



## Evaluation of Usage Indirect ELISA Using Antigens From Two Different Brucella Strains in Serological Diagnosis of *B. canis* Infection

Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK<sup>1</sup> Oktay KESKİN<sup>1</sup> Esra BÜYÜKÇANGAZ<sup>2</sup> Osman Yaşar TEL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Sanlıurfa, Turkey

<sup>2</sup>Uludağ University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Bursa, Turkey

Received: 31.03.2016

Accepted: 18.05.2016

### SUMMARY

The aim of this study was to develop two indirect ELISAs (i-ELISA) using heat-extracted antigens prepared with the *B. canis* M- and *B. abortus* RB51 strains for the serologic diagnosis of *B. canis* infection in dogs. Reference sera consisted of 16 agar gel immunodiffusion (AGID)-positive sera from animals with clinical signs and positive bacterial isolation and 24 AGID-negative sera from healthy animals with no history or evidence of canine brucellosis were used to assess diagnostic sensitivity and specificity of the tests. Using validation panel, the cut-off values of OD<sub>450</sub> 0.243 and 0.354 were selected to give 100 % diagnostic specificity and sensitivity for *B. abortus* RB51 i-ELISA and *B. canis* M- i-ELISA, respectively. Based on these cut-off values, 113 serum samples taken from dog shelters in Şanlıurfa and Bursa metropolitan municipalities tested by rapid slide agglutination test (RSAT) and both i-ELISAs. Of the 47 dog sera tested from Şanlıurfa, 6 (12.8%) were positive by RSAT, 3 (6.4%) were positive by *B. abortus* RB51-i-ELISA and two of the samples (4.2%) were found positive by *B. canis* M- i-ELISA. Of the 66 serum samples from Bursa, 11 (16.6%) were found positive by RSAT, 5 (7.6%) and 4 (6.1%) of which were confirmed by *B. abortus* RB51 i-ELISA and *B. canis* M- i-ELISA, respectively. In conclusion, both *B. abortus* RB51 i-ELISA and *B. canis* M- i-ELISA yielded the same diagnostic specificity and sensitivity with minor differences and it was thought that they could be used successfully as a confirmatory test together with RSAT as a screening test.

**Key Words:** *Brucella canis* M-, *Brucella abortus* RB51, i-ELISA, Serology, Dog

### ÖZET

### *Brucella canis* İnfeksiyonunun Serolojik Tanısında İki Farklı *Brucella* Suşundan Hazırlanan Antijenlerin İndirekt ELISA'da Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Bu çalışmada, *B. canis* infeksiyonunun serolojik teşhisi için *B. canis* M- ve *B. abortus* RB51 suşlarından hazırlanan antijenlerin kullanıldığı indirekt ELISA (i-ELISA) geliştirilmesi amaçlanmıştır. *B. canis* infeksiyonu etken izolasyonu ve agar jel immunodiffüzyon (AGID) testi ile doğrulanmış 16 adet pozitif serum ve *B. canis* infeksiyonu yönünden hiçbir klinik belirti göstermeyen AGID negatif 24 adet serum testin duyarlılığı ve özgüllüğünü saptamak için referans serumlar olarak kullanılmıştır. Validasyon paneli kullanılarak, tanılabilirlik ve özgüllüğü %100 verecek eşik değeri *B. abortus* RB51 i-ELISA için OD<sub>450</sub> 0.243 ve *B. canis* M- i-ELISA için OD<sub>450</sub> 0.354 olarak belirlenmiştir. Saptanan eşik değer göz önüne alınarak, Şanlıurfa ve Bursa Büyükşehir Belediyesi Köpek Barınaklarından temin edilen 113 adet köpek serumu çabuk lam aglütinasyon testi (ÇLAT) ve geliştirilen iki i-ELISA prototipi ile test edilmiştir. Şanlıurfa ilinden temin edilen 47 köpek serumundan 6'sı (%12.8) ÇLAT ile, 3'ü (%6.4) *B. abortus* RB51 i-ELISA ile ve ikisi (%4.2) de *B. canis* M- i-ELISA ile pozitif bulunmuştur. Bursa ilinden temin edilen 66 adet köpek serumundan 11'i (%16.6) ÇLAT ile, 5'i (%7.6) *B. abortus* RB51 i-ELISA ile ve 4'ü (%6.1) de *B. canis* M- i-ELISA ile pozitif bulunmuştur. Sonuçta *B. abortus* RB51 i-ELISA ve *B. canis* M- i-ELISA'nın küçük farklılıklar ile benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdikleri ve bu testlerin köpeklerde *B. canis* infeksiyonunda doğrulayıcı test olarak ÇLAT ile birlikte başarılı bir şekilde kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Brucella canis* M -, *Brucella abortus* RB51, i-ELISA, seroloji, köpek

### GİRİŞ

*B. canis* infeksiyonu karnivorların abort ve infertilite ile karakterize bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalık dişi ve erkek

köpeklerin reproduktif hayatlarını sona erdirebildiğinden değerli ırklarda özel bir öneme sahiptir (Carmichael ve ark 1966, Wanke 2004, Hollett 2006). Hastalığın tedavisinde antibiyotik kullanımı tatminkar sonuçlar

oluşturmadığından önerilmemektedir. Aynı şekilde bugüne kadar yapılan çalışmalarda *B. canis*'e karşı etkili bir aşı geliştirilememiştir. Yapılan bir araştırmada *B. canis*'in serum ve kanda 59, safra ve idrarda 17 gün canlı kalabileceği bildirilmiştir (Yardımcı ve ark 1998). Bu durumda hastalığın bulaşmasını önleyen gerekli hijyenik tedbirlerin alınması ve belli aralıklarla yapılan serolojik yoklamalarda pozitif bulunanların eliminasyonu, hastalığın kontrol ve eradikasyonunda temel ilkeleri oluşturmaktadır (Carmichael ve Kenney 1970, Pickerill 1970, Carmichael 1990). Dolayısı ile hastalığın serolojik teşhisi hastalığın kontrolündeki ilk önemli basamağı teşkil etmektedir. Köpek brusellozunun rutin serolojik tanısında genellikle 2 merkaptotanol katılan ya da katılmayan tüp aglütinasyon testi (2-ME-TAT, TAT), çabuk lam aglütinasyon testi (ÇLAT, 2-ME-LAT), agar jel immunodiffüzyon (AGID) testi, komplement fiksasyon testi (KFT) ve ELISA kullanılmaktadır (Badakhsh ve ark 1982, Currier ve ark 1982, Carmichael ve Joubert 1987, Alton ve ark 1988, Carmichael 1990, Mateu-de-antonio ve ark 1994). Ancak; otoaglütinasyon oluşturacağı için hemoliz olmuş serumların kullanılmaması, kronik evrelerdeki ve henüz bakteriyeminin gelişmediği erken evrelerde antikor titrelerini saptamadaki yetersizlikleri, oluşturduğu prozon fenomeni ve testte seri dilüsyon yapmanın yarattığı zorluklar gibi bazı dezavantajlar, TAT'ın klinik amaçlı geniş çapta kullanımını sınırlandırmıştır. Ayrıca AGID ve KFT testlerinin gerek standardizasyonları ve gerekse testlerin uygulanmasının komplike olması bu testlerin yaygın olarak kullanılmasını önlemektedir. ÇLAT çok pratik ve güvenilir bir tarama testidir ancak bu testle saptanan çok sayıda yanlış pozitiflerin konfirme edici bir testle doğrulanması gerekmektedir (Badakhsh ve ark 1982, Currier ve ark 1982, Carmichael ve Joubert 1987, Lucero ve ark 2002, Lopez ve ark 2005, Oliveira ve ark 2011). Bu bağlamda i-ELISA halen hastalığın serolojik teşhisinde kullanılan en özgül ve duyarlı test kabul edilmektedir (Wanke 2004, Hollett 2006).

Bu çalışmada, karnivorlarda abort ve infertilitenin önemli bir etkeni olan *B. canis* infeksiyonunun serolojik teşhisinde, konfirme edici olarak kabul edilen farklı bir ELISA yönteminin geliştirilmesi ve bu yöntemde farklı iki suşun kullanılarak test sonuçlarının özgüllük ve duyarlılık açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Bakteriyel suşlar

Çalışmada i-ELISA için gerekli antijen üretiminde kullanılan *B. canis* M- suşu Dr. Carmicheal'dan (Cornell Üniversitesi, Baker Enstitüsü, Ithaca, ABD) ve *B. abortus* RB51 suşu Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Brucella Ulusal Referans Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

### Besiyerleri

Bakteriyel suşların üretilmesinde ve biyotip kontrollerinde Triptik soy agara (Oxoid) % 5-10 oranında inaktif fetal buzağı serumu (Biochrom) katılarak hazırlanan serum dekstroz agar (SDA), thionin besiyeri, bazik fuksin besiyeri ve safranin besiyerleri kullanılmıştır (Alton ve ark 1988).

### Brucella fajları

Testlerde laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan Tbilisi, R/C ve R fajları kullanılmıştır.

### Serum örnekleri

Çalışmada Şanlıurfa İli Büyükşehir Belediyesi köpek barınağından Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'a daha önceki yıllarda teşhis amacıyla

gönderilen ve -20°C'de saklanan 47 ve Bursa İli Büyükşehir Belediyesi köpek barınağından Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'a daha önceki yıllarda teşhis amacıyla gönderilen ve -20°C'de saklanan 66 olmak üzere toplam 113 köpek serumu test edildi.

### Pozitif ve negatif serumlar

İki farklı antijen ile hazırlanan indirekt ELISA prototiplerinin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi amacıyla hastalığın klinik belirtilerini gösteren ve etken izolasyonunun yapıldığı köpeklere ait AGID pozitif olan 16 adet pozitif serum ile hastalığa özgü hiçbir klinik belirti göstermeyen AGID ve ÇLAT testleri ile negatif bulunan sağlıklı köpeklerden elde edilen 24 adet serum referans örnekler olarak kullanıldı. Referans örnekler Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, Arjantin, Prof. S. Estein'den temin edildi.

### Metot

Liyofilize suşlar 0.5 ml PBS (pH 7.2) ile sulandırıldı, 3 adet SDA'a ekildi ve 37°C'de 3 gün süre ile aerobik olarak inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üreyen koloniler saflık yönünden kontrol edildikten sonra klasik yöntemlere göre identifikasyonları yapıldı ve referans suşların kültürel özelliklerine uygunluğu yönünden doğrulandı (Alton ve ark 1988).

Kültürel özellikleri doğrulanmış suşların her birinden bir öze dolusu alınarak yatık SDA tüplerine ekim yapıldı ve kültürler 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra üreyen koloniler 50 ml steril PBS (0.15M) ile toplandı ve elde edilen bakteri solusyonları (*B. canis* M- ve *B. abortus* RB51) 60°C'de su banyosunda 1 saat tutularak ile ısı ile inaktive edildi.

### Antijenin hazırlanması

Antijen üretimi Barrouin-Melo ve ark.(2007) tarafından bildirilen yöntemle yapıldı ve daha sonra ELISA solid faz antijeni olarak kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

### İndirekt ELISA tekniği

İndirekt ELISA farklı araştırmacıların bildirdikleri yöntemlerin bir kombinasyonu olarak yapıldı (Mateu-de-antonio ve ark 1994, Barrouin-Melo ve ark 2007, Nielsen ve ark 2007). Yeni bir ELISA prototipi geliştirileceği için kullanılacak antijenlerin ve konjugatın testte kullanılacakları optimum dilüsyonları, kontrol serumlarının farklı dilüsyonları kullanılarak çapraz titrasyon ile belirlendi. Bunun için karşılıklı titrasyonları yapılarak ve pozitif ve negatif serum arasında en büyük farkı oluşturan dilüsyon optimum titre olarak seçildi. Hazırlanan ELISA solid faz antijeni, 0.05 M sodyum karbonat (pH 9.6) antijen kaplama tampon solusyonu içinde, konsantrasyonu antijen ve konjugat dilüsyonlarının optimizasyonunda belirlenen oranda olacak şekilde sulandırıldı ve 96 gözlü düz tabanlı polistiren pleytlerin (NUNC 692620) tüm kuyucuklarına 200 µl olarak taksim edildi. Antijenle kaplanan pleytler 4 °C de 18-24 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler % 0.05 Tween 20 içeren PBS (PBS/T) ile 5 kez yıkandı. Daha sonra PBS/T içinde 1/100 oranında dilüsyonları yapılmış pozitif ve negatif serumlar 100 µl olacak şekilde serum numunesinden dublike olmak üzere pleyte konuldu. Çalışmada yapılan tüm testlerde sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği açısından standart olarak aynı pozitif ve negatif *B. canis* serumları kullanıldı. Hazırlanan pleytler üstü kapalı olarak oda ısısında 1 saat süre ile inkübe edildikten sonra 5 kez PBS/T yıkandı ve sonra horse radish peroxidase (HRPO) ile işaretlenmiş protein A/G konjugatı (ImmunoPure, Pierce LAB) ürünün çalışmada

belirlenen dilusyonu PBS/T içinde sulandırılarak tüm kuyucuklara 100 µl olarak ilave edildi. Oda ısısında 1 saat inkübasyonu takiben pleytler tekrar 5 kez PBS/T ile yıkanarak ve üzerine 100 µl kromojenik substrat (0.05 M sitrat tamponu pH 4.5 içinde 4.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1.0 mM 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sülfonik asit) diammonyum tuzu) ilave edildi. Pleytlere oda ısısında 10-15 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu yavaşlatmak için 100 µl 1 mM sodyum azid ilave edilerek otomatik ELISA okuyucusu (VERSAmax 3.13/B2573) ile 450 nm'de absorban değerleri okundu.

### İstatistiksel analiz

Gerçek pozitif ve gerçek negatif serumlar kullanılarak elde edilen sonuçlar SPSS 17.0 paket programında Receiver Operator Characteristics (ROC) ile analiz edildi (Schoonjans ve ark 1995). Tanısal özgüllük ve duyarlılığın %100 olarak verecek eşik değerleri ROC analizi ile belirlendi.

### BULGULAR

Çalışmada geliştirilen iki ayrı ELISA prototipinin eşik değerinin belirlenmesinde gerçek pozitif ve gerçek negatif validasyon paneli kullanılarak, *B. abortus* RB51 i-ELISA için OD<sub>450</sub> 0.243 ve *B. canis* M- i-ELISA için OD<sub>450</sub> 0.354, tanısal duyarlılık ve özgüllüğün her ikisinin %100 olduğu eşik değerler olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre *B. abortus* RB51 i-ELISA için optik yoğunluk değeri 0.243 ve *B. canis* M- i-ELISA için optik yoğunluk değeri 0.354'ün üzerinde olan tüm test serumları *B. canis* infeksiyonu için pozitif kabul edildi. Bu amaçla Şanlıurfa ve Bursa Büyükşehir Belediyelerine bağlı köpek barınaklarından alınan serumlar geliştirilen iki ELISA prototipi ve ÇLAT antijeni ile test edildiler. Şanlıurfa ilinden temin edilen 25'i dişi ve 22'si erkek olmak üzere toplam 47 köpekten alınan kan serumunun %12.8'i ÇLAT ile, % 6.4'ü *B. abortus* RB51 i-ELISA ile ve %4.2'si *B. canis* M-i-ELISA ile pozitif bulundu (Tablo 1).

Bursa ilinden temin edilen 37'si dişi ve 29'u erkek olmak üzere toplam 66 köpekten alınan kan serumunun % 16.6'sı ÇLAT ile, % 7.6'sı *B. abortus* RB51 i-ELISA ile ve % 6.1'i *B. canis* M- i-ELISA ile pozitif bulundu (Tablo 2).

**Tablo 1.** Şanlıurfa köpek barınağından toplanan köpek kan serumlarının serolojik test sonuçları

**Table 1.** Serological test results of dog sera collected from dog shelter of Şanlıurfa.

Serum Sayısı n:47	Cinsiyet (Dişi:25) (Erkek:22)	ÇLAT	i-ELISA	i-ELISA
			<i>B. abortus</i> RB51	<i>B. canis</i> M-
1	Dişi	+	+	+
1	Erkek	+	+	+
1	Dişi	+	+	-
2	Dişi	+	-	-
1	Erkek	+	-	-
21	Dişi	-	-	-
20	Erkek	-	-	-
		6	3	2
		(% 12.8)	(%6.4)	(%4.2)

**Tablo 2.** Bursa köpek barınağından toplanan köpek kan serumlarının serolojik test sonuçları

**Table 2.** Serological test results of dog sera collected from dog shelter of Bursa.

Serum Sayısı n:66	Cinsiyet (Dişi:37) (Erkek:29)	ÇLAT	i-ELISA	ELISA
			<i>B. abortus</i> RB51	<i>B. canis</i> M-
4	Dişi	+	+	+
1	Dişi	+	+	-
5	Erkek	+	-	-
1	Dişi	+	-	-
31	Dişi	-	-	-
24	Erkek	-	-	-
		11	5	4
		(% 16.6)	(%7.6)	(%6.1)

### TARTIŞMA ve SONUÇ

*B. canis* köpeklerde infertilite, abort ve üreme bozukluklarına neden olmaktadır. *B. canis* infeksiyonu bir köpek çiftliğine girdiğinde hızla yayılır. Abort yapan dişiler etkeni vajinal akıntıları ile 10<sup>10</sup> CFU/ml düzeyinde, benzer olarak erkekler de etkeni sperma ile aylarca saçarlar (Carmichael ve Kenney 1970, Wanke 2004). Klinik olarak normal görünen köpeklerde veneral bulaşmanın en azından iki yıl daha devam edebildiği göz önüne alındığında hastalığın kontrolünde bulaşmayı önleyici tedbirlerin alınmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Bulaşmayı önlemek için de öncelikle hasta hayvanların doğru bir şekilde ve vakit kaybetmeden teşhis edilmesi en temel adımdır.

Smooth suşlar ile meydana gelen klasik bruselloz ihbarı mecburi bir hastalık olmasına karşılık *B. canis* tarafından oluşturulan köpek brusellozu zoonotik karakterine rağmen bildirim zorunlu bir hastalık değildir. Bu nedenle hastalığın köpeklerdeki insidansı sınırlı bir takım serosurveylerden elde edilen bulgular ışığında değerlendirilmektedir. Bunun en önemli nedenlerinden biri ticari olarak standardize bir test antijeninin mevcut olmaması olabilir. Çalışmamızda bu eksikliklerden yola çıkılarak *B. canis* infeksiyonlarının teşhisinde duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan, köpeklerde ve zoonoz olması nedeni ile insanlarda hastalığın durumunu daha sağlıklı değerlendirmeye olanak veren bir ELISA geliştirilerek rutin serolojik tanıda ÇLAT tarama testinden sonra doğrulayıcı test olarak kullanılması hedeflenmiştir.

Çalışmada pozitif ÇLAT sonuçlarının ELISA'da alınan pozitif sonuçlara göre daha fazla olması diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Lucero ve ark 2002, Lopez ve ark 2009, Escobar ve ark 2010, Uçan ve ark 2010). Bu durum ya hastalığın çok erken devresinde olabileceği şeklinde ya da daha büyük bir olasılıkla yanlış pozitiflik olarak değerlendirilebilir. Zira, ÇLAT'ın *B. canis* infeksiyonunun erken devrelerinde oluşan spesifik immunoglobulin M (Ig M)'leri en erken 1-2 hafta da saptamaktadır. ÇLAT'ın yaygın ve pratik bir test olmasına karşın en büyük dezavantajının düşük özgüllüğü sebebi ile saptadığı çok sayıda yanlış pozitif olgular olduğu bildirilmektedir (Currier 1982, Alton ve ark 1988, Uçan ve ark 2010). *B. canis* hücre duvarı LPS antijenlerinin, rough *Brucella* tür ve suşlarının ve *Actinobacillus equuli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas spp.* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi etkenlerin R-LPS tabakalarının benzerlik gösterdiği ve bunun da çapraz

reaksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Zoha ve Carmichael 1981, Moreno ve ark 1984, Carmichael 1990).

İki farklı antijen ile hazırlanan i-ELISA prototiplerinin duyarlılık ve özgüllükleri birbirine oldukça yakın bulunmuştur. Ancak *B. abortus* RB51 i-ELISA ile *B. canis* M- i-ELISA'ya göre daha fazla pozitiflik saptanması, bu testin daha duyarlı ancak daha az özgül bir test olabileceğini düşündürmektedir. Bu kanıyı test etmek için gerçek infekte ve gerçek infekte olmayan populasyonlardan alınacak çok sayıda serumdan oluşan validasyon panelleri ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulabilir. Çeşitli araştırmacılar *B. canis* M- suşundan hazırlanmış antijenle i-ELISA geliştirmiş ve araştırmamızda elde edilen sonuçlara benzer bir şekilde, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test olarak hastalığın serolojik tanısında doğrulayıcı olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Mateu-de-antonio ve ark 1993, Lucero ve ark 2002, Wanke ve ark 2002, Lopez ve ark 2009). *B. canis* M- suşu *B. canis*'in daha az mukoid olan bir M- varyant suşudur. Bu varyant suş daha az mukoid özelliğe sahip olmasının yanı sıra daha az hidrofobik ve net negatif yüke sahiptir. Bu özellikleri, bu suşu serolojik testler için ideal bir aday yapmakta, gerek ÇLAT ve gerekse ELISA da yalancı pozitiflik oranını önemli bir oranda düşürmektedir (Zoha ve Carmichael 1981, Zoha ve Carmichael 1982, Carmichael ve Joubert 1987, Carmichael 1990). Bu nedenle testin spesifikliğini artırmak için çalışmamızda bu suştan hazırlanan bir ELISA prototipi geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bazı araştırmacılar hücre duvar yapısının *B. canis*'e benzerliği dolayısı ile *B. abortus* RB51 suşundan hazırlanmış ELISA modelleri ile çalışmışlar ve olumlu sonuçlar aldıklarını belirtmişlerdir (Nielsen ve ark 2004, Escobar ve ark 2010). *B. abortus* RB51 suşundan hazırlanan R-LPS'in antijen olarak kullanıldığı ELISA modelinde köpek serumlarında, %95.3 duyarlılık ve %100 özgüllük saptandığı belirtilmiştir. Bu yüksek özgüllüğü araştırmacılar saf olarak sadece R-LPS kullandıklarına bağlamışlardır (Nielsen ve ark 2004). Bu çalışmada her iki suşun sıcak tuzlu su ekstraktları kullanıldı. Bu antijen hazırlama metodu basit, pahalı ve komple ekipmanlara ihtiyaç göstermeyen ve orta ölçekli çoğu laboratuvarında hazırlanacak bir yöntemdir. Bu antijen çoğunlukla R-LPS içermekle beraber bir takım yüzey protein antijenlerini de içermektedir. Bu tarz hazırlanmış ekstraktların sadece RLPS temelli testlere göre daha duyarlı ve hemen hemen aynı özgüllükte olduğu belirtilmektedir (Mateu-de-antonio ve ark 1994, Lucero ve ark 2002, Barrouin-Melo ve ark 2007). Yapılan bu çalışmada enzimle işaretlenmiş spesifik köpek immunoglobulini yerine Fc bölgesine bağlanan enzimle işaretli A/G proteini kullanılmıştır. Bu şekilde testin tüm türlerde kullanılabilmesi bir avantaj olmaktadır. Bunun yanı sıra bu konjugat kullanımının IgG ve IgA'ları da saptayarak köpeklerin klinik durumlarının daha sağlıklı değerlendirilmesine olanak sağlayacağı bildirilmektedir (Lucero ve ark 2002).

ELISA prototiplerinin her ikisi ile de alınan sonuçlar yaklaşık % 4-8 arasında bir pozitiflik ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar Türkiye'de benzer çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (İstanbulluoğlu ve Diker 1983, Diker ve ark 1984, Diker ve ark 1987, Öncel ve ark 2005, Uçan ve ark 2010). Benzer çalışmaların artması ülkemizde hastalığın daha sağlıklı değerlendirilmesine olanak verecektir.

Bu çalışmada, *B. canis* infeksiyonlarının teşhisinde duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan, köpeklerde hastalığın durumunu daha sağlıklı değerlendirmeye olanak veren *B. abortus* RB51 ve *B. canis* M- suşlarının sıcak tuzlu su ekstraktından hazırlanan antijenlerle iki ELISA prototipi geliştirilmiştir. Özgüllüğü ve duyarlılığının yüksek

olmasının yanı sıra, çalışmamızda kullanılan antijenin hazırlanmasının ve uygulanmasının uygun, basit ve düşük maliyet gerektirmesi geliştirilen prototiplerin avantajları arasındadır. Testte konjugat olarak hayvan türüne özgü enzim işaretli immunoglobulin yerine tüm immunoglobulinlerin Fc parçasına bağlanan enzim işaretli rekombinant protein A/G kullanıldığından, bu ELISA prototipleri, ülkemizde hastalığın sadece karnivorlarda değil, zoonoz olması nedeni ile insanlarda ve ayrıca *B. ovis*'e benzerliği nedeni ile koyun ve keçilerdeki *B. ovis* infeksiyonlarının teşhisinde de kullanılabilecektir.

Sonuçta *B. abortus* RB51 i-ELISA ve *B. canis* M- i-ELISA'nın benzer duyarlılık ve özgüllük gösterdikleri ve köpeklerde *B. canis* infeksiyonunda doğrulayıcı test olarak ÇLAT ile birlikte kullanılabilecek güvenilir, pratik ve ekonomik testler olduğu kanısına varıldı.

## TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan *B. canis* M-suşu ve pozitif *B. canis* serumu için Cornell Üniversitesi Baker Enstitüsü, Ithaca, ABD, Prof. Dr. Carmichael'a, referans pozitif ve negatif kontrol serumları için Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), CONICET, Arjantin, Prof. S. Esteyne'e, *B. abortus* RB51 suşu, Tbilisi Fajı, Brucella monospesifik A ve M antiserumları için Pendik Veteriner Kontrol Araştırma Enstitüsü Brucella Referans Laboratuvarı'na, R/C Fajı, R fajı ve BrucellaRough (R) antiserum için Animal Plant Health Agency (APHA-UK)'ya ve aynı enstitüde çalışan ve çalışmanın istatistiksel analizlerini gerçekleştiren Dr. John McGiven'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1988). *Brucella canis*. In: Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique, Publication Paris, France, pp: 169-174.
- Badakhsh FF, Carmichael LE, Douglas JA (1982). Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. *J Clin Microbiol*, 15, 286-289.
- Barrouin-Melo SM, Poester FP, Riberio MB, Alcantara AC, Aguiar PHP, Nascimento IL, Schaer RE, Nascimento RM, Freire SM (2007). Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. *Res Vet Sci*, 83, 340-346.
- Carmichael LE, Joubert JC (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.
- Carmichael LE, Kenney RM (1970). Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis, and immune response. *J Am Vet Med Assoc*, 156, 1726.
- Carmichael LE (1966). Abortions in 200 beagles. *J Am Vet Med Assoc*, 149, 1126.
- Carmichael LE (1990). *Brucella canis*. In: Nielsen K, Duncan JR, eds. Animal Brucellosis, Boca Raton FL, CRC Press, pp: 335-350.
- Currier RW, Raitel WF, Martin RJ, Potter ME (1982). Canine brucellosis. *J Am Vet Med Ass*, 180, 132-133.
- Diker KS, İstanbulluoğlu E, Ayhan H, Soysal G (1984). A serosurvey of *Brucella canis* infections in man at Bursa district. *Mikrobiyol Bult*, 18, 203-207.
- Diker, KS, Aydın N, Erdeger J, Ozyurt M (1987). A serologic survey of dogs for *Brucella canis* and *Brucella abortus* and evaluation of mercaptoethanol microagglutination test. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 34, 268-277.
- Escobar GI, Boeri EJ, Ayala SM, Lucero NE (2010). The feasibility of using prepared with rough *Brucella* strains for diagnosis of canine brucellosis. *Rev Argent Microbiol*, 42, 35-40.
- Hollett RB (2006). Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, 66, 575-587.
- İstanbulluoğlu E, Diker, KS (1983). An serological analysis of *Brucella canis*. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 30, 14-18.
- Lopez G, Ayala SM, Efron AM, Gomez CF, Lucero NE (2009). A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora Buenos Aires province. *Rev Argent Microbiol*, 41, 97-101.

- Lopez G, Ayala SM, Escobar GI, Lucero NE (2005).** Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet Microbiol*, 2005, 105, 181-187.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SA, Lopez G (2002).** Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. *J Med Microbiol*, 51, 656-660.
- Mateu-de-antonio EM, Martin M, Casal J (1994).** Comparison of serological tests used in canine brucellosis diagnosis. *J Vet Diagn Invest*, 6, 257-259.
- Mateu-de-antonio EM, Martin M, Soler M (1993).** Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Am J Vet Res*, 54, 1043-1046.
- Moreno E, Jones LM, Berman DT (1984).** Immunochemical characterization of Rough *Brucella* Lipopolysaccharides. *Infect Immun*, 43, 779-782.
- Nielsen K, Smith P, Conde S, Dragide Benitez G, Gall D, Halbert G, Kenny K, Massengill C, Muenks Q, Rojas X, Perez B, Samartino L, Silva P, Tollersrud T, Lolley M (2004).** Rough lipopolysaccharide of *Brucella abortus* RB51 as a common antigen for serological detection of *B. ovis*, *B. canis*, and *B. abortus* RB51 exposure using indirect enzyme immunoassay and fluorescence Polarization assay. *J Immunoassay Immunoch*, 25, 171-182.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Rojas X, Perez B, Conde S, Samartino L, Robles C (2007).** Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by indirect enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunoch*, 28, 243-250.
- Oliveira MZD, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela R, Barrouin-Melo SM (2011).** Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res Vet Sci*, 90, 425-431.
- Öncel T, Akan M, Sareyyüpoğlu B, Tel OY, Çiftçi A (2005).** Seroprevalance of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 779-783.
- Pickerill PA (1970).** Comments on epizootiology and control of canine brucellosis. *J Am Vet Med Assoc*, 156, 1741-1742.
- Schoonjans F, Zalata A, Depuyd, CE, Comhaire FH (1995).** MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Comput. Methods Programs Biomed*, 48, 257-262.
- Uçan US, Aras Z, Semacan A (2010).** Serodiagnosis of *Brucella canis* infection in dogs by a dipstick enzyme immunoassay. *Eurasian J Vet Sci*, 26, 109-112.
- Wanke MM, Delpino V, Baldi PC (2002).** Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*, 88, 367-375.
- Wanke, MM (2004).** Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 195-207.
- Yardımcı H, Akan M, Atasever A (1998).** *Brucella canis*'in biyolojik materyallerdeki yaşam süresi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 9, 77-79.
- Zoha SJ, Carmicheal LE (1981).** Properties of *Brucella canis* surface antigens associated with colonial mucoidness. *Cornell Vet*, 71, 428-438.
- Zoha SJ, Carmicheal LE (1982).** Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. *Am J Vet Res*, 43, 171-174.