

## Sığırlarda *Leptospira* Seroprevalansının Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT) ve ELISA ile Saptanması (\*)

Hasan Basri ERTAŞ, Burhan ÇETİNKAYA, Adile MUZ, Hasan ÖNGÖR  
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE  
Vildan ÖZDEMİR, Nahit YAZICIOĞLU  
Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.09.2001

**Özet:** Bu çalışmada Elazığ, Diyarbakır ve Malatya illerindeki özel ve devlete ait mezbahalarda kesilen değişik yaş ve cinsiyetteki sığırlardan kesim esnasında toplanan 275 adet serum örneğinden MAT ve ELISA testleri ile *Leptospirosis*'in prevalansının saptanması amaçlandı.

Referens *Leptospira hardjo*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis* ve *L. icterohaemorrhagiae* kültürleri ile hazırlanan MAT ve ELISA antijenleri kullanılarak yapılan testler neticesinde incelenen 275 serum numunesinin 44 (% 16)'ünde MAT ile ve 64 (% 23,3)'ünde ELISA ile pozitiflik saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** *Leptospira*, MAT, ELISA, Sığır

### Determination of the Seroprevalence of *Leptospira* in Cattle by MAT and ELISA

**Abstract:** In this study, 275 serum samples collected from cattle at various ages and of both sexes, slaughtered at state or private abattoirs in Elazığ, Malatya and Diyarbakır were examined by MAT and ELISA for the presence of antibodies against *Leptospira* species.

In the serological analysis, using antigens prepared from reference *Leptospira hardjo*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis*, and *L. icterohaemorrhagiae* cultures, 44 (16%) and 64 (23.3%) of the samples were determined to be positive with MAT and ELISA, respectively.

**Key Words:** *Leptospira*, MAT, ELISA, Cattle

### Giriş

*Leptospirosis* dünyada ve Türkiye'de birçok hayvan türünü etkilediğinden önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Hastalık sığırlarda yavru atma, infertilite, ölü doğum, zayıf yavru, veagalaksi gibi bozukluklara neden olmaktadır (1,2). *Leptospira* türlerinin insanlarda da akut ateş, baş ağrısı, kas ağrısı ve ikterus gibi bozukluklara sebep oldukları bilinmekte ve hastalığın kontrolü dolaylı olarak insan sağlığını da ilgilendirmektedir. Hastalığın zoonoz olmasından dolayı insan sağlığı için oluşturduğu risk bu hastalığın önemini daha da arttırmaktadır (3,4).

*Leptospirosis*'in teşhisi zor olup özellikle mikrobiyolojik metotlar, uzun zaman alması, her zaman doğru sonuç vermemesi ve laboratuvar çalışanları için büyük risk taşıması gibi dezavantajlara sahiptir (5,6). Kültür en güvenilir teşhis yöntemi olmasına rağmen rutin kullanımlarda tercih edilmemekte dolayısıyla hastalığın teşhisi daha çok immunolojik yöntemlerle yapılmaktadır. İmmunolojik testler içerisinde en yaygın olarak kullanılan ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından standart test olarak kabul edilen metot Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT)'dir. Ancak MAT'in yanısıra son yıllarda ELISA da yaygın olarak kullanılan testler arasına girmiştir (7-9).

(\*) Bu çalışma Tarım Bakanlığı Tarafından Desteklenmiştir.

Bununla birlikte gerek MAT gerekse ELISA'nın kendine has avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (10,11). Bu testlerin dışında bazı çalışmalarda Komplement Fiksasyon testi (12,13), Immunocomb (10) ve Immunofloresan testi (14) gibi serolojik testler de Leptospirosis'in teşhisinde kullanılmıştır.

Türkiye'de Leptospirosis'in varlığı ilk olarak 1922 yılında ortaya konulmuştur (15). Sığırlardan Leptospira izolasyonu ise ilk olarak 1954 yılında Özgen ve Tunus tarafından yapılmıştır (16). Yine aynı dönemde, Hakioğlu (17), MAT ile teşhisin yanı sıra etken izolasyonunda da başarılı sonuçlar elde etmiştir. Yurdumuzda değişik zaman dilimlerinde ve değişik hayvan gruplarında MAT ile yapılan geniş kapsamlı birkaç serolojik çalışmada bölgesel farklılıklar nedeniyle % 8'den (18), % 20'lere (19-21), varan oranlarda pozitiflik bildirilmiştir. Bu çalışmalarda en yaygın olarak saptanan serotipler *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* olarak rapor edilmiştir. Elazığ'da Çetinkaya ve ark. (22) tarafından yapılan bir serolojik çalışmada 395 sığır serumu *L. hardjo*, *L. grippotyphosa*, *L. pomona* ve *L. icterohaemorrhagiae* antikorları yönünden MAT ile incelenmiş, bu serumların % 2'sinde pozitif reaksiyon elde edilmiş, pozitif serumların % 1,8'inin *L. hardjo*, % 0,3'ünün ise *L. grippotyphosa* antijenleri ile aglutinasyon verdiği tespit edilmiştir. Adler ve ark. (23) tarafından yapılan ELISA ve MAT'ın karşılaştırmasına yönelik bir çalışmada bu iki test arasında % 96'lık bir korelasyon tespit edilmiştir. Thiermann ve Garrett (11) *L. hardjo* ve *L. pomona* antikorlarını tespit amacıyla yaptıkları çalışmada ELISA ile sırasıyla % 64 ve % 78 oranlarında pozitif buldukları serumlarda MAT ile % 18 ve % 23 oranında pozitiflik saptamışlardır. Winslow ve ark. (24), ELISA ile MAT'ı kıyasladıkları çalışmada ELISA'nın leptospira enfeksiyonlarının erken teşhisinde sonradan MAT ile doğrulanmak suretiyle etkili bir test olarak kullanılabilmesi sonucuna varmışlardır. Surujballi ve ark. (25), sığır serumlarını *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. copanheni*, *L. canicola* ve *L. grippotyphosa* antikorları yönünden MAT ve ELISA ile test etmişler ve çalışmada ELISA'nın sensitivitesini % 95, spesifitesini de % 100 olarak saptamışlardır.

Bu çalışmada dünyada Leptospirosis'in serolojik teşhisinde yaygın olarak kullanılan MAT ve ELISA yöntemlerini kullanarak Elazığ, Diyarbakır ve Malatya illerindeki sığırlarda Leptospirosis'in seroprevalansının tespit edilmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

**Serum Örnekleri:** Çalışmada Elazığ, Diyarbakır ve Malatya illerindeki özel ve devlete ait mezbahalarda kesilen değişik yaş ve cinsiyetteki sığırlardan kesim esnasında rasgele toplanan 275 adet serum örneği kullanıldı.

**Kültürler:** MAT ve ELISA antijenlerini hazırlamak amacıyla Kraliyet Tropikal Enstitüsü'nden (Laboratory of Tropical Hygiene, Department of Biomedical Research, Amsterdam-Hollanda) temin edilen referens *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. grippotyphosa*, *L. hebdomadis* ve *L. icterohaemorrhagiae* kültürleri kullanıldı.

**Besiyeri:** Antijenlerin hazırlanmasında EMJH (Difco) Leptospira vasatı kullanıldı.

**Kontrol Serumları:** Aynı bölgede daha önce yapılmış başka bir serolojik çalışmada (22), MAT ile 1/100 ve daha yüksek sulandırmada pozitif sonuç veren serumlar pozitif kontrol serumları olarak kullanıldı. Yine aynı çalışmada negatif olduğu tespit edilen serumlar ise negatif kontrol serumu olarak kullanıldı.

## Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT)

**MAT Antijenleri:** MAT'ta gerekli olan canlı antijenler Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsündeki Leptospira laboratuvarında üretildi ve testler bu laboratuvarlarda gerçekleştirildi. Sıvı besiyerine inokule edilen Leptospira kültürleri 30-32 °C'de 4-14 gün inkube edildiler. Yoğunluğu 1-2 x 10<sup>8</sup> bakteri/ml olan Leptospira kültürleri antijen olarak kullanıldı. Leptospiraların yoğunluğunun saptanmasında direkt sayım yönteminden yararlanıldı (26).

**Serum Sulandırılması ve MAT'ın Yapılışı:** Öncelikle pozitif serum örneklerinin tespit edilmesi amacıyla, serum örnekleri pozitiflik alt sınırı olarak kabul edilen 1/100 oranında sulandırıldılar. Sulandırma işleminde beşli havuz sisteminden yararlanıldı. Bu yöntemle göre tüpler içerisine 4,5 ml fizyolojik tuzlu su konuldu. Bu tüplerden her birine beş farklı serumdan 0,1 ml alınarak ilave edildi. Son hacim 5 ml'ye ulaştı ve böylelikle her serum numunesi 1/50 oranında sulandırılmış oldu.

Daha sonra her bir serumun 1/50 oranında sulandırıldığı tüplerden 0,2 ml alınarak MAT pletlerindeki kuyucuklara konuldu ve üzerine yine aynı miktarda canlı Leptospira antijeni ilave edildi. Böylelikle serumun son sulandırması 1/100 oldu. Çalışmada 5 farklı

serotip araştırıldığı için bu işlem her serotip için ayrı ayrı yapıldı (26).

Pleytler oda ısısında 2-4 saat tutulduktan sonra pleytlerdeki çukurlardan alınan bir öze dolusu sıvı üzeri kapatılmadan karanlık saha mikroskobunda aglutinasyon yönünden incelendi. Ayrıca her pleytte kontrol amacıyla pozitif ve negatif serum ilave edilmiş antijenler de bulunduruldu.

**Testin Değerlendirilmesi:** Karanlık saha mikroskobunda negatif kontrol çukurlarından ve negatif serum örneklerinin bulunduğu çukurlardan alınan sıvıda mikroskop sahasında bol miktarda serbest halde canlı *Leptospira* bakterilerinin olduğu görüldü. Yer yer parlak tutunmaların bulunduğu ve mikroskop sahasındaki *Leptospiraların* % 50 ve daha fazlasının lize veya aglutine olduğu gözlenen numuneler pozitif olarak kabul edildi. Bu tutunmaların az yada çok oluşuna göre sahadaki *Leptospira* sayısında azalma meydana geldi.

Bu işlem sonunda pozitif olduğu tespit edilen serum örneklerinin antikor titrelerinin tespiti amacıyla serumlar tek tek 1/100'den başlamak suretiyle iki katlı olarak sulandırıldı ve test edildiler. Karanlık saha mikroskobunda pozitif görüntünün meydana geldiği son serum sulandırılması o serum için *Leptospira* antikor titresi olarak tayin edildi (26).

#### ELISA

ELISA Terpstra ve ark. (27) tarafından bildirilen yöntemine göre gerçekleştirildi.

**ELISA Antijenleri:** Suşlar EMJH vasatında 10-12 gün 30 °C'de çalkalayıcı etüvde inkube edildiler. Kültürlerin daha iyi üremelerini sağlamak için besiyerlerine inokülasyondan 4-5 gün sonra 1:10 oranında steril Tween 80 ilave edildi. Tween tamamen tüketildikten ve yeterli üreme elde edildikten sonra kültürler % 0,5 formalin ilave edilerek bakteriler öldürüldü. Su banyosunda her 5 dakikada bir karıştırılmak suretiyle 30 dakika süre ile kaynatıldı. Daha sonra kültürler 10.000 rpm de 30 dak santrifüj edildi ve süpernatant antijen olarak kullanıldı (27).

**Pleytlerin Antijenle Kaplanması:** ELISA pleytlerindeki her kuyucuğa 100 µl antijen süspansiyonu konuldu. Pleytler oda ısısında karanlık bir ortamda içlerindeki sıvı tamamen buharlaşıp kuruyuncaya kadar (1-3 gün) bekletildi ve bu pleytler ELISA testinde kullanıldı.

**Testin Yapılışı:** Antijen kaplı pleytler önce PBS/Tween karışımı ile 4 defa yıkandı. Son yıkamadan sonra pleytler bir pamuklu beze ters vurularak kurutuldu. Daha sonra PBS/Tween/BSA karışımında 1/100 oranında sulandırılmış şüpheli serumlar 100 µl miktarında kuyucuklara ilave edildi. Pleytlerin üzeri kapatılarak 30 °C'de 1 saat inkube edildi. Daha sonra serumlar dökülerek pleytler yıkandı ve üzerlerine PBS/Tween/BSA da sulandırılmış 100 µl konjugat (Peroxidaz işaretli anti-sığır IgG) ilave edildi ve 30 °C'de 1 saat inkube edildi. İnkubasyondan sonra tekrar 4 defa yıkandı ve çukurlara 100 µl substrat (40 mg O-phenylendiamine dihydrochloride+100 ml 0,05 M Phosphate-citrate tampon (pH:5)+40 ml % 30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ilave edildi ve iyice karıştırıldıktan sonra pleytler oda ısısında 2 saat tutuldu. Reaksiyonu durdurmak için 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solüsyonu kullanıldı. Sonra sonuçlar göz ile değerlendirildi (27). Değerlendirme en az iki araştırmacı tarafından gerçekleştirildi.

#### Bulgular

Sığırlardan rasgele toplanan 275 adet serumda beş farklı *Leptospira* serotipiyle hazırlanan antijene karşı antikorların mevcudiyeti araştırıldığında MAT'da % 16 ve ELISA'da % 23,3 oranında pozitiflik tespit edildi. MAT ve ELISA ile incelenen serumlarda sadece *L. grippotyphosa* ve *L. hardjo*'ya karşı antikorlar saptandı. MAT ile incelenen serumların % 6,2'sinde *L. hardjo*, % 8'inde *L. grippotyphosa* ve % 1,8'inde de her iki serotipe karşı oluşmuş antikorlar tespit edildi. ELISA ile yapılan testler neticesinde ise serumların % 11,6'sında *L. hardjo*, % 8'inde *L. grippotyphosa* ve % 3,6'sında ise her iki serotipe karşı oluşmuş antikorlar saptandı. Her iki test ile incelenen serum numunelerinde *L. pomona*, *L. hebdomadis* ve *L. icterohaemorrhagiae*'ye karşı antikor saptanamadı. MAT ve ELISA sonuçlarının türlere ve serum toplanan illere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

Bu sonuçlara göre ELISA testi ile MAT'dan daha yüksek bir oranda pozitiflik saptandığı görülmektedir.

#### Tartışma

İnsan ve hayvan sağlığını yakından ilgilendiren ve dünyada birçok ülkede ciddi ekonomik kayıplara neden olan *Leptospirosis*'in teşhisinde bugüne kadar birçok teknikten yararlanılmıştır. Kültür yönteminin güç, zaman alıcı ve her zaman doğru sonuç vermemesi nedeniyle

Tablo 1. MAT ve ELISA ile elde edilen sonuçların serotipler ve illere göre dağılımı.

Test Edilen Serotip	Elazığ (n:79)		Malatya (n:102)		Diyarbakır (n:94)		Toplam (n:275)	
	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA	MAT	ELISA
<i>L. hardjo</i>	6 (% 7,6)	11 (% 13,9)	5 (% 4,9)	16 (% 15,6)	6 (% 6,3)	5 (% 5,3)	17 (% 6,2)	32 (% 11,6)
<i>L. grippotyphosa</i>	5 (% 6,3)	7 (% 8,8)	4 (% 3,9)	5 (% 4,9)	17 (% 18)	10 (% 10,6)	22 (% 8)	22 (% 8)
<i>L. pomona</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. hebdomadis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. grippotyphosa+</i>	2 (% 2,5)	3 (% 3,7)	-	4 (% 3,9)	3 (% 3,1)	3 (% 3,1)	5 (% 1,8)	10 (3,6)
<i>L. hardjo</i>								
TOPLAM	13 (% 16,4)	21 (% 28,5)	9 (% 8,8)	25 (% 24,5)	26 (% 27,6)	18 (% 19,1)	44 (% 16)	64 (% 23,3)

hastalığın teşhisinde daha çok serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik testlerden en çok kullanılanı ise MAT ve son yıllarda kullanımı yaygınlaşan ELISA'dır.

Dünyada MAT ve ELISA'nın Leptospira antikorlarının tespitinde tek başına ve birlikte kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (11,23,24). Amerika'nın Iowa eyaletinde kesimhanedeki sığırlardan toplanan 204 adet serum örneğinin MAT ile incelenmesi sonucu % 14,5, buna karşılık ELISA yöntemiyle % 39,5 oranında pozitiflik saptanmıştır. Aynı çalışmada ELISA yöntemiyle % 26,5 oranında *L. hardjo* ve % 18 oranında *L. pomona*'ya karşı antikor tespit edilmiştir (28). Kuzey İspanya'daki sığırlarda yapılan bir çalışmada ise incelenen 3578 sığır serum örneğinden % 10,4 oranında MAT ile pozitiflik saptanmış ve en sık tespit edilen serotipler % 5,6 ile *L. pomona*, % 2,4 ile *L. grippotyphosa* ve % 0,8 ile *L. hardjo* olarak bildirilmiştir (29). Hussain ve ark. (30) tarafından Alabama'da yapılan çalışmada ise MAT ile incelenen 286 sığır serum örneğinde % 47,5 *L. hardjo*, % 34 *L. wolffi*, % 12 *L. canicola* ve % 10 *L. pomona*'ya karşı seropozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada sığır serumlarında MAT ile % 16 oranında pozitiflik saptanırken ELISA ile % 23,3 oranında pozitiflik saptandı. Diğer ülkelerdeki araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da bu araştırmada olduğu gibi sığır serumlarındaki Leptospira antikorlarının tespit

edilmesinde MAT ile kıyaslandığında ELISA ile daha fazla pozitiflik saptandığı görülmektedir. Yine aynı şekilde diğer çalışmalarda en yüksek pozitiflik oranı *L. hardjo*'ya karşı tespit edilmiştir. Bu araştırmada da dünyanın değişik bölgelerinde yapılan çalışmalara paralel olarak incelenen serum örneklerinde *L. hardjo* antikorlarının diğer serotiplere karşı oluşan antikorlardan daha yoğun olduğu gözlenmektedir.

Daha önce Elazığ ilinde yapılan diğer bir çalışmada (22), MAT ile test edilen serumların % 1,8'inde *L. hardjo*, % 2,3'ünde *L. grippotyphosa* ve % 0,3'ünde her iki serotipe karşı antikorlar saptanmasına rağmen, bu çalışmada aynı ilden toplanan serumların MAT ile incelenmesinde yukarıda belirtilen serotiplere karşı sırasıyla % 7,6, % 6,3 ve % 2,5 oranlarında pozitiflik saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen oranların daha yüksek olması her iki çalışmadaki örnek seçiminin farklılığından kaynaklanmış olabilir. Çetinkaya ve ark. (22) tarafından yapılan çalışmada serum örnekleri sahada klinik olarak sağlıklı görünen hayvanlardan, bu çalışmadaki serumlar ise mezbahada kesim esnasında toplanmıştır. Bu çalışmadaki pozitiflik oranlarının daha yüksek çıkması, mezbahada kesilen hayvanların çoğunlukla verim düşüklüğü, yaşlılık ve hastalık gibi nedenlerle kesime sevk edilen hayvanlardan ibaret olmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada daha önceki yıllara göre daha yüksek oranda elde edilen pozitiflik oranları, yöredeki sığırlarda leptospira antikorlarının oldukça yüksek oranda tespit edilmesinin bu hastalığın ciddi bir hayvancılık sorunu olarak karşımıza çıkma ihtimalini akla getirmektedir. Ayrıca MAT ile birlikte kullanıldığı bu

çalışmada ELISA yönteminin Leptospira antikorlarını tespit etmede daha başarılı olduğu görülmüştür. İleride farklı laboratuvarlarla koordineli olarak daha kapsamlı metodolojik çalışmalar yapıldığı takdirde ELISA yönteminin, MAT'a alternatif bir test olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

## Kaynaklar

1. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., Carter, G.R.: Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, Spain, 1994; p 296.
2. Dom, P.P., Haesebrouck, F., Vandermeersch, R., Descamps, J., Van Ommeslaeghe, K.: Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* antibodies in milk in Belgian dairy herds. Vet. Quart., 1991; 13: 118-120.
3. Abdollahpour, G., English, A.W., Tasler, J.: Isolation of *Leptospira interrogans* serovar *grippotyphosa* from a heifer in New South Wales. Aust. Vet. J., 1996; 73: 109-110.
4. Hartman, E.G., Franken, P., Bokhout, B.A., Peterse, D.J.: Leptospirose bij runderen; melkerskoorts bij de veehouders (Leptospirosis in cattle and 'milker's fever' in dairy farmers). Tijdschr.-Diergenees., 1989; 114: 131-135.
5. Smith, C.R., Ketterer, P.J., McGowan, M.R., Corney, B.G.: A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* infection in cattle. Aust. Vet. J., 1994; 71: 290-294.
6. Gerritsen, M.J., Olyhoek, T., Smits, M.A., Bokhout, B.A.: Sample preparation method for Polymerase Chain Reaction-based semiquantitative detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* subtype *hardjobovis* in bovine urine. J. Clin. Microbiol., 1991; 29: 2805-2808.
7. Cho, H.J., Gale, S.P., Masri, S.A., Malkin, K.L.: Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars *pomona*, *sejroe* and *hardjo* in cattle. Can. J. Vet. Res., 1989; 53: 285-289.
8. Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Robson, H., Montgomery, J., Ellis, W.A.: Presence of antigens 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.
9. Behymer, D.E., Reimann, H.P., Utterback, W., Elmi, C.D., Franti, C.E.: Mass screening of cattle sera against 14 infectious disease agents, using an ELISA system for monitoring health in livestock. Am. J. Vet. Res., 1991; 52: 1699-1705.
10. Woodward, M.J., Swallow, C., Kitching, A., Dalley, C., Sayers, A.B.: *Leptospira hardjo* serodiagnosis: a comparison of MAT, ELISA and Immunocomb. Vet. Rec., 1997; 141: 603-604.
11. Thiermann, A.B., Garrett, L.A.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars *hardjo* and *pomona* in cattle. Am. J. Vet. Res., 1983; 44: 884-887.
12. Hodges, R.T., Weddell, W.: Adaptation of a complement fixation test for large scale serological diagnosis of bovine leptospirosis. New Zealand. Vet. J., 1977; 25: 261-262.
13. Hodges, R.T., Day, A.M.: Bovine leptospirosis: the effects of vaccination on serological responses as determined by complement fixation and microscopic agglutination tests. New Zealand. Vet. J., 1987; 35: 61-64.
14. Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Dobson, H., Montgomery, J., Ellis, W.A., Baker, J.R.: Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with *Leptospira interrogans* serovar *hardjo*. Res. Vet. Sci., 1996; 60: 157-162.
15. Şerif, H.: The morbus well cases İstanbul. İstanbul seririyatı, 2:101. (Cited by Hakioğlu), 1922.
16. Özgen, H., Tunus, M.: Türkiye'de ilk olarak *Leptospira bovis* suşunun kültürel geliştirilmesi. Türk. Vet. Hekim. Derg., 1954; 24: 1865-1874.
17. Hakioğlu, F.: Uzun Köprü sığırlarında serolojik ve kültürel metotlarla tespit edilen Leptospirosis hastalığı. Türk. Vet. Hek. Der. Derg., 1956; 26: 2767-2796.
18. Özdemir, V.: Türkiye'de Leptospirosis'in dağılımı ve serotiplendirmesi üzerine bir çalışma. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 27-29 Eylül, Ankara, 1994; p 34.
19. Bulu, A.A., Ergün, O.: Yurdumuz sığır Leptospirosis'ine karşı etkin bir aşı hazırlanması üzerinde çalışmalar. Etlik Vet. Mik. Enst. Derg., 1987; 6: 23-24.
20. Bulu, A.A., Dörterler, R., Özkan, Ö., Hoştürk, F.: Doğu Anadolu'nun bazı illerinde (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum) sığır ve koyunlarda Leptospirosis vakaları, yayılışı ve serotipleri üzerine araştırma. Etlik Vet. Mikrob. Enst. Derg., 1990; 6: 49-60.
21. Vardar, T.: 1963-1974 yılları arasında yurdumuz evcil hayvanlarında görülen Leptospirosis olayları. Etlik Vet. Bakt. Enst. Derg., 1976; 4: 147-162.
22. Çetinkaya, B., Ertaş, H.B., Muz, A., Öngör, H., Kalender, H., Özdemir, V.: Elazığ ilinde sığırlarda Leptospirosis'in seroprevalansının saptanması. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 1999; 23: 633-639.

23. Adler, B., Faine, S., Gordon, L.M. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a serological test for detecting antibodies against *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in sheep. *Aust. Vet. J.*, 1989; 57: 414-417.
24. Winslow, W.E., Merry, D.J., Pirc, M.L., Devine, P.L. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection. *J. Clin. Microbiol.*, 1997; 35: 1938-1942.
25. Surujballi, O.P., Marenger, R.M., Eaglesome, M.D., Sugden, E.A.: Development and initial evaluation of an indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of *Leptospira interrogans* serovar *hardjo* in bovine sera. *Can. J. Vet. Res.*, 1977; 61: 260-266.
26. Faine, S.: Guidelines for the control of Leptospirosis. World Health Organisation, Geneva, 1982.
27. Terpstra, W.J., Ligthart, G.S., Schoone, G.J.: ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J. Gen. Microbiol.*, 1985; 131: 377-385.
28. Thiermann, A.B.: Bovine Leptospirosis: Bacteriologic Versus Serologic Diagnosis of Cows at Slaughter. *Am. J. Vet. Res.*, 1983; 44: 2244-2245.
29. Espi, A., Prieto, J.M., Fernandez, M., Alvarez, M.: Serological prevalence to six Leptospiral serovars in cattle in Austria (Northern Spain). *Epidemiol. Infect.*, 2000; 124: 599-602.
30. Hussain, B., Gbadamosi, S.G., Siddique, I.H.: Serological studies on Leptospirosis in cattle in East Central Alabama. *Can. J. Comp. Med.*, 1978; 42: 373-375.