

**BRUCELLA CANIS'E KARŞI OLUŞAN  
ANTİKORLARIN ATLARDA MERKAPTOETANOL  
MİKROAGLÜTİNASYON TESTİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

Nejat AYDIN (\*)    Jale ERDEĞER (\*\*)    K. Serdar DİKER (\*\*\*)

**GİRİŞ**

Brucella canis erkek köpeklerde epididimitis ve testiküler atrofi, dişi köpeklerde ise abortus ve infertiliteye neden olan bir etkidir (3). Bu mikroorganizmanın birçok ülkedeki köpek popülasyonunda varlığı saptanmıştır (1,7,8,15). Doğal konakçısı olan köpek dışında, kedi ve bazı yabani hayvanlarda da bu organizmaya karşı oluşmuş antikörlara raslanmıştır (13,14). Ayrıca, köpeklerden direk bulaşma veya laboratuvar kazası şeklinde oluşan insan infeksiyonları da bildirilmiş ve infeksiyonun zoonotik önemi de ortaya konulmuştur (11).

Atların brucella infeksiyonları üzerinde bir çok araştırma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda, atlarda sadece Br. abortus'un, çoğunlukla eklem ve sinovyal yüzeylerle ilgili lokal ve bazen febril infeksiyonlara neden olduğu belirlenmiştir (4, 10). Sadece bir araştırmada, atlarda Br. canis'e karşı oluşmuş aglütinlerin saptandığı bildirilmiştir (12).

---

(\*) Doç. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

(\*\*) Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

(\*\*\*) Dr. Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Türkiye’de, gerek köpeklerde ve gerekse insanlarda Br. canis infeksiyonlarının varlığı serolojik olarak saptanmıştır (5,9). Br. canis infeksiyonlarının Türkiye’deki varlığı da göz önüne alınarak, bu araştırmada sınırlı bir at populasyonunda olası Br. canis aglütinlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Serum örnekleri : Kara Kuvvetleri Komutanlığına ait 30 dişi ve 46 erkek ve halka ait 2 dişi olmak üzere toplam 78 normal görünüşlü atın kanları toplandı. Kanlardan elde edilen serumlar kullanılmaya kadar  $-20^{\circ}$  de saklandılar.

Merkaptoetanol Mikro Aglütinasyon Testi (ME-MAT): Serumların incelenmesinde, merkaptoetanol tüp aglütinasyon testinden modifiye edilmiş olan ME-MAT testi kullanıldı (6). Bu testte kullanılan pozitif ve negatif kontrol serumları ile stok Br. canis aglütinasyon antijeni Dr. G.M. Brown (USDA Diagnostic Reagent Section,( Ames, Iowa, USA) dan sağlandı.

ME-MAT özetle aşağıdaki şekilde uygulandı: 99.4 ml % 3.5 tuzlu su içine, % 10 formaldehid kapsayan fizyolojik tuzlu sudan 0.6 ml eklendi. Bu solusyonun 99.285 ml’sine, 0.715 ml 2-Mercaptoethanol katılarak 0.1 M merkaptoetanol solusyonu (pH=8.5) hazırlandı. Serumlar mikropate çukurlarında 0.05 ml merkaptoetanol solusyonu içinde iki katlı olarak sulandırıldı. Stok antijenden 4.4 ml, 95.6 ml % 3.5 tuz-formalin solusyonuna katılarak test antijeni hazırlandı (pH=8.5, 550 nanometrede optik dansite = 0.9) Her çukura 0.05 ml test antijeni eklendi ve 30 saniye çalkalandı. Reaksiyon  $37^{\circ}\text{C}$  de 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirildi. Sero-pozitiflik kriteri olarak en düşük titrede pozitif reaksiyon veren pozitif kontrol serumunun titresi kabul edildi.

İstatistiksel analiz : Pozitif reaksiyon veren serumlarda erkekler ile dişiler arasındaki farkın önemli olup olmadığı «Chi-kare» testi ile incelendi (16).

## BULGULAR

ME-MAT testinde kontrol olarak kullanılan pozitif serumlardan en düşük titreli 1: 16 sulandırmada pozitif reaksiyon gösterdi. Bu nedenle, bu test için sero-pozitiflik kriteri 1: 16 olarak kabul edildi.

İncelenen at serumlarından hiçbirisi, bu test için kabul edilen pozitiflik kriteri olan 1: 16 sulandırmada pozitif reaksiyon vermedi. ME-MAT testi ile incelenen toplam 78 serumun 29 tanesi (% 37.1) 1: 4 sulandırmada, 13 tanesi (% 16.6) 1: 8 sulandırmada pozitif reaksiyon verdi (Tablo I). Aygırlara ait 46 serumun 5'i (% 10.8), kısraklara ait serumların ise 8'i (% 25.0) 1: 8 sulandırmada pozitif bulundu.

TABLO : 1 Erkek ve Dişilerde Br. Canis Antikor Titreleleri (%)

Cinsi	İncelenen	1:4	1:8
Ayır	46	19 (% 41,3)	5 (% 10,8)
Kısrak	32	10 (% 31,2)	8 (% 25,0)
Toplam	78	29 (% 37,1)	13 (% 16,6)

İstatiksel analizde, 1: 8 titrede pozitif reaksiyon veren erkekler ile dişiler arasındaki fark chi-kare testinde ve 1 serbestlik derecesinde 2.74 olarak belirlendi (P, 0.1).

## TARTIŞMA

Brucella canis infeksiyonlarının teşhisi daha çok serolojik yolla yapılmaktadır. Brucella cinsine ait bakterilerin bilinen kompleks patogenezi nedeniyle, özellikle organlara veya dokulara lokalize olduktan sonra bunları izole etmek güçleşir. Br. canis için de aynı durum söz konusu olduğundan, bu bakteriden ileri gelen infeksiyonların teşhisi çeşitli serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Ancak, Br. canis mukoid karakterde bir mikroorganizma ol-

duğundan, «S tipi koloni oluşturan Br. abortus gibi organizmalardan hazırlanan antijenler Br. canis infeksiyonlarının teşhisinde kullanılamamaktadır (17). Serolojik testler içinde en çok kullanılan iki tanesi, lam aglütinasyon ve merkaptotanol tüp aglütinasyon testidir. Lam aglütinasyon testinin spesifitesi yüksek, ancak duyarlılığı azdır. Başka bir deyişle, negatif sonuçlar güvenilir olmasına karşılık pozitif sonuçların hepsini ortaya çıkarmamaktadır (2). Merkaptotanol aglütinasyon testi ise hatalı pozitif sonuçları elimine etmesi ve duyarlılığının yüksek olması nedeniyle güvenilir bir yöntemdir. Bu nedenle, bu araştırmada merkaptotanol aglütinasyon testi ve bunun daha az miktarda serum-antijen ve daha kısa inkübasyon süresi gerektiren mikro modifikasyonunun kullanılması tercih edilmiştir. Merkaptotanol serumdaki IgM sınıfı antikorları bozan fakat IgG'ler üzerine etkisi olmayan bir maddedir. Br. canis infeksiyonlarında merkaptotanol kullanılmasının temeli ise, bu infeksiyona karşı bağışıklıkta IgM tipi antikorların rolü bulunmadığına dair araştırma bulgularına dayanmaktadır (8).

Kontrol serumları ile yapılan ön denemelerde, pozitif olduğu bilinen kontrol serumunun 1: 16 titrede çalışması nedeni ile, bu araştırmada kullanılan yöntem için 1: 16 sulandırmadaki reaksiyon aktif infeksiyonun belirtisi olarak kabul edilmiştir. Bu kriterlere göre atlarda aktif infeksiyon ile ilgili pozitif serum belirlenmemesine karşın, 1: 8 sulandırmada % 16.6 oranında pozitif reaksiyon belirlenmiştir. Bu sulandırmadaki reaksiyonlar da şüpheli sonuç olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu sulandırmada dişiler ile erkekler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmemiştir ( $P > 0.1$ ).

Atlarda Br. canis antikorlarını araştıran sadece bir çalışma bulunduğundan, elde ettiğimiz sonuçları etraflıca tartışmak mümkün olmamıştır. Bu konuda yapılan tek araştırmada, Br. canis teşhisi için «card test» kullanılmış ve mezbahada kesilen atların tümünde, kliniğe getirilen atların ise % 61.7'sinde pozitif sonuç alınmıştır (12). Bu araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar muhtemelen kullandıkları yöntemden kaynaklanmaktadır. Zira, incelenen tüm atların, şimdiye kadar hiç bildirilmemiş olan bir infeksiyona karşı böyle yüksek düzeyde antikor taşımaları mümkün görülmemektedir. Nitekim, aynı araştırmacılar, serumları Actinobacillus equuli ile adsorbe ettiklerinde titrelerin birkaç kat düştüğünü açıklamışlardır.

Araştırmamızda, atlarda aktif enfeksiyona işaret Br. canis antikorlarının pozitif sonuç düzeyinde bulunmamasının nedeni incelenen hayvanların tümünün kapalı bir sistem içinde yetiştirilmesi ve köpeklerle temaslarının çok az olmasına bağlanabilir. Ayrıca, Br. canis'in atlarda enfeksiyon oluşturduğunu gösteren bir çalışma da şimdiye kadar yapılmamıştır. Türkiye'de sokak köpeklerinde % 15.6 oranında aktif enfeksiyon saptanmış olması, hatta enfeksiyonun insanlara da bulaştığının iki vak'a ile belirlenmesi dikkati çekmektedir (6,9). Bu nedenle, bu araştırmada elde edilen şüpheli sonuçları da göz önüne alarak, köpeklerle temasın çok olduğu kırsal kesimlerdeki ve çevre koşullarına daha açık atlardan alınan örneklerle yapılacak geniş bir taramanın yararlı olacağı kanısındayız. Ayrıca, atların Br. canis enfeksiyonlarına ne derece duyarlı oldukları da araştırılmaya değer bir konudur.

### Ö Z E T

Toplam 78 atın serumları merkaptotanol mikroaglutinasyon testi ile Br. canis antikorları yönünden incelendi. Merkaptotanol mikroaglutinasyon testinde 1: 16 veya üstündeki sulandırmalarda pozitif reaksiyon veren serumlar aktif enfeksiyonun belirtisi olarak kabul edildi. Bu titrede pozitif reaksiyon veren serum bulunmadı. İncelenen serumların % 37.1'i 1: 4 sulandırmada, % 16.6'sı 1: 8 sulandırmada pozitif reaksiyon verdi. Daha çok sayıda örnek ile ve daha geniş kapsamlı bir at popülasyonunu içine alan bir araştırmanın yararlı olacağı kanısına varıldı.

### S U M M A R Y

The Investigation of Brucella canis Antibodies by Mercaptoethanol Micro Agglutination Test in Horses.

Sera of 78 horses were tested by mercaptoethanol micro agglutination test for agglutinins to Brucella canis. A titer of 1: 16 or more in mercaptoethanol microagglutination test was considered as indicative of active infection. No sera were found to be positive at this titer. Of 78 sera investigated, 37.1 per cent were positive at 1: 4 titer and 16.6 per cent were positive at 1: 8 titer. It was concluded that a survey which will be performed with numerous sera containing wide variety of horses may give more reliable results.

## KAYNAKLAR

- 1 — BOSU, W.T.K. and PRESCOTT, J.F. (1980) : A serologic survey dogs for *Brucella canis* in southwestern Ontario. *Can. Vet. J.*, 21: 198-200.
- 2 — CARMICHAEL, L.E. and JOUBERT, J.C. (1987) : A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. *Cornell Vet.*, 77: 3-12.
- 3 — CARRIER, R.W., RAITHEL, W.F., MARTIN, R.J. and POTTER, M.E. (1982) : Canine brucellosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180: 132-133.
- 4 — DENNY, H.R. (1972) : Brucellosis in the horse. *Vet. Rec.*, 90: 86-91.
- 5 — DİKER, S., İSTANBULLUOĞLU, E., AYHAN H. ve SOYSAL, G. (1984) : Bursa bölgesindeki insanlarda *Brucella canis* infeksiyonları üzerinde serolojik bir inceleme. *Mikrobiyol. Bült.*, 18: 203-207.
- 6 — DİKER, K.S., AYDIN, N., ERDEĞER, J. and ÖZYURT, M. (1987). A serologic survey of dogs for *Brucella canis* and *Brucella abortus* and evaluation of mercapto ethanol microagglutination test. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, (Baskıda).
- 7 — FLORES-CASTRO, A. and SEGURA, R. (1976) : A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.*, 66: 347-352.
- 8 — HOFF, G.L. and NICHOLS, J.B. (1974) : Canine brucellosis in Florida: serologic survey of pound dogs, animal shelter workers and veterinarians. *Am. J. Epidemiol.*, 100: 35-39.
- 9 — İSTANBULLUOĞLU, E. ve DİKER, S. (1983). *Brucella canis* üzerinde serolojik incelemeler. *A.Ü. Vet. Fak. Der.*, 30: 14-18.
- 10 — MACMILLAN A.P. and COCKREM, D.S. (1986) : Observations on the long term effects of *Brucella abortus* infection in the horse, including effects during pregnancy and lactation. *Equine Vet. J.*, 18: 388-390.
- 11 — MONOROE, P.W., SILBERG, S.L. and MORGAN, P.M. (1975). Seroepidemiological investigation of *Brucella canis* antibodies in different human population groups. *J. Clin. Microbiol.*, 25 382,386.
- 12 — Nicoletti, P.L. MAHLER, J.R. and Scarratt, W.K. (1982) Study of agglutinins to *Brucella abortus*, *B canis* and *Actinobacillus equuli* in horses. *Equine Vet. J.*, 14: 302-304.
- 13 — RANDHAWA, A.S., KELLY, V.P. and BAKER, E.F. (1977) : Agglutinins to *Coxiella burnetii* and *Brucella* spp, with particular reference to *Brucella canis*, in wild animals of southern Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 171: 939-942.
- 14 — RANDHAWA, A.S., DIETERICH, W.H. and HUNTER, C.C. (1977) : Prevalence of seropositive reactions to *Brucella canis* in a limited survey of domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 171: 267-268.
- 15 — SAEGUSA, J., UEDA, K., GOTO, Y. and FUJIWARA, K. (1978). A survey of *Brucella canis* infection in dogs from Tokyo area. *Jap. J. Vet. Sci.*, 40: 75-80.
- 16 — SARD, D.M. (1978) : Expectation and observation. *Vet. Rec.*, 103: 552-555.
- 17 — ZOHA, S.J. and CARMICHAEL, L.E. (1981) : Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidness. *Cornell Vet.*, 71: 428-438.