

Bruselloz Şüpheli Olgularda *Brucella canis* Seroprevalansının Araştırılması

Investigation of *Brucella canis* Seroprevalence in Brucellosis Suspected Cases

Şerife YÜKSEKKAYA¹, Zeki ARAS², Uçkun Sait UÇKAN³

¹ Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Konya.

¹ Konya Educational and Research Hospital, Medical Microbiology Laboratory, Konya, Turkey.

² Konya İl Sağlık Müdürlüğü, Konya.

² Konya Provincial Directorate of Health, Konya, Turkey.

³ Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.

³ Selçuk University Veterinary Faculty, Department of Microbiology, Konya, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 08.05.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 30.10.2012

ÖZET

Köpek brusellozunun etkeni olan *Brucella canis* insanlara bulaştığında diğer türlere göre daha hafif veya asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Etken insanlara ya hasta köpeklerden doğrudan temas ile ya da laboratuvarlarda çalışma esnasında bulaşmaktadır. *B. canis* enfeksiyonları hastanelerde rutin olarak araştırılmamaktadır. Ülkemizde insan popülasyonunda *B. canis* enfeksiyonlarının mevcut durumunu ortaya koyacak araştırmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, bruselloz ön tanısı alan hastalarda *B. canis* seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Mart-Ağustos 2011 tarihleri arasında Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesinin çeşitli poliklinik ve kliniklerinden brusellozis şüphesi ile tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, "smooth" *Brucella* antijeninin kullanıldığı Rose Bengal Plate Test (Seromed, Türkiye) sonucu negatif olan 652'si kadın 1000 hastaya (yaş aralığı 15-65 yaş) ait serum örneği dahil edilmiştir. Hastalar, ateş, gece terlemesi, baş ağrısı, halsizlik, iştahsızlık, kas ve eklem ağrısı gibi bruselloz klinik belirtileriyle hastaneye başvuran olgulardır. *B. canis*'e karşı özgül antikorların saptanması amacıyla, *B. canis* NCTC 10854 suşundan R (rough) tipi antijen hazırlanmış ve hızlı lam aglütinasyon testi (LAT) ile modifiye plak aglütinasyon testi (MAT) uygulanmıştır. Hasta serumu örneklerinin %0.34 (34/1000)'ü LAT antijeni ile iki dakika içerisinde aglütinasyon vermiş ve *B. canis* yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Antikor titresinin belirlenmesi amacıyla yapılan MAT ile örneklerin 22 (%0.22)'sinden pozitif sonuç alınmış; hasta serumlarının biri 1/48, beşi 1/96, altısı 1/192, altısı 1/384 ve dördü 1/768 titrede pozitif bulunmuştur. *B. canis* antikorları pozitif olan 22 hastanın 17'si kadın, beşi erkek olup, cinsiyetler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuç olarak, ülkemiz hastanelerinde, bruselloz

İletişim (Correspondence): Dr. Zeki Aras, Konya İl Sağlık Müdürlüğü, 42040 Selçuklu, Konya, Türkiye.

Tel (Phone): +90 332 351 1832, E-posta (E-mail): zekiaras@hotmail.com

için yapılan serolojik taramalarda S tipi brucella antijenlerinin yanı sıra R tipi antijenlerin de kullanılması-
nın, gerek tanı gerekse seroepidemiolojik verilere katkıda bulunabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Bruselloz; *Brucella canis*; tanı; seroprevalans; insan enfeksiyonu.

ABSTRACT

Brucella canis which is the main etiologic agent of brucellosis in dogs, can be transmitted to man. It causes mild or asymptomatic infection in human compared with other *Brucella* species. *B. canis* can be transmitted to man either by laboratory accidents or contact with infected dogs. Since *B. canis* infections in humans are not routinely investigated in hospitals in Turkey, the data are limited to reveal the current status of *B. canis* infections in people in our country. The purpose of this study was to determine the seroprevalence of *B. canis* infection in brucellosis-suspected cases. The study was conducted at Konya Education and Research Hospital, (located at Central Anatolia of Turkey) during March-August 2010 period. Serum samples were obtained from 1000 patients (age range: 15-65 years; 652 of them were women) presented with brucellosis-like symptoms, including fever, headache, night sweats, appetite loss, weakness, arthralgia and myalgia. Rose Bengal Plate Tests (Seromed, Turkey) for smooth *Brucella* species were negative in all serum samples. Rough type *B. canis* antigen was prepared with *B. canis* NCTC 10854 strain for serodiagnosis. Antibody responses to *B. canis* in the serum samples were investigated by rapid slide agglutination test (SAT) and modified plate agglutination test (MPAT). Of the 1000 sera tested, 34 (0.34%) were found to be positive with SAT while the remaining were found negative. MPAT was used for the detection of antibody titer and 22 (0.22%) out of 1000 sera were found positive with MPAT (one had 1/48, five had 1/96, six had 1/192, six had 1/384, four had 1/768 titers). Among 22 positive patients, 17 were female and five were male, and the difference between the genders was found statistically significant ($p < 0.05$). It was concluded the use of both S and R antigens in the serological tests applied for the diagnosis of brucellosis in our country will supplement both diagnosis and seroepidemiological data related to brucellosis.

Key words: Brucellosis; *Brucella canis*; diagnosis; seroprevalence; human infection.

GİRİŞ

İnsanlarda bruselloza neden olan *Brucella* türleri *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. canis*'tir. Köpek brusellozunun etkeni olan *B. canis* insanlara bulaştığında diğer türlere göre daha hafif veya asemptomatik enfeksiyonlara neden olmaktadır¹. Etken insanlara ya hasta köpeklerden doğrudan temasla ya da laboratuvarlarda çalışma esnasında bulaşmaktadır². Hastalığın tanısında; etkenin izolasyonu, serolojik testler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır^{2,3}. Serolojik tanıda; hızlı lam aglütinasyon testi (LAT), modifiye plak aglütinasyon testi (MAT), tüp aglütinasyon testi, 2-merkaptetanol tüp aglütinasyon testi, agar jel immünodifüzyon testi ve ELISA testleri kullanılmaktadır³.

Ülkemizde risk altındaki insanlarda yapılan bir çalışmada, *B. canis* enfeksiyonunun seroprevalansı %9.2 olarak bulunmuştur⁴. Bruselloz şüphesiyle hastanelere başvuran kişilerde ise hastalığın seroprevalansı %3.7'dir⁵. Dünyanın başka bölgelerinde yapılan çalışmalarda da, hayvanlarla teması olan kişiler veya laboratuvar çalışanlarından *B. canis* izolasyonu yapıldığı bildirilmiştir^{3,6}. Ülkemizde insan popülasyonunda *B. canis* enfeksiyonlarının mevcut durumunu ortaya koyacak yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu ça-

alışmada, Konya ilinde hastaneye başvuran bruselloz şüpheli hastalarda *B.canis* seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastalar ve Örnekler

Hastanemiz Etik Kurul onayı ile gerçekleştirilen bu çalışma, Mart-Ağustos 2011 tarihleri arasında yapıldı. Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesinin çeşitli poliklinik ve kliniklerinden bruselloz şüphesiyle tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen, Rose Bengal Plate Test (Smooth *Brucella* antijeni, Seromed, Türkiye) sonucu negatif olan 1000 hasta çalışmaya alındı. Hastalar, ateş, gece terlemesi, baş ağrısı, halsizlik, iştahsızlık, kas ve eklem ağrısı gibi bruselloz klinik belirtilerine sahipti. Toplanan kan örneklerinden ayrılan serumlar, serolojik testler yapıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Pozitif ve Negatif Kontrol Serumları

Pozitif kontrol serumu olarak Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan iki adet *B.canis* pozitif köpeğe ait serum örnekleri; negatif kontrol olarak ise köpek teması olmayan beş sağlıklı insanın kan serum örnekleri kullanıldı.

Hızlı Lam Aglütinasyon Testi (LAT)

Test antijeni, Lisle ve Carmichael⁷ tarafından tanımlanan yöntemle hazırlandı. Refik Saydam Hıfızısıhha Enstitüsü'nden sağlanan *B.canis* NCTC 10854 suşunun ilk kültürü yapıldıktan sonra Roux şişelerinde hazırlanan besiyesinde (pepton 10 g, NaCl 5 g, agar 20 g, distile su 1000 ml) pasajları yapıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen koloniler 20 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile toplanıp 10.000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve aynı işlem iki kez tekrar edildi. Daha sonra pelet 125 g/L oranına uygun şekilde süspanse edildi ve birkaç katlı steril gazlı bezden süzöldükten sonra 56°C'de bir saat tutularak inaktive edildi. Elde edilen antijen süspanسیونunun 20 ml'sine 0.12 ml boya solüsyonu (2 g brillant yeşili ve 1 g kristal viyole 300 ml distile suda çözdürüldü) eklendi. Antijen, son hacmi %6 olacak şekilde sulandırılıp cam yünüyle filtre edildi. Son konsantrasyonu %0.01 olacak şekilde tiyomersal eklendi ve koyu renkli şişede +4°C'de saklandı.

LAT için en ideal antijen-antikor miktarını belirlemek amacıyla, lam üzerine 30, 20 ve 10 µl pozitif ve negatif serumlar ile aynı miktarlarda antijen damlatılarak kombinasyonlar yapıldı. En iyi reaksiyonun, 30 µl antijen ile 30 µl serumun iki dakika boyunca karıştırılmasıyla gerçekleştiği saptandı ve testlerde bu miktarlar kullanıldı⁷.

Modifiye Plak Aglütinasyon Testi (MAT)

MAT antijeninin hazırlanmasında Alton ve arkadaşlarının³ tarif ettiği yöntem kullanıldı. *B.canis* NCTC 10854 suşunun ilk kültürü yapıldıktan sonra Roux şişelerinde yukarıdaki gibi hazırlanan besiyesinde pasajları yapıp 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyonun sonunda üreyen koloniler 50 ml %0.06 formalinli PBS ile toplanıp steril gazlı bezden süzöldü ve 7°C'de bir saat tutularak inaktive edildi. Antijen 10.000 devirde 30

1 dakika santrifüj edildi ve pelet %0.5 formalinli PBS ile süspanse edildi. Elde edilen stok antijen, yoğunluğu %4.5 (v/v) hücre olacak şekilde standardize edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

MAT için U tabanlı mikroyetkin tüm çukurlarına 25 µl PBS dağıtıldı. Pleytin ilk kuyucuğuna 25 µl hasta serumu eklendi ve sonraki çukurlara 25’er µl aktararak çift katlı sulandırım elde edildi. Çukurların tümüne 50 µl *B.canis* antijeni (4.4 ml *B.canis* stok antijeni 100 ml PBS ile sulandırıldı) ilave edildi ve böylece son sulandırım 1/6, 1/12, 1/24...1/768 olarak hazırlanmış oldu. Pleytler 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Son iki sıra pozitif ve negatif kontrol olarak ayrıldı. Değerlendirmede $\geq 1/48$ titreler pozitif, $\leq 1/24$ titreler ise negatif olarak kabul edildi⁸. MAT standardizasyonu, aynı antijenin kullanıldığı standart tüp aglütinasyon testi ile karşılaştırılarak daha önceden tanımlandığı şekilde yapıldı⁸.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgular Minitap-SPSS paket programı ile analiz edildi ve ki-kare testi ile değerlendirildi. İstatistiksel olarak önemlilik $p < 0.05$ değeri ile belirtildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan bruselloz şüpheli 1000 olgunun 652’si kadın ve 348’i erkek olup, yaş aralığı 15-65 yıl arasında değişmektedir. Olgulara ait serum örneklerinden 34 (%0.34)’ü LAT ile iki dakika içinde aglütinasyon vermiş ve *B.canis* yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Diğer 966 örnek ise negatif olarak bulunmuştur. Antikor titresinin belirlenmesi amacıyla yapılan MAT ile örneklerin 22 (%0.22)’sinde $\geq 1/48$ titre saptanmış ve *B.canis* yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo I). MAT pozitif bulunan 22 hastanın 17’si kadın beşi erkek olup, cinsiyetler arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

B.canis köpeklerde bulaşıcı abortus, epididimit ve testis atrofisine neden olan zoonotik bir etkidir. İnsanlara bulaşması genellikle enfekte hayvanlarla temas ile olmaktadır. İnsanlardaki enfeksiyonlar, düzgün koloni oluşturan “Smooth (S) *Brucella*” türlerinin

Tablo I. MAT ile Elde Edilen Pozitif Sonuçların Dağılımı

Serum titresi	Kadın Sayı (%)	Erkek Sayı (%)	Toplam Sayı (%)
1/48	1 (5.9)	0	1 (4.5)
1/96	5 (29.4)	0	5 (22.7)
1/192	4 (23.5)	2 (40)	6 (22.3)
1/384	5 (29.4)	1 (20)	6 (22.3)
1/768	2 (11.8)	2 (40)	4 (18.2)
Toplam	17 (100)	5 (100)	22 (100)

(*B.abortus*, *B.melitensis*, *B.suis*) neden olduğu tabloya benzese de genellikle asemptomatik karakterdedir⁹. S tipi brusella türlerinin aksine *B.canis*'in kolonileri düzensiz (rough; R) yapıya sahiptir. *B.canis*'in bu özelliğinden dolayı, rutinde kullanılan S tipi brusella antijenleri ile *B.canis* enfeksiyonları serolojik olarak teşhis edilememektedir¹⁰. Bu çalışmada, *B.canis* NCTC 10854 suşu kullanılarak hazırlanan R tipi brusella antijeni ile Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran bruselloz şüpheli hastalarda *B.canis* antikorları serolojik olarak araştırılmıştır.

Hastalığın insanlardaki serolojik sıklığını belirlemeye yönelik dünyanın değişik bölgelerinde sınırlı sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır. Almanya'da hastanede yatan hastalarda yapılan bir çalışmada hastalığın seroprevalansı %0.3 olarak bulunmuştur¹¹. Amerika Birleşik Devletleri'nde askeri personelde enfeksiyonun varlığı serolojik olarak araştırılmış ve %0.4 olarak rapor edilmiştir¹². Lucero ve arkadaşları⁶, Arjantin'de *B.canis*'in küçük bir salgına neden olduğunu ve enfeksiyon kaynağının da aborte köpek fetusları olduğunu bildirmişlerdir. Hastalığın ülkemizdeki varlığını göstermek amacıyla ilk çalışma Diker ve arkadaşları¹³ tarafından yapılmış ve Bursa ilinde hastalığın seroprevalansı %1.6 olarak rapor edilmiştir. Köksal ve arkadaşlarının¹⁴ Adana'da yaptıkları çalışmada ise enfeksiyonun sıklığı %8.3 olarak bildirilmiştir. Ülkemizin değişik bölgelerindeki hastanelere bruselloz şüphesiyle başvuran hastalarda yapılan serolojik taramada *B.canis*'in sıklığı %3.7 olarak rapor edilmiştir⁵. Konya'da risk altındaki veteriner hekimler ve köpek barınağı çalışanlarında yapılan bir çalışmada *B.canis* enfeksiyonu seroprevalansı %9.2 olarak bulunmuştur⁴. Sayan ve arkadaşlarının^{5,15} yaptığı iki ayrı çalışmada, bruselloz şüpheli olgularda *B.canis* seropozitifliği mikroaglutinasyon testi ile %3.8 (68/1746), sağlıklı kan donörlerinde ise LAT ile %1.6 (31/1930) olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesine bruselloz şüphesi ile başvuran hastalarda *B.canis* seroprevalansı MAT ile %0.22 olarak tespit edilmiş ve seropozitifliğin cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği izlenmiştir (17 kadın, 5 erkek; $p < 0.05$). Elde ettiğimiz bu veri, kadınların erkeklere göre etkene daha fazla maruz kaldığını vurgulayan Monroe ve arkadaşlarının¹⁶ sonuçları ile uyumludur. Sonuç olarak çalışmamızda, bölgemizde bruselloz şüpheli olgularda düşük oranda da olsa *B.canis*'in varlığı serolojik olarak ortaya konmuş ve kadınların erkeklere göre daha fazla risk altında olduğu görülmüştür. Ülkemiz hastanelerinde, bruselloz için serolojik taramalarda S tipi brusella antijenlerinin yanı sıra R tipi antijenlerin de kullanılmasının, gerek tanı gerekse seroepidemiolojik verilere katkıda bulunabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. Indian J Med Microbiol 2007; 25(3): 188-202.
2. Aras Z, Uçan US. Diagnosis of *Brucella canis* by polymerase chain reaction, pp: 210-25. In: DeGiovine VM (ed), The Dogs: Biology, Behavior and Health Disorders. 2011, Nova Science Publishers, New York, USA.
3. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. *Brucella canis*, pp: 169-74. In: Techniques for the Brucellosis Laboratory. 1988, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France.
4. Köylü Ö, Aras Z, Uçan US. Konya ilinde risk altında bulunan insanlarda *Brucella canis* enfeksiyonu seroprevalansı. Enfeksiyon Derg 2009; 23(2): 73-7.

5. Sayan M, Erdenliç S, Stack J, et al. A serological diagnostic survey for *Brucella canis* infection in Turkish patients with brucellosis-like symptoms. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64(6): 516-9.
6. Lucero NE, Corazza R, Almuzara MN, et al. Human *Brucella canis* outbreak linked to infection in dogs. *Epidemiol Infect* 2010; 138(2): 280-5.
7. Lisle WG, Carmichael LE. A plate agglutination for the rapid diagnosis of canine brucellosis. *Am J Vet Res* 1974; 35(7): 905-9.
8. Damp SC, Crumrine MH, Lewis GE. Microtiter plate agglutination test for *Brucella canis* antibodies. *Appl Microbiol* 1973; 25(3): 489-90.
9. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA. Human infection with M-strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(1): 35-8.
10. Polt SS, Dismukes WE, Flint A, Schaefer J. Human brucellosis caused by *Brucella canis*: clinical features and immune response. *Ann Intern Med* 1982; 97(5): 717-9.
11. Carmichael LE, Flores-Castro R, Zoha S. Brucellosis caused by *Brucella canis*: an update of infection in animals and in humans. WHO Document WHO/BRUC.80/.361 WHO/ZOON./80.135. 1980, Geneva.
12. Lewis GE, Anderson JK. The incidence of *Brucella canis* antibodies in sera of military recruits. *Am J Public Health* 1973; 63(3): 204-5.
13. Diker S, İstanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G. A serologic study of human *Brucella canis* infections in the Bursa region. *Mikrobiyol Bul* 1984; 18(4): 203-7.
14. 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 Bul* 1988; 22(2): 132-41.
15. Sayan M, Erdenliç S, Etiler N. Investigation of *Brucella canis* seropositivity by in-house slide agglutination test antigen in healthy blood donors. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(4): 655-63.
16. Monroe PW, Silberg SL, Morgan P, Adess M. Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *J Clin Microbiol* 1975; 2(5): 382-86.