

Erzurum Bölgesinde Temin Edilen Çeşitli Peynir Örneklerinde Brucella Antijenlerinin ELISA ile Saptanması

Medine GÜLLÜCE(*), Ahmet ADIGÜZEL(*), Ö. Faruk ALGUR(*)

(*) Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Erzurum

ÖZET

Bu çalışmada, Erzurum piyasasından toplanan çeşitli peynir örneklerinde Brucella abortus antijenlerinin sıklığı ELISA tekniği ile araştırılmıştır. Antikor olarak Brucella abortus'a karşı oluşan antikorları içeren antiserum, konjugat olarak peroksidaz enzimi ile işaretili Protein G, substrat olarak da sitrik asit içinde %3'lük hidrojen peroksit ilaveli ABTS (2-2- azino di-3- ethyl benthiozoline- 6 sulfanate) kullanılmıştır. Toplam olarak 120 beyaz peynir, 60 civil peynir ve 52 lor peyniri örneği incelenmiş ve 120 beyaz peynir örneğinin 26'sında (%21.66) Brucella abortus antijeni saptanmıştır. Civil peynir ve lor peyniri örneklerinde ise Brucella abortus antijenine rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Peynir, bruselloz, Brucella abortus, ELISA

ABSTRACT

Detection of Brucella Antigens in Different Cheese in the Erzurum Area by ELISA

In this study, the occurrence of Brucella abortus antigens in different cheese samples collected from Erzurum has been investigated by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Brucella abortus antiserum was used as antibody. Peroxidase-labeled Protein G was used as conjugate. Hydrogen peroxidase (3%) and ABTS (2-2- azino di-3- ethyl benthiozoline- 6 sulfanate) in citric acid was used as substrate. Totally 120 white cheese, 60 civil cheese and 52 lor cheese were analyzed and 26 of totally 120 white cheese were found to be Brucella positive. In civil and lor cheese samples no antigen of Brucella was encountered.

Key Words: Cheese, brucellosis, brucella abortus, ELISA

GİRİŞ

Brucella cinsine ait bakteriler tarafından oluşturulan bruselloz, dünyanın birçok ülkesinde görülen bir zoonozdur. Hastalık, abortus, süt verimi kaybı, damızlık değeri kaybı ve infertilite gibi sebeplerle, hayvansal üretimde kayıplara neden olurken, infekte hayvanlarla doğrudan temas veya kontamine süt ve süt ürünlerinin tüketimi yoluyla insanlara da bulaşarak, önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır (1-3).

Brucella cinsi içerisinde B. abortus, B. melitensis, B. suis, B. ovis, B. canis ve B. neotomae olmak üzere 6 tür bulunmaktadır. İnsanlarda hastalığa neden olan B. melitensis, koyun ve keçilerde; B. abortus, sığır ve mandalarda, B. suis domuzlarda bulunur. B. canis ise köpeklerde bulunur ve insanda nadiren hastalık

oluşturur (4,5). Biyoteknolojik çalışmalar, Brucella cinsinin Proteobacteria sınıfının bir üyesi olduğunu ve Agrobacterium-Rhizobium kompleksindeki bitki patojenleri ile aynı kökten geldiklerini göstermiştir (6,7).

Ülkemizde bu güne kadar koyun ve keçilerde görülen bakteriyel orjinli yavru atmaların genellikle bruselloz sonucu oluştuğu, farklı bölgelerimizde hastalık prevalansının % 0.6 ile % 22 arasında değiştiği belirtilmektedir (8,9).

Brucella etkeninin insanlara bulaşmasında, infekte hayvanlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinin çiğ olarak tüketilmesi, özellikle çiğ süttten yapılan ve olgunlaşmadan tüketime sunulan taze beyaz peynirlerin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (10,11).

Ülkemizde sütün yaklaşık % 20'si peynir üretiminde kullanılmaktadır. 1985 yılında 210.000 ton peynir üretilmiş olup bu miktar dünya peynir üretimine % 1.1'lik bir katkıyı ifade etmektedir. Çeşitli peynir türleri içerisinde dünyada ve Türkiye'de en fazla tüketilen peynirlerin başında beyaz peynir gelmektedir. Diğer taraftan, daha çok Erzurum ve Kars illerinde yağı alınmış sütün değerlendirilmesi amacıyla yapılan ve ülke çapındaki tüketimi gittikçe artış gösteren bir diğer peynir türü de civil peynirdir. Bu peynir türü, yağsız olması nedeniyle bir diyet peyniri gibi kullanılmaktadır (12,13). Ayrıca lor peyniri denilen ve peynir altı suyunun kaynatıldıktan sonra pıhtılaştırılması suretiyle elde edilen peynir türü de gelecek için ümit veren bir potansiyele sahiptir (14).

Süt ve süt ürünlerinde Brucella cinsi bakterilerinin izolasyonunun zaman alıcı ve zor olması, teşhiste indirekt yöntemlerin daha fazla kullanılmasına yol açmıştır (8,15,16). Serolojik testler içerisinde ELISA, yüksek duyarlık ve özgüllüğe sahip olması, çok sayıda örnekle çalışmaya imkan sağlaması ve ucuz olması gibi nedenlerle son yıllarda tercih edilmektedir (17 - 19). Bu çalışmada Erzurum piyasasından temin edilen, çeşitli peynir örneklerindeki Brucella antijenlerinin ELISA ile saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Peynir örnekleri Erzurum'a bağlı köylerden alınmıştır. Peynirlerin taze ve herhangi bir işlemden geçirilmemiş olmasına dikkat edilmiştir.

Pozitif ve Negatif Kontrol Örnekleri

Brucella abortus S 19'un potasyum klorür ekstresi (KCl extract) ile kontamine edilmiş peynir örnekleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu antijen Dr. C.O. Thoen'dan (IOWA State University Brucella ve Mycobacterium laboratuvarı) temin edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise, belirli kullanım sürecinden geçen peynir örnekleri kullanılmıştır (20).

Antiserum

Brucella abortus antiserumu, Pendik Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

Konjugat

Konjugat olarak, % 1 tween 80 içeren 0.5 M NaCl (pH: 7.5) içerisindeki, peroksidad ile işaretli Protein

G (Sigma) kullanılmıştır.

Substrat

Antijen ve konjugat titreleri için substrat olarak sitrik asit içinde % 3 lük hidrojen peroksit ilaveli ABTS (Sigma) kullanılmıştır.

Peynir örneklerinin ELISA için hazırlanması

25 g'lık peynir örnekleri, 500 ml PBS içerisinde blender ile homojenize edilmiş ve Eppendorf tüplerine konularak -20 °C' de kullanılıncaya kadar saklanmıştır (PBS; litrede 8,2 g NaCl, 15.5 ml 0.5 M Na₂HPO₄ ve 5.5 ml 0.5 M NaH₂PO₄ içermektedir). ELISA yıkama solusyonu olarak, 1000 ml destile su içerisinde 29 g NaCl, 23 g Na₂HPO₄, 0.2 g NaH₄PO₄ ve 5 ml tween 80 içeren çözeltisi kullanılmıştır.

ELISA'nın (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Uygulanışı

Thoen ve ark (16) bildirdikleri yöntem modifiye edilerek aşağıdaki şekilde yapılmıştır. Mikropleyitin her bir çukuruna, antiserumun Na₂CO₃ 'de hazırlanan 1/100 dilüsyonundan 0,1 ml konarak 4 °C 'de bir gece inkübe edilmiş, pleyt 3 kez ELISA yıkama solusyonu ile (% 0.5 tween 80 içeren 0.5 M NaCl) yıkanarak 30 dakika kuruması için bekletilmiştir. Daha sonra bütün çukurlara 0.1 ml NaH₄Cl₂ konulmuş, 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edildikten sonra sekiz kez ELISA yıkama solusyonu ile yıkanarak, 30 dakika kurutulmuştur. Her bir çukur bir örneğe ait olmak üzere, birinci sıra pozitif, ikinci sıra negatif kontrollere ayrılmıştır. Bütün çukurlara 0.1 ml peynir örneği konulmuş ve bir saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plate 8 kez ELISA yıkama solusyonu ile yıkanmış ve tekrar 30 dakika oda sıcaklığında kurutulması için bekletilmiştir. Bütün çukurlara 1/500 oranında hazırlanan konjugattan 0.05 ml konulmuş ve bir saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Tekrar sekiz kez ELISA solusyonu ile yıkanan pleyt çukurlarına 0.1 ml substrat konulduktan sonra oda sıcaklığında bir saat bekletilmiş ve çukurların 405 nm'deki absorbansı ELISA okuyucusunda okunarak değerlendirilmiştir.

Cut-off Değerinin Hesaplanması

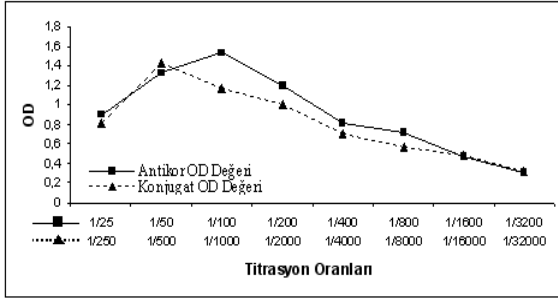
Kontrol grubunun optik dansidite (OD) ortalamasına 2 SD ilave edilerek hesaplanmıştır (21).

BULGULAR

Antikor ve konjugatın uygun konsantrasyonunun saptanması amacı ile yapılan denemeler sonucunda, antikor için en yüksek OD değerinin ölçüldüğü 1/100 oranı uygun antikor titresi olarak, konjugat için de en yüksek OD değerinin ölçüldüğü 1/500 oranı uygun konjugat titresi olarak belirlenmiş (Şekil 1) ve örneklere ELISA uygulanması bu değerlerde gerçekleştirilmiştir.

Şekil.1. Antikor ve konjugatın farklı konsantrasyonlardaki OD değerleri

Negatif kontrol grupları esas alınarak hesaplanan cut-off değeri 0.388 olarak bulunmuş ve bu değerden fazla OD veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir. Toplam olarak 120 beyaz peynir, 60 civil peynir ve 52 lor peynirinin incelendiği bu araştırma sonu-

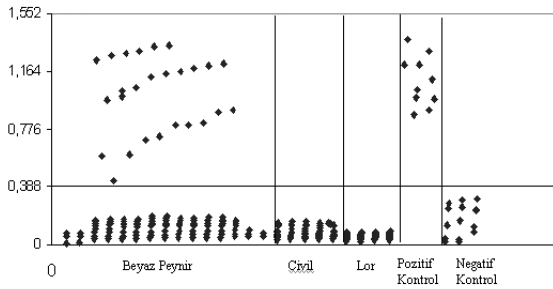


cunda, beyaz peynirlerden 26'sında (% 21.66) pozitiflik görüldüğü halde diğer 2 peynir örneğinde pozitifliğe rastlanmamıştır (Şekil 2).

Şekil.2. ELISA ile incelenen örneklerin OD değerlerinin Cut-off değerine göre dağılımı

TARTIŞMA

Bu araştırma sonucunda beyaz peynirlerde saptadığımız pozitiflik oranının (% 21.66), ülkemizde daha önce peynirler üzerinde yapılmış araştırma sonuçla-



rına göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Nitekim Ünel (22), Balıkesir yöresi beyaz peynirlerinde % 16; Mert (23), Ankara piyasasından toplanan beyaz peynirlerde % 19.3; Tunçbilek (20), yine Ankara piyasasından toplanan beyaz peynirlerde % 5.2 oranlarında Brucella saptamışlardır. Ayaz (24) ise Ankara'da çeşitli marketlerden topladığı beyaz peynirlerde Brucella izole edemediğini belirtmektedir. Ayrıca Sert ve Kıvanç (14), Erzurum piyasasından toplanan 30 adet taze peynir örneğinin hiçbirinde Brucella üremediğini kaydetmişlerdir. Bu bulgular, araştırmamızda yüksek oranda Brucella içeren örnek bulunduğunu gösterse de, hem daha önce yapılmış araştırmaların azlığı, hem de bu araştırma da dahil olmak üzere ülkemizde bu konuda yapılmış bütün araştırmalarda örnek sayılarının azlığı ve örneklemin iyi yapılamaması, böyle bir genelleme yapmamızı güçleştirmektedir. Nitekim Ankara ilinde birbirine çok yakın tarihlerde yapılan çalışma sonuçlarındaki çelişki, bu yargıyı doğrular niteliktedir. Araştırmamızda seropozitiflik oranının, diğer araştırma sonuçlarına göre yüksek çıkması, ELISA tekniğini kullanmamızdan kaynaklanabilir. Çünkü yukarıda sıralanan araştırmalarda genellikle klasik kültürel (veya bazı serolojik) yöntemler uygulanmış olup, bu yöntemlerin ELISA'ya göre etken teşhisinde daha az hassas oldukları, ELISA'nın ise sensitivite ve spesifite bakımlarından diğer yöntemlerden üstün olduğu belirtilmektedir (18,25,26). Üstelik bu araştırmada peroksidazla işaretli protein G kullanılmak suretiyle ELISA'nın yukarıda belirtilen özelliklerinin daha da iyileştirilmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Nitekim, protein G'nin ELISA'da spesifiteyi artırdığı, daha kolay hazırlandığı, daha ucuza mal edildiği ve biyoteknolojik yollarla üretildiği kaydedilmektedir (27,28)

Hem bu araştırmada, hem de daha önce yapılmış araştırmalarda, peynir örneklerinde Brucella saptanması, ülkemizde hala geleneksel usullerle ve çiğ süten peynir yapımının devam ettiğini göstermektedir. Nitekim, ülkemizde köy ve mandıra peynirlerinin büyük bir kısmının çiğ süten ve ilkel şartlarda yapıldığı, fabrika peynirlerinin ise pastörize süten yapıldığı belirtilmektedir (24). Çiğ süten yapılan peynirlerin, en az 90 günlük olgunlaşma dönemini tamamlamadan tüketime verilmemesi gerektiği de belirtilmiştir (29).

Bu araştırma sonucunda civil peynir ve lor peyniri örneklerinde Brucella antijenine rastlanmamıştır. Sert ve Kıvanç (14) tarafından aynı bölgede yapılan çalışmada da civil ve lor peynirlerinde Brucella izole edilmediği belirtilmektedir. Araştırma sonuçlarımız bu bulguyu destekler niteliktedir. Bu peynirlerde bruselloz etkeninin bulunmaması, her iki peynirin yapım tekniğinde ısıtma işlem uygulanmasının varlığına bağlı olabilir.

Ülkemizde bruselloz ile mücadele konusunda yapılan çalışmalar küçümsenmeyecek boyuttadır. Nitekim Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 1984 yılında "Bruselloz Kontrolü ve Eradikasyonu" programı başlatılmış ve bu proje kapsamında 2010 yılına kadar 4-8 aylık bütün dişi buzağuların Brucella abortus S 19 ile, koyun ve kuzuların ise Brucella melitensis REV-1 ile aşılması hedeflenmiştir. Projenin uygulanmaya geçirilmesini takip eden 1989 yılında sığır ve koyun bruselloz sero-prevalansı sırasıyla %3,56 ve %1,26 iken bu oranlar 1991 yılında %1,01 ve %1,83 olarak değişmiştir. Ancak projenin yürütüldüğü yıllarda insan bruselloz vakalarında bir artış kaydedildiği görülmüştür. 1986'da 100.000'de 3,03 olan insanlarda bruselloz sıklığı, 1996'da 100.000'de 15,11'e yükselmiştir (7,30). Araştırmacılar, bu durumun enfeksiyona yakalanma vakalarındaki artıştan ziyade, tarama çalışmalarının kalitesinin ve sayısının artmasına bağlı olduğunu belirtmektedirler. Şüphesiz gıdalardan yapılan izolasyon ve teşhis çalışmaları içinde durum aynıdır. Bu nedenlerle, ister hayvanlar üzerinde, isterse gıdalar üzerinde yapılmış olsun, araştırmalardan elde edilen bulguların doğrudan karşılaştırılması, ancak araştırmaların yapıldığı ülkelerdeki tarama sayıları ve kaliteleri dikkate alındığında bir anlam ifade edecektir. Dolayısıyla, yapılması gereken en doğru şey, ülkemizdeki bu çeşit çalışmaların sayı ve kalitesini arttırmaktır..

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Akritidis N and Pappas G: Ascites caused by brucellosis: a report of two cases. Scand . J. Gastroenterol 36 : 110 (2001).

2. Boschirola M-L, Foulongne V and O' Callaghan D: Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr Opin Microbiol 4: 58 (2001).
3. İzgür M: Hayvancılık ve Brucellosis. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Bruselloz Sempozyumu Kitapçığı S. 68-78 (2000).
4. Al-Eissa YA, Fap MD: Brucellosis in Saudi Arabia: past, present and future. Ann Saudi Med 19 (5): 403-405 (1999).
5. Corbel MJ: Brucellosis An overview. Emerg Infect Dis 3 : 1 (1997).
6. De Ley J, Mannheim W, Segers P, Lievens M, Denijn M, Vanhoucke M, Gillis M: Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of Brucella and CDC group Vd. Int J Syst. Bacteriol 37 : 35 (1987).
7. Anonymous, Türkiye'de sığır ve koyunlarda brusellosis'in sero-epidemiolojisi. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Hayvan Sağlığı Araştırmaları 2000, Ankara s 5-(2001).
8. Muz A, Özer H, Eröksüz H, Ertaş HB, Öngör H, Gülcü HB, Dabak M, Başbuğ O ve Kalender H: Elazığ ve çevresinde koyun ve keçilerde abortus olgularının bakteriyolojik, serolojik ve patolojik olarak incelenmesi. Tr J Vet Anim Sci 23: 77 (1999).
9. Öngör H, Muz A, Çetinkaya B: Atık yapmış koyunlarda brusellozis'in teşhisinde ELISA ile diğer serolojik testlerin karşılaştırılması. Tr J Vet Anim Sci 25: 21 (2001).
10. Sancak YC, Boynukara B, Yardımcı H: Van otlu peynirlerinde Brucella'ların varlığı ve dayanma süresi üzerine bir araştırma. Veterinarium 4 : 1 (1993).
11. Çetin ET ve ark: Türkiye'de insanda bruselloz insidansının saptanması. Doğa Tr J Medical Sci 14 : 324 (1990).
12. Demirci M, Şimşek O, Taştan M: Ülkemizde yapılan muhtelif tip yerli peynirler. Trakya Üniv Ziraat Fak Derg 125: 273 (1994).
13. Kara A, Algur ÖF, Kaya M: Erzurum piyasasından temin edilen beyaz ve civil peynirlerden Listeria türlerinin izolasyon ve identifikasyonu. Tr J Biology 23: 331 (1999).
14. Sert S, Kıvanç M: Taze civil ve lor peynirleri üzerinde mikrobiyolojik çalışmalar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü 5: 287 (1985).
15. Güllüce M, Leloğlu N: Kars ve çevresinde, süt sığırlarında, Brucella abortus'a karşı oluşan antikorların ELISA ve MRT ile saptanması, sonuçlarının karşılaştırılması.

Tr J Vet Anim Sci 20: 251 (1996).

16. Thoen CO, Haas CA, Angus RD, Thownsend AS: Evaluation of potassium chloride extract of *Brucella abortus* in an ELISA for detecting *Brucella* antibodies in bulk tank milk samples from cows. *Vet Microbiol* 45: 185 (1995).

17. Uzal FA, Carrasco AE, Nielsen K, Echaide S, Cabrera RF: An indirect ELISA using a monoclonal anti Ig G1 enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Microbiol* 52 : 175 (1996).

18. Vanzini VR, Aguirre N, Lugaresi CI, De Echaide ST, De Canavesia VG, Guglielmone AA, Marhesino MD, Nielsen K: Evaluation of an direct ELISA for the diagnosis of the bovine brucellosis in milk and serum samples in dairy cattle in Argentine. *Prev Vet Med* 36 : 211 (1998).

19. Shamelian SOA: Diagnosis and treatment of brucellosis. *Neth J Med* 56: 198 (2000).

20. Tunçbilek M: Ankara piyasasında satılan taze peynirlerin brucellosis riski yönünden incelenmesi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara (1992).

21. Keskin O: Sığır tüberkülozis'inin teşhisinde ELISA'nın kullanılması ve allerjik yöntemle karşılaştırılması. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. Ankara (1996).

22. Ünel S, Williams CF ve Stableforth AW: Balıkesir bölgesinde süt krema imalathane ve köylü beyaz peynirlerinde *Brucella melitensis*'in kalma süresi. *Pendik Mikrob Enst Derg* 2 : 67 (1968).

23. Mert A: Ankara yöresinde pazarlanan taze beyaz peynirlerde *Brucella*'ların varlığı üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara (1984).

24. Ayaz Y: Ankara piyasasında satılan beyaz peynirlerde brucellosis etmenlerinin araştırılması. *Etlik Vet Mikrob Enst Derg* 5 : 109 (1986).

25. Batra HV, Chand P, Ganju L, Mukherjee R, Sana da JR: Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies in bovine brucellosis. *Res. Vet. Sci* 46: 143 (1989).

26. Mongini C, Fernandez T, Truvetzky A, Hajos SE: Comperative study of cell- immunoenzymatic methods for the estimation of IgG ve IgM anti- *Brucella* antibodies in the diagnosis of human brucellosis. *J Appl Microbiol* 69 : 86 (1990).

27. Diaz -Aporicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Perez-Ortiz S, Pardo M, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I: Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol* 32 : 1159 (1994).

28. Falkenberg C, Bjorck EL, Akerstrom B, Nilsson S: Purification of Streptococcal protein G expressed by *Escherichia coli* by high performance liquid affinity chromatography using immobilized immunoglobulin G and albumin. *Biomed Chromatogr* 2 : 221 (1987).

29. Anonymous: VIII. Beş yıllık (2001-2005) kalkınma planı süt sanayi-i özel ihtisas alt komisyonu çalışması. s 13 (2000).

30. Adıgüzel A: Erzurum'a bağlı bazı köylerden toplanan süt örneklerinde *Brucella abortus* antikorlarının ELISA ile araştırılması. Ata. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum (2001).