

## Brucella canis'in Biyolojik Materyallerdeki Yaşam Süresi

Hakan Yardımcı<sup>1</sup> Mehmet Akan<sup>1</sup> Ayhan Atasever<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı - ANKARA

<sup>2</sup> Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı - KAYSERİ

### ÖZET

*Bu çalışmada, Brucella canis suşlarının farklı ısılarda ve değişik biyolojik materyallerde yaşam süresi araştırıldı. Serum, kan, safra ve idrara inokule edilen B.canis suşları arasında farklı ısı derecelerinde ve zamanlarda herhangi bir farklılık bulunamadı. B.canis suşları serum ve kanda 59 günlük deneme süresince tüm ısı derecelerinde canlılıklarını sürdürürken, safra ve idrarda 17 gün içinde canlılıklarını kaybettikleri saptandı.*

**Anahtar kelimeler:** B.canis, kan, serum, idrar, safra, yaşam süresi, köpek.

### Survival of Brucella canis in Biological Milieus

### SUMMARY

*Survival of two Brucella canis strains in serum, blood, bile and urine at different temperature was investigated in this study. There was no difference in the survival of both B.canis strains in all biological milieus. While B.canis strains inoculated in blood and serum survived for 59 days, organisms incubated in bile and urine died in 17 days at all incubation temperatures.*

**Key words :** B.canis, blood, serum, urine, bile, survival, dog.

### GİRİŞ

Brucella canis, dişi köpeklerde abortus ve vaginitis'e, erkek köpeklerde orşitis, epididimitis ve kısırlığa neden olur (2). Etken Gram negatif küçük kokobasil şeklindedir (4). B.canis zoonotik özelliğe sahiptir ve insanlarda ateş, bitkinlik ve eklem ağrıları gibi klinik belirtilere yol açmaktadır. İlk kez Carmichael tarafından 1967 yılında köpeklerde brucelloz etkeni olarak izole edilmiştir (2). Köpeklerde B.canis nedeni enfeksiyonun varlığı ilk izolasyonu takiben birçok ülkede bildirilmiştir (4,5,7). Türkiye'de etkenin varlığı serolojik olarak saptanmıştır (6,7). İnfekte hayvanlarda etken, süt, vajinal akıntılar, aborte olmuş fetal ve plasental dokularla dışarı saçılmaktadır. Ayrıca, infekte erkek köpekler çiftleşme sırasında spermaları ile etkeni dişilere bulaştırırlar. İdrarın da bulaşmada önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (5,9,11,12). Hayvanlarda B.canis enfeksiyonlarında klinik belirtiler çoğu zaman dikkati çekmez. Hastalığın tanısı için laboratuvar muayenelerine gereksinim vardır. Bu yöntemler arasında bakterinin izole edilmesinin yanısıra serolojik testlerden de yararlanılmaktadır (1,10).

Bu çalışmada, Brucella canis RM6/66 ve 1/90 suşlarının farklı ısılarda ve değişik biyolojik materyallerde yaşam süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### MATERYAL VE METOT

**Bakteri suşları :** Denemede kullanılan Brucella canis suşları (RM 6/66 ve 1/90) Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlandı.

**Besiyerleri:** Bakterilerin üretilmesinde katı besiyeri olarak %5 defibrine koyun kanlı Brucella agar (Difco) ve sıvı besiyeri olarak Brucella buyyon (Difco) kullanıldı.

**Biyolojik Ortamlar:** Çalışmada kullanılan, defibrine köpek kanı, serum, safra ve idrar örnekleri, serolojik ve

bakteriyolojik muayenelerde B.canis yönünden negatif olan sağlıklı 5 köpekten toplandı. Etik kurallara uygun olarak uyutulan köpeklerden uyutma işleminden önce steril koşullarda kan alındı. Toplanan materyallerden kan dışındakiler 0.2 µm'lik por çaplı milipor filtreden (Sartorius) süzüldü. Tüm materyallerden sterilite kontrolü için katı ve sıvı besiyerine ekimler yapıldı ve üreme saptanamadı.

**Yaşam Süresinin Değerlendirilmesi:** Her iki B. canis suşu Brucella agarda üretildikten sonra PBS (pH: 7.3) içinde homojenize edildi. Biyolojik ortamlardan 9 ml örnek ile bakteri süspansiyonunun 1 ml'si ile karıştırıldı. Bu süspansiyonlardan her biyolojik ortam için iki seri olarak 4 °C, 25 °C ve 37 °C de inkubasyona kaldırıldı. Bakteri sayımları ilk 10 gün boyunca her gün, daha sonra 59'uncu güne kadar her hafta tekrarlandı. Bakteri sayısı inkubasyonun 10.gününe kadar yapıldı. 17.günden itibaren örnekler besiyerine direkt olarak ekildi ve üremenin olup olmadığı kaydedildi. Süspansiyonlardan bir serisi kontaminasyon riskine karşı inkubasyon süresince aynı ortamda bekletildi. Başlangıçtaki bakteri sayısını belirlemek amacıyla 1 ml bakteri süspansiyonu ile 9 ml PBS karıştırıldı ve bu karışımdan bakteri sayımı yapıldı.

**Bakteri Sayımı:** Biyolojik materyallerdeki bakteri sayısını belirlemek için ekim materyalleri 10 katlı sulandırılarak koyun kanlı Brucella agara ekildi. Kültürler 96 saat aerobik koşullarda inkube edildi. Üreme varlığı her gün incelendi ve oluşan koloniler sayıldı. Üreyen kolonilerin saflığı bakteriyoskopi, kültür ve biyokimyasal testlerle doğrulandı.

### BULGULAR

B.canis RM6/66 ve 1/99 suşlarının biyolojik ortamlarda üreme süreleri Tablo 1.de sunulmuştur. Biyolojik ortamlarda başlangıç mikroorganizma sayısı 10<sup>9</sup> bakteri/ml olarak belirlendi. Serum, kan, safra ve idrara inokule edilen B.canis

suşları arasında değişik ısı derecelerinde ve zamanlarda herhangi bir farklılık bulunamadı. B.canis suşları serum ve kanda 59 günlük deneme süresince tüm ısı derecelerinde canlılıklarını sürdürürken, suşların safra ve idrarda 17.günde canlılıklarını kaybettikleri saptandı. Kanda, B.canis suşları

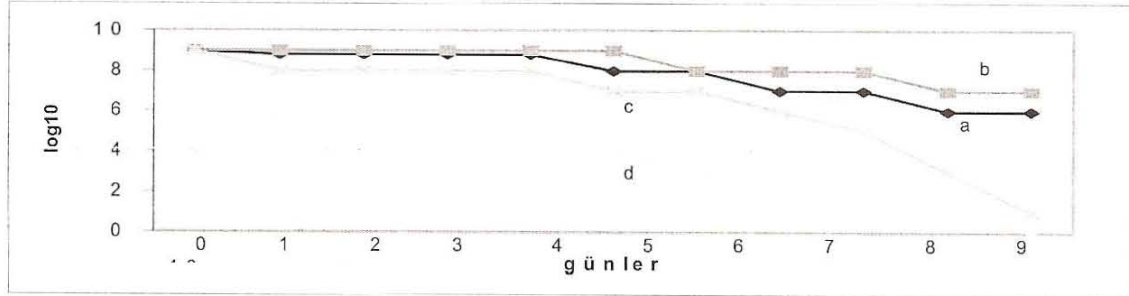
ilk günlerde başlangıç sayısına göre artış gösterirken diğer ortamlarda herhangi bir artışa rastlanmadı. Isı dereceleri dikkate alındığında, safra ve idrarda 37 °C'de 7.günde öldükleri belirlendi.

**Tablo 1.** B.canis RM6/66 ve 1/90 suşlarının biyolojik ortamlarda üreme süreleri

Süre (gün)	Biyolojik ortamlar											
	Serum			Kan			Safra			İdrar		
	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C	4 °C	25 °C	37 °C
1.	9 <sup>a</sup>	9	8	9	8	8	8	8	8	8	8	8
2.	9	8	8	9	8	9	8	7	7	8	8	6
3.	9	8	8	9	9	9	8	7	7	8	8	6
4.	9	8	8	9	9	10	6	5	4	8	8	5
5.	8	8	8	9	8	9	4	3	2	7	3	2
6.	8	7	7	8	8	9	3	2	1	7	2	1
7.	7	7	7	8	6	7	2	1	-	6	-	-
8.	7	7	5	8	6	6	2	1	-	5	-	-
9.	6	6	5	7	6	5	1	-	-	3	-	-
10.	6	6	5	7	5	5	-	-	-	1	-	-
17.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
24.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
31.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
38.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
45.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
52.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
59.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

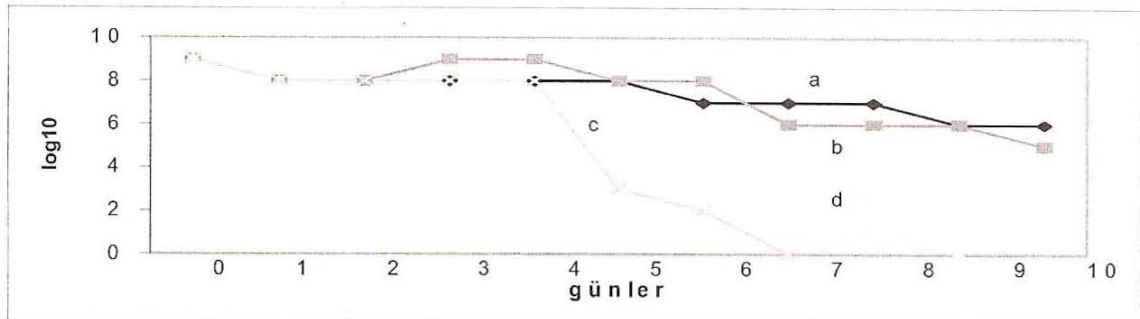
+ : Üreme var; - : Üreme yok; <sup>a</sup>: log<sub>10</sub>

**Şekil 1.** B.canis suşlarının 4 °C'de üreme sonuçları



a: serum, b: kan, c: safra, d: idrar

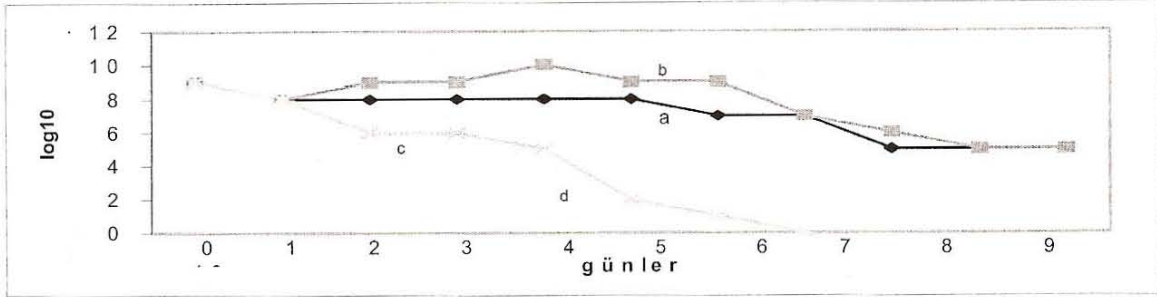
**Şekil 2.** B.canis suşlarının 25 °C'de üreme sonuçları



a: serum, b: kan, c: safra, d: idrar



Şekil 3. B.canis suşlarının 37 °C'de üreme sonuçları



a: serum, b: kan, c: safra, d: idrar

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpek brucellosisi dişi köpeklerde abortus ve infertilite, erkeklerde epididimitis ve testislerde atrofi gibi bozukluklara yol açan ve etkeni *B.canis* olan zoonotik karakterde bir enfeksiyondur. Hastalık dünyanın birçok ülkesinde bildirilmiştir (2). Son yıllarda, Türkiye'de pet hayvan popülasyonunun artmasına bağlı olarak enfeksiyonun etkeni ile yapılan çalışmalar daha önem kazanmıştır. İnfeksiyon Türkiye'de köpeklerde ilk defa İstanbulluoğlu ve Diker (8) tarafından serolojik olarak yapılan çalışma ile bildirilmiş, daha sonra Diker ve ark (6) tarafından yapılan bir serolojik saha çalışması ile desteklenmiştir. Fakat henüz köpeklerden etken izolasyonu bildirilmemiştir.

Bu çalışmada *B. canis*'in değişik ısılarda inkube edilen köpeğe ait biyolojik ortamlarda yaşam süreleri incelendi. Serum, kan, safra ve idrar bu amaçla kullanıldı. İncelenen yazılı literatürde, *B. canis* suşları ile benzer bir çalışma yapılmadığı saptandı. Bu nedenle çalışmada elde edilen sonuçları karşılaştırmak mümkün olmadı. Bununla birlikte, Alton ve ark. (1), *B.canis*'e bağlı bakteriyemi 1-2 sene veya daha uzun sürebileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, kan ve serumda, tüm ısılarda inkube edilen, *B.canis* suşlarının deneme süresi olan 59 gün boyunca ölmemesi ve belirli bir yoğunlukta kalması etkenin karakterine uygun bulundu. Ayrıca kanda ilk günlerde bakteri sayısının artış göstermesi ve serumda da başlangıç sayısına yakın olması Alton ve ark'nın (1) açıklamalarını destekler niteliktedir.

Bu çalışmada safra ve idrarda etkenin tüm inkubasyon ısılarında ilk 17 gün içerisinde ölmesi idrar ve safranin pH'sına bağlanabilir. Ayrıca ısı dereceleri arttıkça (25 ve 37 °C) her iki ortamda da bakterilerin daha erken öldüğü saptandı. Bu da bazı organik inhibitör maddelerin vücut ısısında daha etkin olduğunu ya da mikroorganizmanın optimal üreme ısısında daha fazla metabolik faaliyet göstermesi ve metabolik artıkların inhibitör etkilerine bağlanabilir.

*Brucella canis*'in idrarda 4 °C'de 9, 25 °C ve 37 °C'lerde 6 gün süreyle canlı kalması, zoonoz olan bu etkenin diğer hayvanlar yanında insanlara da bulaştırmasında idrarın önemini ortaya koymaktadır. Nitekim birçok araştırmacı *B. canis* enfeksiyonunun bulaşmasında idrarın da rol oynayabileceğini bildirmektedir (7,9,11).

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan iki *B.canis* suşunun değişik ısılarda inkube edilen biyolojik mater-

yallerde (serum, kan, safra ve idrar) yaşama sürelerinin farklı olduğu ve idrar gibi ekskretlerin hastalığın diğer hayvanlara ve insanlara bulaşmasında önemli rol oynayabileceği belirlendi.

### KAYNAKLAR

- 1-Alton, G.G, Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M.(1988):Techniques for brucellosis laboratory. Pp.169-173, INRA, Paris.
- 2-Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N., Akay, Ö. (1992): Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:741, Atatürk Üniversitesi Basımevi, Erzurum.
- 3-Carmichael, L.E., Kenney, R.B. (1968):Canine abortion caused by *Brucella canis* JAVMA., 152: 605-616.
- 4-Corbel, M.J., Brinley-Morgan,W.J. (1984):Genus *Brucella*. In: Krieg,N.R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Volume 1, pp.377-376, Baltimore, London.
- 5-Creek, N. (1980): *Brucella canis* in dogs. Iowa State Veterinarian, 3: 122-124.
- 6-Diker, K.S., Aydın, N., Erdeğer, J., Özyurt, M. (1988): A serological of dogs for *Brucella canis* and *Brucella abortus* and evaluation of mercaptoethanol microagglutination test. A Ü Vet Fak Derg., 34: 268-277.
- 7-Flores-Castro, R., Suarez, F., Ramirez-Pfeiffer,C., Carmichael, L.E.(1977): Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico city. J.Clin.Microbiol.,6):591-597.
- 8-İstanbulluoğlu, E., Diker, S.(1983):*Brucella canis* üzerinde serolojik incelemeler. A.Ü.Vet.Fak.Derg., 30:14-18.
- 9-Laing, J.A., Brinley-Morgan, W.J.B., Wagner, W.C. (1988): Fertility and infertility in veterinary practice. p: 266. Fourth ed., Baillere Tindal, London.
- 10-Mateu-de-Antonio, E.M., Martín, M., Soler, M. (1993): Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. Am J Vet Res., 54: 1043-1046.
- 11-Serikawa, T., Muraguchi, T., Nakao, N., Irie, Y. (1978): Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. Jap.J.Vet. Sci., 40:353-355.
- 12-Wooley, R.E., Hitchcock, P.L., Blue, J.L. Neuman, M.A., Brown, J., Shotts, E.B. (1978): Isolation of *Brucella canis* from a dog seronegative for Brucellosis. J Am Vet Med Assoc., 173:387-388.