

## **Sığır Brusellozis'inin Allerjik Deri Testleri ile Teşhisi Üzerinde Çalışmalar <sup>1</sup>**

Özkan ASLANTAŞ\*

<sup>1</sup> Bu çalışma aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir.

\* Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antakya-HATAY, TÜRKİYE

**Yayın Kodu: 2006/16-A**

### **Özet**

Bu araştırma, allerjik deri testinin sığır brusellozis'inin teşhisinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Bu amaçla, iki farklı Brucella suşundan değişik metotlarla hazırlanan iki allerjen (Brucellin INRA ve Brucellin) üç farklı gruptaki (enfekte, sağlıklı ve aşılı) hayvanlarda etkisi Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Agglütinasyon Testi (SAT), Rivanol Agglütinasyon Testi (RivA) ve Komplemant Fiksasyon Testi (KFT) kullanılarak araştırıldı. Enfekte gruptaki hayvanlarda iki allerjen birlikte değerlendirildiğinde %77, RBPT, SAT, RivA ve KFT'leriyle sırasıyla %70, %85, %88 ve %89 oranında pozitif reaksiyon elde edildi. Aşılanmış gruptaki hayvanlarda iki allerjen birlikte değerlendirildiğinde %66, RBPT, SAT, RivA ve KFT'leriyle sırasıyla %8, %8, %8 ve %6 oranında pozitif reaksiyon elde edildi. Sağlıklı ve aşılanmamış gruptaki hayvanların iki allerjen ile %3'ü pozitif bulunurken, serolojik testlerde negatif bulundu. Sonuç olarak, allerjik deri testlerinin sığır brusellozis'inin teşhisinde serolojik testlerle birlikte sahada kullanılabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar sözcükler:** Brusellozis, allerjik deri testi, sığır

### **Investigations on Diagnosis of Bovine Brucellosis by Allergic Skin Tests**

#### **Summary**

This study was conducted in order to investigate possibility of use of allergic test in the diagnosis of bovine brucellosis. For this aim, two allergens (Brucellin INRA and Brucellin) prepared using two different methods on the cattle of three groups (healthy, vaccinated and infected) were investigated using Rose Bengal Plate Test (RBPT), Serum Agglutination Test (SAT), Rivanol Agglutination Test (RivA) and Complement Fixation Test (CFT).

When two allergen tests were considered together, 77% positive reactions were obtained in infected group. In this group, positive reactions at 70%, 85%, 88% and 89% were obtained respectively from RBPT, SAT, RivA and CFT. In vaccinated group, 66% positive results were obtained by two allergens, whereas seropositive results at 8%, 8%, 8% and 6% was obtained respectively from RBPT, SAT, RivA and CFT. While 3% positive results were determined in healthy and unvaccinated group, negative results were obtained in all serological tests.

As a result, it was concluded that allergic skin test could be used for the diagnosis of bovine brucellosis in combination with serological test in the field.

**Keywords:** Brucellosis, allergic skin test, cattle

---

#### **İletişim (Correspondence)**

Phone: +90 326 2455845/1523

e-mail: aslantas@mku.edu.tr



## GİRİŞ

Brusellozis, sığır, koyun, keçi, domuz gibi hayvanlarda genital organlara yerleşerek yavru atma, kısırılık, mastitis, arthritis ve orşitise neden olan zoonotik bir enfeksiyondur<sup>1</sup>.

Brusellozis'in tanısı klinik materyallerden etken izolasyonu (*Brucella abortus*) veya etkene karşı oluşan spesifik immün yanıtın saptanması ile yapılmaktadır. Ancak, enfekte sığırlardan her zaman etken izolasyonu yapılamadığı gibi, serolojik testlerde de şüpheli veya yanlış negatif sonuçlar elde edilebilmektedir<sup>2,3</sup>. Bu amaçla, kültürel ve serolojik incelemelerde negatif veya şüpheli sonuçların alındığı enfekte sürülerde gerçek enfekte sığırların tespiti amacıyla oldukça spesifik, ucuz ve uygulanması kolay allerjik deri testleri geliştirilmiştir<sup>3-6</sup>.

Evcil hayvanlarda brusellozis'in tanısı amacıyla farklı brucella suşlarından değişik metot ve isimlerle üretilen allerjenler kullanılmıştır<sup>7-9</sup>. Rough brucella suşlarından hazırlanan allerjenlerin antikor yanıtına neden olmaması nedeniyle, Bhongbhibhat ve ark<sup>10</sup> tarafından *Brucella melitensis* B 115 rough suşundan üretilen Brusellin INRA allerjenine çalışmalarda sıklıkla rastlanmaktadır. Ancak, *B. abortus*'un mukoid ve rough suşlarından hazırlanan allerjenlerin *B. abortus* rough suşlarından hazırlanan allerjenlerle karşılaştırıldığında, özellikle, kronik brusellozis olgularını saptamada etkinliğinin daha fazla olduğu bildirilmiştir<sup>7</sup>.

Bu çalışmada, sığır brusellozisinin sahada allerjik deri testleri ile teşhisi, enfekte ve sağlıklı hayvanların ayrımı, serolojik testler kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

**Antijenler:** *Brucella abortus* S99 suşundan hazırlanan Rose Bengal Plate Test ve Brusella Tüp Aglütinasyon Test antijenleri Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Komplement Fikzasyon Test'i ise Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Brusella Laboratuvarı'nda yapıldı.

**Allerjenler:** Bu çalışmada, *Brucella melitensis* B115 rough suşundan hazırlanan Brusellin INRA ve *Brucella abortus*'un mukoid suşundan hazırlanan Brusellin allerjeni kullanıldı. Brusellin INRA allerjeni Dr.

M. Reichel'den (Central Animal health Laboratory, Upper Hutt/Yeni Zelanda), Brusellin allerjeni ise Dr. Z. Bercovich'ten (Institute For Animal Science and Health, Leystad/Hollanda) temin edildi.

**Hayvan Gruplarının Tespiti:** Kars merkez ve ilçelerinde buzağılama döneminde brusellozis'e bağlı yavru atmaların görüldüğü sığır sürüleri (enfekte grup), ergin *B. abortus* S19 aşısı ile aşıli sağlıklı sığır sürüleri (aşılanmış grup) ve sağlıklı aşısız sürüler (aşılanmamış grup) çalışma materyalini oluşturdu (Tablo 1).

**Tablo 1.** Çalışmada incelenen sığırların yerleşim yerlerine göre dağılımı.

**Table 1.** Distribution of cattle examined in the study according to locations.

Yerleşim Birimi	Hayvanların Brusellozis Yönünden Durumu	Hayvan Sayısı
Ocaklı Köyü/Merkez	Enfekte Grup	15
Değirmendere Köyü/Arpaçay	Enfekte Grup	38
Büyük Çatak Köyü/Susuz	Enfekte Grup	12
Ortakale Köyü/Selim	Enfekte Grup	35
Karakaş Köyü/Merkez	Aşılanmış Grup	31
Azat Köyü/Merkez	Aşılanmış Grup	57
Çamurlu Köyü/Merkez	Aşılanmış Grup	12
Boğazköy/Merkez	Aşılanmamış Grup	100
<b>TOPLAM</b>		<b>300</b>

### Metot

**Allerjik Testlerin Uygulanması ve Değerlendirilmesi:** Allerjen boynun sağ veya sol tarafından normal deri kalınlığı kompasla birkaç kez ölçülüp ortalaması alındıktan sonra 0.1 ml intradermal olarak uygulandı. Allerjenin uygulandığı bölgede 48-72 saat sonra 2 mm ve 2 mm'yi aşan eritem, şişkinlik ve ödem oluşumu pozitif kabul edildi (1,5,13). Kontrol olarak, her gruptaki 10 sığıra aynı miktarda (0.1 ml) steril fizyolojik tuzlu su (FTS) uygulandı.

**Rose Bengal Plate Test (RBPT):** Temiz bir lam üzerine bir damla (0.03 ml) antijen eşit miktar şüpheli serum ile karıştırıldı ve aglütinasyon oluşumu yönünden 4 dakika içinde değerlendirildi<sup>14</sup>.

**Serum Aglütinasyon Test (SAT):** Test edilecek serum örneklerinin %0.5 fenollü fizyolojik tuzlu su ile 1:10'dan 1:640'a kadar iki katlı dilüsyonları yapılarak üzerlerine eşit miktarda *B. abortus* tüp aglütinasyon antijeninden ilave edilerek 37°C'de 18-24 saat inkube edilerek sonuçlar değerlendirildi. Aşısız sığır serumları için  $\geq 1:40$ , aşıli sığır serumları için  $\geq 1:80$  SAT titreleri pozitif kabul edildi<sup>14</sup>.







Enfekte grupta bulunan sığırlarda Brucellin INRA'nın RBPT, SAT, RivA ve KFT'lerine göre sensitivite ve spesifitesi sırasıyla %75.7 - %30.8, %75.6 - %40, %76.1 - %50.0 ve %76.1 - %50.0, Brucellin'in sensitivite ve spesifitesi ise sırasıyla %87.9 - %35.3, %87.5 - %60.0, %95.0 - %75.0 ve %93.0 - %71.4 bulundu.

Allerjik testlerde pozitif ve negatif olarak değerlendirilen enfekte ve aşılı hayvanlardaki deri kalınlıklarının ortalama değerleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

**İstatistik Analiz:** İki allerjen arasında istatistiksel olarak fark önemsiz ( $p>0.05$ ), allerjenler ile serolojik testler arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli ( $p<0.01$ ) bulundu.

**Tablo 3.** Allerjik deri testi uygulanan enfekte ve aşılı sığırlarda ortalama deri kalınlıkları

**Table 3.** Mean skin indurations in vaccinated and infected cattle that allergic skin test performed.

Hayvanın Durumu	Pozitif (mm) $\bar{X}$ SE*		Negatif (mm) $\bar{X}$ SE*	
	Brucellin INRA	Brucellin	Brucellin INRA	Brucellin
Enfekte	12.01±0.332	11.56±0.247	7.73±0.569	8.32±0.588
Aşılı	11.81±0.675	12.93±0.467	7.92±0.276	8.26±0.695

\*SE: Standart Error

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Brusellozis, dünyada yaygın olarak görülen, önemli ekonomik kayıplara neden olan ve insan sağlığını da doğrudan ilgilendiren zoonotik bir enfeksiyondur<sup>1</sup>. Enfeksiyonun teşhisinde bakteriyolojik incelemeler etiyolojik açıdan daha kesin sonuç vermesine rağmen, sürüde atık yapan hayvanların belirlenmesinde ve atık fötüs teminindeki güçlükler etkenin izolasyon ve identifikasyon olasılığını azaltmaktadır. Bu nedenle, epidemiyolojik çalışmalarda serolojik testlerden daha fazla yararlanılmakla birlikte, sürüde subakut ve kronik enfekte hayvanlar bulunduğu serolojik testlerde yanlış negatif veya pozitif sonuçlar alınabilmektedir<sup>8,16</sup>. Bu olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla, araştırmacılar değişik *Brucella* suşlarından farklı metotlar ile hazırladıkları allerjenleri sığır brusellozis'in teşhisi amacıyla sahada serolojik testlerle karşılaştırmalı olarak kullanmışlardır<sup>9,12</sup>. Mac Diarmid ve Hellstrom<sup>4</sup>, KFT ile pozitif olarak saptadıkları 77 sığırın %61.04'ünü, Martrenchar ve ark<sup>12</sup>, 890 Zebu sığırı üzerinde yaptıkları bir çalışmada serolojik testlerle %8.4'ünü, allerjik deri testleri ile %6.4'ünü pozitif

olarak saptamışlardır. Worthington ve ark<sup>9</sup>, *B. abortus* 45/20 rough suşundan iki farklı metotla hazırladıkları Brucellin B ve Brucellin W allerjenlerini ticari Brucellergen allerjeni ile karşılaştırdıkları çalışmalarında; 65 seropozitif hayvanda Brucellin W allerjeni ile 31, Brucellin B allerjeni ile 28 ve Brucellergen allerjeni ile 32 sığırdan pozitiflik saptamışlardır. Bercovich ve ark<sup>5</sup>, 14 sürüye ait toplam 882 süt sığırında serolojik ve allerjik deri testleri ile uygulamışlar, seronegatif 5 sürüde allerjik deri testi ile 20 pozitiflik elde ederken, seropozitif 9 sürüde allerjik deri testi ile 30 seropozitiflik elde etmişlerdir. Araştırmacılar, ayrıca, seronegatif sürüde allerjik deri testi ile pozitif buldukları 7 sığırdan etken izolasyonu yapmışlardır. Bercovich ve Ter Laak<sup>3</sup>, allerjik deri testinin sahada bireysel kullanılabilirliğini saptamak için, KFT ile pozitif olarak saptadıkları 93 sığırın 81'ini allerjik deri testleri pozitiflik saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, allerjik deri testinin sığırlarda bireysel enfeksiyonu saptamada yeterli sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, farklı metotlarla hazırlanan iki değişik allerjenin yavru atmaların görüldüğü sığır sürülerinde etkisi serolojik testler kullanılarak araştırıldı. Enfekte gruptaki hayvanlarda Brucellin INRA ve Brucellin allerjenlerine sırası ile 37 (%74) ve 40 (%80) pozitif allerjik reaksiyon alınırken, KFT'i ile sırasıyla 46 (%92) ve 43 (%86) pozitif reaksiyon elde edildi.

Aşılanmış sığır gruplarında allerjik deri testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri konusunda yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir<sup>4,17</sup>. MacDiarmid ve Hellstrom<sup>4</sup>, *B. abortus* S19 aşısı ile aşılanmış sığırların 14-18 ay, inaktif *B. abortus* 45/20 aşısı ile aşılanmış hayvanların 18 ay boyunca allerjik deri testlerinde pozitif yanıt verdiğini, Fensterbank ve Pardon<sup>17</sup>, *B. abortus* S19 ve 45/20 aşısı ile aşılanmış sığırlara en az iki yıl sonra allerjik deri testlerinin uygulanabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, en az altı ay önce aşılanmış gruptaki hayvanlarda Brucellin INRA ile 29 (%58), Brucellin ile 37 hayvanda (%74) aşuya bağlı reaksiyon alındı. Bu durum, aşılı hayvanlarda allerjik deri testlerinin, aşılamadan sonra iki yıla kadar pozitif yanıt vermesi sebebiyle aşılı sığırlarda allerjik deri testlerinin serolojik testlerle birlikte kullanılması gerektiğini belirten yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir.

Sağlıklı ve aşılanmamış sığırlarda allerjik deri testlerinin spesifitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>4,9,11,13</sup>. MacDiarmid ve Hellstrom<sup>4</sup>, KFT ile seronegatif buldukları 5064 sığıra allerjik deri testi uygulamışlar 1 pozitif ve 3 şüpheli reaksiyon elde etmişlerdir. Wort-



hington ve ark<sup>9</sup>, brusellozis'ten ari sürülere ait 6498 sığırın %0.093'sinde, Bercovich ve ark<sup>11</sup>, brusellozis'ten ari 549 sığırın 11'inde (%2) allerjik deri testi ile pozitif reaksiyon elde etmişlerdir. Pouillot ve ark<sup>13</sup>, Brusellozis'ten ari 20 sürüye ait toplam 2412 sığıra allerjik deri testi uygulamış ve 4 sığırı (%0.17) pozitif bulmuşlardır. Bu çalışmada, sağlıklı ve aşılammamış gruptaki sürülerde serolojik testlerle pozitiflik saptanmamasına karşın Brucellin ile 1 (%2) Brucellin INRA ile 2 (%4) sığırdaki seropozitiflik saptanmıştır.

Bu araştırmanın bulguları ve verileri ışığında, allerjik deri testinin sığır brusellozis'inin gerek sürü bazında gerekse bireysel uygulamasının pratik olması, saha taramalarında pratik uygulaması, kolay ve kısa sürede değerlendirilmesi, enfeksiyondan şüpheli portörler ile yanlış pozitif serolojik reaksiyon veren hayvanları sağlıklı hayvanlardan ayırmak için güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi görülmüştür. Büyük hayvan popülasyonuna sahip olan ülkemizde, Brusellozis konusunda yapılacak epidemiyolojik çalışmalara ve eradikasyon programlarına allerjik deri testlerinin serolojik testlere dahil edilmesinin yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

#### Teşekkür

İlgi ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Erdoğan FİNCİ'ye teşekkür ederim.

#### KAYNAKLAR

- 1 **Güllüce M:** Kars ve çevresinde sığırlarda *Brucella abortus*'a karşı oluşan antikorların ELISA ve diğer serolojik yöntemlerle karşılaştırılması. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Kars, 1993.
- 2 **Corbel JM:** Recent advances in the study of brucella antigens at their serological cross reactions. *Vet Bull*, 55 (12): 927-942, 1985.
- 3 **Bercovich Z, Ter Laak:** An evaluation of the delayed type hypersensitivity test for diagnosing brucellosis in individual cattle: A field study. *Vet Microbiol*, 22, 241-248, 1990.
- 4 **MacDiarmid SC, Hellstrom JS:** An intradermal test for diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. *Prev Vet Med*, 4, 361-369, 1987.
- 5 **Bercovich Z, Ter Laak EA, Van Liaepzig JHH:** Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test. *Prev Vet Med*, 13, 277-285, 1992.
- 6 **Bercovich Z, Muskens JAM:** The sensitizing effect of a *Brucella abortus* antigen in the cattle after repeated intradermal inoculations. *Vet Microbiol*, 51, 83-93, 1996.
- 7 **Bercovich Z, Dekker T, Eger A, Haagsma J:** Comparison of the potency of several Brucella allergenes used to detect brucellosis in cattle. *Vet Res Com*, 20, 141-151, 1996.
- 8 **Kaya O:** Koyun ve keçi brusellozis'inin allerjik deri testleri teşhisi üzerinde çalışmalar. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Konya, 1993.
- 9 **Worthington RW, Weddell W, Neilson FJA:** A practical method for the production of brucella skin test antigen. *N Z Vet J*, 41(1):7-11, 1993.
- 10 **Bhonghibhat N, Elberg SS, Chen TH:** Characterisation of brucella skin test antigens. *J Infect Dis*, 122,70-82, 1970.
- 11 **Bercovich Z, Haagsma J, Van Leipzig H, Taaijke R:** Specificity of the skin delayed type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a brucella allergen. *J Vet Med*, 40, 582-588, 1993.
- 12 **Martrenchar A, Njanpop BM, Yaya A, Njjoya A, Tulasne JJ:** Problems associated with tuberculosis and brucellosis skin-test methods in northern Cameroon. *Prev Vet Med*, 15(2-3):221-229, 1993.
- 13 **Pouillot R, Garin-Bastuji B, Gerbier G, Coche Y, Cau C, Dufour B, Moutou F:** The Brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet Res*, 28(4):365-74, 1997.
- 14 **Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM:** Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA, Paris, 1988.
- 15 **Tizzard I:** Serological assays. *JAVMA*, 181(10):1162-1165, 1982.
- 16 **Kipal G:** Atiologische untersu drangen über den abort bei schafen unter besonderer berucksichtigung des nachweises von brucellar, campylobacter, salmonelen, listerien, leptospien und clamydien, Berlin. *Munch Med Wochenschr*, 100, 405-408, 1987.
- 17 **Fensterbank R, Pardon P:** Diagnostic allergique de la brucellose bovine. I. Conditions d'utilisation d'un allergene proteique purifie: La brucelline. *Ann Rech Vet*, 8(2):187-193, 1997.