

KARS YÖRESİNDEKİ SİĞIRLARDA LİSTERİA MONOCYTOGENES ENFEKSİYONLARININ ELISA YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Use of ELISA Technique in the Investigation of Listeria Monocytogenes Infection in Cattle in Kars District

H.Metin ERDOĞAN* Gürbüz GÖKÇE* H.İbrahim GÖKÇE* A.Haydar KIRMIZIGÜL*
Vehbi GÜNEŞ* Erkan SURAL* Kemal YILMAZ*

ÖZET

İntensif ve kapalı ahırlarda küçük aile işletmeleri şeklinde sığırçılık yapılan Kars yöresinde Listeria monocytogenes enfeksiyonlarına karşı gelişen anti-listeriolysin O (LLO) antikollarının ELISA yöntemi ile araştırılması amacıyla epidemiyolojik bir ön çalışma gerçekleştirildi.

Çalışmada kullanılan örnekler üç ayrı bölgeden toplandı; 68 örnek Ardahan çevresindeki köylerden, 106 örnek Kars çevresindeki köylerden ve 288 örnek Kars Merkez köylerinden toplanmıştır. Tüm numuneler ELISA ile işlendi ve Ardahan çevresindeki sığırların 92.6 %'si (63/68), Kars çevresindeki sığırların 88.7 %'si (94/96) ve Kars merkez köylerindeki sığırların 75.3 %'si (217/288) anti-LLO antikollarını taşıdığı tespit edildi. Bölgeler arasındaki bu farklılık istatistiksel bir öneme sahipti ($P < 0.001$).

Bu, Kars yöresindeki sığırlarda Listeria enfeksiyonlarının varlığını ortaya koymak için yapılan ilk çalışmadır. Elde edilen sonuçların daha geniş ve kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmaya temel oluşturacağı kanısındayız.

Anahtar Sözcükler: Listeria monocytogenes enfeksiyonları, ELISA, Sığır, Kars.

SUMMARY

A preliminary epidemiological study, employing an ELISA assay, was designed to investigate anti-listeriolysin O (LLO) antibodies to listeria monocytogenes infection in cattle in Kars district where an intensive, indoor cattle husbandry in small family farms is a common practice.

The study samples were collected from three different regions; 68 samples from villages in the vicinity of Ardahan, 106 samples from villages in the vicinity of Kars and 288 samples from villages in central Kars district. ELISA was carried out on all samples and 92.6 % (63/68) of cattle in Ardahan, 88.7 % (94/96) of cattle in the vicinity of Kars and 75.3 % (217/288) of cattle in central Kars had anti-LLO antibodies. There was a statistically significant difference between the regions ($P < 0.001$).

This study was the first study of listeria infection in cattle in Kars district and the results obtained in this study could form a base for a more broad and detailed epidemiological study.

Key Words: Listeria monocytogenes infection, ELISA, Cattle, Kars.

GİRİŞ

Listeriosis insan ve hayvanların yaygın, enfeksiyöz ve zoonotik bir hastalığı olup, listeria ailesine mensup Listeria monocytogenes tarafından meydana getirilmektedir. Hastalık hem insan ve hem de hayvanlarda 3 yaygın form halinde seyrederek. Bunlar, meningoensefalitis, sepsisemi ve abortus'tur. Son yıllarda, özellikle ruminantlarda, Listeria monocytogenes'den kaynaklanan mastitis, iritis ve keratokonjonktivitis vakalarına da sıkça rastlanmaktadır (1,2).

Son yıllarda hastalığın etiolojisi, patogenezi ve epidemiyolojisi üzerine yapılan moleküler ve epidemiyolojik çalışmaların sonucu olarak

Amerika ve Avrupa ülkelerinin çoğunda bu hastalıkla çeşitli mücadele stratejileri geliştirilmiş (3,4) olmasına rağmen hastalığın epidemiyolojisi halen tam olarak anlaşılamamıştır (5).

Epidemiyolojik çalışmaların en önemli unsuru hastalığı kesin ve hızlı bir şekilde teşhis etmektedir. Bu nedenle Listeria monocytogenes enfeksiyonlarının teşhisi amacıyla çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Bunlar; izolasyon, seroloji (ELISA, aglütinasyon vs) ve moleküler biyoloji (PCR; Polymerase Chain Reaction) tekniklerini içermektedir (6).

* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Bilim Dalı, Kars-Türkiye

Listeria monocytogenes enfeksiyonlarının insan ve hayvanlardaki insidansının son yıllarda yükselmesi ve hastalığın gerek direkt, gerekse de dolaylı olarak (hayvansal ürünler ile) hayvanlardan insanlara bulaşması bu mikroorganizmadan kaynaklanan enfeksiyonları daha önemli bir hale getirmektedir (7,8). Zoonotik özelliği nedeniyle hayvancılık yapılan ve hayvansal ürünlerin üretildiği bölgelerde hastalık önemli bir halk sağlığı problemi olabilmektedir (9).

Bu çalışmanın amacı, dünyada yaygın olarak bulunan ve ülkemizde de görüldüğü bildirilen (10) *Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarının, ELISA tekniğini kullanarak, yoğun bir şekilde hayvansal üretim faaliyetleri olan Kars yöresinde bulunup bulunmadığını ortaya koymaktır. Daha önce Kars yöresinde bu konuda bir çalışma yapılmadığından, bu araştırmanın önemli bir açığı kapatacağı kanısındayız.

MATERYAL ve METOT

Çalışma materyali:

Çalışmanın materyalini oluşturan sığır serumları 3 ayrı bölgeden temin edildi. Bu bölgeler ve toplanan numune sayısı sırasıyla şöyle; Kars merkezindeki köylerden 288 adet, Kars çevresindeki köylerden 106 adet ve Ardahan çevresindeki köylerden 68 adet.

ELISA prosedürü:

Çalışmada kullanılan kolesterolle presipite edilmiş listeriolysin O antijeni (CP-LLO), İngiltere'nin Bristol Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

ELISA yöntemi Low ve ark (11) ve Erdoğan (8) tarafından geliştirilen prosedüre göre uygulandı. Kısaca, 96 çukurlu mikroplytler (Greiner, İngiltere) 1:50 oranında Karbonat-Bikarbonat bufferde (pH 9.6) sulandırılan CP-LLO antijeninden her çukura 100 µl olacak şekilde kaplandı ve 37 °C de bir gece bekletildikten sonra 5 kez PBS-Tween buffer (pH 7.2) ile yıkandı. Mikroplytler 1:100 oranında PBS ile sulandırılmış Foetal Calf Serum ile 2 sa

at süresince oda ısısında bloke edildi ve tekrar PBS-Tween ile yıkandı. Daha sonra numune serumlar 1:50 oranında PBS ile sulandırılarak her bir çukura 100 µl kondu ve 37 °C de 2 saat inkübe edildi. Mikroplytler, PBS-Tween ile yıkama işleminden sonra, alkaline Phosphatase ile konjuge edilmiş anti-Bovine IgG'den (Sigma, Almanya) 100 µl her bir çukura eklendi ve 4 °C de bir gece inkübe edildi. Mikroplytler, PBS-Tween ile yıkandıktan sonra, 1 mg/ml oranında Karbonat-Bikarbonat bufferde sulandırılan Phosphatase substrattan (Sigma, Almanya) 100 µl her çukura kondu. 10 dakika beklendikten sonra Tecan-Spectra marka ELISA readerda 405 nm dalga boyundaki filtre ile mikroplytler okundu. Kontrol amacıyla her bir mikroplyt üzerinde bilinen pozitif ve negatif serumlar da kullanıldı.

ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi:

Öncelikle negatif serumlar OD (Optical Densities) değerlerinin ortalaması alındı (ortalama OD= 0.370) ve bu değere elde edilen standart hatanın (Standart hata = 0.0405) 3 katı ilave edildi (12). Elde edilen değer iki katı cut-off değer (0.984) olarak alındı (13) ve 0.984 değerinden büyük OD değerinde olan test serumları pozitif kabul edildi.

Bölgeler arasındaki farklılıklar Ki-Kare (X²) testi kullanılarak tespit edildi (14).

BULGULAR

Toplam olarak 462 adet sığır serumu anti-LLO antikorları açısından test edildi ve bunların % 81'i (374/462) pozitif bulundu. Numunelerin toplandığı bölgelere göre pozitif hayvan sayısı sınıflandırıldığında; Ardahan çevresindeki sığırların % 92.6'sı (63/68), Kars çevresindeki sığırların % 88.7'si (94/106) ve Kars merkezindeki sığırların % 75.3'ü (217/288) *Listeria monocytogenes*'e tarışı antikor taşıdığı saptandı (Tablo 1). Kars merkezindeki pozitif hayvan sayısı diğer bölgelere göre istatistik olarak önemli derecede azdı (P<0.001).

Tablo 1. Anti-LLO antikorları yönünden pozitif hayvan sayısının bölgelere göre dağılımı
Table 1. Regional distribution of the frequency of animals positive for anti-LLO antibodies.

Bölgeler	Hayvan sayısı	Pozitif Hayvan Sayısı (%)	OD \bar{x} (S \bar{x})
Ardahan çevresi	68	63 (92.6)	1.365 (0.239)
Kars çevresi	106	94 (88.7)	1.326 (0.236)
Kars merkezi*	288	217 (75.3)	1.466 (0.165)

* Bölgeler arasındaki istatistikî fark tespit edildi (P<0.001)
 \bar{x} (S \bar{x}) OD değerlerinin ortalaması ve standart hataları

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmanın amacı, yoğun hayvansal üretim faaliyeti olan Kars yöresinde *Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarının varlığını ortaya koymaktır. Bunu gerçekleştirmek için ELISA'nın teşhis amacıyla kullanıldığı epidemiyolojik bir ön çalışma dizayn edildi.

ELISA, daha duyarlı ve spesifik olması nedeniyle günümüzde enfeksiyöz hastalıkların teşhis ve takibinde, sıkça kullanılan serolojik bir yöntemdir. *Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarının teşhis ve takibinde de ELISA son yıllarda çokça kullanılmaktadır. Bu amaçla *Listeria monocytogenes*'den hazırlanmış çeşitli antijenler (hücre duvarı (O) antijenleri, flagellar antijen (H), extracellüler proteinler vs) denenmiştir. Özellikle O ve H antijenlerin diğer Gram + bakterilerle çapraz reaksiyon göstermesi, araştırmacıları *Listeria monocytogenes*'in serolojisinde alternatif antijenler kullanılmaya itmiştir (6). Bunlar arasında listeriolyisin O (LLO) antijeninin *Listeria monocytogenes*'e karşı üretilen antikorların tespitinde daha spesifik olduğu ortaya konmuştur. LLO tüm patojen *Listeria monocytogenes* türleri tarafından üretilen bir protein olup, bu bakterilerin konakçı hücre içerisinde yaşayıp çoğalmasında sağlar (15). Ayrıca yapılan çalışmalar hem genetik düzeyde ve hem de antijenik epitoplara açısından LLO'nun *Listeria monocytogenes*'e spesifik olduğunu göstermiştir (11,16,17). Dolayısıyla anti-LLO antikorlarının tespiti, *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunun varlığına işaret eder (11). Bu sayılan hususlar gözönüne alın-

rak LLO, çalışmamızdaki tercih edilen antijen olmuştur.

Bu çalışma, numunelerin toplandığı odakların bölgeyi tam olarak temsil etmemesi ve toplanması gereken örnek sayısının istatistikî olarak tespit edilmemesinden dolayı gerçek anlamda bir epidemiyolojik çalışmayı yansıtmamaktadır. Aynı şekilde çalışmada kullanılan hayvanlardan tekrar kan örneği toplama olanmaz olmadı. Ancak elde edilen sonuçlar enfeksiyonun bölgede ilk kez tanınması yönünden yararlı olacaktır. Bölgedeki taramada test edilen hayvanların ortalama % 81'inin anti-LLO antikorları taşıması diğer çalışmalar ile uygunluk göstermektedir (8,18) Yüksek oranda LLO pozitif sığırın bulunması, fakat klinik semptomların bulunmaması sığırların daha önce *Listeria monocytogenes* enfeksiyonuna maruz kaldığının veya örnekleme anında subklinik enfeksiyon geçirdiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir (11,18).

Çalışmada bölgeler arasındaki farklılığın, bu bölgelerde farklı yetiştirme, bakım, barındırma ve beslenme uygulamalarına bağlı olabileceği speküle edilse bile, çalışma esnasında hayvan ve işletmeler ile ilgili veri toplanamaması bu farklılığın izahını mümkün kılmamaktadır.

Kars yöresinde hayvancılığın büyük ölçüde küçük aile işletmeleri şeklinde gerçekleşmesi nedeniyle hayvansal ürünlerin hazırlanmasında pastörizasyon ve hijyenik kurallara pek riayet edilmediği gözönüne alınırsa elde edilen sonuçların ışığında bölgede daha geniş kapsamlı

çiftlikten-tabağa zincirini takip edecek bir epidemiyolojik çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. İmren HY, Şahal M: Veteriner İç Hastalıkları, 235-237, 2. Baskı, Medisan, Ankara, 1991.
2. Radostits OM, Blood DC, Gay CC: Veterinary Medicine, 660-666, 8 ed, Bailliere Tindal, London, 1994.
3. Farber JM, Peterkin PI: *Listeria monocytogenes*, a Foodborne Pathogen. Microbiological Reviews, 55, 476-511, 1991.
4. Archer DL: *Listeria monocytogenes*: The Science and Policy. Food Control, 7(4-5): 181-182, 1996.
5. Donachie W, Low JC: Ovine Listeriosis. The Veterinary Annual, 35, 304-312, 1995.
6. Low JC, Donachie W: Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. The Veterinary Journal, 153 (1): 9-29, 1997.
7. McLauchlin J: The Relationship between *Listeria* and Listeriosis. Food Control, 7(4-5): 187-193, 1996.
8. Erdoğan HM: An Epidemiological Study of Listeriosis in Dairy Cattle. PhD Thesis, Bristol University, Bristol, UK, 1998.
9. Seeliger HPR: Listeriosis, Man-made? Acta Microbiologica Hungarica, 36 (2-3): 107-111, 1989.
10. Aslan V, Turgut K, Kaya O, Sevinç M: Sığırlarda Listeriosis Olgusu. Hay Araş Derg, 1(1): 37-39, 1991.
11. Low JC, Davies RC, Donachie W: Purification of Listeriolysin O and Development of an Immunoassay for Diagnosis of Listeric Infections in Sheep. J Clin Microbiol, 30(10): 2705-2708, 1992.
12. Yirrel DL, Reid HW, Norval M, Howie SEM: Immune Response of Lambs to Experimental Infection with Orf Virus. Veterinary Immunology and Immunopathology, 22, 321-332, 1989.
13. Baetz AL, Wesley IV: Detection of Anti-Listeriolysin-O in Dairy Cattle Experimentally Infected with *Listeria monocytogenes*. J Vet Diagnostic Investigation, 7(1): 82-86, 1995.
14. Dean AG, Dean JG, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan KM, Fagan RF, Arner TG: Epi-Info Version 6: A Word Processing Database and Statistics Program for Epidemiology on Microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, U.S.A, 1994.
15. Sheehan B, Kocks C, Dramsi E, Gouin AD, Klarsfeld Mengaud J, Cossart P: Molecular and Genetic Determinants of the *Listeria monocytogenes* Infectious Process. Current Topics in Microbiology and Immunology, 192, 184-216, 1994.
16. Mengaud J, Chenevert J, Geoffroy C, Gaillard L, Cossart P: Identification of the Structural Gene Encoding the SH-activated Haemolysin of *Listeria monocytogenes*: Listeriolysin-O is Homologous to Streptolysin O and Pneumolysin. Infection and Immunity, 55, 3225-3227, 1987.
17. Berche P, Reich KA, Bonnichon M, Beretti JL, Geoffroy C, Raveneau J, Cossart P, Gaillard JL, Geslin P, Kreis H, Veron M: Detection of Anti-Listeriolysin-O for Serodiagnosis of Human Listeriosis. Lancet, 335(8690): 624-627, 1990.
18. Low JC, Donachie W: Clinical and Serum Antibody Responses of Lambs to Infection by *Listeria monocytogenes*. Research in Vet Sci, 51, 185-192, 1991.