

Sığır Abortuslarında Leptospirozis Yönünden İmmunoperoksidaz İncelemeler

Ahmet TEMUR

Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Patoloji Laboratuvarı, Erzurum - TÜRKİYE

Yavuz Selim SAĞLAM

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.04.2002

Özet: Bu çalışmada, aborte sığır fötüslerinde leptospirozisin varlığı araştırıldı. Her fötüse ait karaciğer, akciğer, dalak ve böbreklerden hazırlanan doku kesitleri avidin-biotin immunoperoksidaz boyama tekniğiyle boyandı ve dokulardaki antijen lokalizasyonu incelendi. İncelenen 33 sığır fötüsünden 8'inin (% 24,24) leptospirozis yönünden pozitif olduğu ve pozitif olgulardan 3'ünün akciğer (% 37,5), 2'sinin karaciğer (% 25), 4'ünün böbrek (% 50) ve 4'ünün dalağında (% 50) leptospira antijenleri saptandı.

Leptospira antijenleri akciğerlerde interalveoler ve interlobuler septumda, karaciğerde portal bölgedeki makrofajlarda ve hepatositlerin sitoplazmalarında, böbreklerde pelvis renalisin epitel hücreleri ile tubulus epitellerinde ve intertubular interstisyumdaki makrofajların sitoplazmalarında tespit edildi. Dalakta ise antijenlerin makrofajların sitoplazmalarında bulunduğu ve parankim içinde diffuz bir şekilde yayıldığı gözlemlendi. Çalışma sonucunda abort fötüslerde leptospirozisin yüksek oranda bulunduğu görüldü.

Anahtar Sözcükler: Sığır, abort, leptospirozis, immunoperoksidaz

Immunoperoxidase Studies on Leptospirosis in Bovine Abortion

Abstract: This study was conducted to determine leptospirosis from aborted bovine fetuses. Tissue sections of the liver, lung, spleen and kidney were stained with avidin-biotin peroxidase complex, and antigen localization was examined. These examinations showed positive staining in eight (24.24%) out of 33 fetuses for the presence of leptospira antigens. In these eight cases, leptospira antigens were found in three lung (37.5%), two liver (25%), four kidney (50%) and four spleen (50%) samples.

Microscopic studies demonstrated that leptospiral antigens were located in the interalveolar and interlobular septum of the lung; in the cytoplasm of hepatocytes and macrophages in the portal regions of the liver; and in the epithelial cells of the renal pelvis, tubular epithelium and macrophages in the intertubular region of the kidney. In the spleen, antigens were observed in the cytoplasm of macrophages. In conclusion, it was suggested that leptospirosis plays an important role in the etiology of bovine abortions.

Key Words: Bovine, abortus, leptospirosis, immunoperoxidase

Giriş

Leptospirozis çeşitli *Leptospira interrogans* serovarları tarafından oluşturulan ve septisemi, hepatitis, nefritis, mastitis ile birlikte gebelerde abort ya da erken doğumlara sebep olan zoonoz bir hastalıktır. (1-4). Sığırlarda yaygın olarak *L. grippotyphosa*, *L. pomona*, *L. hardjo*, *L. hebdomadis*, *L. icterohaemorrhagiae* türlerine rastlanılmaktadır (2-4).

İnkübasyon süresi sonunda septisemi (leptospiromi) şekillenir ve etkenler özellikle karaciğer, böbrek, akciğer, plasenta, meme ve serebrospinal sıvıda bulunur. (2,4,5). Leptospiralaların önceleri böbreklerin tubulus

lumenlerinde, antikor geliştiğinde ise proksimal konvolut tubuluslarında yerleşerek çoğaldıkları (2,4), etkenlerin plasentaya geçmesi ile fötüste şekillenen septisemi ve anoksi sonucu ölen fötüsün atılabileceği vurgulanmıştır (2,4,5).

Hastalığın tanısı, etken izolasyonu, serolojik ve histopatolojik muayeneleri ile yapılmakla birlikte, son yıllarda immunoperoksidaz (İ.P.) tekniği ile formolde tespit edilip parafinde bloklanan doku kesitlerinde bakteriyel antijenin saptanmasıyla da tanı konulmaktadır (4,6-8). Daha önce yapılan çalışmalarda sığırlarda Leptospirozis hastalığına Türkiye'nin bazı illerinde önemli

oranlarda rastlanılmıştır (9,10). Bu çalışmada, aborte siğir fötüslerinin bazı iç organlarında leptospiral antijenlerin immunperoksidaz yöntemiyle belirlenmesi ve lokalizasyon bölgelerinin saptanması ile hastalığın varlığının araştırılması ve rutin teşhiste uygulanabilirliği amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırma materyalini Erzurum Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'ne bağlı illerden (Erzurum, Erzincan, Kars, Ağrı, Iğdır, Ardahan) getirilen 33 adet siğir fötüsü oluşturdu. Nekropsisi yapılan fötüslerin karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerlerinden alınan doku örnekleri incelendi.

Mikroskopik incelemeler için alınan doku örnekleri % 10'luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Parafinde bloklanan dokulardan 5 µ kalınlığında kesitler alındı ve immunperoksidaz-hemotoksilen boyama tekniği uygulandı (11).

İmmunoperoksidaz boyama için ticari kit (Shandon, Standard Sensitivity CadenzaTags, Peroxidase Kit With AEC -Katalog No. 407300) kullanıldı. *L. grippotyphosa* ve *hardjo* serotiplerine ait hiperimmün serumlar Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Leptospira Laboratuvarından sağlandı. Boyama işlemi manuel olarak immün boyama cihazında (Sequenza Immunostaining Center-Shandon) yapıldı.

Hiperimmün serumların hangi dilüsyonlarda ve hangi inkubasyon ortamında çalıştığını belirlemek amacıyla, pozitif dokular farklı dilüsyonlardaki hiperimmün serumlarla ve farklı inkubasyon ortam ve ısılarında avidin-biotin immunperoksidaz boyama tekniği kullanılarak boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen veriler doğrultusunda en uygun dilüsyondaki hiperimmün serumla en uygun inkubasyon ısısında bütün dokular boyanarak incelemeye alındı. (6,12,13). Hiperimmün serumların optimum inkubasyon ortamı 37 °C'de 1 saat ve optimum dilüsyonları ise *L. grippotyphosa*'da 1/2000, *L. hardjo*'da ise 1/1600 olarak uygulandı.

Pozitif kontrol olarak kullanılan fötal dokuların pozitifliği, ilgili fötüsün Levaditi-Manovelian tekniği ile (11) boyanmış karaciğer ve böbrek kesitlerinden elde edilen ışık mikroskopik bulguları yanında, atık yapmış annenin kan serumunun Etlik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünde yapılan serolojik muayeneleri ile teyit edildi.

Bulgular

Çalışmada incelenen 33 fötüsün 8'inde (% 24,24) leptospira antijenlerine rastlanıldı. Çalışma süresince leptospirozis yönünden pozitif olduğu saptanan 8 fötüsün birinde incelenen dört organda, diğerlerinde de tek yada birkaç organında birlikte olmak üzere; 3'ünün akciğer (% 37,5), 2'sinin karaciğer (% 25), 4'ünün böbrek (% 50) ve 4'ünün dalağında (% 50) antijen lokalizasyonu belirlendi.

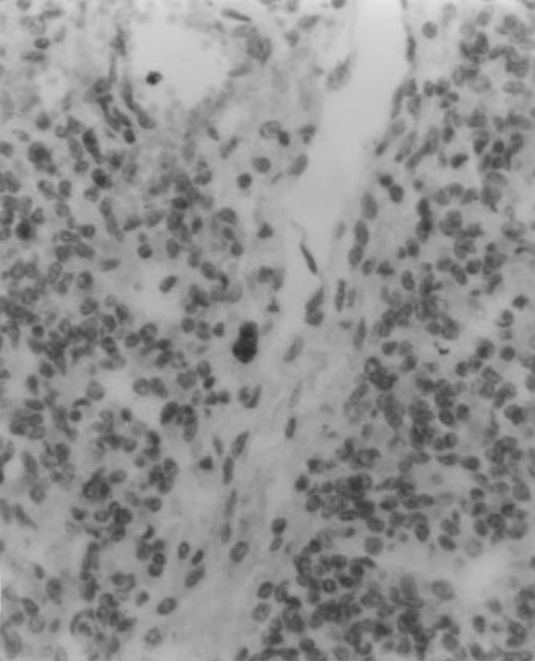
İki serotipe (*L. grippotyphosa* ve *L. hardjo*) ait hiperimmün serumlarla yapılan çalışmada, hiperimmün serumların birbiriyle çapraz reaksiyon verdiği saptandı.

Leptospiral antijenler, kırmızı granüller tarzında, akciğerlerde interalveoler ve interlobuler septumdaki makrofajların sitoplazmalarında (Şekil 1), karaciğerde portal bölgelerdeki hepatositler ve makrofajların sitoplazmalarında görüldü (Şekil 2). Böbreklerde pelvis renalisin lamina epitelyalisinde transisyonel yüzey epitel hücreleri ile kortikal bölgedeki tubulus epitellerinde ve intertubular interstisyumdaki makrofajların sitoplazmalarında yerleştiği görüldü (Şekil 3). Dalakta ise, antijen kapsayan makrofajların parankim içinde diffuz bir şekilde yayıldığı (Şekil 4), özellikle subkapsüler parankimal bölgelerde, venöz sinuslar çevresinde ya da içerisinde, ayrıca dalak trabeküllerindeki perivasküler alanlarda yoğunlaştıkları gözlemlendi.

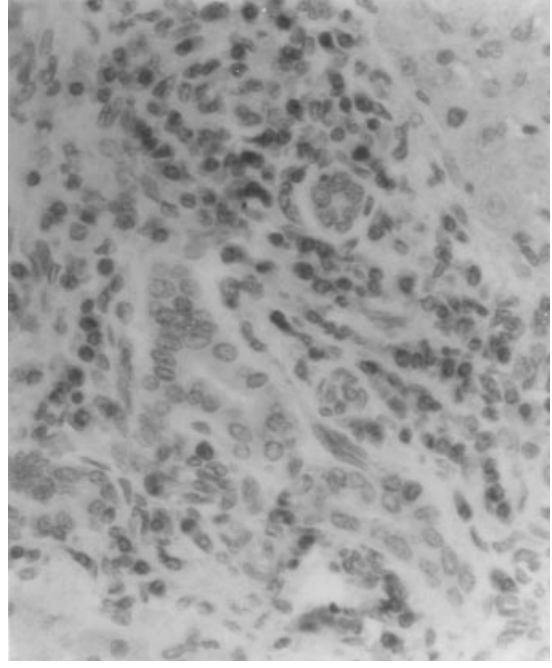
Tartışma

Doku ve vücut sıvılarından etken izolasyonu ile leptospirozisin kesin tanısının yapılabildiği, ancak leptospiraların buldukları dokularda geçici olarak görünmeleri, hızla ölmeleri ve örneklerin taze olmaması izolasyonu güçleştirmektedir (2,6,14).

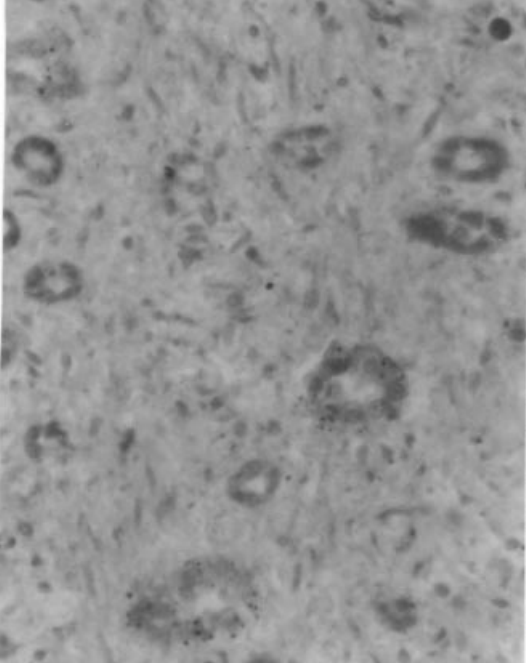
Benzer şekilde gümüşleme teknikleri ile etkenlerin iyi boyanabilmesi için doku örneklerinin çok taze olması ve iyi tespit edilmesi gerektiği, aksi durumlarda güçlükle tanındıkları ve boyanmış preparatlarda etkenlerin şişerek sarmal görünümünü kaybettikleri belirtilmektedir (4,13,15). Tanıdaki bu güçlüklerden dolayı immunperoksidaz boyama metodu ile leptospirozisin tanısının daha kolay konulabileceği (4,6,7), duyarlılığının % 78 ve kesinliğinin % 100 olduğu bildirilmiş (7), bu çalışmada da abort siğir fötüslerinde leptospirozis varlığı İP tekniği ile ortaya konulmuştur.



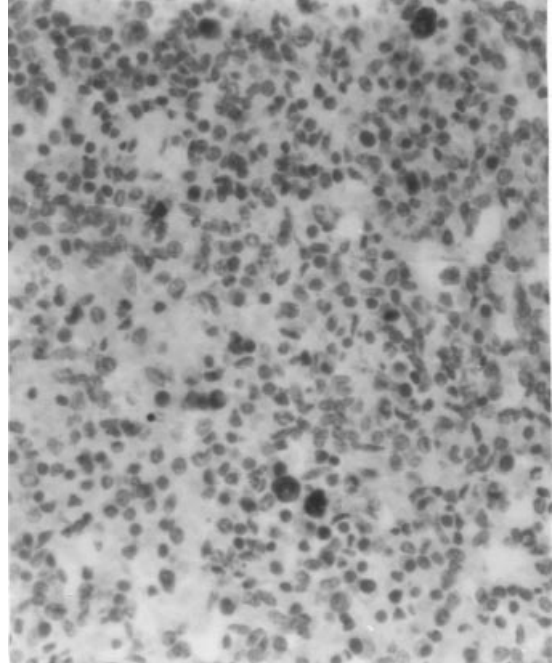
Şekil 1. Akciğerin interlobüler bölgesindeki makrofaj sitoplazmasında görülen antijen lokalizasyonu. İmmunoperoksidaz - hematoksilen, X 400



Şekil 2. Karaciğerde hepatositler ve makrofajların sitoplazmalarında antijen lokalizasyonu. İmmunoperoksidaz - hematoksilen, X 400



Şekil 3. Böbrekte, tubul epitelleri ve makrofajların sitoplazmalarındaki antijen lokalizasyonu. İmmuno peroksidaz - hematoksilen, X 400



Şekil 4. Dalak paransiminde makrofaj sitoplazmalarındaki antijen lokalizasyonu. İmmunoperoksidaz - hematoksilen, X 400

Çalışmada, 33 aborte siğir fötüsünün karaciğer, akciğer, dalak ve böbreklerinden hazırlanan ve immunoperoksidaz tekniği ile boyanan toplam 132 adet doku kesiti incelenmiş ve 8 fötüsün (% 24,24), Leptospirozis yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. Araştırmanın yürütüldüğü aynı bölgede daha önce yapılan çalışmalarda siğir kan serumunda % 16 (9) ile % 17,8 (1) oranında leptospiroze rastlanıldığı ve *L. sejroe*, *L. hebdomadis* ve *L. grippotyphosa*'nın yaygın görüldüğü bildirilmiştir. Özdemir (10), 15,596 adet siğir kan serumunun 1254'ünün (% 8,04) leptospirozis yönünden pozitif olduğunu ve en yaygın serotiplerin *L. sejroe*, *L. hardjoprajitno* ve *L. grippotyphosa – moskova* olduğunu belirtmiştir.

Sağlam ve ark. (16), aborte siğir fötüslerine, Yener ve Keleş ise (17) leptospirozis şüpheli ergin siğirlerin doku kesitlerine yaptıkları Lavaditi boyamalarında etkenleri saptayamadıklarını, ancak ergin siğirlerin karaciğer, dalak ve böbrek dokularına ait parafin kesitlerin immunoperoksidaz boyamasında, leptospiral antijenleri belirlediklerini bildirmişlerdir. Ellis ve ark. (6), leptospira türleri yönünden kültür pozitif olan 18 böbreğin 17 (% 94,4)'sinde ve kültür negatif olan subakut intersitisyel nefritisi bir böbreğin kesitlerinde immunoperoksidaz boyamada leptospiralara rastladıklarını kaydetmişlerdir.

Kirkbride ve Johnson (18), test ettikleri 773 siğir fötal serumunun 52'sinin, Kaszanyitzky ve ark. (19), atık yapmış 843 inek serumunun 210 (% 25)'unun pozitif olduğunu ve 1141 siğir fötüsünün 21'inde Leptospira izolasyonu gerçekleştirdiklerini, leptospira türlerine bağlı abortusların tanısında serolojik testlerin yeterli olamayacağını, immunoperoksidaz gibi diğer laboratuvar yöntemleri ile de desteklenmesi gerektiğini benzer şekilde Kıran ve ark. da (20) belirtmişlerdir.

İmmunohistokimyasal boyamalarda doku kesitlerinin hiperimmun serumla inkübasyon süresi, ortam ısı ve hiperimmun serum dilüsyonları literatür bilgi (6,12) ile uygunluk göstermiştir. Çalışmada *L. grippotyphosa* ve *L. hardjo* serotiplerine ait antijenlerin birbiriyle çapraz reaksiyon verdikleri belirlenmiş ve immunoperoksidaz tekniğinin geniş bir çapraz reaksiyon spektrumuna sahip olmasının leptospirozisin genel teşhisinin konulmasında

faydalı olabileceği diğer araştırmacılar (6,7) tarafından da vurgulanmıştır.

Fötal organlarda leptospira antijenlerinin lokalizasyonu konusunda bir bilgiye rastlanılmamakla birlikte, ergin hayvan dokularında leptospiraların özellikle karaciğer, böbrek, adrenal bez, akciğer, plasenta ve serebro-spinal sıvıda bulunduğu bildirilmektedir (2,4,5). Bu çalışmada leptospirozis yönünden pozitif olduğu saptanan 8 fötüsten 3'ünün akciğer, 2'sinin karaciğer, 4'ünün böbrek ve 4'ünün dalağında antijen lokalizasyonunun belirlenmesi, ergin hayvanlarda olduğu gibi fötal dokularda da leptospiral antijenlerin aranmasında böbrek ve karaciğer dokularının yanısıra akciğer ve dalağın da önemli organlar olduğunu göstermektedir.

Leptospiraların çoğunlukla böbrek tubuluslarının luminal kenarında yerleştiği (6,8) ve koyu kahverengi renkte görüldükleri, ayrıca böbreklerde şiddetli intersitisyel nefritisin bulunduğu ve antijenlerin tubuler hücrelerin sitoplazmasında ve özellikle şiddetli yangı alanlarındaki hücrelerde ve peritubular makrofajlarda da leptospira antijenlerinin bulunabileceği bildirilmektedir (2,4,5). Scanziani ve ark. (7) daha ilerlemiş olaylarda, makrofajlarda bulunan antijenlerin uzun bir süre varlıklarını devam ettirdiğini vurgulamışlardır.

Çalışmada leptospiral antijenlere, böbrekte pelvis renalis ve tubulus epitel hücrelerinde, hepatositlerin sitoplazmalarında, ayrıca böbrek, karaciğer, akciğer ve dalakta farklı lokalizasyonlar gösteren makrofajların sitoplazmalarında yerleşmiş oldukları gözlemlendi.

Sonuç olarak bu çalışma, araştırma materyalinin sağlandığı bazı Doğu Anadolu Bölgesi illerinde siğirlerde yavru atmaya sebep olan hastalıklar içerisinde leptospirozisin önemli bir yer tuttuğunu, izolasyon ve identifikasyonu zor olan leptospiraların, fötal dokularda da immunohistokimyasal tekniklerle kolaylıkla teşhis edilebileceğini ve böbreklerin yanısıra karaciğer, dalak ve akciğerlerin de etkenlerin tespitinde dikkate alınması gereken önemli fötal organlar olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

1. Bulu, A.A., Dörterler, R., Özkan, Ö., Hastürk, F.: Doğu Anadolunun bazı illerinde (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum) siğir ve koyunlarda Leptospirosis vakalarının yayılışı ve serotipleri üzerinde araştırma. Etlik Vet. Mikrobiol. Enst. Derg. 1990; 6: 49-60.
2. Maxie, M.G.: The Urinary System. In. Pathology of Domestic Animals, Eds. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. Vol. 2, 4th ed., pp. 480-520, Academic Press, Inc., San Diego, USA, 1993.

3. Malakhov, Yu.A., Soboleva, G.L.: Specific immunoprophylaxis of leptospirosis in animals. *Veterinariya*, 1993; 5: 5-7.
4. Milli, Ü.H.: Üriner Sistem. Alındı: Veteriner Patoloji, Cilt II, Ed: Hazıroğlu, H., Milli, Ü.H. Tamer Matbaacılık, Ankara. 1998.
5. Jones, T.C., Hunt, R.D.: *Veterinary Pathology, Fifth Edition*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1983.
6. Ellis, T.M., Robertson, G.M., Hustas, L., Kirby, M.: Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Aust. Vet. J.*, 1983; 60: 364-367.
7. Scanziani, E., Luini, M., Fabbi, M., Pizzocaro, P.: Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnostic of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.* 1991; 50: 229-232.
8. Scanziani, E., Sironi, G., Mandelli, G.: Immunoperoxidase studies on Leptospirosis nephritis of swine. *Vet. Pathol.* 1989; 26: 442-444.
9. Özkan, Ö., Dörterler, R., Hoştürk, F.: Erzurum ili ve yöresindeki sığır ve koyunlarda sarılık ve kan işeme semptomlarıyla seyreden hastalıklarda *Clostridium oedematiens*, *Leptospira* ve kan protozoonlarının insidensinin belirlenmesi. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 1993; 7: 97-104.
10. Özdemir, V.: Türkiye'de leptospirozisin dağılımı ve serotiplendirme üzerine bir çalışma. I. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, 27-29 Eylül, Ankara 1994; p 34.
11. Luna, L.G.: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Third Edition, McGraw-Hill Book Company, New York, 1968.
12. Boenisch, T., Farmilo, A.J., Stead, R.H.: *Immunochemical Staining Methods*. Ed. Naish, J. In: *İmmunokimyasal Boyama Yöntemleri El Kitabı*. Hayat & Dako, İstanbul, 1998.
13. Falini, B., Taylor, C.R.: New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1983; 107: 105-117.
14. Pope, V., Larsen, S.A., Schriefer, M.: Immunologic methods for diagnosis of spirochetal diseases. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, Ed; Rose, N.R., et. al. Fifth Edition, ASM Press, Washington, 1997; 510-525.
15. Russell, C.J., Faine, S.: *Leptospira*. In: *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I, Ed. Krieger, R., Hold, J.G., Williams & Wilkins, London, 1984.
16. Sağlam, Y.S., Türkütanıt, S., Taştan, R., Bozoğlu, H., Otlı, S.: Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde görülen bakteriyel sığır ve koyun abortlarının etiyolojik ve patolojik yönden İncelenmesi. *Vet. Bil. Derg.* 1998; 14: 133-145.
17. Yener, Z., Keleş, İ.: Sığırlarda Leptospirosis üzerinde klinik ve patolojik incelemeler. *Vet. Bil. Derg.* 2001; 17: 21-26.
18. Kirkbride, C.A., Johnson, M.D.: Serologic examination of aborted ovine and bovine fetal fluids for the diagnosis of border disease, bluetongue, bovine viral diarrhoea, and Leptospirosis infections. *J. Vet. Diag. Invest.* 1989; 1: 132-138.
19. Kaszanyitzky, J.E., Bajmocy, E., Bacsadi, A., Matiz, K.: Observations on leptospiral abortion in farm animals. *Magyar-Allatorvosok-Lapja*. 1997; 119: 415-419.
20. Kıran, M.M., Baysal, T., Gözün, H., Güler, L., Gündüz, K., Kuyucuoğlu, Ö., Küçükayan., U.: Konya yöresinde koyun abortusları üzerine patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. *Etilik Vet. Mikrobiyol. Derg.* 1997; 9: 109-128.