

Koyunlarda *Anaplasma phagocytophilum*'a Karşı Antikorların Western Blot Yöntemi İle Araştırılması

Ahmet ÜNVER* Mitat ŞAHİN* Hidayet Metin ERDOĞAN** Özgür ÇELEBİ*

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kars - TÜRKİYE

Yayın Kodu: 2005/17-A

Özet

Koyunlarda kene hummasına, zorunlu hücre içi bir bakteri olan *Anaplasma phagocytophilum* neden olmaktadır. Bu çalışmada Kars bölgesinde 104 koyundan toplanan serum örnekleri organizmanın insan orijinli *A. phagocytophilum* izolatu kullanılarak Western blot yöntemi ile testi edildi. Değerlendirilen 12 örnekte (%11.5) *A. phagocytophilum*'un 61- ve 43-kDa antijenlerine, 8 örnekte (%7.7) sadece 43-kDa antijenine ve 7 örnekte ise (%6.7) sadece 61-kDa antijenine karşı reaktivite tespit edildi. Kars bölgesinde kene hummasının varlığını ortaya koyan bu çalışma, veteriner hekimlerin ve koyun yetiştiricilerinin bu hastalığı dikkate almaları gerekliliğini belirlemiştir. Ayrıca etkenin veya varyantlarının zoonotik potansiyeli nedeniyle hastalık beşeri hekimler tarafından da dikkate alınmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Anaplasma phagocytophilum*, koyun, Western blot, Kars.

Investigation of Antibodies Against Anaplasma phagocytophilum in Sheep by Western Blot Analyses

Summary

Tick-borne fever in sheep is caused by an obligatory intracellular bacterium, *Anaplasma phagocytophilum* (formerly known as *Ehrlichia [Cytoecetes] phagocytophila*). One hundred and four sheep serum samples from different localities in Kars region were tested to detect antibodies against *A. phagocytophilum* by Western blotting using purified human-originated *A. phagocytophilum*. Twelve sera (11.5%) reacted with both 61- and 43-kDa antigens of *A. phagocytophilum* while 8 sera (7.7%) reacted with 43-kDa antigen only. Seven (6.7%) serum samples had reactivities to 61-kDa of *Anaplasma* antigen. The present study indicates that *A. phagocytophilum* infection exists among sheep in Kars and this should be considered by both veterinarians and physicians in this region.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, sheep, Western blot, Kars.

İletişim (Correspondence)

Yrd.Doç.Dr.Ahmet ÜNVER

Tel: +90 474 2426800

e-mail: ahmetunver@hotmail.com

GİRİŞ

Kene hummasına (tick-borne fever), *Rickettsiae* ailesinden granüositlerde zorunlu hücre içi karakterde bir mikro organizma olan *Anaplasma phagocytophilum* neden olmaktadır^{1,3}. Önceleri *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* olarak ifade edilen bu etken, son yıllarda yapılan taksonomik düzenleme ile *Ehrlichia equi* ve "insanların granüositik ehrlichia (HGE) ajanı" ile beraber *A. phagocytophilum* olarak tek tür adı ile adlandırılmıştır⁴. Avrupa'da koyunlarda kene humması'nın varlığı ve *Ixodes ricinus* keneleri tarafından bulaştırıldığı yüzyılı aşkın bir zamandır bilinmektedir³. Önceden HGE ajanı ve *E. equi* olarak adlandırılan etkenler ise Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'nın bazı bölgelerinde insan, at, köpek ve *Ixodes cinsi* kenelerde varlığı moleküler yöntemler ile belirlenmiştir^{4,7}. Koyunlarda kene humması yüksek ateş, lökopeni ve immunsupresyon ile kendini göstermekte ve böylece sekonder infeksiyonlara ortam hazırlamaktadır^{1,3}. Gebe koyunlarda yavru atmalar ile ilişkili vakalar da bildirilmiştir^{3,8,9}. Hastalığın direk teşhisinde, kan ve diğer dokulardan yapılan bakteriyoskopi, uygun hücre kültürlerinde etkenin izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), indirek teşhisinde ise IFA, ELISA, İmmunoblot gibi serolojik teknikler yaygınlıkla kullanılmaktadır^{1,3,5,7}.

Ateş, lökopeni ve immunsupresyon ile diğer infeksiyonlara altyapı hazırlayarak büyük ekonomik kayba yol açma potansiyeli bulunan *A. phagocytophilum*'un Kars bölgesindeki durumu ile ilgili bir çalışma mevcut değildir. Ayrıca, bu bölgede *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, ve *Listeria* türlerinin atık kuzularda varlığı bildirilmiş olmasına rağmen, koyun atıkları etyolojisinin önemli bir bölümü tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır¹⁰⁻¹². Koyunlarda bazı vakalarda^{8,9} atık etkeni olarak bildirilen *A. phagocytophilum*'un Kars bölgesinde mevcut olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışma, Kars bölgesi koyunlarında kene hummasının varlığını serolojik olarak ortaya koymakta, gelecekte yapılacak bilimsel çalışmalara temel oluşturmakta ve *A. phagocytophilum*'un epidemiyolojisini daha iyi anlamaya yardımcı olmaktadır.

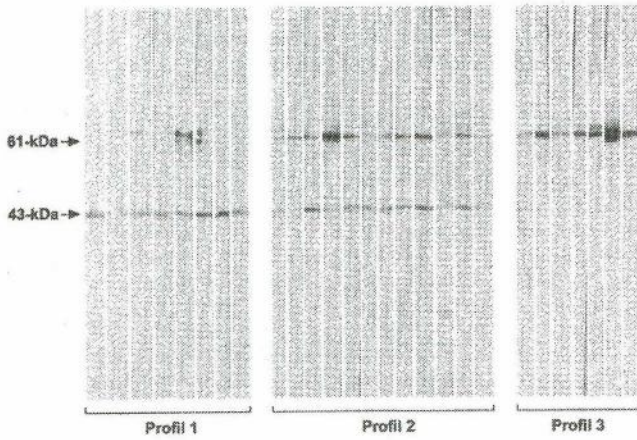
MATERYAL ve METOT

Koyun serum örnekleri: Kars merkez köylerinden oluşan, 6 farklı odaktan toplam 104 koyundan kan örnekleri toplandı ve serumları ayrıldı. Serum örnekleri Western blot ile analiz edildi.

Western immunoblot analizi: Western immunoblot yöntemi Rikihisa ve arkadaşlarının bildirildiği şekliyle gerçekleştirildi^{5,13,14}. Bu teknikte, antijen olarak kullanmak amacıyla, insan orijinli *A. phagocytophilum* HL-60 hücre kültüründe in vitro olarak üretildi ve Sephacryl S-1000 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) kolon kromatografi yöntemi ile daha önce bildirilen yöntem ile saflaştırıldı^{5,13,14}. Mikroorganizmanın üretilmesinde kullanılan konakçı hücre (HL-60) de negatif kontrol olarak kullanıldı. *A. phagocytophilum* ve HL-60 antijenlerinin SDS-poliakrilamid jelde elektrofrez tabii tutulduktan sonra yarı-kuru transfer cihazı ile nitroselüloz membrana aktarıldı. *A. phagocytophilum* ve HL-60 antijenlerini içeren membranlar şerit şeklinde kesilerek 1:100 oranında dilüe edilen serumlar ile ayrı ayrı ortamlarda inkübe edildi. Sekonder antikor olarak peroksidaz ile konjuge anti-sheep Immunglobulin G (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD, ABD) 1:2,000 oranında kullanıldı. Antikor bağlanmış antijenleri ortaya koymak amacıyla substrat olarak pH'sı 6.2'ye ayarlanmış 70 mM sodyum asetat içinde 0.3%'lük 3,3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japonya) ve 0.05% hidrogen peroksit kullanıldı.

BULGULAR

Toplam 104 koyun serum örneklerinin Western blot ile analizinde üç farklı reaktif antijen profili ortaya çıktı. 12 örnekte (%11.5) *A. phagocytophilum*'un hem 61- hem de 43-kDa antijenlerine karşı reaktivite tespit edilirken 8 örnekte (%7.7) sadece 43-kDa antijeninde reaktivite belirlendi (Şekil 1). *A. phagocytophilum*'un majör immuno-dominant antijeni olan 43-kDa proteinine karşı reaktivite gösteren toplam 20 serum örneğindeki bu sonuçlar, kene hummasına karşı özgün bir reaksiyon olarak değerlendirildi ve hastalığın Kars bölgesinde seroprevalansı % 19.2 olarak belirlendi. 7 adet serumda ise (%6.7) sadece 61-kDa *Anaplasma* antijenine karşı antikorlar tespit edildi. Bir "ısı şok proteini" (heat shock protein) olan bu antijenin prokaryotik mikroorganizmalar arasında antijenik olarak benzerlik gösterdiği¹⁵ ve serolojik testlerde çarpaz reaksiyona yol açtığı bilindiği için, bu örneklerdeki reaktif antikorların *Anaplasma*'ya karşı özgün olmadığı şeklinde değerlendirildi. Western blot ile pozitif bulunan örneklerde, kontrol amacıyla kullanılan konakçı hücre HL-60'ye karşı herhangi bir reaktivite tespit edilmedi.



Şekil 1. Koyun serumlarının Western blot ile analizi. Reaktif *A. phagocytophilum* antijenlerinin pozisyonu ve kilodalton cinsinden büyüklükleri ok işaretleri ile panelin sol tarafında belirtilmiştir. *A. phagocytophilum* antijeninin kilodalton cinsinden büyüklüğü, Precision Plus (Bio-Rad) protein standartının eş zamanlı elektroforezi ile belirlendi. Reaktif *A. phagocytophilum* antijenlerine göre ayrılan 3 farklı profil (1-3) panelin altında belirtilmiştir. Negatif bulunan örneklerin ve kontrol amacıyla kullanılan HL-60 proteininin Western blot şeritleri resimde sunulmadı.

Figure 1. Western blot analyses of sheep sera. The sizes (kDa) of *A. phagocytophilum* antigens were indicated on the left based on the protein marker, Precision Plus (Bio-Rad). The profiles (1-3) based on the reactivities to *A. phagocytophilum* were indicated below. Western blot strips of the negative samples and control antigens, HL-60, were not shown.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Avrupa'da yüzyıla yakın bir zamandır bilinen koyunlarda kene humması'nın Kars bölgesinde serolojik olarak varlığını ortaya koyan bu çalışma, bölgedeki veteriner hekimlerin ve koyun yetiştiricilerinin bu hastalığı dikkate almaları gerekliliğini belirlemiştir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da yapılan çalışmalarda, hastalık etkenine antijenik ve genetik olarak oldukça benzerlik gösteren ve önceleri "insanların granülositik ehrlichia (HGE) ajanı" ve *E. equi* olarak adlandırılan etkenler sırası ile insanlarda ve sığırlarda bulunmuştur^{1,3,6}. Bu bildirilere dayanarak kene humması etkeninin zoonotik potansiyele sahip olabileceği de düşünülürse bölgede Granülositik Anaplazmozis'in sadece koyunlarla sınırlı olmayıp, insan, sığır ve atlarda da mevcut olabileceği düşünülmektedir. Serolojik olarak ortaya konulan bu hastalığın Kars bölgesindeki varlığı, gelecekteki çalışmalarda etkenin moleküler yöntemler veya izolasyon ile ortaya konularak teyit edilmelidir.

İnsan orijinli *A. phagocytophilum* ile koyun orijinli *A. phagocytophilum*, konakçı orijinleri farklı olmasına

rağmen antijenik ve genetik olarak birbirlerinin hemen hemen aynıdır ve bu nedenle de günümüzde aynı tür adlarıyla anılmaktadır¹⁴. Koyun orijinli *A. phagocytophilum* uzun yıllardır bilinmesine rağmen insan orijinli *A. phagocytophilum* hücre kültürlerinde izolasyon ve üretilme çalışmalarında daha çok çalışılmış ve in vitro ortama uyumu gerçekleştirilerek serolojik testlerde antijen olarak başarıyla kullanılmıştır¹². Bu nedenle mevcut çalışmada *A. phagocytophilum*'a karşı antikorların tespitinde Western blot analizinde antijen olarak insan orijinli saflaştırılmış *A. phagocytophilum* kullanılmıştır.

Kene popülasyonu açısından zengin bir bölge olan Türkiye'de koyunlarda *Hyalomma anatolicum*, *H. marginatum*, *H. detritum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *R. bursa*, *R. turanicus*, *Haemaphysalis parva*, *H. sulcata*, *H. inermis*, *H. punctata*, *Dermacentor marginatus*, *Boophilus annulatus*, *Ornithodoros lahorensis* ve *Ixodes ricinus* kenelerinin varlığı bildirilmiş^{16,17} ve bu türlerin bir çoğu Kars bölgesi koyunlarında enfestasyon halinde bulunmuştur¹⁸. Avrupa'da özellikle Güneydoğu Avrupa'da *Ixodes ricinus* kenelerinin *A. phagocytophilum*'u taşıdığını ortaya koyan bildirimlerden^{1,14,18} yola çıkılarak, Kars bölgesi koyunlarında varlığı bilinen bu tür kenelerin hastalığın bulaşmasından sorumlu olabileceği düşünülebilir. Fakat, bulaşmadan sorumlu vektörü belirlemek ve hastalığın epidemiyolojisini daha iyi anlamak için, bölgede endemik kene türlerini *Anaplasma* etkenlerini taşıyıp taşımadığı yönünde araştırmalar yapılmalıdır.

Kars bölgesinde kuzu atıkları oldukça sıklıkla gözlemlenmekte ve hayvancılık endüstrisinde büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bölgedeki atık fetal dokularda, *Brucella*, *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* gibi bazı bakteriyel etkenler bulunmasına rağmen kuzu atıkları etyolojisinin önemli bir bölümü hala aydınlatılmamıştır¹⁰⁻¹². Koyunlarda *A. phagocytophilum*'un atık nedeni olarak bulunduğu vakalar son yıllarda bildirilmiştir^{8,9}. Bu çalışmada serolojik olarak bölgedeki varlığı ortaya konulan kene humması etkeninin atık nedeni olup olmadığı ileriki çalışmalarda daha detaylı çalışılıp ortaya konulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Western blot tekniğinde kullanılan materyallerden bazılarını sağlayan Ohio Eyalet Üniversitesi'nden Dr. Yasuko Rikihisa'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1 **Ogden NH, Woldehiwet Z, Hart CA:** Granulocytic ehrlichiosis: An emerging or rediscovered tick-borne disease? *J Med Microbiol*, 47(6):475-482, 1998.
- 2 **Ristic M, Huxsoll D:** Tribe II. *Ehrlichiae*. In, Krieg NRJ, Holt G(eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Baltimore, MD., USA: The Williams and Wilkins Co., 704-711, 1984.
- 3 **Woldehiwet Z:** Tick-borne fever: A review. *Vet Res Comm*, 6:163-175, 1983.
- 4 **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR:** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*; unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; description of six new species combinations; and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:2145-2165, 2001.
- 5 **Zhi N, Rikihisa Y, Kim H-Y, Wormser GP, Horowitz HW:** Comparison of major antigenic proteins of six strains of the human granulocytic ehrlichiosis agent by Western immunoblot analysis. *J Clin Microbiol*, 35:2606-2611, 1997.
- 6 **Parola P:** Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5):297-304, 2004.
- 7 **Christova I, Van De Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L:** Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22(9):535-542 2003.
- 8 **Garcia-Perez AL, Barandika J, Oporto B, Povedano I, Juste RA:** *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from Northern Spain. *Ann N Y Acad Sci*, 990:429-32, 2003.
- 9 **Jones GL, Davies IH:** An ovine abortion storm caused by infection with *Cytoecetes phagocytophila*. *Vet Rec*, 136(5):127, 1995.
- 10 **Sağlam YS, Türkütanit SS, Taştan R, Bozoğlu H, Otlı S:** Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden incelenmesi. *Selçuk Üniv Vet Bil Derg*, 14: 133-145, 1998.
- 11 **Şahin M, Beytut E:** Yeni doğan kuzularda *Listeria ivanovi* enfeksiyonu. Altıncı Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 14-16 Eylül 2004, Elazığ.
- 12 **Unver A, Erdogan HM, Atabay HI, Şahin M, Celebi O:** Isolation, identification, and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars, Turkey. *Revue Med Vet*, 157:42-46, 2006.
- 13 **Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC:** Western blot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis* or *E. ewingii* infection of dogs and human. *J Clin Microbiol*, 32: 2107-2112, 1994.
- 14 **Unver A, Rikihisa Y, Ohashi N, Cullman LC, Buller R, Storch GA:** Western and dot blotting analysis of *Ehrlichia chaffeensis* indirect fluorescent-antibody assay-positive and -negative human sera by using native and recombinant *E. chaffeensis* and *E. canis* antigens. *J Clin Microbiol*, 37: 3888-3895, 1999.
- 15 **Sumner JW, Nicholson WL, Massung RF:** PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the groESL heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol*, (35):2087-2092, 1997.
- 16 **Goddard J:** Ticks. In, Physician's Guide to Arthropods of Medical Importance. Ann Arbor, MI, USA: CRC Press, Inc., 248-294, 1993.
- 17 **Sayın F, Dyncer S, Karaer Z, Dumanly N, Cakmak A, İncü A, Yukary BA, Vatanserver Z:** Status of tick infestation of sheep and goats in Turkey. *Parassitologia*, 39:145-152, 1997.
- 18 **Arslan MO:** Kars bölgesi koyunlarındaki kene türleri. Yayınlanmamış çalışma.