

Marmara bölgesinde ruminantlardaki abort olgularında leptospirozisin levaditi ve immunohistokimyasal yöntemlerle teşhisi ve histopatolojik bulgularla karşılaştırılması

Diagnosis of leptospirosis with levaditi and immunohistochemical methods in abortion cases in ruminants in Marmara region and comparison with histopathological findings

ÖZET

Leptospiroz, abort, ölü doğum, kısırılık ve süt verimi kayıplarına neden olan ve hayvancılık için ekonomik açıdan çok önemli, zoonoz karakterli, bakteriyel bir enfeksiyondür. Bu çalışmada, 2013-2018 yılları arasında Marmara Bölgesi'ndeki il ve ilçelerden Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne getirilen ruminantlardaki abort olgularından leptospirozun immunohistokimyasal (İHK) ve Levaditi yöntemlerle teşhisi ve histopatolojik bulgularla karşılaştırılması amaçlanmıştır. Materyal olarak 12 farklı ilden 750 kuzu, 218 oğlak ve 284 buzağı olmak üzere toplam 1252 adet abort fötüs kullanılmıştır. Fötüslerin nekropsileri yapıldıktan sonra iç organlardan alınan örnekler rutin takipleri yapılarak, hematoksilen eozinle boyanmıştır. Ayrıca böbrekler, karaciğer ve akciğerlerden İHK ve Levaditi yöntemleriyle leptospira etkenleri aranmıştır. Çalışmada, makroskopik olarak bazı fötüslerde deri altı ödemleri ve vücut boşluklarında sıvı birikimi, ikterus, karaciğerde miliyer nekroz odakları görülürken, çoğunda otolitik değişiklikler izlendi. Mikroskopik incelemelerde karaciğerde periasiner nekroz ve böbrek tubullerinde nekroz ve hiyalin silindirlerine rastlandı. İHK yöntemle yapılan boyamalarda 1252 adet fötüsün 160 tanesinde ve İHK pozitif örneklerin Levaditi yöntemle boyamalarında ise 108 adet pozitif boyanma tespit edildi. Levaditi boyama metodu ile etkenler sadece böbrekte belirlenirken, karaciğer ve akciğerde gözlenmedi. Ancak İHK metodu ile karaciğer, böbrek ve akciğerde de pozitif boyanmalar saptandı. Sonuç olarak Marmara Bölgesi'ndeki ruminantlarda leptospiroza bağlı abort oranı %12,77 olarak belirlenmiştir. Leptospirozun teşhisinde, İHK metodunun Levaditi boyama yöntemine göre daha hassas olduğu gösterilmiştir. Çalışma sonucunda Marmara Bölgesi için ruminantlarda leptospirozun önemli bir abort sebebi olduğu ortaya konulmuş, hastalıkla ilgili farkındalığın artırılması ve aşılama çalışmalarının yapılmasının hastalıkla mücadelede çok etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Abort, immunohistokimya, leptospiroz, Levaditi, ruminant.

ABSTRACT

Leptospirosis is a bacterial infection of zoonotic character, which causes abortion, stillbirth, infertility and milk yield losses and is very important for livestock economically. In this study was aimed to diagnose and compare the abortion cases with leptospirosis in ruminants coming to Pendik Veterinary Control Institute from the provinces and districts of Marmara region between 2013-2018 by immunohistochemical (IHC) and Levaditi methods and to compare with histopathological findings. A total of 1252 aborted fetuses; 750 lambs, 218 kids and 284 calves from 12 different provinces were used as materials. After the necropsies of the fetuses, the samples taken from the internal organs were routinely followed and stained with hematoxylin eosin. In addition, leptospira agents were searched by IHC and Levaditi methods from kidneys, liver and lungs.

How to cite this article

Arslan, Z., Hatipoğlu F. (2022). Diagnosis of leptospirosis with levaditi and immunohistochemical methods in abortion cases in ruminants in Marmara region and comparison with histopathological findings. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 7(1), 19-28. <https://doi.org/10.31797/vetbio.997081>

Research Article

Zeynel Arslan^{1a}
Fatih Hatipoğlu^{2,3b}

¹Pendik Veterinary Control Institute, Pathology Laboratory, Istanbul, Turkey ²Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Selcuk University Konya, Turkey ³Department of Pathology Faculty of Veterinary Medicine, Kyrgyz-Turkish Manas University, Bishkek, Kyrgyzstan

ORCID-

^a[0000-0002-0563-8244](https://orcid.org/0000-0002-0563-8244)

^b[0000-0002-0103-5868](https://orcid.org/0000-0002-0103-5868)

Correspondence

Fatih HATİPOĞLU

fhatip@selcuk.edu.tr

Article info

Submission: 19-09-2021

Accepted: 27-01-2022

Online First: 12-04-2022

Publication: 30-04-2022

e-ISSN: 2548-1150

doi prefix: 10.31797/vetbio

• <http://dergipark.org.tr/vetbio>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution

4.0 International License



In the study, macroscopically, some fetuses showed subcutaneous edema and fluid accumulation in body cavities, icterus and miliary necrosis foci in the liver, but most had autolytic changes. Microscopic examination revealed periaciner necrosis in liver and necrosis and hyaline cylinders in renal tubules. Positive staining was observed in 160 of 1252 fetus samples in IHC staining and Levaditi staining of IHC positive samples revealed 108 positive staining. Levaditi staining method was used to determine the agent only in kidney tissue, but not in the liver and lung. However, positive results were obtained in liver, kidney and lung by IHC method. As a result, the abortion rate of leptospirosis in ruminants was determined as 12,77% in Marmara region of Turkey. In the diagnosis of leptospirosis, IHC method is more sensitive than Levaditi staining method. As a result of this study, it has been shown that leptospirosis has an important place in abortions in ruminants in Marmara Region of Turkey and it is concluded that raising awareness about the disease and vaccination will be very effective in combating the disease.

Keywords: Abortion, immunohistochemistry, leptospirosis, Levaditi, ruminant.

İRİŞ

G Leptospiroz, abort, ölü doğum, kısırılık ve süt verimi kayıplarına neden olan, hayvancılık için ekonomik açıdan çok önemli, zoonoz karakterli, bakteriyel bir enfeksiyondur (Bolin, 2005).

Hastalık akut septisemik veya kronik nefritik formlarında gözlenir. Etken hastalığı geçiren hayvanların böbreklerinde mikrokoloniler halinde lokalize olur ve uzun süre idrarla atılır (Türkütanıt vd., 2002; Villanueva vd., 2016).

Patojenik leptospira türleri, yabani ve evcil birçok memeli türü tarafından taşınır. Direkt veya indirekt yollarla diğer hayvanlara bulaştırılır (Villanueva vd., 2016). Hastalığa ilgili oluşan üreme sorunları ve süt üretiminde düşüşler nedeniyle sığır ve koyun endüstrisinde ekonomik kayıplara yol açar. Ayrıca enfekte hayvanlarda kronik renal enfeksiyon gelişir. Enfekte hayvanlar idrarları ile etkeni diğer hayvanlara yayarak hayvansal üretim ve ilgili endüstrilerde çalışanlar için potansiyel zoonotik bir tehdit oluşturur (Fang vd., 2014). İkterus, hemoglobinuri, organ ve dokularda kanamalar, abortus, mastitis ve septisemi ile seyreder. Olguların %25-30'unda abortus vakası görülür. *Leptospira (L.) hardjo* ve *L. pomana* abortus ve infertilitenin önemli serovarlarıdır. Etkenler uzun süre böbrek ve genital sistemde canlı kalabilirler. Etken fötusa plasenta yolu ile geçer. Hayvanlar arasında bulaşma çiftleşme, temas ya da kontamine çevre ile olmaktadır. Genellikle

gebeliğin son üçte birlik döneminde abortus şekillenir. Fötüs otolize uğramış şekilde atılır (Özdemir ve Erer, 2018). Leptospiroz, koyun ve sığırlarda benzer semptomlar gösterir. Hastalık ateş, anoreksi, şiddetli sarılık, hemoglobini, anemi, sinirsel belirtiler ve ölüm ile karakterizedir. Gebeliğin son üçte birinde abort, zayıf yavru doğumu, ölü doğum ve kısırılık gibi üreme sorunları, akut leptospirozda koyunlarda, ateş, apati, dyspnea, septisemi, zayıflık ve ölüm ortaya çıkar (Lucheis ve Ferreira, 2011).

Hastalığın teşhisi etken izolasyonu, serolojik ve histopatolojik muayenelerle yapılır. Ancak son yıllarda immunperoksidaz tekniği ile formolde tespit edilip parafinde bloklanan doku kesitlerinde bakteriyel antijenin saptanmasıyla tanıya gidilmektedir (Temur ve Sağlam, 2003). Leptospirozun laboratuvar tanısı, klinik örneklerin doğrudan incelenmesine, etkenin izole edilmesine, serolojik testler yoluyla anti-leptospiral antikörlerin tespit edilmesine veya etken DNA'sının moleküler yöntemlerle tespit edilmesine dayanır (Bisias vd., 2009, Fang vd., 2014). Kültür, çeşitli örneklerden bakteri izole edilmesi nedeniyle önemli tanımlayıcı bir teşhistir. Ancak uzun zaman alması, zahmetli olması ve diğer etkenlerle kontamine olması nedeniyle zordur. (Fang ve ark. 2014). Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) analizleri, 1990'lardan bu yana leptospirozun tanısında güvenilir ve hızlı moleküler yöntemler olarak kullanılmaktadır (Fang vd., 2014; Lucheis ve Ferreira, 2011). Levaditi boyamada, sarı zemin üzerinde siyah boyanmış spiral etkenler görülür.

Etkenin iyi boyanabilmesi için dokunun tespit edilmeden önceki tazeliği büyük önem arz etmektedir. Aksi durumlarda etkenin görünümünde değişimler olduğu belirtilmiştir (Falini ve Taylor, 1983; Russell ve Faine, 1984).

Sunulan çalışmada, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne (PVKE) Marmara Bölgesi'ndeki illerden 2013-2018 yılları arasında getirilen ruminantlara ait abort olguları içerisinde leptospirozun teşhisinde kullanılan Levaditi ve immuhistokimyasal (İHK) yöntemlerinin karşılaştırması ile bu olgularda gözlenen histopatolojik değişikliklerle uygunluğu araştırılarak teşhiste hangi yöntemlerin güvenli olarak kullanılabileceği amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METHOD

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nin farklı il ve ilçelerinden 2013-2018 yılları arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen 1252 adet sebebi bilinmeyen veya leptospiroz şüpheli aborte fötüslerin (koyun fötüs, keçi fötüs, sığır fötüs) nekropsileri yapılarak doku örneklerinin incelemeleri yapıldı.

Histopatolojik inceleme

Soğuk zincir şartlarında PVKE'ne kargoyla veya elden getirilen fötlüslere ait örnekler, patolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formalinde tespit edildikten sonra rutin laboratuvar metotları ile hazırlanan parafin bloklardan mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak tümü Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyandıktan sonra (Luna, 1968) ışık mikroskopunda incelendi.

Levaditi Boyama

Formol tespitini takiben 2 mm inceliğinde trimlenen doku örnekleri, çeşme suyunda 1-3 saat süreyle yıkandı. 24 saat süreyle % 96'luk alkolde tutuldu. Doku, kabın dibine çökünceye kadar distile suda tutuldu. Taze hazırlanmış gümüş nitrat solüsyonu (%3) içine konuldu ve karanlıkta 37 °C'de 3-5 gün solüsyon yenilenecek bekletildi. Distile suda çalkalandı.

Karanlıkta oda sıcaklığında, 1-3 gün indirgeme solüsyonunda bekletildi. Distile suda çalkalandı. %80, %96'luk alkol ve absolut alkollerden her birinde 30 dakika (dk) ve 2 ksilol kabında 1'er saat tutularak geçirildi ve 2 parafin kabında 45'er dk bekletildi. Parafine gömüldükten sonra 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri, ksilollerden geçirilerek üzerleri lamelle kapatıldı.

İmmunhistokimyasal Boyama

İHK boyamalar BioSite Histo HRP Kit (Novex, BioSite, KDB-10016) prosedürüne göre yapıldı. Lizinli lama alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C'de veya 60 °C'de 1 saat inkube edildi. İnkubasyonu tamamlanan kesitler 3 kez 5'er dk ksilolde tutuldu. Alkol serilerinden 2 kez 10'ar dk geçirildi. Antijen retrieval için sitratlı tamponda (pH 6.0) mikrodalgada 800 watta 15 dk kaynatıldı. Bundan sonra aynı tampon içerisinde 400 watta 15 dk mikrodalgada bekletildi. Sonra 20 dk dış ortamda bekletildi. % 3'lük hidrojen peroksitte 20 dk tutuldu (3 cc hidrojen peroksitt 97 cc methanol). Sonra preparatları başka bir kaba alıp Fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7,6) 10 dk bekleyerek yıkama yapıldı. Karanlık ortamda PBS'den çıkarıp preparatın altını ve etrafını kuruladıktan sonra Protein Bloklama Çözeltisi (blocking solution) damlatıldı ve 10 dk bekletildi. Preparatın üzerindeki fazla blocking solution kuruladıktan ve fazlalığı dökdükten sonra üzerine Rabbit Anti Leptospira Antibody (Invitrogen, PA1-7228) döküldü ve 1 saat karanlık ortamda bekletildi. 2 kez 5'er dk PBS ile yıkandı. Etrafını kurulayıp Broad Spectrum Seconder Antibody damlatıldı. 10 dk karanlık ortamda bekletildi. Tekrar 10 dk PBS yıkama kurulama aşamasından sonra HRP Streptavidin karanlık ortamda 10 dk tutuldu. Sonra tekrar 10 dk PBS ile yıkandı. Kromojen olarak (karanlık ortamda her preparat için 200 µl) diamiobenzidine (DAB) (ScyTek, 38607) damlatıldı ve 10 dk beklendi. Distile suda yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilende 3-5 dk bekletilip, suda mavileşinceye kadar yıkandı. Alkol-Ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

BULGULAR

Çalışmada PVKE'ne 2013-2018 yılları arasında gelen toplam 1252 abort örneğinden İHK yöntemi ile 160 olguda (%12,77) leptospira pozitifliği belirlenmiş olup yıllara göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir. İncelenen 750 koyun

fötüsünün 76'sında (%10,13), 218 keçi fötüsünün 26'sında (%11,92) ve 284 sığır fötüsünün 58'inde (%20,42) İHK yöntemiyle pozitiflik saptanmıştır (Tablo 2).

Tablo 1. Örneklerin yıllara göre toplam ve İHK pozitif sayıları

Yıl	Örnek Sayısı	İHK Pozitif Örnek Sayısı
2013	217	42
2014	153	38
2015	190	27
2016	190	22
2017	264	22
2018	238	9
Toplam	1252	160

Tablo 2. Örneklerin ruminant türü, İHK pozitif sayı ve oranları.

Ruminant türü	İncelenen fötüs sayısı (n)	İHK Pozitif fötüs sayısı (n) ve oranı (%)
Koyun	750	76 (%10,13)
Keçi	218	26 (%11,92)
Sığır	284	58 (%20,42)
Toplam	1252	160 (%12,77)

Çalışma sonucunda elde edilen pozitif fötüs örneklerinin Marmara Bölgesi'ndeki illere göre dağılımı Tablo 3'de verilmiştir.

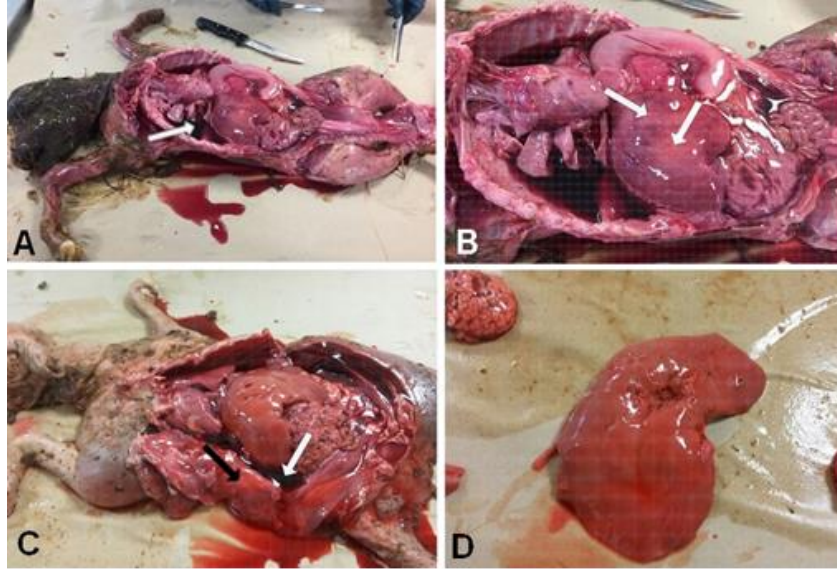
Tablo 3. Örneklerin yıllara ve Marmara Bölgesi'ndeki illere göre dağılımı.

		2013			2014			2015			2016			2017			2018			TOPLAM
		Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	Koyun	Keçi	Sığır	
Kırklareli	Örnek	15	5	12	5	3	3	14	8	5	13	5	7	19	12	10	23	8	6	173
	Pozitif	1	1	2	1	1	1	3	2	1	1	1	2	1	1	3	1	-	-	23
Edirne	Örnek	23	9	11	9	6	4	18	7	7	16	7	7	21	8	9	26	4	3	195
	Pozitif	4	3	5	3	3	2	1	-	2	2	1	3	2	-	3	1	-	-	35
Tekirdağ	Örnek	14	6	4	5	1	3	12	4	3	14	3	5	17	5	5	17	1	3	122
	Pozitif	4	2	1	-	-	1	-	-	1	-	-	1	-	1	1	-	-	-	12
Kocaeli	Örnek	9	-	6	9	3	5	9	1	7	13	6	5	13	2	3	12	1	3	107
	Pozitif	2	-	1	3	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	-	-	-	12
Yalova	Örnek	4	1	2	5	3	2	4	-	-	4	2	2	5	-	-	5	-	1	40
	Pozitif	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Sakarya	Örnek	9	-	3	5	1	5	2	-	-	7	-	-	9	-	5	11	2	-	59
	Pozitif	1	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
Bursa	Örnek	8	3	-	8	1	5	9	2	8	9	4	8	18	5	3	17	4	8	120
	Pozitif	1	1	-	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	-	11
Bilecik	Örnek	8	4	3	6	-	3	5	-	3	2	-	2	11	2	3	8	2	1	64
	Pozitif	-	-	-	1	-	1	-	-	2	-	-	1	1	-	-	3	-	-	9
Balıkesir	Örnek	15	7	11	18	7	5	19	8	6	14	2	8	23	5	6	26	6	7	193
	Pozitif	3	2	3	4	1	2	2	3	2	2	-	2	1	1	2	-	-	-	30
Çanakkale	Örnek	8	5	3	9	3	2	8	4	5	9	4	5	14	7	5	17	1	1	110
	Pozitif	1	-	-	4	1	1	1	-	1	1	-	-	-	1	-	3	-	-	14
İstanbul	Örnek	2	-	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	8
	Pozitif	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Düzce	Örnek	5	1	1	3	-	3	5	1	4	4	2	1	12	2	3	8	2	4	61
	Pozitif	2	-	-	1	-	1	1	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	7

Makroskopik Bulgular

Nekropsisi yapılan ruminant fötüslerinin bazılarında vücut boşluklarında kanlı eksudat,

deri altı ödem (Şekil 1A-C), böbreklerde şişkinlik ve peteşiyel kanamalar, karaciğerde nekroz odakları ve otolitik değişiklikler (Şekil 1C,D) dikkati çekti.

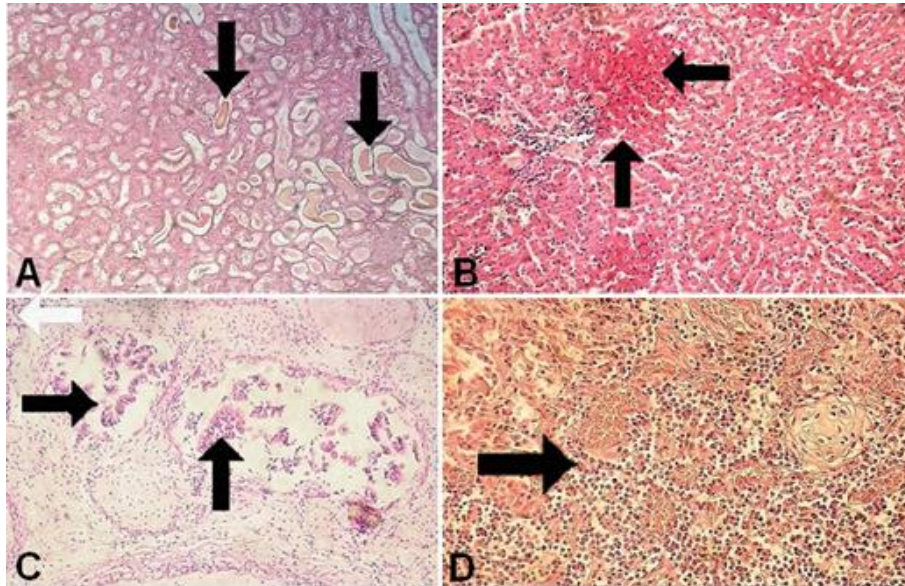


Şekil 1. A. Sığır fötüsün vücut boşluğunda kanlı eksudat (ok), B. Karaciğerde nekroz odakları (oklar), C. Aborte kuzuda otolitik değişiklikler. Deri altında biriken ödem (siyah ok) ve kanlı eksudat (beyaz ok), D. Karaciğer solgun, yumuşak ve büyümüş. (PVKE Patoloji Lab. Arşivi)

Histopatolojik Bulgular

Çalışılan dokulardan hazırlanan doku örneklerinin histopatolojik incelemelerinde en belirgin değişiklikler sırasıyla böbrek, karaciğer ve akciğerde gözlemlendi. Böbreklerin tubulus lümenlerinde hiyalin silindirleri (Şekil 2A), tubulus epitellerinde nekroz, interstisyumda

yaygın kanama alanları ve nötrofil lökosit infiltrasyonları tespit edildi. Karaciğerde periasiner nekroz (Şekil 2B) ve hepatositlerde dejenerasyon saptandı. Akciğerlerde bronş ve alveol epitellerinde dökülme (Şekil 2C) ile lümenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu gözlemlendi (Şekil 2D).



Şekil 2. A. Böbrekte medulladaki tubul lümenlerinde hiyalin silindirleri (oklar), H&E, X200, B. Karaciğerde periasiner nekroz (oklar) ve hepatositlerde dejenerasyon, H&E, X200, C. Akciğerde bronş epitellerinde dökülme (siyah oklar) ve bronş çevresinde nötrofil lökosit infiltrasyonu (beyaz ok), H&E, X200, D. Akciğerde alveoller içerisinde nötrofil lökosit infiltrasyonu (ok), H&E, X400.

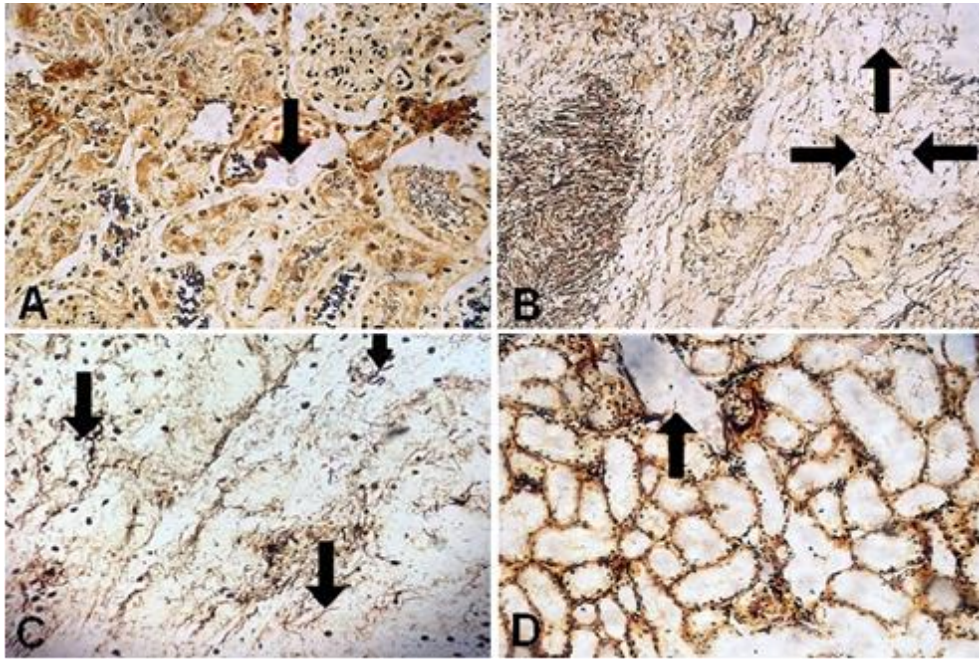
Levaditi Bulgular

Gümüşleme (Levaditi boyama) metoduyla 108 örnekte ve sadece böbrek dokusunda pozitiflik tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul

epitellerinde ve lümenlerinde siyah renkte spiral etkenler olarak görüldü (Şekil 3 A-D). İHK ve Levaditi boyanma sonuçları Tablo 4’de verildi.

Tablo 4. İHK ve Levaditi yöntemlerinde organlara göre pozitif sonuçların dağılımı.

	Toplam Pozitif Örnek	Böbrek	Böbrek+Karaciğer	Böbrek+Akcığer	Böbrek+Akcığer+Karaciğer
IHC	160	125	15	13	7
Levaditi	108	108	-	-	-

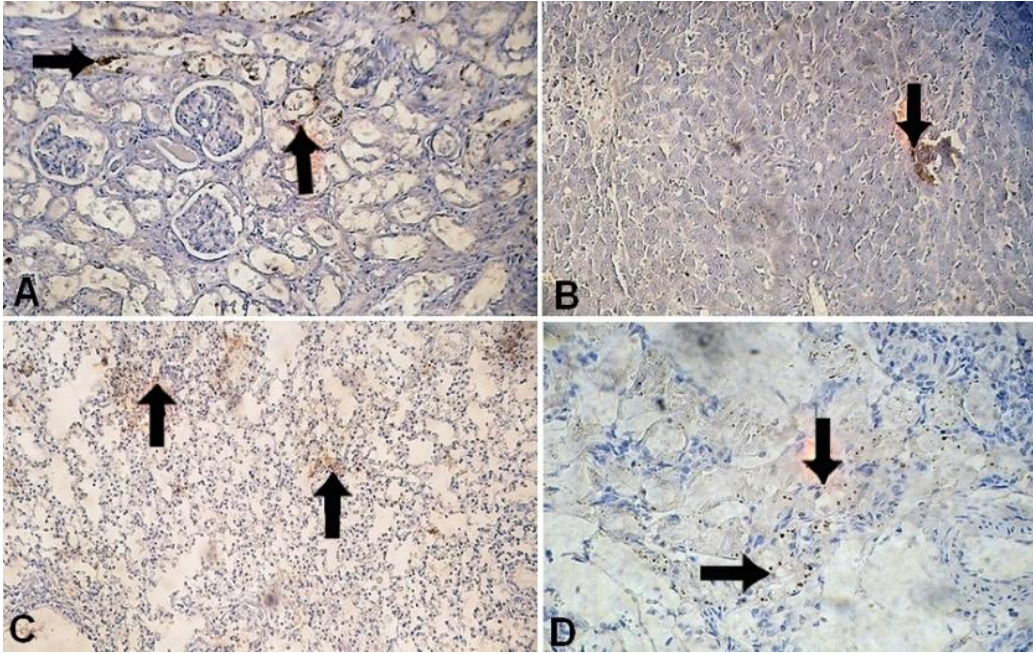


Şekil 3. A. Böbrek tubulus lümenlerinde siyah renkte spiral bakteriler (ok), Levaditi, X400, B. Böbrek korteks tabakasında spiral bakteriler (oklar), Levaditi, X400, C. Böbrek korteksinde yaygın spiral bakteriler (oklar), Levaditi, X200, D. Böbrek tubulus lümeninde siyah renkte spiral bakteriler (ok), Levaditi, X200.

İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmada İHK yöntemiyle 160 örnekte pozitif boyanma tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul epitellerinde intrasitoplazmik kahverengi granüller halinde ve bazen de bazal membrane yakın kısımlarda hücre zarına yapışık vaziyette görüldü (Şekil 4A). Pozitif boyanan 160 örneğin 125 tanesinde sadece böbrekte pozitiflik

saptanırken, 15 tanesinde böbrek ve karaciğerde (Şekil 4B), 13 tanesinde böbrek ve akciğerde (Şekil 4C,D), 7 tanesinde de böbrek ile aynı zamanda karaciğerde hepatositlerin sitoplazmaları, akciğerde interalveolar ve interlobüler septum ile alveol lümeninde hücre içi pozitiflik saptandı. Olguların tümünde (160) böbreklerde pozitiflik vardı (Tablo 3).



Şekil 4. Anti-leptospira rabbit antiserumu ile; A. Tubul epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinde kahverenkte granüler boyama (oklar), böbrek, IHC, X200, B. Hepatositlerde granüler boyama (ok), karaciğer, IHC, X200, C. İnteralveolar septumda kahverenkte granüler boyama (oklar), akciğer, IHC, X200, D. Alveollerde hücre içi granüler boyama (oklar), akciğer, IHC, X200.

TARTIŞMA

Leptospiroz, abort, ölü doğum, erken doğum, infertilite, septisemi, nefritis, hemoglobüri, hepatitis, mastitis gibi semptomlarla karakterize zoonoz bakteriyel bir enfeksiyondür. Hayvanlarda infertilite, ölü doğum, abort, ölüm ve süt veriminde düşüöşlere neden olduğu için hayvancılık ekonomisi açısından çok önemli bir hastalıktır (Bolin, 2005).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD), İngiltere, Avustralya, Yeni Zellanda, eski Sovyetler Birliđi ülkeleri, Avrupa ve Asya'daki birçok ülkeden leptospiroz bildirimini yapılmıştır. İran'da yapılan bir çalışmada %25-42 arasında *Leptospira spp.* seropozitifliği saptanmıştır (Hamali vd., 2012). Hastalığın prevalansına yönelik yapılan çalışmalarda Portekiz'de %15, Nijerya'da %14, Zimbabve % 10, Çek Cumhuriyeti'nde %7 olarak bildirilmiştir (Hamali vd., 2012). Ayrıca Nikaragua, Brezilya, Hindistan, Güneydođu Asya ve ABD'inde salgınlara neden olmuştur. Özellikle büyük su baskınlarından sonra birçok ülkede hastalık salgınlara neden olmuştur. El Nino kasırgasından sonra özellikle Orta ve

Güney Amerika'da birçok vaka tespit edilmiştir (Levett, 2001).

Miller vd. (1991) ABD'nin 49 eyaleti ve Porto Rico'da yaptıkları çalışmada böbrek ve kan serumu örneklerini incelemişler ve kan serumu analizleri sonucunda %49 oranında pozitiflik saptamışlardır. Çalışma sonucunda böbreklerin %1,7'sinde leptospiraları izole etmişler, en sık görülen serovarların *L. hardjo* (%83), *L. pomona* (%12.5) ve *L. grippotyphosa* (%4.5) olduğunu bildirmişlerdir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de leptospirozun tanısı, baskın serovarları ve prevalansı üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ulaş ve Alver'in (1973) yaptıkları çalışmada Batı Anadolu ve Trakya'da Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT) ile *L. grippotyphosa*'ya karşı %5,09, *L. sejreo*'ya karşı %3,4 ve *L. icterohaemorrhagiae*'ye karşı %0,104 pozitiflik bildirmişlerdir. Şahin vd. (2000), Kars ve Ardahan'da ELISA ve MAT testi ile çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda MAT testi ile %33,63'ünde, ELISA testi ile %36,26'sında *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* serovarlarına karşı antikör saptamışlardır. Ertaş ve ark. (2000), Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki illerinde MAT ve ELISA

ile çalışma yapmışlar ve çalışma sonucunda *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. hebdomadis* ve *L. icterohaemorrhagiae*'ye karşı spesifik antikorlar tespit etmişlerdir. MAT testi ile %16 ve ELISA ile %23,3 oranında antikor saptamışlardır. Bu çalışma sonucunda ELISA spesifitesinin %84 ve sensitivitesinin %68 olduğunu bildirmişlerdir. Doğu Anadolu'daki bazı illerde hastalık sığırlarda %17,8 ve koyunlarda %2,8 oranında serolojik olarak saptanmıştır (Bulu vd., 1990). Erzurum yöresinde yapılan bir çalışmada (Özkan vd., 1993), hastalığın sığırlarda %16, koyunlarda % 0,04 oranında seyrettiği görülmüştür. Sunulan çalışmada 2013-2018 yılları arasında Marmara Bölgesi'nden Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen büyükbaş ve küçükbaş ruminant fötüsleri İHK ve Levaditi yöntemleriyle incelendi. Çalışmada 1252 adet abort fötüstan İHK metodu ile 160 adetinde (%12,77) pozitiflik saptanırken, Levaditi boyama yöntemi ile 108 örnekte (%8,6) leptospira etkenleri gözlemlendi. İHK metodu ile yapılan incelemelerde, 750 adet koyun fötüsünün 76 adedinde (%10,13), 218 adet keçi fötüsünün 26 adedinde (%11,92) ve 284 adet sığır fötüsünün 58 adedinde (%20,42) leptospiroz pozitif olarak tespit edildi.

Elde edilen bulgular iller bazında incelendiğinde; Edirne (%17,94), Kırklareli (%13,29), Tekirdağ (%9,83), Kocaeli (%11,21), Yalova (%7,5), Sakarya (%6,77), Bursa (%9,16), Bilecik (%14,06), Balıkesir (%15,54), Çanakkale (%12,72), Düzce (%11,47) ve İstanbul (%0) oranlarında pozitiflik bulunmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen il bazındaki verilerden en yüksek pozitifliğin Edirne'de %17,94 oranında olduğu görülmüştür. Edirne'de pirinç tarlalarının yoğun olması ve buna bağlı olarak etkenin sulak arazileri sevmesi ve yüzey sularında kolayca üreyebilmesi pozitifliğin yüksek olmasını açıklamaktadır. İstanbul'da pozitiflik oranının % 0 olarak belirlenmesi, gelen örnek sayısının çok az olmasından (8 olgu) kaynaklandığını düşündürmüştür.

Dokulardan etken izolasyonunun yapılabildiği, fakat etkenin hızla ölmesi ve örneklerin taze olmaması izolasyon aşamasında güçlük çıkarmaktadır (Ellis, 1983; Maxie, 1993). Gümüşleme teknikleri ile etkenin iyi boyanabilmesi için dokunun tespit edilmeden önceki tazeliği önem arz etmektedir. Aksi durumlarda etkenin görünümünde değişimler olduğu belirtilmektedir (Falini ve Taylor, 1983; Russell ve Faine, 1984). Oluşan böyle güç durumlar karşısında immunperoksidaz metodu ile leptospiroz tanısını koymanın daha kolay (Ellis, 1983; Scanziani 1991), hassasiyetin %78 ve doğruluğunun %100 olduğu bildirilmiştir (Scanziani, 1991). Hathaway vd. (1982), MAT testini kullanmışlar ve pozitiflik saptadıkları örneklerden de izolasyon çalışması yapmışlardır. Aborte sığır fötüslerinin böbrek, akciğer, karaciğer ve kan örneklerinden yaptıkları çalışma sonucunda, sadece aborte fötüs böbreklerinden leptospira izole etmişlerdir. Benzer şekilde sunulan çalışmada da Levaditi yöntemiyle sadece aborte fötüslerin böbreklerinden etken tespiti yapılmıştır.

Sağlam vd. (2008) abort fötüslerinde, Yener ve Keleş (2001) ise leptospira şüpheli sığırların dokularına yapılan Levaditi boyamalarında etkenleri tespit edemediklerini fakat immunperoksidaz boyamada leptospira antijenlerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Abortusların tanısını koyabilmek açısından serolojik testlerin yeterli olamayacağını, bu çalışmaların immunperoksidaz gibi yöntemler ile desteklenmesi gerektiği (Kıran vd.,1997) belirtilmiştir. Leptospira etkenlerinin genelde böbrek tubuluslarının lumenlerine yerleştiği (Ellis, 1983; Scanziani, 1991) ve şiddetli nefritis tablosu oluşturduğu bildirilmektedir (Maxie, 1993). Bu çalışmada İHK yöntemiyle koyun fötüslerinde hafif, orta, keçi fötüslerinde orta ve güçlü derecede, sığır fötüslerinde orta ve güçlü derecede antijen tespiti yapılan diğer çalışmalarla (Szeredi ve Haake, 2006; Sağlam vd., 2008) uygunluk göstermektedir. Araştırmacılar (Sağlam vd., 2008, Szeredi ve

Haake, 2006) abortuslarda leptospirozun İHK ve Levaditi yöntemleri ile tanıda başta böbrek olmak üzere karaciğer, akciğer, plasentada antijen ve etken tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da İHK yöntemiyle böbrekte yoğun olmak üzere karaciğer ve akciğerde antijen pozitifliği tespit edilirken, Levaditi yöntemiyle sadece böbreklerde etkenlere rastlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda, anti-leptospira rabbit antiserumu ile boyanma tarzının, dalga formunda ve kümeler şeklinde olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da hem dalga formunda hem de yoğun antijen kümelenmeleri şeklinde boyanmalar diğer çalışmalarla (Sağlam vd., 2008; Szeredi ve Haake, 2006) uyumludur. Sunulan çalışmada İHK yöntemiyle yapılan boyamalarda leptospira antijenleri, böbrekte tubulus epitel hücreleri, karaciğerde hepatositlerin sitoplazmaları, akciğerde interalveolar ve interlobüler septum ile alveol lümeninde hücre içinde tespit edildi.

Sunulan çalışmada, teşhis amacıyla gönderilen aborte fötüslerin çoğunda makroskopik olarak otolitik değişiklikler görülmüştür. Bu olgulardan hazırlanan preparatların incelemeleri sırasında da otolitik değişiklikler nedeniyle histopatolojik bulguların değerlendirilmesi organ bazında ve istenilen düzeyde yapılamamıştır. Bu nedenle İHK ve Levaditi yöntemleriyle negatif sonuçlar elde edilen olgulara ait histopatolojik bulguların değerlendirme ve yorumlarının da eksik veya yanlış olabileceği kanısına varılmıştır. İHK ve Levaditi yöntemleriyle pozitif sonuç elde edilen olgulara ait gözlenebilen mikroskopik değişiklikler dikkate alınarak histopatolojik bulgularla karşılaştırılması yapılabilmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, ruminant abortuslarında leptospira enfeksiyonlarının izolasyon zorluğundan dolayı leptospirozun spesifik ve erken tanısında İHK yönteminin güvenli sonuçlar verdiği, ayrıca

Levaditi metodunun da tanıda kullanılabileceği gösterilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, Marmara Bölgesi'ndeki ruminant abortuslarında leptospira enfeksiyonlarının önemini ortaya koymuş, ülkemiz ve dünyada önemli bir zoonoz olan leptospiroz ile mücadelede aşılamanın, kemiricilerle mücadelenin ve hastalıkla ilgili olarak toplum farkındalığının artırılmasının önemli olduğu kanaatine varılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile hayvancılık sektöründe ve ülke ekonomisinde önemli ekonomik kayıplara neden olan leptospiroza bağlı abort olgularının önlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması için konunun önemine dikkat çekilmek istenmiştir.

AÇIKLAMALAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18202048 proje numarası ile desteklenmiştir.

Zeynel Arslan'ın Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

Çalışma sözlü ve özet olarak "4th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2021), pp. 211, 24-26 November 2021, Ankara, Turkey" sunulmuştur.

Etik beyan: Bu çalışma, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Yerel Etik Kurulu tarafından 06/04/2018 tarih, 186 sayılı yazısı ve 06/2018 numaralı kararı ile onaylanmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar, bu makale için bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedirler.

KAYNAKLAR

- Bisias, G., Burriel, A., Boutsini, S., Kritas, S., & Leontides, L. (2009).** A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*, 8, 1-7.
- Bolin, C.A. (2005).** Leptospirosis in cattle: Disease review and update. *Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference*. 8-12, Orlando, Florida.
- Bulu, A.A., Dörterler, R., Özkan, Ö., & Hoştürk, F. (1990).** Doğu Anadolunun bazı illerinde (Kars, Erzurum, Gümüşhane, Artvin) sığır ve koyunlarda leptospirosis vakaları, yayılımı ve serotipleri üzerine araştırmalar. *Etik Vet Mikrobiyol Derg*, 6, 6, 50-61.

- Ellis, T.M., Robertson, G.M., Hustas, L., & Kirby, M. (1983).** Detection of leptospire in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. *Australian Veterinary Journal*, 60, 364-67.
- Ertaş, H.B., Çetinkaya, B., Muz, A., Öngör, H., Özdemir, V., & Yazıcioğlu, N. (2000).** Sığırlarda leptospirozisin tanısında MAT ve ELISA'nın kullanımı. *IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Ankara, s.46.
- Falini, B., & Taylor, C.R. (1983).** New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Archives Pathology Laboratory Medicine*, 107, 105-17.
- Hamali, H., Joozani, J., & Abdollahpour, R. (2012).** Serodiagnosis and molecular survey on leptospiral abortions in the dairy cattle of Tabriz. *Iranian Journal Veterinary Research*, 13, 2, 120-5.
- Kıran, M.M., Baysal, T., Gözün, H., Güler, L., Gündüz, K., Kuyucuoğlu, Ö., & Küçükayan, U., (1997).** Konya yöresinde koyun abortusları üzerine patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 9, 109-28.
- Levett, P.N. (2001).** Leptospirosis. *Clinic Microbiol Review*, 14, 2, 296-326.
- Lucheis, S.B., & Ferreira, R.S., (2011).** Ovine Leptospirosis in Brazil. *Journal of Venomous Animal and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 4, 394-405.
- Luna, L.G. (1968).** Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York. p.32-39.
- Maxie, M.G. (1993).** The Urinary System. In: Pathology of Domestic Animals, Eds. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. Vol. 2, 4th ed., Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp. 480-520.
- Miller, D.A., Wilson, M.A., & Beran, G.W. (1991).** Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. *American Journal Veterinary Research*, 52, 1761-65.
- Özdemir, Ö., & Erer H. (2018).** Dişi Genital Sistem, In: H. Erer, M.K. Çiftçi (Eds), *Veteriner Sistemik Patoloji, II. Cilt*, 3. Baskı, Konya, Güler Ofset, p.199-242.
- Özkan, Ö., Dörterler, R., & Hoştürk, F. (1993).** Erzurum ili ve yöresindeki sığır ve koyunlarda sarılık ve kan işeme semptomlarıyla seyreden hastalıklarda *Clostridium eodemtiens*, *Leptospira* ve kan protozoonlarının insidansının belirlenmesi. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 7, 4, 97-104.
- Russell, C.J., & Faine, S. (1984).** *Leptospira*. In: R. Krieg, J.G. Hold, (Eds), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I, Williams & Wilkins, London, p.62-7
- Sağlam, Y.S., Yener, Z., Temur, A., & Yalcin, E. (2008).** Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. *Small Ruminant Research*, 74, 1, 119-22.
- Scanziani, E., Luini, M., Fabbi, M., & Pizzocaro, P. (1991).** Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnostic of renal leptospirosis of pigs. *Research in Veterinary Science*, 50, 229-32.
- Szeredi, L., & Haake, D.A. (2006).** Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by *Leptospiral* infection. *Veterinary Pathology*, 43, 5, 755-61.
- Şahin, M., Aydın, F., Özdemir, V., Genç, O., & Güler, M.A. (2000).** Kars ve Ardahan illerinde sığır Leptospirozisinin kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması. *IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi*, Ankara, s:48.
- Temur, A., & Sağlam, Y.S. (2003).** Sığır abortuslarında leptospirosis yönünden immunperoksidaz incelemeler. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*, 27, 917-21.
- Türkütant, S.S., Sağlam, Y.S., Arslan, M.Ö., Bozoğlu, H., & Dinler, U. (2002).** Sarılık görülen koyun ve sığırlarda kan protozoonları ve leptospirosis üzerine etiyopatolojik incelemeler. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 13, 1, 45-55.
- Ulaş, H., & Alver, H. (1973).** Batı Anadolu ve Trakya'da sığırlarda leptospira insidansı ve etken izolasyonu üzerine araştırma. *Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, VI, 41-9.
- Yener, Z., & Keleş, İ. (2001).** Sığırlarda Leptospirosis üzerinde klinik ve patolojik incelemeler, *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 17, 1, 21-26.