

KONYA İLİNDE RİSK ALTINDA BULUNAN İNSANLARDA *BRUCELLA CANIS* İNFEKSİYONU SEROPREVALANSI

THE SERO PREVALENCE OF *BRUCELLA CANIS* INFECTION IN A RISKY HUMAN POPULATION IN PROVINCE KONYA

Öznur KÖYLÜ¹, Zeki ARAS², Uçkun Sait UÇAN²

¹Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Kan Merkezi, Meram;

²Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Selçuklu; Konya

Anahtar Sözcükler: *Brucella canis*, seroprevalans, insan infeksiyonu

Keywords: *Brucella canis*, seroprevalence, human infection

Geliş: 01 Aralık 2008

Kabul: 01 Nisan 2009

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, Konya İli'nde Nisan-Ekim 2008'de insanda *Brucella canis* infeksiyonu seroprevalansını saptamak idi. İnsanda *B. canis*'ten ileri gelen brusellozun serolojik tanısı ancak R-tipi antijenin kullanılması ile yapılabilir. Araştırmada toplam 76 serum örneğinde Çabuk Lam Aglütinasyon Testi (ÇLAT), Modifiye Yavaş Aglütinasyon Testi (MYAT) ile R-tipi etkene karşı (*B. canis*) ve Rose Bengal Pleyt Test (RBPT) ve Serum Aglütinasyon Test (SAT) ile de S-tipi etkenlere (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*) karşı antikor yanıtı araştırıldı. Örneklenen riskli popülasyonda *B. canis*'in serolojik sıklığı %9.2; S-tipi etkenlere ait serolojik sıklık ise %0 olarak bulundu. Konya'da *B. canis* infeksiyonu serolojik olarak ilk kez gösterildi.

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the prevalence of *Brucella canis* infection in man in the Konya Province, Turkey, in the April-October 2008 period. The sero-diagnosis of *B. canis* infection in man can only be made by using antigen obtained from R-typed brucella. Antibody responses to R-type agent (*B. canis*) or S-typed agents (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus* or *Brucella suis*) in 76 serum samples were investigated by Rapid Slide Agglutination Test (RSAT) and Modified Plate Agglutination Test (MPAT) for R-typed agent and Rose Bengal Plate Test (RBPT) and Serum Agglutination Test (SAT) for S-typed agents. Seroprevalance of the population in respect to *B. canis* and S-typed Brucellae antibodies were found %9.2 and %0, respectively. This is the first serologic report on *B. canis* infection in man in the Konya Province, Turkey.

GİRİŞ

Brucella canis köpeklerin bruselloz etkeni olup; insana bulaş, infekte köpek veya köpek salgılarıyla temas ile (özellikle abortus dönemi sonrasında) ya da laboratuvar infeksiyonu şeklinde olur (1-3).

İnsanda köpek orijinli brusellozun klinik bulguları S-tipli *Brucella* bakterilerinden ileri gelen bruselloz kliniğine benzer (1, 3). Başarılı tedavi olgularında dahi aylar sonra relapslar görülebilir. Mortalite düşüktür. Tedavi edilmeyen hastalarda gelişecek endokardit veya meninjit komplikasyonları sonucu ölümler görülebilir (%2-5) (4).

Hastalığın tanısında bakteriyolojik izolasyon ve serolojik testler birlikte kullanılmaktadır (1). Serolojik tanıda; Çabuk Lam Aglütinasyon Testi (ÇLAT), 2-Merkaptoetanol Çabuk Lam Aglütinasyon Testi (2-Me ÇLAT), Modifiye Yavaş Aglütinasyon Testi (MYAT), Tüp Aglütinasyon Testi (TAT), 2-Merkaptoetanol Tüp Aglütinasyon Testi (2-Me TAT), Agar Jel İmmünodifüzyon Testi (AGID) ve ELISA testleri yaygın şekilde kullanılmaktadır (4-7).

Klinik bulgularının ortak olmasına rağmen, R tipi *Brucella* etkeninden (*B. canis*) ileri gelen infeksiyonların S tipi *Brucella* etkenlerinden (*Brucella abortus* ve *Brucella*

melitensis) hazırlanan ticari antijenler ile saptanamaması bu infeksiyonun sıklığının düşük belirlenmesinde en önemli etmendir. Bu nedenle, dünyada insandaki *B. canis* infeksiyonlarının sıklığının tahmin edilenden daha yüksek olduğu ileri sürülmektedir (7, 8).

Bu çalışmada Konya İli'nde risk grubunda yer alan mesleklere ait insanlarda *B. canis* antikor düzeylerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kan Serumları ve Antijenler: Çalışmada, kan serumu örnekleme Nisan-Ekim 2008 tarihleri arasında yapıldı. Bu amaçla, Konya İl Merkezi'nde bulunan belediye köpek barınağı çalışanları (18 kişi) ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi sağlık personelinden (58 kişi) herhangi bir sağlık şikayeti olmayan toplam 76 (71 erkek, 5 kadın) kişiden venöz kan (4 ml) örnekleri alındı. Veteriner Fakültesi'ndeki örnekleri kliniklerin (Cerrahi, Jinekoloji, İç Hastalıkları ve Dölerme) akademik personeli ve köpeklerle temas içinde bulunan intörn veteriner hekimlerin kan serumları oluşturdu. Kan örnekleri alınmadan önce bilgilendirme yapıldı ve onay alındı. Alınan kan örnekleri derhal laboratuvara getirilerek, 1000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi ve serumları Eppendorf tüplere alınarak kullanılıncaya kadar -20° C'de saklandı. Çalışmada kullanılan R-tipi etken antijenleri Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda hazırlandı ve serolojik testler aynı laboratuvarında gerçekleştirildi. R tipi antijen, Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nden sağlanan *B. canis* NCTC 10854 suşundan hazırlandı. Ticari SAT ve RBPT antijenleri ise Pendik Veteriner ve Kontrol Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları: Çalışmada pozitif kontrol serumu olarak Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan pozitif köpek serumları (iki köpeğe ait) kullanıldı (Bu serumlar serolojik olarak negatif olan sağlıklı köpeklerin hiperimmünizasyonu ile elde edilmiştir). Negatif kontrol amacıyla köpek teması olmayan sekiz sağlıklı insanın kan serum örnekleri kullanıldı.

Serolojik Testler: Çalışmada ÇLAT, MYAT testleri *B. canis* antikorlarının aranmasında; RBPT (Rose Bengal Plate Testi) ve SAT (Serum Aglutinasyon Testi) ise S-tipi *Brucella* etkenlerine karşı oluşan antikorların aranmasında kullanıldı.

Antijenlerin Hazırlanması

ÇLAT Antijeninin Hazırlanması: Antijen, Lisle ve Carmichael (6)'in bildirdiği yöntemle göre hazırlandı: *B. canis* NCTC 10854 suşunun ilk kültürü yapıldıktan sonra 20 tane petri kabına dökülen besi yerinde (pepton 10 g, NaCl 5 g, agar 20 g, distile su 1000 ml) pasajları yapıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda koloniler 20 ml PBS ile toplanıp 10 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Toplanan pelet aynı işlemle iki kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra pelet 125 g/L oranına uygun şekilde 20 ml PBS ile süspense edildi ve birkaç katlı steril gazlı bezden süzülükten sonra 56° C'de bir saat tutularak inaktive edildi. Elde edilen 20 ml antijen süspansiyonuna, boya solüsyonundan (2 g brillant green ve 1 g kristal viyole 300 ml distile suda çözülürdü) 0.12 ml miktarında (boya son yoğunluğu 6ml/L) eklenerek boyandı ve % 6 antijen hacmi olacak şekilde sulandırılıp cam yünü ile filtre edildi. Son olarak, % 0,01 son konsantrasyon olacak şekilde tiyomersal eklendi ve koyu şişede + 4° C'de muhafaza edildi.

Modifiye Yavaş Aglutinasyon Testi (MYAT) Antijeninin Hazırlanması: Test antijeni, Alton ve ark. (1)'nin bildirdiği yöntemle göre hazırlandı. *Brucella canis* NCTC 10854 suşunun ilk kültürü yapıldıktan sonra 20 tane petri kabına dökülen besiyerinde (pepton 10 g, NaCl 5 g, agar 20 g, distile su 1000 ml) pasajları yapıp 37° C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda elde edilen koloniler 10 ml % 0.06 formalinli fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile toplanıp birkaç katlı steril gazlı bezden süzülükte ve 70° C'de bir saat tutularak inaktive edildi. Süspansiyon soğutulduktan sonra 10 000 devirde 30 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra tortu % 0.5 formalinli PBS ile süspense edildi. Elde edilen antijen, yoğunluğu % 4.5 (v/v) hücre olacak şekilde standardize edildi. Hazırlanan stok antijen süspansiyonu kullanılıncaya kadar + 4° C'de muhafaza edildi.

Testler

Çabuk Lam Aglutinasyon Testi (ÇLAT): Lam üzerine 40, 20, 10 ve 5 µl serum ve aynı miktarlarda antijen damlatılarak kombinasyonlar yapıldı ve en ideal antijen-antikor miktarı belirlendi. En iyi reaksiyonun, 20 µl antijen ile 20 µl serumun iki dakika boyunca karıştırılmasıyla gerçekleştiği saptandı ve testlerde bu miktarlar kullanıldı (6).

Modifiye Yavaş Aglutinasyon Testi (MYAT): Damp ve ark. (5) bildirdiği yöntemle göre yapıldı. U tabanlı mikrop-leytin her bir gözüne 25 µl PBS dağıtıldı. Pleytin ilk kuyucuğuna 25 µl kan serumu ilave edildi ve sonraki

gözlere 25'er µl aktarılarak çift katlı sulandırma elde edildi. Daha sonra tüm gözlere 50 µl *B. canis* antijeni (4.4 ml *B. canis* stok antijeni 100 ml PBS ile sulandırıldı) ilave edildi ve son sulandırmaları 1/6, 1/12, 1/24...1/768 olarak elde edildi. Üstü kapatılan pleytler 37° C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Son iki sıra pozitif ve negatif kontrol olarak bırakıldı. Aglütinasyonun görüldüğü son kuyucuk *reaksiyon titresi* olarak, 1/48 ve üstündeki titreler pozitif, 1/24 ve altındaki titreler ise negatif olarak kabul edildi. Modifiye yavaş aglütinasyon testinin standardizasyonu, aynı antijenin kullanıldığı standart tüp aglütinasyon testi ile karşılaştırılarak bildirildiği şekilde yapıldı (1).

Rose Bengal Plate Testi (RBPT): Toplanan ve soğuk koşullarda muhafaza edilen kan serumları ve antijenin sıcaklıkları, öncelikle oda sıcaklığına (22 ± 4° C) getirildi. Daha sonra bir lam üzerine serum örneğinden bir damla (30 µl) damlatıldı. Üzerine aynı miktarda antijen ilave edilip, yaklaşık 2 cm çapında bir daire oluşturacak şekilde antijen ile serum 4 dakika boyunca karıştırıldı. Süre sonunda aglütinasyonun gerçekleşmesi bruselloz yönünden pozitif olarak değerlendirildi (1).

Serum Aglütinasyon Testi (SAT): Test edilecek serumların, % 0.5 oranında fenol içeren fizyolojik tuzlu su (FTS) ile sulandırmaları yapıp her bir tüpteki 0.5 ml serum sulandırması üzerine 0.5 ml SAT antijeni ilavesiyle 1:10, 1:20,... 1:1280 dilüsyonlar elde edildi. Tüpler 37° C'de 17-24 saat bekletildikten sonra sonuçlar değerlendirilip 1:40 ve daha yüksek titrede 80 IU/ml'ye karşılık olan ++ (%50 berrak) pozitif reaksiyon gösteren serumlar bruselloz yönünden pozitif kabul edildi (1).

İstatistik: Ele edilen değerler Minitap-SPSS paket programı ile analiz edildi ve *t*-testi ile değerlendirildi. İstatistik olarak önemlilik p<0.05 değeri ile belirtildi.

BULGULAR

Konya İl Merkezi'nde bulunan ve Büyükşehir Belediyesi tarafından işletilen köpek barınağında çalışan kişilerden sağlanan toplam 18 kan serum örneğinin, MYAT ve ÇLAT testleri ile yapılan kontrollerinde, serumların üç tanesi her iki test ile de *B. canis* yönünden pozitif bulundu. Onsekiz kan serumunun RBPT ve SAT testleri ile yapılan yoklamalarında ise serumların tamamı negatif bulundu (Tablo 1).

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde görevli sağlık personelinin alınan toplam 58 kan serum örneğinin MYAT, ÇLAT ve RBPT testleri ile yapılan serolojik yoklamalarında ise örneklerin sırasıyla 4, 6 ve 3'ü pozitif olarak saptanırken diğerleri negatif bulundu. Veteriner Fakültesi sağlık personeli kan serumu örneklerinden ÇLAT ile pozitif bulunan 6 örneğin 4'ü MYAT ile de pozitif sonuç verdi (MYAT pozitif veren örneklerin tamamının titreleri 1/48'dir). Örneklerin tamamı SAT ile negatif sonuç verdi (Tablo 1).

Toplam 76 örneğin %9.2'si MYAT ile, %11.8'i ÇLAT ile ve %3.9'u ise RBPT ile pozitif olarak bulundu. Kaynak bazında yapılan incelemede ise, belediye barınak çalışanlarında serolojik pozitiflik MYAT ve ÇLAT ile %16.7 oranında bulunurken Veteriner Fakültesi sağlık personelinde ise MYAT ile %6.9 ve ÇLAT ile %10.3 olarak saptandı. Belediye barınak çalışanları ile Veteriner Fakültesi sağlık personeline ait serolojik sıklık farklılıkları arasında testler yönünden fark önemsiz (*t* testi; p>0.05) bulundu.

TARTIŞMA

Brucella türlerinin konak spesifitesi olmakla birlikte tümü, insan dahil çeşitli hayvan türlerinde infeksiyon yapabilir. Dolayısıyla köpek kaynaklı R tipi veya S tipi *Brucella* etkenlerinin insanlar için potansiyel bir infeksiyon riski

Tablo 1. İnsanda *Brucella canis* infeksiyonuna ilişkin serolojik testler ile alınan sonuçlar

	ÇLAT		MYAT		RBPT		SAT	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Barınak çalışanları	3	15	3	15	-	18	-	18
Veteriner. Fak. sağlık personeli	6	52	4	54	3	55	-	58
Toplam	9	67	7	69	3	73	-	76
%	11.8	88.2	9.2	90.8	3.9	96.1	-	100

ÇLAT: Çabuk lam aglütinasyon testi, MYAT: Modifiye yavaş aglütinasyon testi, RBPT: Rose Bengal plate testi, SAT: Serum aglütinasyon testi

vardır. Bu nedenle brusellozdan kuşkulanılan olgularda serolojik testlerin yapılırken mutlaka R tipi antikorların da aranması gerekir. Bu durumdan ötürü de dünyada infeksiyonun sıklığının gerçek değerinden daha düşük bildirildiği ileri sürülmektedir (7). Bir meslek hastalığı olarak da tanımlanabilecek bruselloz hayvanlardan insana doğrudan veya dolaylı olarak bulaşır. Hastalık gelişmekte olan ülkelerde bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (7, 9, 10).

Hastalığın Türkiye’de köpeklerdeki serolojik sıklığı çeşitli illerde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarla belirlenmiştir (11, 12).

Dünyada ve Türkiye’de hastalığın insanlardaki sıklığını belirlemeye yönelik çalışmalarda değişik oranlar bildirilmiştir. Hastanede yatan hastalarda yapılan iki çalışmada serolojik sıklık Meksika’da %13 (13), Almanya’da %0.3 (14) olarak rapor edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nde askeri personelde (15) %0.4, Florida’da sakinlerinde %0.6 (16) ve Oklahoma sakinlerinde ise %67.8 (10) olarak bildirilmiştir. Türkiye’de yapılan çalışmalarda ise, infeksiyon ilk kez Diker ve ark. (9) tarafından Bursa’dan örneklenen kan serumlarında araştırılmış ve sıklığın %1.6 olduğu bildirilmiştir. Adana’da ise infeksiyon sıklığı %8.3 olarak belirlenmiştir (17).

Modifiye yavaş aglütinasyon testi, insan kan serumlarında *B. canis* antikorlarının aranmasında kullanılabilir pratik ve ekonomik bir testtir (5, 10). Çalışmamızda *B. canis* antikorlarının belirlenmesinde ÇLAT, screening testi olarak; MYAT ise doğrulama testi amacıyla kullanıldı. Veteriner hekimler de köpek kaynaklı bruselloz yönünden risk altındadırlar (10). Çalışmamızda Veteriner Fakültesi serolojik pozitiflik oranı MYAT testi ile %6.9 (4/58) iken barınak personelinde %16.7 (3/18) bulunmuştur. İstatistiksel olarak fark bulunmasa da veteriner hekimlerdeki düşük oran mesleki disipline bağlanabilir.

İnsanda bruselloz S tipi türlerden de (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) ileri gelebilen akut bakteriyemik fazın

ardından gelişen kronik dönem ile karakterize, çeşitli organ ve dokuların etkilendiği zoonotik bir infeksiyon olarak tanımlanır (3, 4). Ülkemizde 1984 yılında büyük ve küçük ruminantlarda uygulanmaya başlanan *Ulusal Brusellozis Eradikasyon Projesi*’ne rağmen hastalık hem ruminant hayvanlarda hem de insanlarda endemik seyrine devam etmektedir. Ayrıca köpekler nadiren de olsa *B. melitensis* veya *B. abortus* ile infekte olabilirler ki bu durumun da insanlardaki S-tipi antikor yanıtına neden olan türlerin köpekten bulaşması olasılığını doğurur. Bu çalışmada tüm serumlar aynı zamanda S tipi *Brucella* türlerine karşı antikor yanıtı yönünden de araştırıldı (RBPT ve SAT), ancak hiçbir örnekte serolojik pozitifliğe rastlanmadı. Bu bulgu, halen serolojik testlerle ölçülen S tipi antijene karşı oluşan antikorların yanı sıra R tipi antikorların da mutlaka belirlenmesi gereğini ortaya koymuştur. Aksi takdirde, bruselloz serolojik pozitiflik gözden kaçmaktadır.

Brucella canis antikorlarının sıklığının kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (18). Ancak bu durumun, kadınların daha güçlü bir immün yanıt oluşturabilmelerinden mi yoksa erkeklere göre etkene daha fazla maruz kalmalarının bir sonucu mu olduğunun tartışıldığı bir çalışmada (10), etkene maruziyetin belirleyici faktör olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda ise barınak personelinin tamamının, fakülte personelinin ise büyük çoğunluğunun erkeklerden oluşması nedeniyle cinsiyet etkisinin istatistiksel analizi yapılmamıştır.

Sonuç olarak, standart (S tipli) *Brucella* antijenleri ile köpek kökenli brusellozun tanınmaması önemli atlamalara neden olabilmektedir. Brusellozdan kuşkulanılan olgularda *B. canis*’ten hazırlanan (R-tip) antijenle de incelemenin yapılması bu atlamaların önüne geçecek ve toplumdaki gerçek sıklığın belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Inra, 1988: 169-74.
2. Aydın N. *Brucella* infeksiyonları. Aydın N, Paracıkoğlu J, ed. *Veteriner Mikrobiyoloji*’de. Ankara: İlike-Emek Yayınları, 2006: 145- 163.
3. Jawetz E, Brooks GF, Melnick JL, Butel JS, Adelberg EA, Ornston LN. *Medical Microbiology*. 18th ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1989: 227-32.
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Brucellosis. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_t.htm. Erişim tarihi: 02.09.2008.
5. Damp SC, Crumrine MH, Lewis GE. Microtiter plate agglutination test for *Brucella canis* antibodies. *Appl Microbiol* 1973; 25: 489-490.
6. Lisle WG, Carmichael LE. A plate agglutination for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am J Vet Res* 1974; 35: 905-909.

7. **Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G.** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol* **2002**; 51: 656-660.
8. **National Brucellosis Committee.** *Summary on Brucellosis Surveillance*. Atlanta: Center for Disease Control, **1974**.
9. **Diker S, İstanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G.** A serologic study of human *Brucella canis* infections in the Bursa region. *Mikrobiyol Bül* **1984**; 18: 203-207.
10. **Monroe PW, Silberg SL, Morgan P, Adess M.** Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *J Clin Microbiol* **1975**; 2: 382-386.
11. **İstanbulluoğlu E, Diker S.** *Brucella canis* üzerine serolojik incelemeler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* **1983**; 30: 14-18.
12. **Öncel Y, Akan M, Sareyyüpoğlu B, Tel OY, Çiftci A.** Seroprevalance of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* **2005**; 29: 779-783.
13. **Flores-Castro R, Segura R.** A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet* **1976**; 66: 347-352.
14. **Carmichael LE, Flores-Castro R, Zoha S.** Brucellosis caused by *Brucella canis*: an update of infection in animals and in humans. Geneva: WHO Document WHO/BRUC.80/361 WHO/ZOON./80.135. (1980).
15. **Lewis GE, Anderson JK.** The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. *Am J Public Health* **1973**; 63: 204-205.
16. **Hoff GL, Schneider NJ.** Serologic survey for agglutinins to *Brucella canis* in Florida residents. *Am J Trop Med Hyg* **1975**; 24: 157-159.
17. **Köksal F, Akan E, Başlamışlı L, Diker S, Yiğit S Özcan K.** Antibody levels to *B. abortus*, *B. canis* and *C. burnetti* in the sera of patients with brucellosis-like symptoms. *Mikrobiyol Bül* **1988**; 22: 132-141.
18. **Washburn TC, Medearis DN, Childs B.** Sex differences in susceptibilities to infections. *Pediatrics* **1965**; 35: 57-64.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Uçkun Sait UÇAN
Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Selçuklu, KONYA
e-posta: usucan@selcuk.edu.tr