

Kars ve Ardahan İlleri'nde Sığır Leptospirozisinin Serolojik Yöntemlerle Araştırılması*

Mitat ŞAHİN

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

Fuat AYDIN

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

Vildan ÖZDEMİR

Etilik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Leptospira Ünitesi, Ankara - TÜRKİYE

Oktay GENÇ

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

M. Ali GÜLER

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

Geliş Tarihi: 22.03.2000

Özet: Bu araştırmada, Kars ve Ardahan illerinde yetiştirilen, sığırlarda leptospirozisin varlığını ve enfeksiyona neden olan serotipleri belirlemek amacıyla, Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT) ve Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile leptospiral antikorların varlığı araştırıldı. Çalışmada *Leptospira hardjo* ve *Leptospira grippotyphosa* serotiplerinden hazırlanan canlı ve sonike antijenler kullanıldı. Araştırma süresince bölgede 30 yerleşim biriminden 2 yaş ve üstü 840, 2 yaş altı 150 adet olmak üzere toplam 990 adet leptospirozise karşı aşılanmamış sığır kan serumu toplandı. Örneklerin değerlendirilmesinde MAT'de *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa*'ya karşı iki serotipe birlikte pozitif değer verenlerin toplam sayısı 333 (%33,63) , ELISA yönteminde aynı antijenlere karşı 359 (%36,26) serumda pozitiflik belirlendi. Yaş grupları dikkate alındığında 2 yaş ve üstü hayvanlardan temin edilen serumlarda pozitiflik oranının daha yüksek olduğu belirlendi. Seroepidemiolojik çalışmalarda ELISA yönteminin MAT' a göre daha kolay uygulanabilir olduğu sonucuna varıldı. Bölgede leptospira enfeksiyonlarının özellikle *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* tarafından oluşturulduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Sığır, leptospirozis, MAT ve ELISA yöntemleri

Serological Survey of Bovine Leptospirosis in Kars and Ardahan Provinces

Abstract: In this study, leptospiral antibodies were investigated by Microscopic Agglutination Test (MAT) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in order to detect leptospirosis and serotypes which cause leptospira infection in cattle raised in Kars and Ardahan. Live and sonicated antigens prepared from *Leptospira hardjo* and *Leptospira grippotyphosa* serotypes were used. Blood samples were taken from 150 cattle under 2 years of age and 840 cattle 2 years of age or older (a total of 990) which were unvaccinated against leptospirosis in 30 rural settlements.

Seropositivity against *L. hardjo* and *L. grippotyphosa* was detected in 333 (33.63%) and 359 (36.26%) blood samples by MAT and ELISA respectively. In the age groups, seropositivity was found to be higher in cattle 2 years of age or older. We concluded that ELISA was easier than MAT and leptospirosis was caused by *L. hardjo* and *L. grippotyphosa* in this region.

Keys Words: leptospirosis, cattle, MAT and ELISA, serodiagnosis

Giriş

Leptospirozis, leptospira genusuna bağlı türlerden ileri gelen bütün evcil hayvanlarda ve insanlarda görülen genel olarak hemoglobinemî, ikterohemoglobînüri, ikterus, septisemi, anemî, abortus, agalaksi ve mastitis gibi semptomlarla karakterize enfeksiyöz bir hastalıktır (1,2).

Hastalık ilk kez 1864'te Griesinger, daha sonra Weil tarafından titreme, yüksek ateş, kas ağrıları, kanama ve böbrek hastalıkları ile paralellik gösteren genel sarılık semptomları ile tanımlanmıştır (3,4). Japonya'da 1911'de Inado ve Ido adlı araştırmacılar ilk patojen serotip olan *Leptospira icterohaemorrhagiae*'yi maden işçilerinden

* Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (VHAG-1313).

izole etmişlerdir (5-7). Türkiye'de 1922 yılında Hüsamettin Şerif leptospirozisin varlığını kesin olarak ortaya koymuştur (3,5,8-10). Enfeksiyon çeşitli serotipler tarafından oluşturulmaktadır. Bir çok ülkede yapılan araştırmalar ile enfeksiyona sebep olan serogruplar tespit edilmiştir. Amerika'da *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, Japonya'da *L. hebdomadis*, Rusya ve İsrail'de *L. grippotyphosa* en yaygın serotip olarak belirlenmiştir (11-15). Ulaş ve arkadaşları, 1962'de Türkiye'de sığır leptospirozisinin yayılışı ve tipleri üzerine serolojik araştırmalar yapmışlardır (5). Bulu ve ark.(8), Kars, Artvin, Gümüşhane ve Erzurum illerinde sığır ve koyunlarda leptospirozis vakalarının yayılışı ve serotipleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, 1445 sığır ve 675 koyun kan serumunun MAT ile serolojik muayenesinde sığırlarda *L. grippotyphosa* ile % 4,3, *L. sejroe* serogrubu ile % 5 oranında pozitiflik belirlemişlerdir. Aynı çalışmada Erzurum ili Dadaş köyünde hasta bir sığırın idrarından Dadaş-1 adlı yeni bir suş izole edilmiştir. Bu suşun MAT ile serolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde *L. grippotyphosa* serogrubundan olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, Doğu Anadolu Bölgesinde leptospirozis enfeksiyonunun özellikle *L. grippotyphosa*, *L. sejroe*, *L. hebdomadis* serogrupları tarafından ileri geldiğini belirtmişlerdir. Türkiye ve Doğu Anadolu illerinde yapılan araştırmalar (3,8-10) leptospirozisin günümüz sığır yetiştiriciliğinin önemli problemlerinden birisi olma özelliğini koruduğunu ve ekonomik kayıplara neden olduğunu göstermektedir.

Leptospiralar, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1994 yılı basımında Trepanemataceae takımı içerisinde Leptospiraceae familyasında bulunurlar. *L. biflexa* apatojen, *L. interrogans* ise patojen türleri içermektedir. *L. interrogans* 23 serogruptan oluşup, 200'ün üzerinde serovar içerirken *L. biflexa* 38 serogruba ait 65 serovar içermektedir (16,17). Leptospiralar Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz, sarmal biçimli mikroorganizmalardır. Flagellaları olmamalarına karşın uzun eksenleri etrafında dönerek ve bükülerek aktif hareket ederler. Aerobik olup optimal üreme ısısı 28-32°C'dir. Anilin boyalarıyla kolay ve iyi boyanmayan leptospiralar, kısmen Giemsa ve daha iyi olarak da gümüşleme (Levaditi, Fontana) yöntemleri ile boyanırlar (5,17,18).

Doğal olarak enfekte boğaların genital sisteminden *L. hardjo*'nun izole edilmesinden dolayı hastalığın venereal

olarak taşınabileceği ileri sürülmüştür (19). Etkenler enfeksiyondan sonra 8-54 hafta kadar idrarla saçılabilir (20). Dickeson ve Cove (21), sığır leptospirozisinin mevsimsel, iklimsel ve bölgesel faktörlere bağlı olarak prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, hastalığın bahar aylarında daha fazla gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bölgesel ısı farkının izolasyonda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Hathaway ve ark. (7), süt sığırlarında *L. interrogans* serovar hardjo enfeksiyonunun prevalansını belirlemeye yönelik olarak 2 yıllık bir çalışma sonunda, MAT yöntemiyle mevsimlere göre değişmek üzere süt sığırlarında enfeksiyonun prevalansının % 38,8 ve %76,2 arasında olduğunu, enfeksiyona en çok Eylül-Kasım, en az olarak Ocak ayında raslandığını belirtmişlerdir. Araştırmada mevsimsel değişimin iki yılda da yaklaşık olarak aynı sonuçları verdiği belirtilmiştir.

Leptospirozis'in direkt teşhisi leptospiremik dönemde kandan, leptospirürik dönemde ise böbrek ve idrardan yapılmaktadır. Etkenin idrarla çıkışı aralıktır (5,17,20,22,23). Leptospiraları üretmek amacıyla kullanılan besiyerlerine kontaminantların üremesini engelleyen 5- fluorouracil, nalidiksik asit gibi kimyasal maddeler ile vankomisin, neomisin gibi antibiyotikler ilave edilir. Üremeyi teşvik amacıyla Tween 80/40, laktalbümin hidrolizat (LH) ve tavşan serumlarından yararlanılmaktadır (13,20,24-26). Leptospiraların izolasyonunda genellikle yarı-katı EMJH (Ellinghausen McCullough Johnson Herreris) vasatından yararlanılmaktadır. İzolasyonu 28-32 °C'de 12 haftalık inkübasyon sonunda olmaktadır (20,23,25,27) .

Leptospiraları izole etmek güç ve zaman alıcı olduğundan, enfeksiyonun tanısında serolojik yöntemler tercih edilmektedir (8,28,29). Leptospirozis serolojik tanısı amacıyla MAT, Rapid Makroskopik Aglutinasyon Testi, Mikrokapsül Aglutinasyon Testi (MCA), SEL (Sensitize Eritrosit Lizis Testi), CF (Complement Fixation Test), HT (Hemolitik Test), FAT (Fluoresan Antikor Testi), İHA (İndirekt Hemaglutinasyon) testleri ile ELISA tekniğinden yararlanılmaktadır (8,28,30-32). Bu yöntemlerden, serolojik tanı amacıyla çoğunlukla MAT kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarla ELISA yönteminin MAT yöntemine göre daha duyarlı, uygulanmasının kolay olduğu, serumda IgM ve IgG antikorlarının belirlenebilmesi gibi avantajlarının bulunduğu belirtilmiştir (6,7,21,25,30,33) .

ELISA tekniğinde hangi antijenlerin kullanılacağı ve antijenleri hazırlamada standart bir metodun bulunmaması nedeniyle ELISA rutin test olarak kullanılmamaktadır (7,21,25). ELISA yönteminde sonikasyon (34,35), fenol ekstraksiyonu (32), etanol ekstraksiyonu (36) ve SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) ile ekstrakte dış zar (Outer Envelope (OE)) (37) antijenleri kullanılmaktadır. Non-ekstrakte antijenler tür spesifik iken, OE antijenleri ve fenol ekstraksiyonu ile elde edilen LPS antijenleri serogrup ve serovar spesifiktir. Sonike antijenler ise daha ziyade tür spesifitesinden sorumludur (38). Adler ve ark.(30), ELISA tekniğini kullanarak, *Leptospira interrogans* serovar hardjo ile bağışık ve enfekte sığırlarda IgG antikorlarını araştırmışlardır. Çalışmada MAT ve ELISA yöntemlerinin teknik açıdan karşılaştırılması yapılmış ve leptospiral enfeksiyonların teşhisi için ELISA'nın kullanılmasının daha kolay ve pratik olduğu belirtilmiştir. Değişik araştırmacılar tarafından ELISA'nın, enfeksiyonun başlangıcında doğal olarak şekillenen IgM'nin ölçülmesinde duyarlı ve spesifik sonuçlar verdiği bildirilmiştir (6,23,28). Çeşitli araştırmalarda antikorlar ELISA ve MAT'la birlikte araştırıldığı halde, enfeksiyondan sonraki dönemlerde antikorların belirlenmesi iki testte farklı zamanlarda olmuştur (14,16,30). Örneğin ELISA ile enfeksiyondan 7 gün sonra antikor titresi tespit edilirken, MAT yöntemiyle 14 gün sonra tespit edilebilmiştir(30).

Leptospira enfeksiyonlarının kontrolü, enfeksiyonu oluşturan serogruba karşı aşı uygulanmasıyla mümkündür. Bu amaçla leptospirozisin epidemiyolojisine yönelik serolojik ve kültürel çalışmalar yapılmıştır (3,20,39,40).

Bu araştırmada Kars ve Ardahan illerinde yetiştirilen sığırların kan serumlarında MAT ve ELISA ile *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa* - Moskova V serotiplerine karşı antikor olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Serum örnekleri :

Kars ve Ardahan yöresinde 30 yerleşim biriminden 2 yaş ve üstü 840, 2 yaş altı 150 genç sığırdan elde edilen toplam 990 kan serumu çalışmanın materyalini oluşturdu. Alınan örnekler leptospira enfeksiyonuna karşı aşılanmamış sığırlardan temin edildi. Kan serumlarında *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa*'ya karşı oluşan spesifik antikorların serolojik olarak saptanması amacıyla MAT ve ELISA yöntemlerinden yararlanıldı.

MAT için antijen hazırlanması :

Mikroskobik aglütinasyon testinde, Etlük Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa* suşlarının Johnson besiyerinde üretilen bir haftalık kültürlerinden yararlanıldı. Kültürleden hazırlanan canlı antijenler mililitresinde en az 107 bakteri olacak şekilde ayarlandı. Antijenler *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa* Moskova - V referens suşlarından oluşmaktaydı.

Mikroskobik aglütinasyon testi:

Araştırmada toplanan sığır kan serumlarının PBS (Phosphate Buffered Saline, pH : 7,2) ile 1/50'den 1/640'e kadar olan çift katlı dilüsyonları hazırlandı. Pleytlerin her bir çukuruna dilüsyonları yapılan serum sulandırılmalarından 0,2 ml konduktan sonra üzerine yine aynı miktarda olmak üzere hazırlanan antijenden konularak 30°C 'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her serum-antijen dilüsyonundan bir öze dolusu temiz bir lamın üzerine alınarak karanlık saha mikroskopunda 40X incelendi. Mikroskop sahasında tanecikler veya bulut şeklinde kümeleşme, hareketli leptospiraların görülmemesi pozitif, mikroskop alanında aglütinasyonunun olmaması ve hareketli leptospiraların görülmesi ise negatif olarak değerlendirildi. Oluşan aglütinasyonun derecesi ++++ üzerinden yapılarak +(%25), ++ (%50), +++ (%75) ve ++++ (%100) olarak değerlendirildi. Mikroskobik aglütinasyon testinde 1/100 ve üzeri dilüsyonlarda ++ aglütinasyon veren serumlar pozitif olarak kabul edildi.

ELISA :

ELISA için antijen hazırlanması :

ELISA tekniğinde kullanılacak antijenin hazırlanması Berhovich ve ark. (11)'nin bildirdiği yöntemle yapıldı. Antijen hazırlamak amacıyla *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa* serotiplerinin Johnson besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ekimi yapılan kültürler 30 °C'de 14 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üreyen bakteri kültürü 8000 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyondan sonra sediment 0,01 M pH'sı 7,2 olan steril PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 1/10 oranında dilüe edilerek 2 kez yıkandı. Dilüsyon işleminden sonra bakterinin hücre duvarının parçalanması amacıyla leptospira kültürleri 500 W ' luk sonikatörde 20 kHzs-1'de 3 dakika sonike edildi. Daha sonra hazırlanan antijenin bakteriyel kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla % 0,01'lik formaldehid solüsyonundan ilave edilerek kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

ELISA tekniğinin uygulanışı :

ELISA tekniği Thiermann ve Garrett (32)'in bildirdiği yönetime göre yapıldı. Antijen bağlanma kapasitesi yüksek olan (Coaster, Type I, Cat no: 3590) düz tabanlı pleytler kullanılarak, aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapıldı.

- 1- ELISA'da kullanılacak antijen 0,05 M karbonat-bikarbonat buffer (pH 9,6) ile 1/100 oranında sulandırılarak pleytin her bir çukuruna 100 ml miktarında konulup + 4 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda her pleyt, litreye 0,5 ml miktarında Tween 20 ilave edilmiş 0,01 M PBS (PBT) ile 3 kez yıkandı.
- 2- Bloking amacıyla pleytin her çukuruna 0,01 M PBS ile sulandırılmış %2'lik siğir serum albumini 100 ml miktarında konularak + 4 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda pleytler 0,01 M PBT ile 3 kez yıkandı.
- 3- Araştırmada kullanılan serum örnekleri PBT ile 1/200 oranında sulandırılarak pleytin her çukuruna 100ml miktarında ilave edildi. Serum ilave edilen pleytler 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra pleytler yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve etüvde 37 °C'de 15 dakika kurumaya bırakıldı.
- 4- Bu işlemlerden sonra PBS ile 1/25000 oranında sulandırılan anti-bovine IgG peroksidaz konjugat (Sigma A -7414)'dan her çukura 100 ml ilave edilip 37 °C'de 90 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda pleytler tekrar PBT ile 3 kez yıkandı.
- 5- Substrat olarak kullanılan Tetrametilbenzidin (TMB)'den her çukura 100 ml ilave edilip oda ısısında ELISA çalkalayıcısında 8 dakika tutulduktan sonra reaksiyon 0,1 M H2SO4 ile durdurularak pleytler 450 nm'de ELISA reader (Metertech)' da okundu.

Antijen ve serum sulandırmalarının belirlenmesi:

Her pleytte birer göze pozitif ve negatif kontrol serumları ilave edildi. Checker- board yöntemine göre 20

negatif serum kullanılarak yapılan işlemde antijen sulandırma oranı 1/100 ve serum dilüsyon oranı ise 1/200 olarak belirlendi.

Pozitiflik eşiği 'nin belirlenmesi :

ELISA testinin değerlendirilmesinde pozitiflik eşiğinin belirlenmesi amacıyla, mikroskopik aglütinasyon testinde negatif sonuç veren 20 adet serum ile 1/1600 ve üzeri titrede pozitiflik saptanan 20 adet siğir kan serumu kullanıldı. Yirmi adet negatif serumun aritmetik ortalaması hesaplanarak standart sapması 3 ile çarpılıp aritmetik ortalamaya ilave edilerek Optik Dansiteleri (OD) hesaplandı. Buna göre *L. grippotyphosa* için pozitiflik eşiği 0,6 OD, *L. hardjo* için 0,5 OD olarak tesbit edildi. Bu değerlerin üstü pozitif altı ise negatif olarak kabul edildi.

Bulgular

Kars ve Ardahan yörelerinden toplanan 990 siğir kan serumunun MAT ve ELISA yöntemleri ile incelenmesi sonucu 2 yaş ve üzeri 840 siğira ait kan serumunun MAT ile 205'i (%24,40) *L. hardjo*, 59'u (% 7,02) *L. grippotyphosa*, 36'sı (% 4,28) da hem *L. grippotyphosa* hem de *L. hardjo* ile pozitif bulunmuştur.

Aynı kan serumlarının ELISA ile değerlendirilmesi sonucu ise 225'i (%26,78) *L. hardjo*, 63'ü (%7,50) *L. grippotyphosa*, 36'sı (% 4,28) ise hem *L. hardjo* hem de *L. grippotyphosa*' ya karşı pozitif bulunmuştur.

İki yaşın altında 150 siğira ait kan serumlarının MAT ile incelenmesinde *L. hardjo*' ya karşı 13(%8,66), *L. grippotyphosa*'ya karşı 19 (%12,66), hem *L. grippotyphosa* hem de *L. hardjo*'ya karşı 1 (%0,66) serumda pozitiflik belirlenmiş, ELISA tekniğinde ise *L. grippotyphosa* ve *L. hardjo*' ya karşı MAT 'daki ile aynı sayıda serum pozitif olarak belirlenirken sadece hem *L. grippotyphosa* hem de *L. hardjo* ' ya karşı 3 (%2) serum pozitif olarak tesbit edilmiştir (Tablo 1). Kars yöresinde 16 yerleşim biriminden temin edilen 611 adet kan serumunun MAT ile değerlendirilmesinde, *L. hardjo*

	<i>L. hardjo</i>		<i>L. grippotyphosa</i>		<i>L. hardjo + L.grippotyphosa</i>		Toplam	
	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA
2 yaş ve üstü	205	225	59	63	36	36	300	324
2 yaş altı	13	13	19	19	1	3	33	35
Toplam	218	238	78	82	37	39	333	359

Tablo 1. MAT ve ELISA testleri ile pozitif bulunan *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* serum sayıları.

142(%23,24), *L.grippotyphosa* 52 (%8,51), *L.grippotyphosa* ve *L. hardjo* ile ikisine birlikte pozitif sonuç veren 32 (%5,24) adet olmak üzere toplam 226 (%36,99) adet serum örneği pozitif bulunmuştur (Tablo 3). Ardahan yöresinde 10 yerleşim biriminden sağlanan 229 adet serum örneğinin MAT ile değerlendirilmesinde ise sırasıyla *L. hardjo* 63 (%27,51), *L.grippotyphosa* 7 (%3,06), *L.grippotyphosa* ve *L.hardjo* ile ikisine birlikte pozitif sonuç veren 4 (%1,75) olmak üzere toplam 74 (%32,31) adet serum pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4).

Yaş grupları dikkate alınmadığında toplam 990 siğir kan serum örneğinin ELISA ve MAT ' a göre elde edilen değerleri; ELISA'da *L. hardjo*'ya 238 (%24,04), *L.grippotyphosa* ' ya 82 (% 8,28), hem *L.grippotyphosa* hem de *L. hardjo*'ya karşı 39 (% 3,93) olmak üzere toplam 359 (%36,26), MAT ' da *hardjo* ' ya 218 (% 22,02)*L. grippotyphosa*'ya 78 (% 7,87), hem *L. grippotyphosa* hem de *L.hardjo*' ya karşı 37(% 3,73) olmak üzere toplam 333 serumda (% 33,63) pozitiflik belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 2. Araştırmada temin edilen iki yaş altı siğirlerin kan serumlarının MAT ile değerlendirilmesi.

ALINDIĞI YER	Örnek sayısı	<i>L. hardjo</i>	<i>L. grippotyphosa</i>	<i>L.hardjo+L.grippe</i>	Negatif Örnek sayısı
KARS					
EBK	40	3	5	-	32
Gelirli	20	1	4	-	15
Susuz	50	4	5	1	38
İncesu	40	5	5	-	30
Toplam	150	13	19	1	117

Tablo 3. Kars ilinden toplanan serum örneklerinin alındıkları yerlere göre MAT ile pozitiflik dağılımı.

ALINDIĞI YER	Örnek sayısı	<i>L. hardjo</i>	<i>L. grippotyphosa</i>	<i>L.hardjo+grippotyphosa</i>	Negatif Örnek sayısı
KARS Merkez					
Çamurlu	35	8	2	2	23
Mezra	45	13	1	3	28
Boğazköy	38	10	1	3	24
Kümbetli	40	9	3	5	23
Benliahmet	43	12	5	6	20
Dikme	40	10	4	-	26
KARS-APAÇAY					
Kümbet	35	8	2	2	23
Tepecik	40	8	3	-	29
Akçakale	30	5	3	3	19
Akçalar	35	9	4	1	21
Kardeştepe	38	10	3	-	25
Dağköy	32	7	2	-	23
KARS- SUSUZ					
Yolboyu	35	10	3	-	22
KARS- AKYAKA					
Ocaklı	35	9	5	3	18
Demirkent	50	8	5	3	34
KARS- SELİM					
Kotanlı	40	6	6	1	27
TOPLAM	611	142	52	32	385

Tablo 4. Ardahan ilinden toplanan serum örneklerinin alındıkları yerlere göre MAT ile pozitiflik dağılımı.

ALINDIĞI YER	Örnek sayısı	<i>L. hardjo</i>	<i>L. grippoyphosa</i>	<i>L.hardjo+grippyphosa</i>	Negatif Örnek sayısı
ARDAHAN					
Tepeler	25	7	-	-	18
Yanlızcam	26	6	-	-	20
ARDAHAN-GÖLE					
Demirkapı	20	5	-	-	15
ARDAHAN-ÇILDIR					
Öncül	26	4	1	-	21
Gölbelen	26	8	-	-	18
Taşköprü	26	7	2	1	16
Gülyüzü	25	8	-	2	15
Çanaksu	15	5	1	-	9
Göldalı	20	7	1	1	11
Doğruyol	20	6	2	-	12
TOPLAM	229	63	7	4	155

Tartışma

Leptospirozis, evcil hayvanlarda sarılık, anemi, hemoglobüri, hematüri, septisemi, organ ve dokularda peteşiyal kanamalar, erken doğum, zayıf buzağı doğumu, abortus, mastitis, süt verimi düşüklüğü ve ölüme yol açan zoonotik bir enfeksiyondur. Enfekte sığırlarda kısa bir süre sonra gelişen bakteriyemi periyodu esnasında etkenler böbrek ve üreme sistemlerine lokalize olurlar. Bu enfeksiyondan sonra hayvanlar, idrarlarıyla aylar hatta yıllarca leptospiraları yayarak, diğer hayvanlar ve insanlar için rezervuar olarak hizmet ederler (41). Gerek yurt dışında (12,14,42) gerekse Türkiye'de (8-10) sığır ve koyunlarda enfeksiyona en sık neden olan leptospira serotipleri *L.hardjo* ve *L.grippyphosa* olarak belirlenmiştir.

Hasta hayvanlarda sarılık, kan işeme, ateş ve abort, sütün renginin bozuk, kanlı veya pembe renkte görülmesi, süt veriminin azalması ve süt kesikliğinin görülmesi leptospirozisin göstergesi olmakla birlikte klinik semptomlara göre teşhisi zordur (16,17,37,43). Leptospirozis; babesiozis, anaplasmozis, theileriozis, basiller hemoglobüri, non enfeksiyöz hepatitis ve kronik bakır zehirlenmesiyle karışabilir (5,44). Bu enfeksiyonun kesin tanısı etkenin izole edilmesiyle direkt ya da serolojik yöntemlerle indirekt olarak yapılmaktadır (23,39,45,46). Leptospiraların izolasyonu için idrar, kan, böbrek dokusu, atık fötüs, karaciğer vb. numuneler dikkatli ve vakit

geçirilmeden laboratuvara getirilmelidir (18,35,38). Bu mikroorganizmaların izolasyonu zor ve zaman alıcı olduğundan dolayı, enfeksiyonun teşhisi genellikle seolojik yöntemlerle yapılmaktadır (5,13,16,17,24,28,47). Kingscote ve Proulx (13), Kanada'nın Kuzey Ontario bölgesinde 264 sığırlık bir işletmede abort, zayıf buzağılama ve verim kaybının görüldüğü bir sürüde beş yıl boyunca leptospirozisin varlığını MAT ve kültürel yöntemlerle araştırmışlardır. Serolojik olarak yıllara göre değişmekle beraber pozitiflik oranının %54-60 olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı araştırmada, kesime gönderilen 18 boğanın 6'sından alınan böbrek dokusundan yapılan kültürel yoklamada, 4 leptospira suşu izole edilmiştir. İzole edilen leptospira suşlarının 2'si *L. hardjo* hardjoprajitno olarak tanımlanmıştır. Yapılan araştırmalar (6,30,32,35,40), leptospiraların kültürünün pahalı, yorucu ve zaman alıcı olduğunu göstermektedir. Kültürlerin kontaminasyon riski oldukça yüksektir (22,30,35). Bu nedenle enfeksiyonun tanısı genellikle serolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Leptospira antikorlarının aranmasında MAT, komplement fikzasyon, floresan antikor tekniği ve ELISA yöntemlerinden yararlanılmaktadır (19,22,26,48).

Bu araştırmada MAT ve ELISA'da antijen olarak kullanılan *L. hardjo*-prajitno ve *L. grippyphosa* Moskova – V serotipleri Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. ELISA tekniğinde antijen

olarak Berhovich ve ark. (11)'nin kullandığı sonike hücre duvarı antijeni ve konjugat olarak peroksidaz işaretli anti bovine Ig G antikorlarından yararlanıldı.

Thiermann ve Garrett (32), antiglobulin ve anti IgG ELISA ile MAT'ın duyarlılığını karşılaştırdıkları bir çalışmada, anti-globulin ELISA'nın, anti-IgG ELISA ve MAT'dan daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Berhovich ve ark. (11), *L. hardjovovis* ile enfekte sığırlarda ELISA ve MAT yöntemlerinin karşılaştırılmasında 2 yöntem arasında % 90 korelasyon belirlemişlerdir. Tagliabue ve ark. (49), 1100 sığırdan aldıkları kan serumlarının MAT ve ELISA ile değerlendirilmesi sonucu, MAT ile pozitif bulunan 213 hayvanın 209'unu ELISA ile pozitif, 3'ünü şüpheli ve 1'ini de negatif olarak tespit etmişlerdir. Buna karşın MAT ile negatif bulunan 887 hayvanın ELISA ile 807'sini negatif, 27'sini şüpheli, 53'ünü ise pozitif olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar inaktif antijenlerin kullanılmasından dolayı ELISA'nın MAT'a göre daha güvenli, değerlendirilmesi kolay, mikroskopik değerlendirmedeki subjektiviteden uzak bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. ELISA, MAT gibi çok sayıda canlı leptospira kültürlerinin sürekli pasajlarla yenilenmesini gerektirmeyen, ucuz, yapılması kolay ve çalışanların enfeksiyona yakalanma riski olmayan bir yöntemdir (7,15,21,33).

Türkiye'nin bazı bölgelerinde leptospirozisin epidemiyolojisine yönelik araştırmalar yapılmıştır (8-10). Bulu ve ark. (8), 1990 yılında Doğu Anadolu'nun bazı illerinde yaptıkları bir çalışmada 1445 adet sığır kan serumunun MAT ile değerlendirmesinde 258(%17,8) örnekte leptospiral antikorların varlığını saptamışlardır. Aynı araştırma içerisinde Kars ilinin Göle ve Selim ilçelerinden temin edilen 696 adet sığır kan serumunun MAT ile yoklanmasında %29,60 oranında *L.sejroe hardjo* ve %0,57 *L.grippotyphosa* ile olmak üzere %30,17 oranında pozitiflik belirlemişlerdir. Özdemir (9), Türkiye'de leptospirozisin dağılımı ve serotiplendirilmesi üzerine yaptığı bir çalışmada 74 ilden tesadüfi örnekleme ile 15596 adet sığır kan serumunu MAT yöntemi ile 7 ayrı serogrup antijen kullanarak incelemiştir. Bu örneklerden 1254 adeti (%8,04) müspet bulunmuştur. Serolojik araştırmada en yaygın tip olarak *L.sejroe-hardjo* (%62,46) ve *L.grippotyphosa*- Moskova-V (%37,54) tespit edilmiş, diğer serotiplere karşı pozitif değerler saptanmadığı bildirilmiştir. Araştırmacı leptospirozisin

Türkiye'nin diğer bölgelerine nazaran Doğu ve Güney Doğu Anadolu sığırlarında daha yaygın olduğunu belirtmiştir.

Türkiye'de yapılan araştırmalar(8-10), leptospira enfeksiyonlarının genellikle *L. sejroe hardjoprajitno* ve *L. grippotyphosa* tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Kars ve Ardahan illerinde yukarıda belirtilen araştırmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir. Bölge sığırlarında enfeksiyon *L. sejroe hardjoprajitno* ve *L.grippotyphosa* tarafından oluşturulmaktadır. Yaş farkı dikkate alındığında iki yaşından genç sığırlarda iki yaş ve üstü sığırlara göre pozitiflik oranının %11,63 daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu durum genç sığırların ileri yaşlarda enfeksiyon etkenleriyle karşılaşma ihtimalinin olması ve yaşla doğru orantılı olarak portörlük veya enfeksiyonu geçirme olasılığı ile açıklanabilir. Yaşlı hayvanların portör olarak kaldıkları ve enfeksiyonu yaydıkları değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (6,7,21). Çalışmada MAT ve ELISA yöntemlerinin saha şartlarında uygulanabilirliği bakımından önemli farklar olduğu, ELISA'nın seroepidemiolojik çalışmalarda kullanılabilir olduğu görüşüne varıldı.

Araştırmada genç sığırlarda her iki serolojik yöntemle de, *L.grippotyphosa* antikorları, *L.hardjo* antikorlarından sayısal olarak daha fazla oranda tespit edildi. Genç sığırlarda, bölgede enfeksiyona neden olan serotipleri belirlemek amacıyla toplanan serumlar sayısal olarak ve odak olarak az olması nedeniyle, bu sonuç genel durumu yansıtmayan lokal bir bulgu olarak düşünülebilir. Araştırmadan elde edilen verilere göre Kars ve Ardahan illerinde sığır leptospirozisi genellikle *L. hardjo* ve *L.grippotyphosa* tarafından oluşturulmaktadır. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların (3,4,8,9) verileriyle de paralellik göstermektedir. Her iki suşla birlikte pozitif değerler veren örnek sayısı MAT ile 37, ELISA da 39 olarak belirlendi. Bu durum bölgede enfeksiyonun birden fazla serotiple birlikte seyredebilceğini göstermektedir.

Sonuç olarak verim düşüklüğü ve ölümlerle ekonomik kayıplara neden olan leptospiroze karşı Kars ve Ardahan illerinde yüksek oranda pozitif değerler elde edilmiştir. Leptospirozis bölge hayvancılığının önemli problemlerinden birisi olma özelliğini korumaktadır.

Kaynaklar

1. Johnson, R.H., Allan, P.J. and Dennett, D.P. Association of hardjo with abortions in a group of heifers. *Aust. Vet. J.*, 1974; 50, 325 - 326.
2. Higgins, R.J., Harbourne, J.F., Little, T.W.A. and Stevens, A.E. Mastitis and abortion in dairy cattle associated with leptospira of the serotype hardjo. *Vet. Rec.*, 1980; 107, 307 - 310.
3. Bulu, A.A. ve Ergün, O. Yurdumuzda Sığır Leptospirozisine Karşı Etkin Bir Aşı Hazırlanması Üzerine Çalışmalar. *Etilik Vet. Mikrob. Derg.*, 1987; 6 (1) 23 - 46.
4. Tuncel, E. ve Ögütman, R. Erzurum ve çevresinde Leptospirozis üzerinde çalışmalar. *Türk Hij. Tec. Biyo Derg.*, 1975; 34 (3) 101-121.
5. Arda, M., Minbay, A., Leloğlu, N., Aydın, N. ve Akay, Ö. Özel Mikrobiyoloji, Bakteriyel ve Mikotik İnfeksiyonlar. Atatürk Üniversitesi Basımevi Erzurum, 1992.
6. Chappel, R.J., Ellis, W.A., Adler, B., Amon, L., Millar, B.D., Zhu, S.S. and Prime, R.W. Serological evidence for the presence of *Leptospira interrogans* serovar bratislava in Australian pigs. *Aust. Vet. J.*, 1992; 69 (5) 119 - 120.
7. Hathaway, S.C., Little, T.W.A. and Pritchard, D.G. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. *Vet. Rec.*, 1986; 119 (26) 84 - 86.
8. Bulu, A.A., Dörteler, R., Özkan, Ö. ve Hoştürk, F. Doğu Anadolunun Bazı İllerinde (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum) Sığır ve Koyunlarda Leptospirozis Vakaları Üzerine Araştırma. *EtilikVet. Mikrob. Derg.*, 1990; 6 (6) 49 - 60.
9. Özdemir, V. Türkiye'de Leptospirozisin dağılımı ve serotiplendirilmesi üzerine bir çalışma. I. Ulusal Vet. Mikrobiyoloji Kongresi Kitapçığı s. 34, Ankara, 1994.
10. Özkan, Ö., Dörteler, R. ve Hoştürk, F. Erzurum ili ve yöresinde sığır ve koyunlarda sarılık semptomu ile seyreden hastalıklarda *Clostridium oedematis*, *Leptospira* ve kan protozoonlarının insidensinin belirlenmesi. *Etilik Vet. Mikrob. Derg.*, 1993; 7 (3) 97 - 104.
11. Berhovich, Z., Taaijke, R. and Bokhout, B.A. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira hardjo* infections in cattle. *Vet. Microbio.*, 1990; 21, 255 - 262.
12. Bolin, C.A., Thiermann, A.B. and Handsaker, A. Effect of vaccination with pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo - bovis infection of pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 1989; 50 (1) 161 - 165.
13. Kingscote, B.F. and Proulx, J. The successful management of *Leptospira hardjo* infection in a beef herd in Northern Ontario. *Can. Vet. J.*, 1986; 7, 435 - 439.
14. Miller, D.A., Wilson, M.A. and Beran, G.W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, 1991; 52 (11) 1761 - 1765.
15. Sugiyama, Y., Sugiyama, F. and Yagami, K. Comparative study on cross reaction of Leptospiral antibodies in several serological tests to detect antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 1993; 55 (1) 149 - 151.
16. Herrmann, J., Bakoss, P., Korver, H., Bulu, A.A., Bellenger, E., Terpstra, W.J., Girons, I.S. and Baranthon, G. A new serovar in the grippotyphosa serogroup comprising Leptospiral isolates from different regions. *Int. J. Bacterio.*, 1994; 44 (2) 362 - 364.
17. Carter, G.R. and Chengappa, M.M. Leptospirosis. In: *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*. 4th Ed., Lea and Febiger, LONDON, 1991.
18. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. Leptospiraceae. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. pp. 62 - 67, 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
19. Ellis, W.A., Cassels, J.A. and Doyle, J. Genital leptospirosis in bulls. *Vet. Rec.*, 1986; 118, 333.
20. Leonard, F.C., Quinn, P.J., Ellis, W.A. and Farrell, K. Duration of urinary excretion of Leptospirae by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet. Rec.*, 1992; 131, 435 - 439.
21. Dickeson, D. and Cove, D.N. A serological survey of dogs, cats and horses in Southeastern Australia for Leptospiral antibodies. *Aust. Vet. J.*, 1993; 7 (10) 389 - 390.
22. Nicholson, V.M. and Prescott, J.F. Outer membrane proteins of three pathogenic *Leptospira* species. *Vet. Microbio.*, 1993; 36, 123 - 138.
23. Gregoire, N., Higgins, R. and Robinson, Y. Isolation of Leptospirae from nephritic kidneys of beef cattle at slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, 1987; 48 (3) 370 - 371.
24. Brem, S., Kopp, H., Meyer, P. and Hollmann, P. First isolation of *Leptospira interrogans* serovar hardjo from catheter urine of cattle in the Federal Republic of Germany. *Isr. J. Vet. Med.*, 1987; 43 (4) 307 - 309.
25. Goddard, R.D., Luff, P.R. and Thornton, D.H. The serological response of calves to *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccines and infections as measured by the microscopic agglutination test and anti IgM and IgG Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Vet. Microbio.*, 1991; 26, 191 - 201.
26. Prescott, J.F., Miller, R.B. and Nicholson, V.M. Isolation of *Leptospira hardjo* from kidneys of Ontario cattle at slaughter. *Can. J. Vet. Res.*, 1987; 51, 229 - 231.
27. Pereria, M.C. Bovine Leptospirosis in cattle in Portugal: Bacteriological findings. *Vet. Rec.*, 1991; 128, 549 - 550.
28. Arimtsy, Y. A new method for diagnosis of Leptospirosis: A microcapsule agglutination (MCA) test. *Isr. J. Vet. Med.*, 1988; 44 (1) 1 - 8.

29. Gerritson, M.J., Koopmans, M.S. and Olyhoek, T. Effect of streptomycin treatment on the shedding of and the serologic responses to *Leptospira interrogans* serovar hardjo subtype hardjobovis in experimentally infected cows. *Vet. Microbio.* 1993; 38, 129 - 138.
30. Adler, B., Cousins, D.V., Faine, B. and Robertson, G.N. Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo as measured by Enzyme Immunoassay. *Vet. Microbio.* 1982; 7, 577 - 585.
31. Cousins, D.V., Robertson, G.M., Parkinson, J. and Richard, R.B. Use of the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo in pregnant ewes. *Zb Bakt.* 1991; 275, 335-342.
32. Thiermann, A.B. and Garrett, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovar hardjo and pomona in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44 (5) 884 - 887.
33. Little, J.W.A., Hathaway, S.C., Broughton, E.S. and Searwright, D. Development of a control strategy for *Leptospira hardjo* infection in a closed beef herd. *Vet. Rec.* 1992; 131 (24) 383 - 386.
34. Adler, B., Cooper, A.M., Locarnini, S.A. and Faine, S. Detection of specific immunoglobulins M and G in human sera by solid - phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbio.* 1980; 11, 452 - 457.
35. Waltman, W.D. and Dawe, D. Enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of leptospiral antibodies in swine sera. *Am. J. Vet. Res.* 1983; 44, 1120 - 1122.
36. Fairbrother, J.M. Antibody response to genus and serovar specific leptospiral antigens in leptospira infected cows. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46, 1422 - 1426.
37. Biancifiori, F. and Cardaras, P. Enzyme - linked immunoassay in the diagnosis of leptospirosis in domestic animals using peroxidase - conjugate protein A. *Comp. Immuno Microbio Infect. Dis.* 1983; 6, 57 - 65.
38. Adler, B., Ballard, S.A., Miller, S.J. and Faine, S. Monoclonal antibodies reacting with serogroup and serovar epitope on different lipopolysaccharides subunits of *Leptospira interrogans* serovar pomona. *FEMS Microbio Let.* 1989; 47, 213 - 218.
39. Lewis, J. The routine application of a microtechnique for the demonstration of Leptospiral antibodies. *J. Med. Microbio.* 1978; 11, 355 - 358.
40. Mendoza, and Prescott, J.F. Serodiagnosis of Leptospirosis in pigs using an axial filament Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *Vet. Microbio.* 1992; 31, 55 - 70.
41. Dhaliwal, G.S., Murray, R.D. and Dobson, H. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of cows from dairy herds naturally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Res. Vet. Sci.* 1996; 60, 163 - 167.
42. Cousins, D.V., Robertson, G.M. and Hustas, L. The use of the Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle. *Vet. Microbio.* 1985; 10, 439 - 450.
43. Hungerford, T.G. *Diseases of Livestock.* 9 th Ed., McGraw - Hill Book Company, Sydney, 1990.
44. Gyles, C. and Thoen, C.O. *Pathogenesis Bacterial Infections in Animals.* Iowa State University Press, Ames, 1988.
45. Arimitsu, Y., Kobayashi, S., Akama, K. and Matuhasi, T. Development of a simple serological method for diagnosing Leptospirosis: a Microcapsule Agglutination Test. *J. Clin. Microbio.* 1982; 15 (5) 835 - 841.
46. Cole, J.R., Sulzer, C.R. and Pursell, A.R. Improved Microtechnique for the Leptospiral Microscopic Agglutination Test. *App. Microb.* 1973; 25 (6) 976 - 980.
47. Miller, D.A., Wilson, M.A. and Beran, G.W. Relationship between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle and regional, climatic and seasonal factors. *Am. J. Vet. Res.* 1991; 52, 1766 - 1768.
48. Surujballi, O., Henning, D., Marenger, R. and Howlett, C. Development of monoclonal antibody - based competitive Enzyme - Linked Immunosorbent Assay for the detection of *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjobovis antibodies in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.* 1997; 61, 267 - 274.
49. Tagliabue, S., Lafelli, C. and Brocchi, E. Standardisation of an ELISA for the serological diagnosis of bovine leptospirosis. *Selezione Veterinaria.* 1994; 35 (8) 743 - 752.