

KÖPEK SERUMLARININ LEPTOSPIROZİS YÖNÜNDEN MİKROSKOPİK AGLUTINASYON TESTİ VE ELISA İLE İNCELENMESİ*

THE EXAMINATION OF DOGS FOR LEPTOSPIROSIS BY MICROSCOPIC AGLUTINATION TEST AND ELISA

Vildan ÖZDEMİR**

K. Serdar DİKER***

Kabul Tarihi: 20.07.1999

ÖZET:

Bu çalışmada, MAT ve ELISA ile sokak köpeklerindeki leptospirozisin yaygınlığı, dominant serotipler ve aşıli köpeklerdeki antikor titreleri incelendi. Çeşitli illerden toplanan 286 adet sokak köpeğinde dört ayrı serogruba karşı (*L. grippotyphosa*; Duyster, *L.icterohaemorrhagiae*; Kantorowics, *L.ballum*; Mus 127, *L.canicola*; Hond Utrecht IV) antikor taraması yapıldı.

İncelenen serumların % 26.9'sü leptospira antikorları yönünden pozitif bulundu. Dominant serotip olarak ilk sırada *canicola*, daha sonra sırasıyla *grippotyphosa* ve *icterohaemorrhagiae* belirlendi. İnfeksiyon oranı erkek köpeklerde % 30.2, dişilerde % 19.5 olarak bulundu. Bir yaşından büyük köpeklerin % 27.5'inde, bir yaşından küçük köpeklerin % 24.0'ünde infeksiyon saptandı.

İncelenen 182 adet aşıli hayvandaki antikorların tespitinde MAT ve ELISA arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Leptospirozis, MAT, ELISA.

SUMMARY:

In the present study, MAT and ELISA were used to detect the prevalence of leptospirosis in stray dogs, dominant serotypes and the antibody levels of vaccinated dogs. The sera collected from 286 stray

* Aynı adlı doktora tezinden özetlenmiştir.

** Etlik Vet. Merk. Kont. Arşt. Enst. ANKARA.

*** A.Ü.Vet.Fak.Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ANKARA.

dogs from different provinces were examined for four different serogroups, *L. grippotyphosa*; Duyster, *L. icterohaemorrhagiae*; Kantorowics, *L. ballum*; Mus 127, *L. canicola*; Hond Utrecht IV .

Leptospiral antibodies were detected in 26.9 % of sera examined. The most prevalent serotype was *canicola*, followed by *grippyotyphosa* and *icterohaemorrhagiae*. Infection rate was found to be 30.2 % in male dogs and 19.5 % in female dogs,

27.5 % in the dogs older than one year of age and 24.0 % in the dogs younger than one year of age.

No difference was found between MAT and ELISA results of 182 vaccinated animals.

Key Words: Dog, Leptospirosis, MAT, ELISA

GİRİŞ

Leptospirozis, genel adı *Leptospira* olan uzun sarmal mikroorganizmaların evcil hayvanlarda, insanlarda ve rodentlerde neden olduğu infeksiyöz hastalıklara verilen ortak bir isimdir. Şimdiye kadar insan ve hayvanlardan izole edilmiş parazitik leptospiralarda, 26 serogrup içinde 250'den fazla serotip saptanmıştır.

İnsan ve hayvanlarda görülen leptospiral infeksiyonlar, sebep olan serotiplere göre isimler almışlardır (23,40). Veteriner dalında, köpeklerdeki serotip *icterohaemorrhagiae* için 'Yellows', serotip *canicola* için 'Stuttgart' hastalığı veya köpek tifosu gibi terimler kullanılmıştır .

Leptospiraların orijininin Rusya olduğu ve 1729 yılında kahverengi ratların gemilerle Baltık limanlarına ve İngiltere'ye taşındığı ve buralardan dünyaya yayıldığına inanılmaktadır (23). Köpeklerdeki leptospirozisin klinik tablosu, ilk defa 1852 yılında Hofer tarafından tanımlanmış fakat hastalığın arttığı 19. yüzyılın sonuna kadar klinik sendromlara yeterince özen gösterilmemiştir (26).

Köpeklerde *icterohaemorrhagiae* serotipi infeksiyonları Almanya'da ilk defa 1916 yılında Krumbein ve Freiling (37) tarafından bildirilmiştir. İngiltere'de Okell ve ark.(42) oldukça öldürücü olan "yellows" hastalığının sebebi olarak serotip *icterohaemorrhagiae*'yi, Hollanda'da Klarenbeek ve Schüffner (35) Stuttgart hastalığının sebebi olarak serotip *canicola*'yı bulmuşlardır. Daha sonra her iki serotip

Avrupa'nın hemen her yerinde, Asya'da, Kuzey ve Güney Amerika'da (39) bildirilmiştir. Bundan sonra Leptospirozis'in insan ve köpeklerde sık olarak görülmemeyen fakat oldukça ölümcül olduğu görüşü kabul edilmiştir. Leptospirozis, 1921-1925 ve 1946-1952 yılları arasında pikler oluşturarak Avrupa'nın çoğu yerinde gözlenmiştir (26). Türkiye'de köpeklerde leptospiraların varlığı ilk kez Unat ve Gürtürk (51) tarafından bir köpekten *L.canicola* izolasyonu ile bildirilmiştir.

Leptospira'lar Gram negatif, hareketli, sporsuz, obligat aerob, kapsülsüz, sarmal biçimde mikroorganizmalardır. Leptospiralar en küçük spiroketlerdir. Serotipler morfolojik olarak aynıdır (21).

Leptospiraların optimum üreme ısıları 28-32 °C'dir. Sıvı ve yarı katı ortamlarda (Korthof, Stuart, Fletcher, EMJH) iyi ürerler. Patogen suşlar için besi yerlerine %10 sığır serum albumini (18,31) veya tavşan serumu ilave edilir. Pirimidinlere karşı dirençlerinden dolayı, bir çok bakterinin üremesini durduran ve diğer spiroketlerin duyarlı olduğu pirimidin analogu 5-fluorouracil selektif izolasyon besi yerlerinde kullanılmaktadır. Kültürler 196 °C'lik nitrojen tanklarında saklanabilir, liyofilize edilemezler (21,32).

Leptospiralarda serotiplerin identifikasyonu, mikroskopik aglutinasyon testleri ile yapılır. Bilinmeyen izolat ilk olarak bir seri antiserum ile serogruplara olan duyarlılığı belirlemek için test edilir. Daha sonra belirlenen serogrup içindeki serotiplerin antiserumları ile test edilir. Son olarak da bilinen serotipler ile izolatın antijenik kimliğini belirlemek için aglutinin- absorpsiyon testi uygulanır (4,17). Kmety (36) leptospira suşlarının identifikasyon yolu olarak faktör analizi geliştirmiş ve serogrupların referens serotiplerinin aglutinojenik faktörlerini analiz etmiştir. Leptospiralar genomik yapılarına göre de sınıflandırılmaktadır. Deosiribonükleik asit (DNA) kompozisyonuna göre leptospiralar parazitik ve saprofitik gruplara ayrılmakta, parazitik gruptaki leptospiralar da içerdikleri guanin + sitozin oranına göre yedi gruba dağılmaktadır (30).

Leptospiralar, konvansiyonel serolojik işlemlerle ve DNA homoloji çalışmaları yolu ile sınıflandırıldığı zaman sonuçlar değişkenlik gösterebilmektedir. Kros-aglutinin absorpsiyon testi ile serotipler içinde bulunan farklı suşların ayrımı yapılamamaktadır ve bu nedenle leptospiraların sınıflandırılması ve identifikasyonunda Restriksiyon Endonükleaz Analiz (REA)'i kullanılmaktadır (38). Genomik proplar kullanılarak yapılan çalışmalar patojenik ve nonpatojenik leptospira türlerinin ayrımı üzerine yoğunlaşmıştır (20,47,54). Leptospira suşla-

rının karakterizasyonu için rekombinant DNA problemleri ile Southern blot analizi uygulaması önerilmektedir (53).

Leptospira infeksiyonlarının kaynağı, genellikle infekte hayvanların kontamine ettiği mera, içme suyu, infekte idrarın bulaştığı yiyecekler, atık fütuslar ve infekte uterus akıntılarıdır. Bunların içinde en önemli bulaşma kaynağı idrardır (10).

Kemiricilerin çoğu idrarları ile leptospira çıkarmalarına rağmen serumlarında antikora rastlanmamıştır. Bu da leptospirozis salgınlarının esas sorumlusunun "antikorsuz taşıyıcı" rodentler oranına bağlı olduğunu göstermektedir (7).

Modern ve hızlı hayvan nakliyatı yoluyla infeksiyon, lokal, bölgesel hatta ülkeler arası taşınabilmektedir. İnfekte idrar damlalarının etrafa saçılması, köpeklerde genital bölgeyi koklama alışkanlığı, infekte hayvanların etleri ile beslenme, çiftleşme, suni tohumlama direkt bulaşma, kontamine suların yüzeyi ve vektör keneler ise indirekt bulaşma olarak hayvanlar arasındaki bulaşmanın bilinen doğal yoludur (26,40). Cinsiyet farkı önem taşımazken, yaş önemlidir. Genç hayvanlar yetişkinlerden daha duyarlıdır (9).

Leptospiraların vücuda girişi, genellikle lezyonsuz mukoz membrandan veya su ile yumuşamış deriden olmaktadır. Etken bu yüzeylerden aktif olarak kan dolaşımına girer ve leptospiremi meydana gelir. Bakteriyemik fazın klinik bulguları ve süresi çoğu vakalarda hafif ateş ve geçici halsizlikten, gebe hayvanların yavru atmasına ve bazen anemi, sarılık, depresyon, meningitis, agalaksi, konvulsiyonlar ve ölüme kadar çok geniş bir şekilde farklılık gösterir (9).

İcterohaemorrhagiae serogrubuna ait leptospiralarla infekte olan insan ve köpeklerde ikterik safha yaygındır ve bu Weil veya Stuttgart hastalığının belirtisidir. Sarılık, infeksiyonun üçüncü ile yedinci günleri arasında görülür. Karaciğer şişkin ve hassastır. Bunu oliguri ve anuri takip ederek hasta hayvan üremiden ölebilir veya sarılık haftalar sonra iyileşme ile azalabilir (8). İnfekte olan köpeklerde klinik bulgular ile serotiplerin ayırımı mümkün değildir. Köpeklerin leptospiralar ile temasının daha çok gri ratların (*Rattus norvegicus*) idrarlarının saçılması ile olduğu iddia edilmektedir (34). Hastalık her yaştaki köpeği etkiler. İnkubasyon periyodu 5-15 gündür.

Hastalığı geçiren hayvanlar, uzun süre bağışık kalırlar ve hastalığa bir daha yakalanmazlar. Kazanılan bağışıklık, serotipe spesifiktir. Konakçılar başka serotiplere karşı duyarlı olurlar. Bağışıklıkta, aglutine eden antikorlar önemlidir ve leptospiraların yüzey kompo-

nentleri, koruyucu humoral immun yanıtın oluşumunu sağlar (5,6, 13).

Bakteriyoskopi ile kesin sonuca gidilememesi ve kültür sonuçlarının çok zaman alması nedeniyle leptospira antikorlarını belirlemede, aglutinasyon, komplement fikzasyon, hemolitik test ve floresan antikor tekniği gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır. MAT, leptospirozisin teşhisinde referans test olmasına rağmen, hassaslığı ve güvenilirliği, kronik taşıyıcıları belirlemede ve aşı antikor titresini ayırma testi için infeksiyon antikor titresini ayırmada zayıf kalmaktadır. Katı faz ELISA, 1980'lerden beri leptospirosis dahil olmak üzere insan ve hayvanlardaki birçok infeksiyöz hastalığın serolojik teşhisinde kullanılmıştır (15,22,49). Köpeklerin leptospira infeksiyonunun serolojik teşhisi için ELISA ilk kez Hartman ve ark. (28) tarafından kullanılmıştır. Araştırmacılar testin MAT ile uyumlu sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Hartman ve ark. (29), deneysel yolla infekte edilen köpeklerde ELISA ile ilk IgM'lerin 4. günden sonra saptandığını, IgG'lerin ise 2-3 ayda en yüksek düzeye çıktığını bildirmişlerdir. MAT ile ELISA'nın karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ELISA'nın daha duyarlı olduğu ve infeksiyonu daha erken dönemde saptadığı bildirilmiştir (56). Bununla birlikte MAT gibi ELISA da aşı ile infeksiyon antikor titresini ayıramamaktadır. Hastalığın erken dönemlerinde alınan kan serumu kullanılarak, IgM antikorlarına özel ve hassas olan mikrokapsül aglutinasyon testi geliştirilmiştir. MAT'a göre 8-128 kere daha hassas olan bu testte, sentetik polimerlerin mikrokapsülleri, leptospiral antijenler için taşıyıcı olarak kullanılmıştır (1,3).

Çeşitli ülkelerde, köpeklerdeki serolojik araştırmalar serotip icterohaemorrhagiae infeksiyonlarını %15-33 ve serotip canicola infeksiyonlarını %3-45 olarak açıklamaktadır (24,40). Amerika'da Thierman (48), MAT ile inceledikleri köpeklerde serotip icterohaemorrhagiae sıklığını % 37.8 ve Kanada'da Prescott ve ark. (44) serotip icterohaemorrhagiae sıklığını % 29.5, serotip canicola sıklığını % 19,2 olarak bulmuşlardır. Avustralya'da Dickeson ve Love (16), ev köpeklerinde 8 serotipe karşı leptospira seropozitifliğini % 9.8 olarak saptamışlardır. Almanya'da 1985-1988 yılları arasında köpeklerde % 48.7 leptospira seropozitifliği saptanmıştır (12). Arjantin'de sokak köpeklerinde % 51 oranında leptospira seropozitif saptandığı bildirilmiştir (41). Hindistan'da yapılan çalışmalar, köpeklerin kan serumlarında yapılan taramalar ile hastalığın oranı % 21.3 ve % 10.3 olarak bildirilmiştir (56,57). Everard ve ark. (19) üzerinde çalıştıkları köpek popülasyonunda, hastalığı erkeklerde % 47 ve dişilerde % 38 oranında

bulmuşlardır. Bir başka çalışmada oran erkeklerde % 27,6 dişilerde ise % 18,9 olarak bildirilmektedir (2). Ancak bu, klinikte görülme oranı ile değişiklik gösterir.

Türkiye'de köpek leptospirozisinin serolojik tanısı ile ilgili ilk çalışma, Ulaş ve Alver (50) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, Batı Anadolu ve Trakya bölgesindeki 28 sokak köpeğinin birinde MAT ile serotip grippotyphosa'ya karşı antikor saptamışlardır. Vardar (55), 107 köpek serumunun %33' ünü leptospirozis yönünden pozitif bulmuştur. Ülgen ve ark. (52), 82 sokak köpeğinde 5 serotipe karşı %11 oranında seropozitiflik saptamışlardır.

Bu çalışmada Türkiye'deki köpek leptospirozunun varlığı, aşı-sız köpeklerde yaygın olan serotiplerin belirlenmesi, hastalığın prevalansı, yaş ve cinsiyete göre dağılımı, aşıli köpeklerde antikorları saptamada MAT ve ELISA testlerinin karşılaştırmalı olarak test edilmesi amaçlanmıştır. Leptospirozis konusunda çalışmalar; yarattığı ekonomik kayıplar nedeniyle genelde sığır, koyun ve domuz popülasyonunda ağırlıklı olarak devam etmekte, hastalıktan korunma ve yayılmasını önlemek amacı ile araştırmalar yapılmaktadır. Bunun yanısıra bütün dünyada evcil köpekler, *Leptospira interrogans* serotip canicola ve icterohaemorrhagiae ile hazırlanan inaktif aşılarla korunmaya çalışılmaktadır. Ancak bunların dışındaki serotipler ile kolaylıkla enfekte olabilirler. Evcil köpeklerin yaşamımızdaki önemi ve leptospirozisin zoonoz bir hastalık olması nedeniyle, köpekler insanlar için bir tehdit oluşturmaktadırlar. Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, yapılan bu çalışma kapsadığı bölgelerde bir ilk olması ve bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı düşüncesi ile orijinal nitelik taşıdığı düşünülmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Köpeklerde leptospirozisin serolojik teşhisi amacıyla, Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkezi Komutanlığı'na ait aşıli köpeklerden 182 adet kan toplandı. Ayrıca İstanbul, Bursa, Ankara ve Aydın illerindeki aşısız sokak köpeklerinden 286 adet kan toplandı. Kanların, serumları çıkartıldı ve numara verilerek -20 °C'de saklandı.

Materyaller toplanırken, hayvanların cinsiyet ve yaşları da kaydedildi. Aşıli köpeklerde, aşılama tarihleri belirlendi. Toplanan serumların cinsiyet ve yaşa göre dağılımı Tablo 1' de gösterilmiştir.

Tablo 1: Aşısız köpeklerden toplanan materyallerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı.

Cinsiyet	Yaş		Toplam
	<1	>1	
Erkek	37	162	199
Dişi	13	74	87
Toplam	50	236	286

Suşların pasajları ve antijen üretiminde, modifiye Johnson sentetik besiyeri kullanıldı.

Antijen hazırlanmasında kullanılan, *L. interrogans* serotip canicola "Hond Utrecht IV" suşu, *L. interrogans* serotip grippotyphosa "Duyster" suşu, *L. interrogans* serotip icterohaemorrhagiae "Kantorowics" suşu ve *L. interrogans* serotip ballum "Mus 127" suşu ile çalışmada kullanılan anti-canicola, anti-grippotyphosa, anti-icterohaemorrhagiae ve anti-ballum serumları ve negatif kontrol serumları, Hollanda'dan (Laboratory of Tropical Hygiene Dep. Of Biomedical Research, Royal Tropical Enstitute, Amsterdam) sağlandı.

Mikroskopik aglutinasyon testinin yapılışı:

İki katlı sulandırması yapılan serumlara eşit miktarda antijen eklenerek 30 °C'de 3 saat inkube edildi. Pozitif kontrolden ve en yüksek sulandırmadan başlamak üzere, serum-antijen karışımı karanlık saha mikroskobunda değerlendirildi. Karışımdan bir öze dolusu alınarak, temiz bir lam üzerine konuldu ve 10X objektif ile lamel kapatmadan değerlendirildi. 1/100 ve üzerindeki sulandırmalarda %50 aglutinasyon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi. Her antijen için ayrı pleyt kullanıldı (14).

ELISA'nın yapılışı

Antijen olarak, ısı inaktivasyonu ile hazırlanan süpernatant kısım kullanıldı. Antijen ile kaplanıp oda sıcaklığında kurutulmuş pleytlere, serumların iki katlı sulandırmaları yapıldı ve 1 saat 30 °C'de inkube edildi. Yıkandıktan sonra konjugat konularak 1 saat daha inkube edildi. Tekrar yıkanıp, son olarak substrat ilave edilip iyice çalka-

landı ve oda ısısında iki saat bekletildi. Pozitif ve negatif serumlar, renk değişikliğine göre gözle değerlendirildi (46).

İstatistiki Analiz: Pozitif bulunan köpeklerde yaş ve cinsiyetin önemi "Ki-Kare" metodu ile değerlendirildi.

BULGULAR

İstanbul, Ankara, Bursa ve Aydın illerinden toplanan 286 adet aşısız köpek serumunun 77 (%26.9) adedinde leptospiralara karşı antikor tespit edildi.

Gemlik Askeri Veteriner Okulu'ndan temin edilen 182 aşılı köpeğin 16 (% 29.1) adedinde leptospiralara karşı antikor tespit edilmiştir.

Araştırmada dört ayrı serogruba ait dört serotip ile çalışıldı. İncelenen serumların 64'ü (%83.1) tek bir serotip ile reaksiyon verdi. Dominant serotip olarak canicola (% 45.4) bulundu , bunu grippotyphosa (% 24.6) ve icterohaemorrhagiae (% 12.9) izledi. Birden fazla serotip ile reaksiyon veren serum sayısı 13 (%16.9) olarak bulundu. Hiçbir serum serotip ballum ile pozitif reaksiyon vermedi.

Leptospira antikorı saptanan aşılı 16 köpek serumundan 11(%68.8)'inde yalnız serotip icterohaemorrhagiae'ya karşı, 2 (%12.5)'sinde yalnız serotip canicola'ya karşı, 3 (%18.7) adedinde ise her iki serotipe karşı reaksiyon görüldü. Aşılı köpeklerin hiç birinin serumunda serotip grippotyphosa ve serotip ballum'a karşı pozitif reaksiyon görülmedi.

Pozitif bulunan aşısız köpeklere ait serumların yaş ve cinsiyet faktörü yönünden dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Leptospirozis yönünden pozitif bulunan aşısız köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımı.

Cinsiyet	Yaş		Toplam
	<1(n:50)	>1(n:236)	
Erkek (n:199)	10	50	60(%30.2)
Dişi (n: 87)	2	15	17(%19.5)
Toplam	12(%24.0)	65(%27.5)	77

Cinsiyete göre dağılımda,incelenen 199 erkek köpeğin 60'ı (%30.2) , 87dişi köpeğin 17'si (%19.5) pozitif bulundu. Erkek ve dişi-

ler arasında fark istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Yaş göre dağılımda bir yaşından küçük hayvanların 12'si (%24.0), bir yaşından büyük hayvanların 65'i (%27.5) pozitif olarak tespit edildi. Bir yaşından büyük ve küçük köpeklerde infeksiyon oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$).

İnfeksiyon oranı 1 yaşından küçük erkek köpeklerde % 5.0, 1 yaşından büyük erkek köpeklerde % 25.2 olarak tespit edildi. İnfeksiyon oranı bir yaşından küçük dişi köpeklerde % 2.2, bir yaşından büyük dişi köpeklerde % 17.3 olarak bulundu.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpek leptospirozisi halen bütün dünyada yaygın bir hastalık olmaya devam etmektedir. Leptospirozisin klinik formları nispeten az oranda görülmesine karşın, infeksiyonun gerçek yaygınlığı serolojik çalışmalarla anlaşılmaktadır. Köpek leptospirozis olgularında birçok serotip saptanabilmesine karşın, köpekler serotip canicola'nın doğal taşıyıcısı olarak kabul edilmekte ve bazı köpek populasyonlarında baskın serotip olarak belirlenmektedir. Serotip icterohaemorrhagiae'nın da sokak köpeklerinde yaygın olarak bulunduğu bildirilmektedir (24).

Bu çalışmada köpek leptospirozisinin tanısındaki değerini belirlemek için ELISA ile MAT karşılaştırılmış ve bu testler ile çeşitli köpek populasyonlarında leptospira seropozitifliği araştırılmıştır.

Bu çalışmada incelenen 286 adet aşısız sokak köpeğinin %26.9'unda, değerlendirmeye esas alınan MAT ile canicola, grippotyphosa ve icterohaemorrhagiae serotiplerine karşı seropozitiflik saptandı. Türkiye'de MAT ile yapılan serolojik taramalarda; Batı Anadolu ve Trakya bölgesindeki sokak köpeklerinde serotip grippotyphosa'ya karşı %3.6 seropozitiflik belirlenmiştir (50). Vardar (55), %33'lük prevalans gösterdiği çalışmasında, köpeklerin kaynağını ve hangi serotiplerin incelendiğini belirtmemiştir. İlgen ve ark. (52), Bursa ilindeki sokak köpeklerinde leptospirozis seroprevalansını %11 olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada incelenen hayvanların orijinlerinin, yaş ve cinsiyet dağılımlarının farklı olmasının, saptanan seropozitiflik oranını etkileyebileceği düşünülmektedir. Çeşitli ülkelerde MAT ile yapılan serolojik taramalarda köpeklerdeki leptospirosis oranları; Hindistan'da % 21.3, Amerika'da % 37.8, Danimarka'da % 32.3, Barbados adasında % 41, Japonya'da % 23 ve Kanada'da %

39.2 olarak bulunmuştur (2,11,19,44,48,56). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen bulgular arasında benzerlikler ve farklılıklar saptanmasına karşın, leptospirosisin tüm dünyada köpek popülasyonlarında yaygın olarak bulunduğu gerçeği açıkça anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada incelenen aşısız köpeklerde en sık rastlanan serotipin canicola olduğu saptandı. Bu serotipi sırasıyla grippotyphosa ve icterohaemorrhagiae'nın izlediği belirlendi. Köpeklerde serotip ballum infeksiyonlarına rastlanmadı. Türkiye'de serotiplerin ayrıntılı olarak incelendiği tek çalışmada Ülgen ve ark. (52) serotip grippotyphosa, ballum, pomona ve canicola'ya karşı antikor saptayamamışlar, sadece serotip icterohaemorrhagiae'ya karşı %11 oranında pozitiflik bulmuşlardır. Bu durumun bölgesel farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünüldü.

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda serotip canicola, grippotyphosa ve icterohaemorrhagiae'ye köpek popülasyonlarında yaygın olarak rastlandığı bildirilmiştir. Amerika'da en yaygın olarak serotip icterohaemorrhagiae (48), Kanada'da serotip icterohaemorrhagiae ve canicola (44), Hindistan'da serotip icterohaemorrhagiae (56), Japonya'da serotip canicola (2), Barbados adasında serotip icterohaemorrhagiae (19) belirlenmiştir. Çeşitli ülkelerde saptanan dominant serotipler ile bu çalışmada bulunan serotipler arasında benzerlik olduğu gözlemlendi. Aşısız köpeklerde birden fazla serotip ile reaksiyon veren serum sayısı 13 (% 16.9) olarak bulundu. Genel olarak, bir serotip ile yüksek titre veren bir serum, diğer serotip yada serotipler ile düşük titre verdi. Bazı araştırmacılar, bir serotip ile yüksek titre veren serumların, diğer serotipler ile düşük titre göstermesini kros-reaksiyonlara bağlamaktadırlar(45).

Bu çalışmada incelenen erkek köpeklerin %30.2'sinde, dişi köpeklerin %19.5'inde seropozitiflik saptandı. Ülgen ve ark. (52), bu oranı dişi köpeklerde %13.7 ve erkek köpeklerde %6.5 olarak bildirmişlerdir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda erkek ve dişilerdeki seropozitiflik oranı sırasıyla Barbados'ta % 47- % 38 (19), Japonya'da % 27.6- % 18.9(2), Hollanda'da % 68.3- % 31.7(26) ve Danimarka'da % 12.9- % 17.3 (11) olarak bulunmuştur. Bu literatürlerde de görüldüğü gibi, Ülgen ve ark. (52) ile Borg-Petersen ve Fennestad (11) dışındaki tüm çalışmalarda erkeklerdeki seropozitiflik oranının, dişilere göre daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada, erkeklerde dişilere göre daha yüksek pozitiflik oranının saptanması, çoğu

literatür bulgusu ile uyumludur. Özellikle erkek köpeklerin genital bölgeyi koklamaları ve yeni yapılan idrarı yalamaları nedeniyle, leptospirozisin erkek köpeklerde daha sık görüldüğü bildirilmektedir (26).

Bu çalışmada elde edilen bulgular hayvanların yaşı açısından değerlendirildiğinde, bir yaşından büyük köpeklerde % 27.5 , bir yaşından küçük köpeklerde % 24.0 seropozitiflik saptandı. Diğer ülkelerde yapılan çalışmaların bazılarında bir yaşından büyük köpeklerde pozitiflik oranının daha yüksek olduğu açıklanmıştır (2,11,26,56).

Bu çalışmada incelenen aşı 182 adet köpekte % 8.7 seropozitiflik bulundu. Bu hayvanlarda sadece aşı içeriğinde yer alan serotip icterohaemorrhagiae ve serotip canicola'ya karşı antikorlar saptandı. Aşılı köpeklerde sadece aşı serotiplerine karşı antikor saptanması, bu köpeklerin kontrollü koşullarda yetiştirilmesine ve diğer olası rezervuarlarla temaslarının olmamasına bağlanabilir. Ancak tümü aşılı olmasına karşın, köpeklerin sadece % 8.7'sinde antikor saptanmasının aşılardan sonra geçen süreye bağlı olduğu düşünüldü. Ayrıca bu araştırmada köpekler sadece bir kez aşılanmış ve sonraki yıllarda aşılama tekrarlanmamıştır. Her sene tekrarlanması gereken bir aşı olduğu düşünülürse, 10 ay önce ve ilk defa aşılanan köpeklerde bile, elde edilen düşük titreler veya negatif sonuçlar normal bulundu.

Bu çalışmada kullanılan ELISA ile standart test olarak kabul edilen MAT karşılaştırıldığında MAT'ın leptospira ile infekte hayvanları saptamada daha etkili olduğu belirlendi. Aşısız köpeklerde MAT ile % 60.4 pozitiflik saptanırken bu oran ELISA ile %39.7 olarak bulundu. Bu farklılığın MAT'ta hem IgM'lerin hem de IgG'lerin, ELISA'da ise sadece IgG'lerin saptanmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Buna bağlı olarak, ELISA ile pozitiflik saptanamayan hayvanlarda daha çok IgM yanıtının uyarılmış olduğu düşünüldü. MAT ile daha yüksek titrelerde pozitiflik saptanması bu düşüncüyü destekledi. ELISA ile saha taramasına ait literatür bulunamadı. Ancak deneysel çalışmaların sonuçlarının ELISA ile değerlendirildiği çalışmalarda IgG'lerin infeksiyon başlangıcından 2-3 ay sonra yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (29). Bu da, bu çalışmada ELISA ile daha düşük oranda pozitiflik saptanmasına başka bir açıklama getirmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, sokak köpeklerinin kan serumlarında anti-leptospiral antikor taşıdıklarını ve leptospirozisin yaygın olduğunu gösterdi. Enfeksiyon oranının, köpek popülasyonu içindeki bir yaşından büyük erkek hayvanlarda en yüksek düzeyde

bulunduğu belirlendi. Bu bulgular, köpeklerin leptospiraların önemli bir kaynağı olduğunu ve insanlara bulaşmada önemli bir rol oynayabileceğini gösterdi. Ayrıca, tek doz leptospira aşısının, hayvanların çoğunda uzun süreli antikor titresi oluşturmaya yetmediği anlaşıldı. Saha veya sürü taramalarında MAT'ın infekte köpekleri tespit etmede daha etkili olduğu belirlendi. ELISA' nın ise, ancak IgG ve IgM'lerin ayrı ayrı saptanması durumunda saha taramalarında kullanılabilceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1- ARIMITSU Y (1988). A new method for diagnosis of Leptospirosis: A microcapsule agglutination (MCA) Test. *Isr J Vet Med*, 44, 1-8.

2- ARIMITSU Y, FUKUMURA K, SHINGAKI Y (1989a). Distribution of leptospirosis among stray dogs in the Okinawa islands, Japan: Comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests, *Br Vet J*, 145, 473-477.

3- ARIMITSU Y, KOBAYASHI S, AKAMA K, MATUHASI T (1982). Development of a simple serological method for diagnosing Leptospirosis: a Microcapsule Agglutination Test, *J Clin Microbiol*, 15, 835-841.

4- BABUDIERI B (1971). Proposed standardization of the agglutinin-absorption test for *Leptospira*, *Bull Wld Health Org*, 44, 795-810. Blobel H, Schlieber T (1985). *Leptospira*, *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, V, 90-154.

5- BEY RF, JOHNSON RC (1978a). Protein-free and low-protein media for the cultivation of leptospira, *J Clin Microbiol*, 19, 562-569.

6- BEY RF, JOHNSON RC (1982). Immunogenicity and humoral and cell-mediated immune responses to leptospiral whole cell, outer envelope, and protoplasmic cylinder vaccines in hamsters and dogs, *Am J Vet Res*, 43, 835-840.

7- BIRNBAUM S, SHENBERG E, TORTEN M (1972). The influence of maternal antibodies on the epidemiology of leptospiral carrier state in mice, *Am J Epidemiol* 96, 313-317. Blobel H, Schlieber T (1985). *Leptospira*, *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, V, 90-154.

8- BISHOP L, STRANDBERG JD, ADAMS RJ, BROWNSTEIN DG, PATTERSON R (1979). Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospira, *Am J Vet Res*, 40, 839-844.

9- BLOBEL H, SCHLIEBER T (1985). *Leptospira*, *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, V, 90-154.

10- BLOOD DC, HENDERSON JA (1979). Diseases caused by leptospira spp, *Vet Med*, 5, 565-572.

11- BORG-PETERSEN C, FENNESTAD KL (1962). Incidence of canine leptospirosis in Denmark, *Nord Vet Med*, 14, 609-619.

12- BREM S, KOPP H, MEYER P (1990). Leptospira antibody detection in dog serum in the years 1985 to 1988, Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1 , 6-8.

13- BROUGHTON ES, SCARNELL J (1985). Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination, Vet Rec, 117, 307-311.

14- COLE JR, SULZER CR, PURSELL AR (1973). Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test, Appl Microbiol, 25, 976-980.

15- COUSINS DV, ROBERTSON GM, HUSTAS L (1985). The use of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to Leptospira interrogans serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle, Vet Microbiol, 10, 439-450.

16- DICKESON D, LOVE DN (1993). A serological survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies, Aust Vet J, 70, 389-390.

17- DIKKEN H, KMETY E (1978). Serological typing methods for leptospire. Blobel, H., Schlieber, T.(1985). Leptospira, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

18- ELLINGHOUSEN HC, McCULLOUGH WG (1965). Nutrition of L.pomona and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80, Am J Vet Res 110, 45-51.

19- EVERARD COR, JONES CJ, INNIS VA, CARRINGTON DG, VAUGHAN AW (1987). Leptospirosis in dogs on Barbados, Isr. J Vet Med, 43, 288-295.

20- FACH P, TRAP D, GUILLOU JP (1991). Biotinylated probes to detect Leptospira interrogans on dot blot hybridization or by in situ hybridization, Lett. in Appl Microbiol, 12, 171-176.

21- FAINE S (1982). Guidelines for the control of Leptospirosis, World Health Organisation-Geneva.

22- GODDARD RD, LUFF PR, THORNTON DH (1991). The serological response of calves to Leptospira interrogans serovar hardjo vaccines and infection as measured by the microscopic agglutination test and anti-IgM and anti-IgG enzyme-linked immunosorbent assay, Vet Microbiol, 26, 191-201.

23- GSELL O (1984). The history of Leptospirosis: 100 Years, Zbl Bakt Hyg, 257, 473-478.

24- HANSON LE (1982). Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective, *J Am Vet Med Assoc*, 181, 1505-1509.

25- HARTMAN EG (1984a). An IgM- and IgG- specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect anti-leptospiral immunoglobulins in dogs, *Zbl Bakt Hyg A* 257, 508-510.

26- HARTMAN EG (1984b). Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands, *Zbl Bakt Hyg*, 258A, 350-359.

27- HARTMAN EG, VAN DEN INGH TSGAM, ROTHUIZEN J (1986). Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG —specific elisa. *Vet Immun Immunopathol*, 13, 261-271.

28- HARTMAN EG, VAN HOUTEN M, VAN DER DONK JA, FRIK JF (1984a). Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay, *Vet Immunol Immunopathol*, 7, 33-42.

29- HARTMAN EG, VAN HOUTEN M, VAN DER DONK JA, FRIK JF (1984b). Determination of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in sera of experimentally infected dogs by solid phase enzyme linked immunosorbent assay, *Vet Immunol Immunopathol*, 7, 43-51.

30- JOHNSON RC, FAINE S (1984). *Leptospira*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 62-67.

31- JOHNSON RC, HARRIS VG (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospirae, *J Bacteriol*, 94, 27-31.

32- JOHNSON RC, ROGERS P (1964a). 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae, *J Bacteriol*, 87, 422-426.

33- KEENAN KP, ALEXANDER AD, MONTGOMERY CA (1978). Pathogenesis of experimental leptospira interrogans, serovar bataviae, infection in the dog: Mikrobiological, clinical, hematologic, and biochemical studies, *Am J Vet Res*, 39,449-453.

34- KIKTENKO VS (1985). Influence of the mechanism of transmission of the infective agent on the aetiological structure of leptospiral foci, *J Hyg Epidemi Microbiol Immunol*, 29, 77-82.

35- KLARENBECK A, SCHIFFNER WAP (1933). Het voorkomen van een afwijkend leptospiraras in Nederland, *Ned Tijdschr Ge-*

neesk, 77, 4271. Hartman EG (1984b). Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands, Zbl Bakt Hyg, 258A, 350-359.

36- KMETY E (1966). Main antigens as criterion for differentiating leptospiral serotypes, Ann Soc Belge Med Trop, 46, 103. Blobel H, Schlieber T (1985). Leptospira, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

37- KRUMBEIN R, FRIELING B (1916). Zur Weilschen Krankheit, Dtsch Med Wschr, 42, 564-566. Blobel H, Schlieber T (1985). Leptospira, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

38- MARSHALL RB, WILTON BE, ROBINSON AJ (1981). Identification of leptospira serovars by restriction-endonuclease analysis, J Med Mikrobiol, 14, 163-166.

39- MEYER KF, STEWART-ANDERSON B, EDDIE A (1939). Canine leptospirosis in the United States, JAVMA, 95, 710-729. Blobel H, Schliebe, T (1985). Leptospira, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

40- MICHNA SW (1970). Leptospirosis, Vet Rec, 86, 484-496.

41- MYERS DM (1980). Leptospiral antibodies in stray dogs of Moreno, Province of Buenos Aires, Argentina, Rev Argent Microbiol, 1, 18-22.

42- OKELL CC, DALLING T, PUGH LP (1925). Leptospiral jaundice in dogs, Vet J, 81, 3-35. Blobel H, Schlieber T (1985). Leptospira, Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

43- PRESCOTT J (1991). Treatment of Leptospirosis, Cornelle Vet, 81, 7-12.

44- PRESCOTT JF, FERRIER RL, NICHOLSON VM, JOHNSTON KM, HOFF B (1991). Is canine leptospirosis underdiagnosed in southern Ontario? A case report and serological survey, Can Vet J, 32, 481-486.

45- ROTHWELL JT (1990). Serum agglutinating antibodies to Leptospira interrogans serovar canicola presumed due to serovar robinsoni infection in an Australian dog, Aust Vet J, 67, 232.

46- TERPSTRA WJ, LIGTHART GS, SCHOONE GJ (1980). Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), Zbl Bakt Hyg, A 247, 400-405.

47- TERPSTRA WJ, SCHOONE GJ, TER SCHEGGET J (1986). Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridisation with ³²P- and biotin- labelled probes, J Med Microbiol, 22, 23-28.

48- THIERMAN AB (1980). Canine leptospirosis in Detroit, Am J Vet Res, 41, 1659-1661.

49- THIERMAN AB, GARRET LA (1983). Enzym-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona in cattle, Am J Vet Res, 44, 884-887.

50- ULAŞ H, ALVER H (1973). Batı Anadolu ve Trakya'da sığırlarda leptospira insidensi ve etken izolasyonu üzerine araştırma, Pendik Vet Kont Arşt Enst Derg, VI , 41-49.

51- UNAT EK, GÜRTÜRK S (1954). Türkiyede *Leptospira canicola* infeksiyonu, Mikrobiyol Derg, 5, 179-182.

52- ÜLGEN M, ÇETİN C, ÖZDEMİR V, BÜYÜKÇOBAN M (1997). Bursa ilindeki sokak köpeklerinde leptospirozisin seroprevalansı, Etlık Vet Mikrobiyol Derg, 9, 108-114.

53- VAN EYS GJJM, GERRITSEN MJ, KORVER H, SCHOONE GJ, KROON CCM, TERPSTRA WJ (1991). Characterization of serovars of the genus *Leptospira* by DNA hybridization with Hardjobovis and Icterohaemorrhagiae recombinant probes with special attention to serogroup Sejroe, J Clin Mikrobiol., 29, 1042-1048.

54- VAN EYS GJJM, ZAAL G, SCHOONE GJ, TERPSTRA WJ (1988). DNA hybridization with Hardjobovis-specific recombinant probes as a method for type discrimination of leptospira interrogans serovar hardjo, J Gen Microbiol, 134, 567-574.

55- VARDAR T (1974-1976). 1963-1974 yılları arasında yurdumuz evcil hayvanlarında görülen leptospirosis olayları, Etlık Vet Bakt Enst Derg, 4, 147-162.

56- VENKATARAMAN KS, NEDUNCHELLIYAN S (1992). Epidemiology of an outbreak of leptospirosis in man and dog, Comp Immun Microbiol Infect Dis, 15, 243-247.

57- VENKATARAMAN KS, NEDUNCHELLIYAN S (1993). Seroepidemiology of canine leptospirosis in Madras city, Ind J Anim Sci, 63, 150-152.