

BRUCELOSIS'DE LABORATUVAR TEŞHİSİ, SAĞALTIM ve KORUNMA YÖNTEMLERİ



Prof.Dr. Nejat AYDIN

- İnsan ve hayvanlarda **Brucella** cinsi içerisindeki mikroorganizmalar tarafından oluşturulan **Brucellosis**, genellikle, subakut ve kronik olarak seyreden infeksiyöz bir hastalıktır.
- Hayvanlarda, özellikle, abortuslara ve bazen de infertiliteye neden olan Brucellosis insanlarda daha ziyade, vücut ısısının aralıklı yükselişi, ateş, yorgunluk, romatizma benzeri eklem ve kas ağrılarına neden olan bir zoonotik infeksiyondur.

- İnfeksiyöz hastalıklara yönelik hijyenik önlemlerin alınmasıyla birlikte, hastalıklarla ilgili kontrol çalışmalarının yapılması da göz önünde tutulması gerekir. Zira, hastalık sürüye bir defa girecek olur ise eradikasyon çalışmaları büyük ölçüde güç olmaktadır.
- Bunun yanısıra Brucella etkenlerinin intraselüler karakter taşımaları ve her türlü olumsuz dış etkilere dayanıklı olmaları göz önünde tutulduğunda alınacak önlemlerde ne derece handikap teşkil edeceği kaçınılmazdır.
- Dolayısıyla, bunun gibi eradikasyonu oldukça güç olan infeksiyonlarda sağaltımdan ziyade korunmaya önem verilmesi gerekliliği de açıktır.

- Genellikle, yavru atımından başka klinik belirtiyeye rastlanmayan hastalık, **Campylobacteriosis, Trichomonas fetus, Chlamydia psittaci, mikotik abortuslar, viral abortuslar** ve **gıda zehirlenmeleri** ile karıştırılabilir.
- Bu nedenle kesin teşhis için **laboratuvar muayeneleri** esastır.
- Laboratuvara gönderilen materyallerin muayenesini ise, başlıca 5 aşamada gerçekleştirilebilir.
- Laboratuvar muayeneleri için en çok kullanılan marazi maddeler atık yavruya ait kotiledonlar, f3tal membranlar, f3tusun mide içeriği, f3tus karaciğeri, ayrıca anaya ait vaginal akıntılar, atılmamış plasenta, s3t ve kandır.



1) Bakteriyoskopi:



- Laboratuvara ulaştırılan materyallerden, öncelikle, frotiler hazırlanarak, **Gram, modifiye Ziehl Neelsen, Stamp ve Köster** boyama yöntemleri ile boyamalar yapılarak mikroskop altında etken aranır.
- Özellikle, Stamp boyama yöntemi Chlamydia psittaci, Coxiella burnetti ve Brucella etkenlerini ayırmada önem taşımaktadır.
- Bakteriyoskopide ayrıca, Fluorescein'le hazırlanmış özel konjugatlar ile **direkt Floresans Antikor Testinden** de yararlanılmaktadır.
- Son yıllarda **Ko-aglutinasyon testi** de alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

2) Kültür:

- Gönderilen materyallerden eitli besi yerlerine ekimler yapılarak izolasyona gidilir. Bu amaçla en çok kullanılan besi yerleri, **serumlu Tryptose Agar, Brucella Albimi Agar, Trypticase Soy Buyyon** gibi zenginletirilmi besi yerleridir.
- İlk izolasyonlarda B.abortus için **%10 CO₂'li** atmosferden yararlanılır. Ekim yapılan besi yerlerini içeren petriyeler **37 °C'de 5-7 gün** inkubasyona brakılarak üreyen koloniler Brucella etkenleri yönünden değerlendirilerek identifikasyon için eitli biyokimyasal testlere bavurulur.



3) Hayvan Deneyi:



- Kontamine materyallerden veya şüpheli kolonilerden etken izolasyon ve identifikasyonu için, genellikle, **kobaylardan** yararlanılır.
- Erkek kobaylara periton içi inokulasyon yapıldıktan sonra **3-6 hafta** süre içinde hayvanlar gözlem altında tutularak bu süre içinde kobaylardan kan alınır ve **serolojik testler** uygulanır.
- Ölen veya öldürülen kobayların **nekropsilerinde**, testislerde orşitis (**Straus Reaksiyonu**), lenf düğümlerinde büyüme, dalak ödemi ve karaciğerdeki değişiklikler kaydedilerek bunlardan Brucella için özel zenginleştirilmiş besiyerlerine ekim yapılarak etken izolasyonuna gidilir.

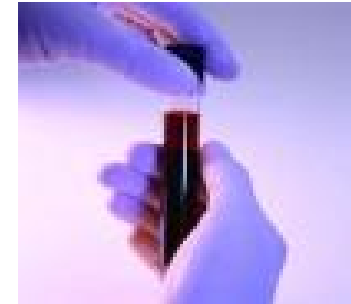
4) Serolojik Testler:

- Brucellosis'in tanısında serolojik testlerin çok büyük önemi vardır. Kesin teşhis koyabilmek için bir serolojik testle yetinmeyip en az ikinci veya üçüncüsünü uygulamak gerekmektedir.
- Serolojik test uygulamasında abort yapmış hayvanlarda, kan veya kan serumunda gerçekleştirilecek testler için gereken kan örnekleri, en erken **üç hafta geçtikten** sonra alınmalıdır.
- Serolojik test uygulamalarını üç ana başlık altında toplamak mümkündür.

A) Kan Serumu Kullanılarak Yapılan Serolojik Testler

- Bu amaçla, hayvanların **vena jugularis'inden** alınan kandan serum elde edilerek aşağıdaki testler uygulanır.

1-Çabuk Aglutinasyon Testi (Plate Test): Kan serumu üzerine boyalı ve konsantre antijenden bir damla konularak 5-10 dakika içinde oluşan aglutinasyon sonucuna göre değerlendirilen bu test, özellikle, sahada genel bir fikir vermesi yönünden önem taşıyan kalitatif bir testtir. Çabuk aglutinasyon testi taze kan ile de uygulanabilmektedir.

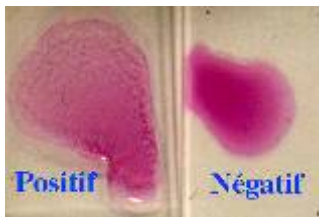


ANTIGEN BRUCELLA
ROSE BENGAL

Diagnosa penyakit brucellosis pada sapi



2-Rose Bengal Plate Test (RBPT): Lam üzerinde uygulanabilen bu testte Rose Bengal ile boyanmış standart antijen kullanılır. Ancak, antijen hazırlamada kullanılan Buffer'in pH'sı 3.6 civarındadır. Bu asidite, serumdaki IgM'lerin aktivitesini önleyerek, **IgG**'lerin, özellikle, IgG1'lerin reaksiyona katılmasına yardımcı olur.



3-Serum Aglutinasyon Testi (SAT): Hastalığın teşhisinde önemli olan temel testlerden birisidir. Genellikle, **erken olguların** ortaya konulmasında yararı bulunan bu testin uygulanmasında ve değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken hususlar önemlidir.

*Bu test, gerek aşılama ve gerekse infeksiyon sonu oluşan spesifik ve ayrıca nonspesifik antikorları belirler ancak ayrımlarını yapamaz.

*Abortuslardan hemen sonra kandaki antikorları saptayamaz. Kronik olgularda ise negatif çalışabilir.

*Ayrıca, kullanılan antijenin hazırlanmasındaki ve uygulanmasındaki aksaklıklar da testi olumsuz yönde etkileyebilir.

4-Komplement Fiksasyon Testi (KBR): Serum aglutinasyon testine oranla, özellikle, **kronik** olgularda daha spesifik bir testtir.

*Ancak, spesifik olmayan ve inkomple antikörlerin araya girdiği durumlarda hemen daima negatiftir. *

*İnfeksiyonun ortaya çıkarılmasında önemli bir test olarak değerini korumakta ise de araştırmacılar, bu **testle birlikte Coombs (Antigulobulin) testinin** uygulanmasıyla daha kesin sonuç alınacağını ileri sürmektedirler.

5-Coombs (Antiglobulin) Testi: Brucella etkenlerine karşı serumda bulunan bazı spesifik **inkomple antikorların** aglutinasyon oluşturmadığı bilinmektedir.

- *Dolayısıyla bu testin uygulanmasındaki amaç, serum aglutinasyon testinde reaksiyon vermeyen bu antikorları ortaya koymaktır.
- *Testin uygulanışında ilk olarak antijen ve şüpheli serum inkubasyona bırakılır, sonra yıkama işlemi yapılarak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır. Sonra bu komplekse türe spesifik antiglobulin eklenir. **Aglutinasyon** şekillenmesi **pozitif** olarak değerlendirilir.

6-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Bu test antikor ya da antijeni saptamak için direkt veya indirekt olarak uygulanabilmektedir.

- *Son yıllarda Brucellosis'in teşhisinde **indirekt ELİSA** daha çok kullanılan duyarlı ve güvenilir bir test olup doğrulama testi olarak da yararlanılmaktadır.
- *Yukarda açıklanan testlere göre **daha spesifik** ve çoğu zaman da duyarlı olan ELISA'dan, özellikle, saha taramalarında yararlanılmaktadır.
- *Bu teknikte tercih edilen konjugata (anti-immunoglobulin) bağlı olarak **tüm immunoglobulin sınıf ve alt sınıfları** ayrı ayrı belirlenebilmektedir.
- *Yakın zamanlarda, monoklonal antikor kullanılarak uygulanan Competitif ELISA'in de Ig sınıflarının saptanması ve aşıklı hayvanları ayırmada yardımcı olan bir test olarak uygulandığı ileri sürülmektedir.



7-Pasif Hemaglutinasyon Testi: Spesifik ve duyarlı olduğu bildirilen bu yöntemden de Brucellosis'in teshisinde yararlanılmaktadır.

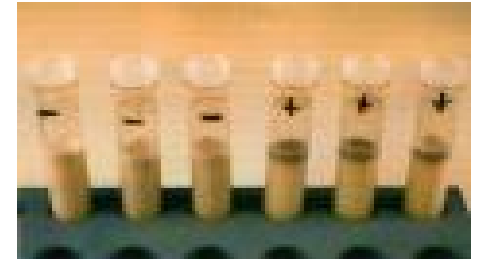
8-Fluoresans Antikor Tekniđi (FAT): Bu testin, özellikle, sığır Brucellosis'inin teşhisinde yarar sağladığı, spesifik ve duyarlı bir test olarak uygulandığı ileri sürülmektedir.

B) Süt ve Süt Serumu ile Yapılan Serolojik Testler

1-Ring Test: Bir saha tarama testi olarak yararlanılan bu test, reaktör sürüleri ortaya koymada öneme sahiptir.

-Bu testin esası sütle çıkartılan antikorların saptanmasıdır.

-**Hematoksilen** veya **tetrazolium**'la boyanmış antijenden 1 ml. süt için 1 damla damlatılarak oda ısısında bekletilir. Şayet süt üzerinde **kırmızı veya mavi renkte bir halka** oluşursa **pozitif** olarak değerlendirilir. Homojen dağılım ise negatiftir.



2-Süt Serumu ile Aglutinasyon Testi:

- Hastalıktan şüpheli hayvanlardan alınan yeterli miktardaki süt örnekleri laboratuvarında **3000 dev/dak ile 10-15 dakika** santrifüje edildikten sonra tortu ve yağ kısmı atılarak sadece süt kısmı alınır.
- Bunun her ml'sine peynir mayası (**rennin**) katılarak **37 °C'de** su banyosunda **6 saat** bekletilir. Berrak olan sıvı alınarak tekrar santrifüje edilir ve bu şekilde elde edilen süt serumu aynen kan serumu gibi işlenir.
- Süt serumu ile aglutinasyon tıpkı kan serumundaki gibi **tüpte** ve **lamda** uygulanabilir. Hastalığın teşhisinde, süt serumu kan serumu kadar değerli değildir.

C) Diğer Testler

1-Vaginal Mukus Aglutinasyon Testi:

Hastalıktan şüpheli ineklerden alınan vaginal mukus, fenollü fizyolojik tuzlu su ve santrifügasyon yardımı ile klarifiye edildikten sonra **yavaş tüp aglutinasyon** testi uygulamak suretiyle değerlendirme yapılır.

2-Sperma ile Aglutinasyon Testi: Erkek hayvanlardan alınan sperma kuvvetlice santrifüje edildikten sonra üst kısım (seminal plazma) alınarak **yavaş tüp aglutinasyon** testine tabi tutularak değerlendirme yapılır.

3-Kas sıvısı ile Aglutinasyon (Myoaglutinasyon):

Atılmış yavrunun kas parçaları ezilip, homojenize edilerek, santrifügasyondan sonra üst sıvı **yavaş tüp aglütinasyon** testinde kullanılır.

4-Bakteriyofaj Testi: Brucella etkenlerinin identifikasyonunda **Tibilisi (Tb)**, **Weybridge**; **Berkeley** ve **Anti Rough** fajlarından yararlanılmaktadır.

- Steril bir pamuk tamponla çizgi halinde kesif bir Brucella suspansiyonundan ekim yapıldıktan sonra üzerinde bir damla faj dilusyonlarından (RTD) konular ve 48 saat 37 °C'de inkubasyondan sonra lize olma durumu gözlenerek değerlendirme yapılır.

5-Allerjik Testler: Bazı ülkelerde sığır, koyun, keçi ve domuz Brucellosis'ini ortaya çıkarmak için allerjik testler kullanılmaktadır.

- Genellikle, **Brucellin** olarak bilinen **allergenlerle** (Brucella lysate, Brucellergen, Melitin, MBP vs.) yapılan bu test daha ziyade sığır, koyun ve keçilerin kuyruk altı derisine 0.1-0.2 ml miktarında uygulanmaktadır. Domuz ve keçilerin kulak üstü ve sığırların koyun derisi altına da 0.5 ml verilmektedir.
- Aşılanmamış sürülerde infeksiyonun belirlenmesinde büyük önem taşıyan bu test, aşıllı ve doğal bir infeksiyon sonucu iyileşen hayvanlarda geçerli olmamaktadır.

- Bahsedilen tüm bu testler dışında konu ile ilgili çalışmalarda kullanılan **Opsonositofajik test** ve **Flokulasyon (Meinieke Reaksiyonu)** testinden de yararlanılmaktadır.
- Son yıllarda **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)** da kullanılan yöntemler arasındadır.

Sağaltım ve Korunma

- Hayvanlarda Brucellosis'in ilaçla sağaltımı uygulanmamaktadır.
- Ancak, koruyucu önlemlerin alınması ve aşılamalar ile hayvanların hastalıktan korunması önem taşımaktadır.

Koruyucu önlemler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1-Sürüye infeksiyonu sokmamak:** Sağlam sürülere infeksiyonu sokmamak için dışarıdan kontrolsüz ve muayenesiz hayvanın konulmaması çok önemlidir.
- 2-Reaktörleri elimine etmek:** Sürülerde bulunan reaktör hayvanlar, serolojik testler aracılığı ile muayene edildikten sonra pozitif oldukları belirlenenler hemen sürüden ayrılmalıdır.

3-Hijyenik önlemler almak: Serolojik olarak hastalığın saptandığı hayvanlar sürüden uzaklaştırılarak barınakların iyi bir dezenfeksiyonu yapılmalıdır.

- Atık yapmış veya hasta hayvanlar derhal ayrılarak, atık materyaller gömülerek veya yakılarak yok edilmelidir.
- İnfekte hayvanların sütleri kullanılmamalı ve kaynatıldıktan sonra imha edilmelidir. Ayrıca, sağıcılar bir hayvandan diğerine geçerken ellerini dezenfektan solusyonlarla yıkamalıdır. İnfekte hayvanlar buzağılara emzirilmemeli ve suni olarak beslenenlere temiz ve mikropsuz süt verilmelidir.
- Yavru atmış hayvanlara müdahale eden Veteriner Hekimlerin de çok dikkatli olmaları gerekir.

4-Hastalık kaynaklarını ortadan kaldırmak:

Hastalıklı hayvanlara ait atık yavru, yavru zarları, plasenta gibi materyaller ahır ve meralardan uzak yerlere götürülerek tekniğine uygun şekilde imha edilmelidir.

5-Periyodik dezenfeksiyon: Hayvan barınakları ve ekipmanlarının düzenli periyotlarda dezenfeksiyonuna özen gösterilmelidir.

6-Hayvanları bağışık kılmak (Aşılamalar):

- Bütün infeksiyöz hastalıklarda olduğu gibi, Brucellosis'e karşı yapay immunité elde etmek amacıyla yaklaşık 50-60 yıldan beri birçok canlı ve ölü virulent veya nonvirulent aşılar geliştirilmiştir.
- Bunları iki kategori içerisinde (aglutinojen ve aglutinojen olmayan) toplamak mümkündür.



A) Aglutinojen aşılar:

Bu grup aşılar canlı ve inaktif aşılar olmak üzere iki şekilde hazırlanırlar.

a) Canlı Aşılar

- **B.abortus S19 aşısı**: B.abortus suşunun S (Smooth) tipi kolonilerinden hazırlanır. Her dozunda (genellikle 5 ml) 60×10^9 bakteri içerir. Liyofilize olan bu aşı bir yıldan fazla dayanıklıdır. 4-6 aylık dişi danalara boyun derisi altına uygulanan bu aşı hayvanda 4.-5. gebeliğe kadar bağışıklık sağlamaktadır. Son yıllarda ergin hayvanların aşılanmasında da kullanılan bir aşıdır.
- **B.melitensis Rev 1 aşısı**: Brucella melitensis'in attenuasyonu ile hazırlanır. Koyun ve keçilere uygulanır. Gebe olmayan dişi koyunlara koç katımından 2 ay önce deri altı yolla uygulanan bu aşı da hayvanlarda uzun süreli bir bağışıklık sağlar.

b) İnaktif Aşılar

B.melitensis H 38 aşısı: Brucella melitensis'den hazırlanmış inaktif ve adjuvantlı bir aşıdır. Genellikle, küçükbaş hayvanlarda uygulama alanı bulmuştur.

Aglutinojen aşılar tek bir enjeksiyonla uzun süreli bir bağışıklık sağlayarak hayvan yaşamının neredeyse tümü boyunca yeterli olması gibi yararları yanısıra bazı dezavantajları da taşımaktadır.

- Bu tür aşılar aşıli organizmada aynen infeksiyon gibi IgM ve IgG tipi antikorların oluşumuna neden olmaktadır. Dolayısıyla Brucella infeksiyonlarında serolojik testlerin değerlendirilmesinde güçlükler ortaya çıkmaktadır.
- Canlı olduklarından uygulayanlar yönünden tehlike oluşturmaktadırlar.

B) Aglutinojen olmayan aşılar:

- Genellikle, etkenin R formunda hazırlanan bu tür aşılar çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle inaktive edildikten sonra adjuvantlı olarak uygulanırlar.

- **B.abortus 45/20 aşısı:** Bu aşı aglutinojen olmayan aşılarda en fazla kullanılan bir aşıdır. B.abortus'un R formundan hazırlanmış olup adjuvantlı olarak sığırlara uygulanmaktadır.
- **B.suis S-2 aşısı:** B.suis biyotip 1 ile ortak özellik gösteren bir suştan hazırlanan atenue bir aşıdır. Oral yolla uygulanmaktadır.

- **B.abortus RB 51 aşısı:** B.abortus'un virulent 2308 suşunun sürekli pasajlanmasıyla elde edilmiş rifampine dirençli mutant bir suştan hazırlanmaktadır.
- **B.abortus PB aşısı:** Brucella'ya karşı hazırlanmış, hiperimmün serumlarla doyurulmuş B.abortus Buck 19 suşundan hazırlanan bu aşı, özellikle infeksiyon sonucu oluşan immunglobulinlerin teşhiste karışmamasında yararlı olmaktadır.

- **Aglutinojen olmayan aşıların** uygulayanlar açısından tehlike arz etmemesi ve infeksiyonlarda teşhisin doğru konulması yönünden yardımcı olmaları gibi **yararları** yanısıra,
- Tek bir enjeksiyonun yeterli olmaması ve uzun süreli bağışıklık sağlayamamaları gibi **dezavantajları** da bulunmaktadır.

Yasal bakımdan Brucellosis,

- İlk defa 1937 yılında **ihbarı mecburi hastalıklar** sınıfına dahil edilerek, bu tarihte **Hayvan Sağlık Zabıtası Kanunu** kapsamına alınmıştır. Daha sonraları da **tazminatlı hastalıklar** içine konulmuştur.
- Günümüzde ise 1995 yılında değiştirilerek yasalaşan **3285 sayılı Hayvan Sağlığı ve Zabıtası Kanunu** hükümlerine göre işlem yapılmaktadır.
- T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü'nce 1984 yılında "**Türkiye Brucellosis Mücadele Projesi**" çerçevesince çalışmalar sürdürülmekte olup Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2004 Yılı Hayvan Hastalık ve Zararlıları ile Mücadele Programı kapsamında ergin hayvanların da B.abortus S19 ve B.melitensis Rev 1 aşısı ile aşılınmaları gibi hastalıkla ilgili diğer uygulamalara devam edilmektedir.

Sonuç olarak,

- Brucellosis'in çeşitli ülkelerdeki ve Türkiye'deki insidens ve prevalansı hakkında bilgi vermek oldukça güçtür.
- Zira hayvan hareketlerinin hem ulusal hem de uluslararası düzeyde yoğun olması, yeterli istatistik bilgilerin alınamaması, dolayısıyla gerçek sonuçların değerlendirilememesi ve bir çok ülkede de bu hastalığa gereken önemin verilmemesi gibi nedenler bu sonucu yaratmaktadır.

- *TEŐEKKÜRLER*

