

# Konya ilinde köpeklerde listeriozis seroprevalansı

## The seroprevalence of canine listeriosis in dogs in Konya province

Zeki ARAS<sup>1</sup>, Uçkun Sait UÇAN<sup>2</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Listeriozis, insan ve hayvanlarda abortus, septisemi ve meningoensefalitise sebep olmaktadır. Enfekte köpekler *Listeria monocytogenes* suşlarını dışkı ve idrarları ile etrafa saçtıkları için halk sağlığı yönünden büyük bir öneme sahiptirler. Bu çalışmada, Konya bölgesindeki köpeklerde listeriozis enfeksiyonunun serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmanın köpek materyalini Konya il merkezinde bulunan belediye köpek barınağı (n= 106) ve Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler (n= 20) ile SÜVF Kliniklerine getirilen köpeklerden (n= 9) alınan toplam 135 kan serumu oluşturmuştur. Serumlar Mikro Standart Tüp Aglutinasyon (mSAT) ve ELISA testleri ile incelenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Mc Nemar Testi ve Fisherin Kesin  $\chi^2$  testi ile belirlenmiştir.

**Bulgular:** Toplam 135 kan serum örneğinin 31 (%23)'i mSAT ile ve 21 (%15,5)'i ELISA ile pozitif bulunmuştur. On dört serum örneği sadece mSAT testi ile pozitif bulunurken ELISA testi ile negatif olarak bulunmuştur. Kan serum örneklerinin 114 tanesi (%84,5) ELISA testi ile negatif olarak bulunmuştur. Listeriozisin serolojik sıklığı Konya Belediye Köpek Barınağı, SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesi ve SÜVF kliniklerine getirilen köpekler

### ABSTRACT

**Objective:** Listeriosis causes abortion, septicemia and meningoencephalitis in humans and animals. Infected dogs are important in public health as they can spread *Listeria monocytogenes* strains via their faeces or urine. The aim of this study was to investigate the presence of listeriosis in dogs in Konya Province.

**Method:** A total of 135 blood serum samples were collected from dogs from the municipality kennels (n= 106) and also from veterinary clinics (n= 9) and the Dog Research Unit (n= 20) of the Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University. Samples were examined by Micro Standard Tube Agglutination Test (mSAT) and ELISA. The statistical differences between the groups were determined by the Mc Nemar Test and Fisher Exact  $\chi^2$  Test.

**Results:** Out of 135 serum samples tested, 31 (23%) and 21 (15.5%) were found to be positive for listeriosis by mSAT and ELISA, respectively. Fourteen serum samples which were positive by mSAT were negative with ELISA, while 114 samples (84.5%) were negative by ELISA. The frequencies of listeriosis in municipality kennels, the veterinary clinics and dog research unit of the Veterinary Faculty were 24.5%,

<sup>1</sup> Konya İl Sağlık Müdürlüğü, Selçuklu, KONYA

<sup>2</sup> Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KONYA

İletişim / Corresponding Author : Zeki ARAS

Konya İl Sağlık Müdürlüğü, 42 040, Selçuklu, KONYA

Tel : +90 332 351 1832

E-posta / E-mail : zekiaras@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 25.11.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 15.02.2012

için sırasıyla, mSAT testi ile %24,5, %11,1 ve %20, ELISA testi ile %19,8, %0 ve %0 olarak belirlenmiştir. ELISA testi sonuçlarına göre, belediye köpek barınağında bulunan köpeklerde enfeksiyonun seroprevalansı Veteriner Fakültesinin birimlerine getirilen veya oraya ait köpeklere göre daha yüksek olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Bu çalışma ile Konya bölgesi sokak köpeklerinde yüksek sayılabilecek bir oranda ve ilk kez *L. monocytogenes* seropozitifliği tespit edilmiştir. Bu yüksek oranın veteriner ve halk sağlığı açısından tehdit oluşturduğu kanısına varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Köpek, *Listeria monocytogenes*, ELISA, mSAT, halk sağlığı

11.1% and 20%, respectively by mSAT and 19.8%, 0% and 0% by ELISA, respectively. According to ELISA results, the listeriosis frequency was found higher in dogs from the municipality kennels than in animals from the veterinary clinics or in dogs of the research unit of veterinary Faculty.

**Conclusions:** The present study shows that the seropositivity to *L. monocytogenes* in stray dogs from Konya is high and it is of concern for the veterinary and human public health.

**Key Words:** ELISA, dog, *Listeria monocytogenes*, mSAT, Public Health.

## GİRİŞ

*Listeria monocytogenes* tarafından oluşturulan listeriozis, genellikle sporadik, zaman zaman enzootik olarak ortaya çıkan, meningoensefalitis, abortus, septisemi ya da konjunktivitis ile karakterize, bazen de latent olarak seyredabilen zoonoz bir enfeksiyondur (1). Enfeksiyon, dünyanın her bölgesinde görülebilmektedir. Etken doğada çok yaygın olarak bulunur ve birçok hayvan türünden izole edilmiştir. *L. monocytogenes*, klinik veya subklinik seyirli enfeksiyona sebep olabilen, enfekte hayvanların dışkıları ile çevreyi kontamine eden ve direkt temas yolu ile diğer hayvan ve insanlara bulaşabilen enfeksiyöz bir etkindir (1, 2).

Enfeksiyonun tanısında, etken izolasyon ve identifikasyonuna dayanan kültür yöntemi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemin uzun zaman almasından dolayı moleküler ve serolojik testler de sıklıkla kullanılır (3). Serolojik testlerden kompleman fiksasyon, indirekt hemaglutinasyon, agar jel difüzyon, serum aglutinasyon ve ELISA testleri hastaları ve portörleri ortaya koymak amacıyla kullanılmaktadır (3,4). Bu yöntemlerin dışında, *L. monocytogenes*'in hızlı tespiti için, immünokromatografi, immünofloresans ve

immüno manyetik ayırım yöntemlerinden de yararlanılmaktadır (5).

Mikroorganizmaların, enfekte veya portör hayvanların dışkıları ile etrafa saçılması ve enfeksiyonun zoonoz bir karakter sergilemesi nedeniyle sokak köpekleri halk sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptir. Yapılan çalışmalarda, Van, Şanlıurfa, Erzurum ve Kars yörelerinde yaşayan sokak köpeklerinde *L.monocytogenes* varlığı gösterilmiştir (4,6-8). Ülkemizdeki köpeklerin *L. monocytogenes* taşıyıcılığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmasından dolayı; bu çalışmada, ELISA ve Mikro Standart Tüp Aglutinasyon (mSAT) testleri kullanılarak, Konya bölgesindeki köpeklerde listeriozis varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, Konya il merkezinde ki belediye köpek barınağında bulunan 106 (76 dişi, 30 erkek) köpek ile Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi (SÜVF) Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan 20 dişi ve SÜVF Kliniklerine aşılama için getirilen 9 (1 dişi, 8 erkek) köpektan 2007 yılı içerisinde alınan toplam 135 adet kan serumu kullanılmıştır. Kan

örnekleri klinik olarak sağlıklı görünen hayvanlardan rastgele olarak toplanmış ve 1000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Toplanan kan serumları 56 °C’de 30 dakika tutularak inaktive edilip, kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Araştırma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Toplanan serumların mSAT testi ile titre tayini yapılmış ve en yüksek titre veren serum (1/2560) pozitif kontrol olarak ELISA testinde kullanılmıştır. Negatif kontrol serumları ise sağlıklı beş adet köpekten elde edilmiştir.

Mikro Standart Tüp Aglutinasyon Testi (mSAT), Regnault (9)’un bildirdiği yöntemin mikropleytlere uyarlanması ile gerçekleştirilmiştir. *L. monocytogenes* tüp aglutinasyon antijeni, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı’ndan temin edilmiştir. Serum örneklerinin, 1/4 ile 1/2560 arasında çift katlı seri dilüsyonları fizyolojik tuzlu su ile yapılmıştır. Daha sonra tüm çukurlara 50 µl tüp aglutinasyon antijeni dağıtılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda 1/160 ve üstü dilüsyonlarda tam aglutinasyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) testinde kullanılan somatik O antijeni, Peel ve ark. (10)’nın bildirdiği yöntemle göre hazırlanmıştır. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı’ndan temin edilen *L. monocytogenes* antijeni, 4.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiş ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile üç kez yıkanmıştır. Pelet az miktarda PBS ile sulandırılmış ve beş dakika sonikatörde tutularak bakteriler parçalanmıştır. Antijenin protein konsantrasyonu, Lowry ve ark. (11)’nin önerdiği yöntemle dayanan DC protein assay (Cat No. 500-0116, Bio-Rad Lab. USA) ile belirlenmiştir.

ELISA testi, Low ve Donachie (12)’nin bildirdiği yöntemle göre standardize edilerek uygulanmıştır. Optimum antijen ve Anti-Dog IgG HRP konjugat (Sigma, A-9042) konsantrasyonları ile serum dilüsyonunu belirlemek için dama tahtası yöntemi

kullanılmıştır. Optimum antijen, konjugat ve serum dilüsyonları sırasıyla 100 µg/ml, 1/2000 ve 1/100 olarak belirlenmiştir. Immulon II mikropleytlere (Nunc C bottom Immunplate 96 well, 446612) 0.05 M karbonat-bikarbonat tampon’da (pH 9.6) homojenize edilen 100 µl antijen aktararak 37 °C’de bir gece tutulmuştur. Bu süre sonunda mikropleytlere yıkama solüsyonu (%0.05 Tween 80 içeren PBS, pH 8) ile beş kez yıkanmıştır. Daha sonra antijen yapışmayan polystyren yüzeylerin nötralizasyonu (Blocking step) amacıyla 200 µl, %1’lik siğir serum albümini (BSA, Sigma A8531) postcoat solüsyonu şeklinde hazırlanarak her bir göze eklenmiş, 37 °C’de 1,5 saat bekletildikten sonra beş kez yıkanmıştır. Sulandırma solüsyonu (%1 BSA ve %0,05 Tween 20 içeren PBS) ile 1/100 oranında sulandırılmış kontrol ve test serumlarından 100 µl alınarak mikropleytin ilgili gözlerine ilave edilerek 37 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. Pleytlere beş kez yıkandıktan sonra sulandırma solüsyonu ile 1/2.000 oranında sulandırılmış konjugattan tüm gözlerle 100 µl ilave edilip 37 °C’de bir saat tutulmuştur. Yıkama işleminden sonra tüm gözlerle 100 µl TMB substrate (Sigma, SIT-0440) ilave edilerek oda ısısında 5-10 dakika inkübe edilmiştir. Stop solüsyonundan (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 100 µl eklenerek ELISA reader’da (MWGt Lambda Scan 200 Bio-Tek Inst. Inc. USA.) 450 nm dalga boyunda mikropleytlere absorpsiyon değerleri okutulmuştur. Cut-off değerine (1.216) eşit veya yüksek absorpsiyon değerine sahip örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

İstatistik analizler Minitap-SPSS paket programı kullanılarak Mc Nemar Testi ve Fisherin Kesin x2 Testi ile yapılmıştır. İstatistiki olarak önemlilik p<0,05 değeri ile ifade edilmiştir.

## BULGULAR

Toplam 135 kan serum örneğinden 31 (%23)’i mSAT ile aglutinasyon vermiş ve listeriozis yönünden pozitif olarak kabul edilmiştir. Yüz dört adet (%77) örnek listeriozis negatif olarak saptanmıştır. Pozitif kan serumlarına ait aglutinasyon titreleri Tablo 1’de

**Tablo 1.** Serumların mSAT ve ELISA ile analiz sonuçları

Kaynak	mSAT titreleri						ELISA	
	≤1/80*	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	Pozitif	Negatif
Belediye Barınağı	80	14	6	5	-	1	21	85
S.Ü.Veteriner Fakültesi Uygulama Çiftliği	16	2	2	-	-	-	-	20
S.Ü. Veteriner Fakültesi Klinikleri	8	-	1	-	-	-	-	9
<b>Toplam</b>	<b>104</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>21</b>	<b>114</b>

\* mSAT ile negatif kabul edildi.

verilmiştir. Örneklerin 21 (%15,5)'i ELISA testi ile pozitif, 114 (%84,5)'ü ise negatif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan iki ayrı serolojik test ile elde edilen sonuçlar arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2).

Örneklerin elde edildiği kaynak bazında yapılan incelemede ise kan örneklerinin toplandığı belediye köpek barınağı, üniversite çiftliği köpek ünitesi ve SÜVF kliniklerine getirilen köpeklere ait pozitiflik, mSAT ile sırasıyla %24,5, %20 ve %11,1 ve ELISA ile sırasıyla %19,8 %0 ve %0 olarak saptanmıştır. ELISA test sonuçlarına göre, belediye köpek barınağı ile diğer iki kaynağa ait köpeklerdeki sero-pozitiflik farklılığı istatistiksel olarak önemli ( $p<0,05$ ) bulunmuştur.

**Tablo 2.** ELISA ve mSAT test sonuçlarının karşılaştırılması

Testler	mSAT		Toplam	
	Pozitif	Negatif		
ELISA	Pozitif	17	4	21
	Negatif	14	100	114
<b>Toplam</b>	<b>31</b>	<b>104</b>	<b>135</b>	

## TARTIŞMA

Zoonoz enfeksiyonlardan olan listeriozis, insanlarda ve hayvanlarda abortus, septisemi ve meningoensefalitise neden olmaktadır (1). İnsanlarda görülen listeriozis vakalarının son yıllarda artması enfeksiyonun halk sağlığı yönünden önemini göstermektedir (13). Doğada bulunan *L. monocytogenes* suşlarının önemli kaynaklarından birisinin dışkıları ile çevreyi kontamine eden portör hayvanlar olduğu bildirilmiştir (2). Köpeklerin *L. monocytogenes* fekal taşıyıcılığı çeşitli ülkelerde araştırılmış ve %0,9-1,3 oranlarda taşıyıcılık tespit edilmiştir (14,15). Ülkemizde yapılan bir çalışmada da, Bursa ilinde sokak köpeklerinin *L. monocytogenes* fekal taşıyıcılığı %1,22 olarak tespit edilmiştir (16).

Bu çalışmada, Konya il merkezinde bulunan belediye köpek barınağı ve SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler ile SÜVF Kliniklerine aşılama için getirilen köpeklerde *L. monocytogenes* varlığının serolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda incelenen toplam 135 adet serumun 31'i mSAT ile pozitif bulunurken, aynı serumların sadece 21'i ELISA ile pozitif bulunmuştur. Bu iki test ile elde edilen sonuçlar arasındaki fark çapraz reaksiyondan meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Tüm hücre antijeninin kullanıldığı aglütinasyon testlerinde, *L. monocytogenes* ile bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* K8) arasında çapraz reaksiyonun olabileceği bildirilmiştir (17). Bourry ve ark. (18) *L.monocytogenes* antikorlarının varlığını ELISA yöntemi ile değerlendirdiklerinde testin özgüllük ve duyarlılığını %88 ve %100 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada da, listeriozisin serolojik tanısında, ELISA testinin aglütinasyon testi olan mSAT'a göre antikorları belirlemede daha spesifik olduğu sonucuna varılmıştır.

Ülkemizde listeriozisin köpeklerdeki varlığını serolojik olarak belirleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ceylan ve ark. (4), Van yöresindeki 90 sokak köpeğini serum aglütinasyon testi ile incelemişler ve %40 oranında seropozitiflik belirlemişlerdir. Babür ve ark. (6) Şanlıurfa İli sokak köpeklerinde yaptıkları çalışmada listeriozis seroprevalansını %18,75, Aktaş ve ark. (7) ise Erzurum yöresi sokak köpeklerinde bu oranı %26,3 olarak rapor etmişlerdir. Gıcık ve ark. (8) Kars ilinin değişik odaklarında ki sahipli köpeklerde listeriozisin serolojik varlığını %22,3 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, ELISA testi ile elde ettiğimiz %21'lik seropozitiflik oranı, Babür ve ark. (6), Aktaş ve ark. (7) ve Gıcık ve ark.

(8)'nın sonuçları ile uyumlu fakat Ceylan ve ark. (4) belirlediği %40'lık orandan düşük bulunmuştur. Bu farklılık, kullanılan testlerin özgüllüğünün farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği gibi bölgesel farklılıktan da ileri gelmiş olabilir.

Kan serum örneklerinin elde edildiği köpeklerin ait olduğu kaynaklar incelendiğinde, ELISA test sonuçlarına göre sadece belediye köpek barınağında yaşayan sokak köpeklerinin %19,8'i listeriozis yönünden pozitif olarak saptanmıştır. Buna karşın, SÜVF Köpekçilik Araştırma ve Uygulama Ünitesinde bulunan köpekler ile SÜVF kliniklerine getirilen köpeklerde enfeksiyonun seroprevalansı sıfır olarak bulunmuştur. *L. monocytogenes* suşlarının çevreye yayılmasında ve insanlara bulaşmasında önemli kaynaklarından birisinin, dışkıları ile çevreyi kontamine eden portör hayvanlar olduğu bildirilmiştir (2). Bu durum göstermektedir ki, sokak köpekleri yüksek seropozitiflik oranları ile halk sağlığı açısından riskli bir popülasyondur.

Konya bölgesi sokak köpeklerinde yüksek sayılabilecek bir oranda *L. monocytogenes* seropozitifliği tespit edilmiştir. Konya Bölgesinde risk grubu insanlarda enfeksiyonun prevalansının tespit edilmesi, köpek kaynaklı bulaşma olasılığının araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Vet J, 1997; 153: 9-29.
2. Skovgaard N, Norrung B. The incidence of *Listeria* spp. in faeces of danish pigs and in minced pork meat. Inter J Food Microbiol, 1989; 8: 59-63.
3. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: A review. FEMS Microbiol Rev, 2005; 29: 851-75.
4. Ceylan E, Karaca K, Akkan HA, Keles I, Kutlu I. Van yöresi sokak köpeklerinde listeriozis seroprevalansı. YYU Sağlık Bil Derg, 2005; 8(1-2): 15-17.
5. Fung DYC. Rapid methods and automation in microbiology. Compr Rev Food Sci F, 2002; 1: 3-21.
6. Babür C, Altaş MG, Çelebi B, Sevgili M, Özkan AT, Gökçen A. Şanlıurfa yöresi sokak köpeklerinde toxoplasmosis, leishmaniosis ve listeriosis'in seroprevalansı. Türk Hij Den Biyol Derg, 2007; 64: 11-16.

7. Aktaş MS, Özkanlar YE, Özkan AT, Babür C, Balkaya İ. Erzurum İli barınak köpeklerinde listeriosis ve leishmaniasisin seroprevalansının araştırılması. Türkiye Parazitol Derg, 2010; 34(2): 76-80.
8. Gıcık Y, Sarı B, Babür C, Çelebi B. Kars yöresinde köpeklerde *Toxoplasma gondii* ve *Listeria monocytogenes*'in seropozitifliği. Türkiye Parazitol Derg, 2010; 34 (2): 86-90.
9. Regnault JP. Immunologie Generale. Lausanne: Vigot Pub, 1988.
10. Peel M, Donachie W, Shaw A. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J Gen Microbiol, 1988; 1: 2171-8.
11. Lowry OH, Rosebrogh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951; 193: 265-75.
12. Low JC, Donachie W. Clinical and serum antibody responses of lambs to infection by *Listeria monocytogenes*. Res Vet Sci, 1991; 51: 185-92.
13. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, et al. *Listeria*- Review of epidemiology and pathogenesis. J Microbiol Immunol Infect, 2007; 40: 4-13.
14. Weber A, Potel J, Schafer-Schmidt R, Prell A, Datzmann C. Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1995; 198: 117-23.
15. Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi C. Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. J Vet Med Sci, 1998; 60: 1341-3.
16. Kocabıyık AL, Cetin C, Özakin C. Faecal carriage of *Listeria monocytogenes* in stray dogs in Bursa province, Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 2005; 29: 1357-1359.
17. Bhunia AK. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. Crit Rev Microbiol, 1997; 23: 77-107.
18. Bourry A, Cochard T, Poutrel B. Serological diagnosis of bovine, caprine, and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, 1997; 35(6): 1606.