliz, antikomplementer aktivite, vs) verebildiklerinden, çok sayıda materyalle yapılan çalışmalarda fazla miktarda tüp, pipet, vs gerektirdiklerinden dolayı bazı dezavantajlara sahiptirler (9,15,16). Son yıllarda, brucellosis'in tanısında kullanılmaya başlayan ELISA ise istenilen immunglobulin sınıfının (IgG,IgM,IgA,vs) taranmasına olanak sağlaması, sekonder bağlanma testlerinde (SAT,CFT,vs) meydana gelen spesifik antikorların düzeyi ile ilgili sorunların

olmaması, çok sayıda örneği 24 saatten az bir sürede değerlendirmesi gibi nedenlerle beraber kullanılmıştır (6,7,8).

ELISA ile benzer prensiplere sahip olan EIA (enzim immunassay) teknikleri, son yıllarda sığır brucellosis'inin teşhisinde ticari kit olarak kullanılmaya başlamıştır. Katı faz immunassay prensibine göre çalışan immunocomb (IC) test kiti, birçok bakteriyel ve viral etkene (brusella, klamidy, mikoplasma, newcastle, infeksiyöz bronşitis, gumboro,vs) karşı oluşan antikorları saptayabilmektedir (3,14). Brucella antijenleri ile duyarlılaştırılan immunocomb dişleri enzim-immunassay yöntemiyle brucella etkenine karşı oluşan antikorları yakalayabilmektedir. İlave ekipman veya reaktife ihtiyaç duymadan saha veya laboratuvar koşullarında çalışabilecek şekilde dizayn edilmiş olan immunocomb test kiti kan veya serumda bulunan spesifik antikorları kısa bir süre içerisinde (35 dakika) ortaya koyabilmektedir (4).

Bu çalışmanın amacı, sığırlarda brucella infeksiyonuna karşı oluşan spesifik antikorların ortaya konulmasında rutin olarak kullanılan SAT ve CFT testlerinin yanısıra, enzim immunassay persibi ile çalışan ticari immunocomb test kitinin rutin uygulamaya dahil edilip edilemeyeceğinin araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Serum Örenkleri: Bu çalışmada A.Ü.Veteriner Fakültesi ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Etlik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsüne abort yapmış veya brucella şüpheli sığırlardan alınarak gönderilen 68 adet kan serumu kullanıldı.

Pozitif Kontrol Serum: Pozitif kontrol serumu olarak A.Ü.Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen yüksek titreli liyofilize B.abortus pozitif serumdan yararlanıldı.

Negatif Kontrol Serum: Klinik olarak sağlıklı bir sığırdan alınan SAT ve CFT titreleri negatif olan bir serum negatif kontrol serumu olarak kullanıldı.

Antijenler

Serum Aglutinasyon Test Antijeni: Bu testte Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsünden temin edilen standart B.abortus tüp aglutinasyon antijeni kullanıldı.

Komplement Fiksasyon Antijeni: Test serumlarının CFT titrelerini saptamak amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından üretilen standart B.abortus CFT antijeni kullanıldı.

İmmunoComb Test Kiti: Çalışmada, test serumlarının Brucella antikorları yönünden taranmasında Pethask firmasından (Kocaeli/Türkiye) temin edilen ve Biogal (Galed Lab./İsrail) firmasınca üretilen immunocomb test kiti kullanıldı.

Serum Aglutinasyon Testi: Bu test SAT antijeni ile Alton ve ark.'ın (1) bildirdikleri yöntem göre yapıldı. İnkubasyon süresi sonunda en son dantelanın görüldüğü test tüpündeki serum sulandırması serumun antikor titresi olarak belirlendi. Aglutinasyon derecesi üst sıvının berraklığına göre 4+,3+,2+,+ ve negatif olarak gözle değerlendirildi. SAT titresi 1/40 ve üstü olan aşısızlar ile 1/80 ve üstü olan aşılılar pozitif olarak kabul edildi.

Komplement Fikzasyon Testi: Bu test standart komplement fikzasyon test antijeni kullanılarak Alton ve ark.'ın (1) bildirdikleri yöntem göre sıcakta, makro dilüsyon tekniği ile yapıldı. 1/10 ve üzeri titreler pozitif kabul edildi.

İmmunoComb Testi: İmmunoComb testi üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı (4).

BULGULAR

Serum Aglutinasyon Testi (SAT): Çalışmada kullanılan 68 adet sığır kan serumunun SAT ile muayenesinde 38 adet (%56) pozitif ve 30 adet (%44) negatif bulundu (Tablo 1).

Komplement Fikzasyon Testi (CFT): CFT ile taranan 68 sığır kan serumunun 28'i (%41) pozitif ve 40'ı (%59) negatif bulundu (Tablo-1).

İmmunoComb Testi (IC): IC testi ile incelenen 68 sığır kan serumunun 38'i (%56) pozitif ve 30'u (%44) negatif bulundu (Tablo-1,Şekil-1)

SAT,CFT ve IC ile 68 serum için elde edilen pozitif ve negatif sonuçlar sayısal olarak tablolarda gösterildi (Tablo-2,3,4,5).

Tablo-1: SAT,CFT ve IC sonuçlarının karşılaştırılması

	+	-
SAT	38 (%56)	30 (%44)
CFT	28 (%41)	40 (%59)
IC	38 (%56)	30 (%44)

Tablo-2: SAT ve CFT sonuçlarının IC sonuçları ile karşılaştırılması

		+	IC	-
SAT	+	34 (%50)		2 (%3)
	-	0 (%0)		28 (%41)
CFT	+	28 (%41)		0 (%0)
	-	10 (%15)		30 (%44)

Tablo-3: Ortak SAT ve CFT sonuçlarının IC sonuçları ile karşılaştırması

		+	IC	-
SAT ve CFT	+	28 (%41)		0 (%0)
	-	0 (%0)		28 (%41)

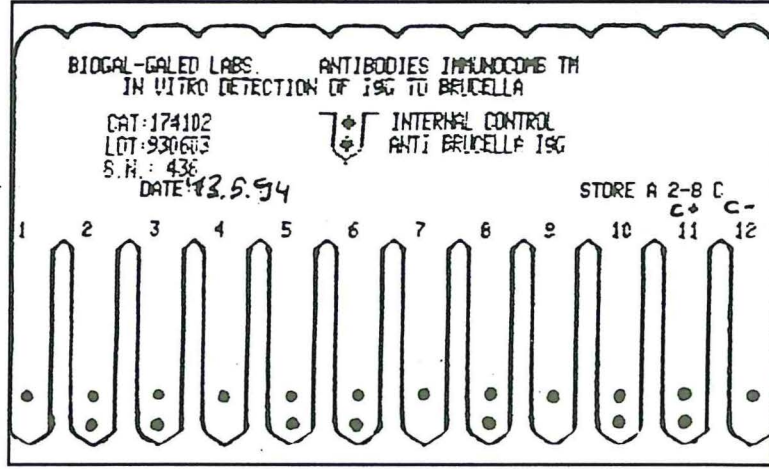
Tablo-4: Ortak SAT ve IC sonuçlarının CFT sonuçları ile karşılaştırması

		+	CFT	-
SAT ve IC	+	28 (%41)		0 (%0)
	-	0 (%0)		28 (%41)

Tablo-5: Ortak IC ve CFT sonuçlarının SAT sonuçları ile karşılaştırması

		+	SAT	-
IC ve CFT	+	28 (%41)		0 (%0)
	-	2 (%0)		28 (%41)

Şekil-1: Immuno Comb Testi



TARTIŞMA VE SONUÇ

Brucellosis, uzun yıllardan beri bilinen, eradikasyonu güç, zoonotik bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde bile tam olarak eradike edilememiştir. Hastalık ulusal ekonomiye etkileyen kayıpları (atık yavrular, ölümler, döl ve süt veriminde azalmalar, kısırılık, vs) yanısıra insan sağlığı yönünden de büyük önem taşımaktadır.

İnfeksiyonun teşhisinde direkt yöntemlerin (etkenin izolasyon ve identifikasyonu) değeri çok fazla olmasına karşın yavru atmış hayvanları saptamak ve bunlardan materyal almak her zaman mümkün değildir. Böyle durumlarda indirekt yöntemlerden (serolojik ve allerjik testler) fazlaca yararlanılmaktadır. Serolojik testler (SAT,CFT,ELISA,vs) çabuk ve pratik olmaları yanısıra, kısa zamanda fazla materyali değerlendirmeye olanak sağlamaları gibi nedenlerle daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Allerjik testler bazen yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlar vermeleri nedeni ile, serolojik testler daha güvenle kullanılmaktadır (5).

Sığırlarda daha çok B.abortus infeksiyonuna rastlanılmaktadır. Bu infeksiyonun serolojik testlerle ortaya konulması üzerinde pek çok araştırma bulunmaktadır (2,11). Özellikle, SAT ve CFT sığır brucellosis'inin teşhisinde rutin olarak kullanılan testlerdir (1,12). Son yıllarda, ELISA'da infeksiyonun teşhisinde kullanılmaya başlamıştır. Ancak, özellikle testin standardizasyonu ELISA'yı uygulayan laboratuvara göre değiştiğinden sonucun pozitif ya da negatif olması da yine o laboratuvar koşullarında değerlendirilmektedir (17).

İmmunoComb testi de son yıllarda birçok infeksiyöz hastalığın teşhisi için kullanıldığı gibi, sığır brucellosis'inin teşhisi için de ticari bir Enzim immunassay kiti olarak piyasaya sürülmüş olup özellikle, ELISA ve diğer konvansiyonel testlerdeki (CFT,SAT) birçok olumsuzluğu ortadan kaldıracabilecek niteliktedir (3,4). Standart bir test olması, saha koşullarında da uygulanıp sonucun sahada alınabilmesi, kısa sürede (35 dakika) sonuç vermesi ve kendi ekipmanı dışında herhangi bir cihaza ihtiyaç göstermemesi gibi nedenlerle hastalığın teşhisine yeni bir boyut getireceği göz ardı edilmeyecek bir gerçektir.

Yapılan kaynak taramasında immunocomb ile sığır brucellosis'i üzerinde yapılmış çalışmaya ait herhangi bir yayına rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, abort yapmış veya brucella şüpheli 18'i B.abortus S19 aşısı ile aşı 68 sığırdan kan serumu alınarak SAT,CFT ve IC testleriyle incelendi. SAT sonuçları değerlendirilirken aşısızlarda 1/40 ve aşı 1/80 ve üzerindeki titreler pozitif, CFT'de 1/10 ve üzeri pozitif kabul edildi. Buna göre, toplam 68 serum için SAT, CFT ve IC testlerinde sırasıyla 38 (%56), 28 (%41) ve 38 (%56) pozitif sonuç alındı (Tablo-1). Buna göre pozitifleri saptamada IC=SAT>CFT sırası elde edildi. Ayrıca, incelenen 68 serumun 28'inde (%41) her 3 test pozitif ve yine 28'inde (%41) her 3 test negatif bulundu. Yalnız iki serum örneğinde (%3) IC ve CFT negatif iken SAT pozitif sonuç verdi (Tablo-2,3,4,5).

Elde edilen sonuçlar bu çalışmada immunocomb testinin pozitifleri belirlemede SAT ile büyük ölçüde paralellik gösterdiğini ispatlamaktadır. Ancak, CFT ile arasında %15 oranında bir farklılık vardır. Bu durum, serumların alındığı sırada hayvanların aşı 1 ya da aşı 2 olmaları, serumların alındığı sırada hayvanların hastalığın akut ya da kronik devresinde bulunması ve buna bağlı olarak da sığırların kanlarında farklı immunglobulin sınıflarını (IgM,IgG1,IgG2) farklı miktarlarda bulundurmalarından ileri gelebilir.

Buna göre, değişik immunglobulin sınıfları ile çalışan konvansiyonel testler (SAT,CFT,vs) yanısıra, immunocomb gibi duyarlı, pratik, çabuk ve saha koşullarında da yararlanılabilen, ancak bu testlere göre daha pahalı olan böyle bir testin de, rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılmasının, daha fazla reaktörü ortaya koyması ve diğer testleri desteklemesi açısından yararlı olacağı bir gerçektir.

KAYNAKLAR

- 1- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E. (1975): Laboratory techniques in brucellosis. 2th ed., World Health Organization, Monograph Series, No.55, Geneva.
- 2- ANON (1986) : Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis. WHO/ Technical Report, 6th Report, Series No.740, Genova.
- 3- ANON (1994): Kanatlı ve çiftlik hayvanlarının bazı hastalıklarında pratik teşhis metodlarıyla ilgili yeni ürünler. Pethast A.P., Biogal (Galed Lab.), İsrail.
- 4- ANON (1994): ImmunoComb-Sığır brucella antikor test kiti kullanma talimatları. Pethast A.P., Biogal (Galed Lab.), İsrail.
- 5- Arda, M., Minbay, A. ve Aydın, N. (1982): Özel mikrobiyoloji, bakteriyel enfeksiyöz hastalıklar. A.Ü. Basımevi, A.Ü. Vet. Fak. Yay., No.386, Ders Kitabı: 284, Ankara.
- 6- Aydın, N., Bisping, W., Akay, Ö. und Kirpal, G. (1988): Untersuchungen zum vorkommen boviner brucellose in der Turkei und bewertung der immunnisierendern wirkung zweier vakzinen. Berl. Münch. Tierarztl. Wschr., 101:109-113.
- 7- Byrd, J.W., Heck, F.C. and Hidalgo, R.J. (1979): Evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay for detecting Brucella abortus antibodies. Am.J. Vet. Res., 40(6): 896-898.
- 8- Cargill, C., Lee, K. and Clarke, I. (1985): Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in a bovine brucellosis eradication program. Aust. Vet. J., 62(2):49-51.
- 9- Chappel, R., McNaught, D.J., Bourke, J.A. and Allan, G.S. (1978): The diagnostic efficiency of some serological tests for bovine brucellosis. J. Hyg. Camb., 80:373-383.
- 10- Corbel, M.J. and Brinley-Morgan, W.J. (1984): Genus brucella Meyer and Shaw 1920, 173^{AL} in: Krieg, N.R.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore/London, Williams and Wilkins, Volume 1, pp.377-378.
- 11- Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J. and Forbes, L.B. (1986) : A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. Can. Vet. Res., 50:485-433.

12- Heck,F.C.Williams,J.D.,Crawford,R.P. and Flowers,A.I.: Comparison of serological methods for the detection of B.abortus antibodies in sera from vaccinated and non-vaccinated cattle.J.Hyg. Camb.,83:491-499.

13- Nicoletti,P.(1980): The epidemiology of bovine brucellosis. Adv.Vet.Sci.Comp.Path.,24:69-97.

14- Rivetz,B.,Weisman,Y,Fish,F.and Herzberg,M.(1985): Evaluation of a novel rapid kit for the visual detection of newcastle disease virus antibodies. Avian Dis.,29(4):929-942.

15- Sutherland, S.S.(1980): Immunology of bovine brucellosis. Vet.Bull.,50:359-368.

16- Tizard,I.(1983): An introduction to veterinary immunology.2th ed.,W.B.Saunders Co.,Philadelphia.

17- Voller,A.,Bidwell,D.E. and Bartlett,A.(1979): The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).Dynatech Europa Borough.House, London.