

AFYON BÖLGESİ SÜT ÖRNEKLERİNDE *BRUCELLA* ANTİKORU ARAŞTIRILMASIBeytullah KENAR¹Mustafa ALTINDIŞ²

ÖZET

Yeni sağılmış sütte, enfekte meme, dışkı veya salgılardan, çevreden ve ekipmanlardan bulaşabilen farklı cinslere ait birçok mikroorganizma bulunur. Bunların en önemlileri, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Brucella* türleridir. İnsanlara Brucellosis, hayvanlardan direkt olarak veya onların süt ve ürünleri ile geçmektedir. Özellikle pastörize edilmemiş veya çiğ süttten yapılan ve olgunlaştırılmadan tüketilen peynirlerin yenilmesi ile sık görülmektedir. Bu çalışmada hayvancılığın yaygın yapıldığı bölgemizin farklı yerlerinden alınan süt örneklerinde, aglütinasyon testi ve Ring halka testi ile *Brucella* antikorlarının varlığı araştırılmıştır. Afyon ili merkez, Bolvadin ve Emirdağ ilçelerine bağlı altı farklı köydeki değişik çiftliklerden elde edilen 120 süt örneğinde *Brucella abortus* antijeni kullanarak aglütinasyon testi ve Ring testi yapılmıştır. Emirdağ'dan alınan süt numunelerinin altısında (6/120=%5.0) test pozitif bulunmuş, bu ineklerden kan alınarak Rose Bengal testi uygulanmış ve sonuçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bruselloz, çiğ süt, aglütinasyon testi, Ring testi, Rose Bengal testi, serum aglütinasyon testi

AN INVESTIGATION OF *BRUCELLA* ANTIBODIES IN MILK SAMPLES
COLLECTED FROM AFYON REGION

SUMMARY

Raw milk can be contaminated by several pathogenic microorganisms found in feces, other excretions and infected mammary glands of animals, or in the environment. *Mycobacterium tuberculosis* and *Brucella spp.* are two of the most important pathogens. *Brucella spp.* is transmitted to the humans via direct contact with the infected animals or by consumption of their milk or milk products. Transmission of the microorganism frequently occurs after oral intake of cheese produced from unpasteurized milk. In this study, unpasteurized milk samples obtained from different parts of Afyon were screened for *Brucella*. Agglutination test using *Brucella abortus* antigen and Ring test were performed at 120 milk samples obtained from six milk collection units. Agglutination test was positive in 6 (5.0 %) milk samples obtained from only one village. Rose Bengal test was performed at blood samples taken from six cows which have positive agglutination test at their milk samples and Rose Bengal test was found positive at all this samples.

Key words: Brucellosis, raw milk, agglutination test, Ring test, Rose Bengal test, Serum Agglutination test

GİRİŞ

Yeni sağılmış sütte değişik cinslere ait, farklı sayılarda mikroorganizma bulunur. Başlangıçtaki toplam bakteri sayısı <1.000/ml olabileceği gibi

1.000.000/ml'den de fazla olabilmektedir. Sütteki toplam bakteri sayısının 10.000/ml'den fazla olması, üretimde önemli bir hijyen probleminin

¹Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD,

²Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Afyon

Geliş tarihi : 26.05.2000 Kabul edilmiş tarihi : 15.05.2001

Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr.Mustafa ALTINDIŞ, Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD, Afyon

olduğunu gösterir (1). Çiğ süte patojenler, enfekte meme, dışkı ve diğer salgılardan, çevreden veya ekipmanlardan bulaşabilir. Bu mikroorganizmalar arasında *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Echerichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Streptococcus agalactiae*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* ve özellikle bazı ülkelerde *Brucella spp.* ile *Mycobacterium tuberculosis* sayılabilir. Sporlu bakteriler ve enterokoklar hariç, yukarıdaki bakterilerin hepsi pastörizasyon ile yok edilebilir. Bununla beraber süt bazen çiğ içilmekte, peynir çiğ süttten yapılabilmekte ya da pastörizasyondan sonra bulaşma olabilmektedir (2).

Brucella türleri Gram negatif, küçük, hareket-siz, kokobasil şeklinde bakteriler olup, dalgalı ateş ya da Malta humması olarak bilinen bruselloza neden olmaktadır. Hastalığın inkubasyon süresi 7-21 gündür. Bakteri, insan vücuduna daha çok sindirim sistemi, deri ve mukoza yolu ile girer, tüm dokulara yayılabilir ve granümatöz bir hastalık yapar. Hastalığın en sık görülen belirtileri; halsizlik, baş, sırt, kas ağrıları, iştahsızlık, kilo kaybı, üşüme ve ateştir. Hastalık için tipik olduğu belirtilen ondulen ateş ise günümüzde çok nadir olarak, uzun süre sağaltım görmemiş hastalarda ortaya çıkabilmektedir. Bir yıldan uzun sürerse kronikleşebilir, bazen bir organda lokalize kalabilir, çoğunlukla da tedavi sonrası bulgular bakterinin, hücre içinde uzun süre kalarak eradike edilememesinden dolayı tekrar çıkar (3).

Bruselloz insanlara hayvanlardan direkt olarak ya da onların süt ve süt ürünleri ile geçmektedir. Özellikle pastörize edilmemiş süt ve çiğ süttten yapılan ve olgunlaştırılmadan tüketilen peynirlerin yenilmesi ile sık görülmektedir (2). İnsanlara hastalık bulaştıktan sonra *Brucella* bakterilerine karşı oluşan özgül IgM ve IgG yapısındaki antikorlar hastalığın ikinci haftasından itibaren belir-meye başlamakta, özellikle IgG uzunca bir süre kanda saptanabilir düzeyde kalmaktadır. Serolojik testler olarak; lam ve tüp aglütinasyon testleri, Coombs testi, kompleman birleşmesi testi (KB), Rose Bengal (RB) lam testi, indirekt hemaglütinasyon (IHA) testi, floresan antikor (FA) testi, radio immunoassay (RIA) testi ve ELISA

kullanılmaktadır (4). Hastalığın görülme sıklığının azaltılmasında; bulaş ve korunma yollarının özellikle risk taşıyan bireyler tarafından bilinmesi gerekliliği yanı sıra açıkta satılan ve toplama merkezlerindeki süt örneklerinin de *Brucella* yönünden periyodik taranması ve kontrolü kaçınılmazdır. Bu çalışmada Afyon ve civarında hayvancılığın yaygın yapıldığı yerleşim yerlerindeki ahırlardan toplanan çiğ sütlerde *Brucella* araştırması yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada hayvancılığın (süt inekçiliğinin) yaygın olarak yapıldığı Afyon il merkezi ile Bolvadin ve Emirdağ ilçelerine bağlı altı farklı köydeki değişik çiftliklerden 120 süt örneği materyal olarak kullanılmıştır. Önce *B.abortus* Ring test antijeni (Biosystems Costabrava Co., Barcelona, Spain) kullanarak lamda aglütinasyon testi yapılmıştır. Her bir süt örneğinden 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 ve 0.005 ml alınıp, üzerine bırakılan birer damla antijen ile ileri geri hareket ettirilerek karışması sağlanmış, 1 dk içinde oluşan reaksiyon gözlenmiştir. Şüpheli ve pozitif reaksiyon veren sütlerle tüpte aglütinasyon testi yapılmıştır. Ayrıca süt örnekleri iyice karıştırılarak 11x100 mm'lik test tüplerine 1 ml koyulmuş üzerine tetrazoliumla boyanmış *B. abortus* antijeninden (Ring antijeni) 0.03 ml damlatılıp hafifçe karıştırılmıştır. Karışıp karışmadığı kontrol edildikten sonra tüpler 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Krema tabakası koyu renkli ve kremanın altındaki süt, beyaz veya beyaza çok yakınsa test pozitif, krema tabakası beyaz, süt koyu renkli veya krema tabakası sütle aynı renkte ise test negatif olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca krema halkası ve sütteki renk değişimlerine göre ++, +++ ve ++++ pozitif olarak derecelendirilmektedir (Tablo 1). Laktasyonun ilk ve son zamanlarında alınan sütler ile az yağlı, homojenize, donmuş, bayat ve mastitisli hayvanların sütleri testin sonuçlarını olumsuz etkileyebileceği gerekçesi ile kabul edilmemiştir (5, 6). Pozitif reaksiyon veren altı süt örneğinin testi negatif bulunan sütlerden birisi ile 1/64'e kadar seyreltilerek tekrarlanmıştır (7). Ayrıca pozitif süt örneklerinin toplandığı çiftliklerde

ineklerden kan alınarak Rose Bengal (Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü; İstanbul, Türkiye) bakılmış, ardından pozitiflerde serum aglütinasyon testi (SAT) uygulanmış, aşızsız sığırlarda 1/40, aşıllılarda 1/80 ve yukarı titreler pozitif kabul edilmiştir (5-7).

Tablo 1. Ring testinde oluşan reaksiyonu okuma tablosu

Krem halkası	Süt kısmı	Derecesi
Koyu kırmızı	Beyaz	++++
Kırmızı	Hafif renkli	+++
Kırmızı	Oldukça renkli	++
Kırmızı	Kırmızı	+
Beyaz	Kırmızı	-

BULGULAR

Değişik merkezlerden toplanan süt örneklerine ait analiz sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir. Emirdağ'dan alınan süt numunelerinin altısında test pozitif bulunmuş (6 / 120), bölgemizde değişik merkezlerdeki ahırlardan toplanan toplam 120 süt örneğinde *Brucella* antikorumlarının varlığı % 5.0 olarak bulunmuştur. Lamda pozitif sonuç veren sütlerin tamamında, tüpte yapılan Ring testinde de pozitif reaksiyon alınmıştır. Bu ineklerden alınan kanlarda Rose Bengal ve Serum Aglütinasyon Testi (SAT) çalışılmış, altısında 1/80 üzeri titrede *Brucella* antikoru pozitif bulunmuştur.

Tablo 2. Değişik bölgelerden alınan süt örneklerinde *Brucella* antikor sıklığı

Örnek alınan yerler	Süt örnekleri		Sütlerde antikor		SAT*	
	N	%	pozitif	negatif	pozitif	negatif
Afyon merkez köyleri	68	56.7	0	68	0	68
Emirdağ-Soğukkuyu	32	26.6	6	26	6	26
Bolvadin	20	16.6	0	20	0	20
Toplam	120	100.0	6	114	6	114

*Serum Aglütinasyon Testi

TARTIŞMA

Ülkemizde bruselloz; morbiditesi oldukça yüksek olmasına karşın, mortalitesi çok düşük bir zoonotik enfeksiyondur. İnsanlar arasında brusellozun belirli bir bölgeye yayılması, o yörede hayvancılık yapılması ile yakından ilişkilidir. Bir ülkede hangi hayvan türü fazla ise insanlar arasında da o tipin enfeksiyonları çoğunluktadır. Hayvanların enfeksiyon tablosu göstermeden önce, aylar boyunca, enfeksiyon etkenini taşımış olması çok önemlidir (8). Bruselloz bir yandan da hastalığın esas kaynağını oluşturan evcil hayvanlarda süt verimini azaltırken, düşükler ile de ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Ergin ve gebe dişi hayvanlar bruselloza daha duyarlıdır. Etken, gebe hayvanlarda uterusu, erkeklerde testise yerleşme eğilimindedir. Gebe hayvanlarda koteledonlara yerleşen bakteri; fetusun yeterli beslenmesini engeller ve yavrunun anne karnında ölmesine ya da düşük olmasına neden olur. *Brucella* etkeninin süte karışması, hayvanda oluşturduğu mastitis, genital akıntı ya da kontamine toz ve damlacıkların süte karışması iledir. Kırsal kesimlerde daha çok *B. melitensis* enfeksiyonu görülürken, büyük şehirlerde daha çok *B. abortus* enfeksiyonuna rastlanır (9). Yapılan bir çalışmada Amerika ve Avrupa'daki süt ineklerinin %20'sinin *B. abortus* ile enfekte olduğu fakat enfekte hayvanların belirlenerek ahırdan ayrılması ile brusellozun yayılmasının bir dereceye kadar sınırlı tutulduğu bildirilmiştir (2).

Eğer *Brucella* süte bulunuyorsa, peynir yapımı sırasında da canlılığını korur. Özellikle keçi sütünün kullanıldığı ülkelerde bruselloza sık rastlanmaktadır. *B. abortus* ve *B. melitensis*'in Pecorino peynirinde 90 güne kadar, Cheddar'da 6 ay canlı kaldığı fakat doğal olarak enfekte olmuş sütün kullanıldığı Camembert'de 200 günden sonra hiçbir bakterinin canlı kalmadığı gösterilmiştir (10). Ayrıca *Brucella* pastörize edilmemiş kremada da bulunabilir. Ancak yeterli sıcaklık uygulaması ile inaktive olur (11). Çalışmamızda, sadece bir köyden alınan (Emirdağ-Soğukkuyu) süt örneklerinden altısında (%5) antikor bulunmuş olup diğer bölgelerden toplanan örneklerde negatif bulunması aynı alanda

bulunan hayvanlar arasında enfeksiyonun yayıldığını göstermektedir.

Brucella türleri ile enfekte ve iyi tedavi edilmemiş hayvanların laktasyon dönemindeki süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi ile her yıl binlerce insan hastalığa yakalanmakta ve sonuçta hastalık insanlarda fizik yetersizlik ve iş gücü kaybına neden olmaktadır. Ülkemizde bildirim yetersizlikleri ve subklinik olguların varlığı nedeniyle gerçek bruselloz insidensi saptanamamakla birlikte, *Brucella* spesifik antikor taşıyan 1.750.000 bireyin olduğu sanılmaktadır (8). İspanya'da 1996 yılında pastörize edilmemiş peynir tüketimine bağlı bir *B.melitensis* epidemisi bildirilmiştir (12). Taze peynirin enfeksiyon kaynağı olduğu ülkelerin başında Akdeniz ülkeleri, Fransa, İtalya, Yunanistan ve Orta Asya ülkeleri gelmektedir (13). Bunun nedenini günümüzde dahi halen bazı yörelerde çiğ süt içiminin devam etmesine ve peynir yapımında da pastörize sütlerin ya da pişmiş sütlerin henüz yaygın olarak kullanılmasına bağlayabiliriz.

Ülkemizde, sütlerde *Brucella spp.* araştırılması ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Fakat brusellozun yaygınlığı ile ilgili bir fikir verebileceği düşüncesi ile ülke genelinde değişik bölgelerde insanlarda saptanan bruselloz seropozitifliği oranı %2-12 olarak belirlenmiştir (9). Afyon ve civarında hayvancılığın yoğun yapıldığı merkezlerde besiciler, kasaplar ile süt toplayıcısı ve süt ürünleri imalathanelerinde çalışan toplam 320 kişide Rose Bengal ve Wright

aglutinasyon yöntemi ile *Brucella* antikor titresinin araştırıldığı bir çalışmada, besicilerde %13.27, kasaplarda %8.57, süt ürünleri çalışanlarında da %15.68 *Brucella* aglutininlerinin saptandığı bildirilmiştir (14). Bu oranların normal popülasyona göre yüksek olması enfekte gıdalar yanında direkt temasla da (düşük materyali, hayvanın genital akıntısı ya da idrarın hasarlı ciltle teması yoluyla) bulaşın yaygın olması ile açıklanabilir. Ülkemizde yapılan benzer çalışmalar Tablo 3'de görülmektedir (15-22). Bu çalışmalarda değişik merkezlerde çoğunlukla risk gruplarında bruselloz sıklığı %5.6-25.0 arasında bildirilmiş olup, sonuçlar ülkemizde brusellozun yaygınlığına bir diğer göstergedir.

Bruselloz, daha çok besin yolu ile bulaşan bir enfeksiyon hastalığı olduğuna göre belirli risk gruplarında daha çok görülmesinden dolayı meslek hastalığı olarak da kabul edilmektedir. Ancak son zamanlarda enfekte besin tüketen tüm kesimleri de etkilediğinden hastalığın toplumsal bir önemi vardır. Korunma önlemleri şu şekilde sıralanabilir;

1. Öncelikle hastalığın bulaş yolları konusunda halkın bilgilendirilmesi gerekmektedir. Taze peynirlerin yeterince tuzlanması ve en az iki ay bekletildikten sonra yenmesi önerilmeli, ayrıca sütlerin pastörizasyonu sağlanmalıdır. Açık satılan sütlerin ve sokak sütçülerinin denetimi yapılmalı, enfeksiyonun epeidemik olduğu yörelerde Kaşar ve Tulum gibi olgunlaştırarak üretilen peynirlerin tüketilmesi,

Tablo 3. Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda belirlenen *Brucella* atikor pozitifliği prevalansı

Araştırmacı	Kaynak	Yıl	Şehir	Grup	Rose Bengal (%)	SAT (%)
Durmaz	15	1992	Malatya	Besiciler	1.4	
Kıyan	26	1999	Ankara	Kasap	13.0	
Çelebi	14	1991	Erzurum	Besiciler	12.0	
Gürel	17	1992	Denizli	Besiciler	11.3	13.5
Kalkan	18	1998	Elazığ	Kasap	21.0	
Kalkan	18	1998	Elazığ	Çiftçi	25.0	
Kaleli	19	1999	Denizli	Çiftçi	6.5	7.2
Çetin	20	1990	İstanbul	Veteriner, mezbaha, deri, konserve, et-balık, yün, süt işçileri, kasaplar.	6.0	
Sönmez	21	1997	Malatya	Çiftçiler	5.62	6.26

SAT: Serum Aglutinasyon testi

etlerin iyice pişirildikten sonra yenmesi önerilmelidir.

2. Ailede bruselloz tanısı almış kişi dışındaki diğer bireylerin de tarama testlerinden geçirilmesi gerekmektedir.

3. Risk altındaki personel eldiven gözlük kullanmalı, kolları örten giysiler giymelidir. Güzellik enstitülerinde ürün hazırlamada "sağlıklı" sığırla plesantası kullanılmasına özen gösterilmelidir. Endemik bölgelerde hayvan idrarları ile kirleşmiş olabilecek sebzelerin iyice yıkanmadan

yenmemesine dikkat edilmelidir.

4. Brusellozu olan bireylerle cinsel ilişki yasaklanmalı veya önlem alınmalı, brusellozlu olguların Sağlık Bakanlığı'na ihbarı kesinlikle yapılmalıdır.

5. İnsanların brusellozdan korunmasında ve hastalığın eradikasyonunda, hayvanların periyodik kontrolü de gerekmektedir. *Brucella* bakterisi ile enfekte olmamış süt danaları *B.abortus* 19 suşu, süt kuzuları *B.melitensis* Rev 1 suşu ile aşılanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Panes JJ, Parry DR, Leech FB. Report of survey of the quality of farm milk in England and Wales in relation of ECC proposals. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1979: 213.
2. Hayes PR. Food Microbiology and Hygiene. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985: 345.
3. Gökengin D. *Brucella* türleri. Serter D, Ertem E, Gökengin D, Ed. Başlıca bakteriyel, paraziter ve mikotik enfeksiyon hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri, 2000: 293-299.
4. Kocabeyoğlu Ö, Koşan E, Öztürkeri H, Emektaş G, Yılmaz M, Durgun T. Bruselloz tanısında çeşitli testlerin birlikte uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1994; 24: 30-3.
5. Harrigan WF, Mccance ME. Laboratory methods in food and dairy Microbiology, London: Academic Press, 1976: 157.
6. Sarısayın F. Koyun brusellozisi alanındaki son gelişmeler semineri. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Pendik. İstanbul, 1969:49.
7. Alkış N: Gıda Mikrobiyolojisi, Ankara: Yeni İnci Matbacılık, 1982: 320-4.
8. Baysal B. *Brucella*. Ustaçelebi Ş, Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 571-6.
9. Sözer TH. Bruselloz. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, ed. Enfeksiyon Hastalıkları'nda. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1996: 486-91.
10. Chapman HR and Sharpe ME. Microbiology and cheese. In: Robinson RK, ed. Dairy Microbiology, Vol 2. London: Applied Science Publishers, 1981; 12(3): 213-7.
11. Davis JG. Microbiology of cream and dairy deserts. In: Robinson RK, ed. Dairy Microbiology, Vol 2. London: Applied Science Publishers, 1981; 12(3): 127-34.
12. Castell MJ, Rullan W, Peiro CEF et al. Epidemic outbreak of 81 cases of brucellosis following the consumption of fresh cheese without pasteurisation. Rev Esp Salud Publica 1996; 70: 303-11.
13. Gotuzzo E, Cellilo C. *Brucella*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Balclow NR, eds. Infectious Disease. Philadelphia: WB Saunders Co, 1992: 1513-21.
14. Altındış M. Afyon bölgesi besicilerinde, kasaplarda, süt ürünleri toplayıcısı ve imalathanelerinde çalışanlarda bruselloz seropozitifliği. ANKEM Derg. 2000; 14(2):227.
15. Çelebi S, Babacan M, Tuncel E, Ayyıldız A. Erzurum yöresinde inaparan bruselloz prevalansı. İnfeksiyon Derg 1991; 21(2) : 199-203.

16. Durmaz E, Durmaz B, Aladağ M ve ark. Malatya yöresinde bruselloz prevalansı. Türkiye Tıp Dergisi. 1997; 4: 102-5.
17. Kıyan M, Cengiz T, Göz M, Sözmen Ş, Ayan Ş. Kasapların serumlarında *Brucella* aglütininin titrelerinin dağılımı. A.Üniv. Tıp Fak Derg 1991; 2: 19-21.
18. Gürel A. Denizli yöresinde insan ve sığır serumlarının brusellozis yönünden serolojik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmesi, Doktora Tezi. Denizli: Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1992.
19. Kalkan A, Felek S, Akbulut A, Papila Ç, Demirağ K, Kılıç SS. Bruselloz için risk taşıyan kişilerde mesleklerinde çalışma süresinin bruselloz seropozitifliği ve aglütinasyon titresi üzerine etkisi. Flora 1998; 3: 107-12.
20. Kaleli İ, Koçoğlu T, Özen N, Akşit F. Denizli yöresinde bruselloz prevalansı. İnfeksiyon Derg, 1999;13(2): 231-33.
21. Çetin ET, Çoral B, Bilgiç A. ve ark. Türkiye'de insanda bruselloz insidensinin saptanması. Doğa 1990; 14: 324-34.
22. Sönmez E, Durmaz B, Aladağ M ve ark. Malatya yöresinde bruselloz prevalansı. Türkiye Tıp dergisi. 1997; 4: 102-5.