

## TÜRKİYE GENELİNDE SIĞIR LEPTOSPIRA SETORİPLERİNİN DAĞILIMININ SAPTANMASI VE LEPTOSPIROZİS'E KARŞI BİR AŞI DENEMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR\*

### DETERMINATION OF CATTLE LEPTOSPIRA SEROTYPES DISTRIBUTION IN TURKEY AND STUDIES ON A VACCINE PREPARATION AGAINST LEPTOSPIROSIS

Vildan ÖZDEMİR\*\*

Kadir KAYA\*\*

Kabul Tarihi: 06.11.2000

---

#### ÖZET:

Türkiye genelinde leptospirozis prevalansını belirlemek amacıyla, 73 ilden 15596 adet sığır serumu MAT ile test edilmiş ve bunlardan 1254 adedi (%8.04) pozitif bulunmuştur. Dominant serogrup olarak L. sejroe (%82.46) ve L. grippotyphosa (%17.54) belirlenmiştir. Diğer serogruplarla pozitif reaksiyon veren serum örneğine rastlanmamıştır. Belirlenen bu serogruplar doğrultusunda hazırlanan bivalent aşı, laboratuvar hayvanlarında ve sığırlarda uygulanmıştır. Uygulanan aşı laboratuvar hayvanlarında tam olarak bağışıklık verirken, sığırların ikisinin idrarlarından leptospira atımını engelleyememiştir.

**Anahtar kelimeler:** Leptospira, sığır, MAT, aşı, bağışıklık

#### SUMMARY:

In order to determine the prevalence of leptospirosis in Turkey, 15596 cattle sera were tested by MAT and 1254 of these sera (8.04%) were found to be positive. L. sejroe (82.46%) and L. grippotyphosa (17.54%) were determined as dominant serogroup. No serum sample which gave positive reaction with other serogroups was seen. Bivalent vaccine prepared from applied to laboratory animals gave a complete immunity, it could not prevent shedding of leptospira from the urine of two cattle.

**Key words:** Leptospira, cattle, MAT, vaccine, immunity.

---

\* Aynı adlı TAGEM-HS-96-09-04-001 kod nolu projeden özetlenmiştir.

\*\* Merk. Vet. Etilik Kont. Arş. Enst. ANKARA

## 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. Parazitik olan *L. interrogans*, ikterus, septisemi, anemi, hemoglobinüri, abortus, mastitis ve ölüm ile son bulan infeksiyonlara neden olur.

Leptospirozis konusunda çalışmalar, yattığı ekonomik kayıplar nedeniyle genelde sığır, koyun ve domuz populasyonunda ağırlıklı olarak devam etmekte, hastalıktan korunma ve yayılmasını önlemek amacı ile araştırmalar yapılmaktadır.

Hastalığın ülkemizde özellikle sığır populasyonunda büyük ekonomik kayıplara neden olduğu tahmin edilmektedir. Ülke genelinde geniş kapsamlı serolojik çalışma yapılmadığından hastalığın yaygınlığı konusunda kesin veriler bulunmamaktadır. Ancak yapılan bölgesel çalışmalarda hastalığın daha çok Doğu ve Orta Anadolu bölgelerinde yaygın olduğu, diğer bölgelerde daha az yaygınlıkta görüldüğü tespit edilmiştir. Hastalıkla mücadelede antibiyotik tedavisi ve karantina tedbirlerinin yanı sıra aşılamanın büyük önemi vardır. Hastalığın insidansının düşmesinde leptospira aşılarının etkinliği çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir.

Bu çalışma ile yurdumuzdaki dominant Leptospira serotiplerinin belirlenmesi ve elde edilecek bulgular ışığında, bu serotiplere karşı bir aşı hazırlanması amaçlanmıştır.

Leptospira'lar Gram negatif, hareketli, sporsuz, obligat aerob, kapsülsüz, sarmal biçimde mikroorganizmalardır. Serotipler morfolojik olarak aynıdır. Konvansiyonel mikroskoplarla görülemezler. Anilin boyalarıyla kolay ve iyi boyanmayan leptospiralara, Giemsa ve daha iyi olarak da gümüşleme (Levaditi, Fontana) yöntemleriyle boyanırlar ve görülebilirler. Karanlık saha mikroskobu ile incelendiğinde sıvı besi yeri içerisinde karakteristik hareketleri gözlemlenebilir (15).

Leptospiralann optimum üreme ısıları 28-32 °C'dir. Bölünme fazları 6-16 saattir (23). Leptospiralann kültürleri ve izolasyonu için çeşitli besi yerleri kullanılır. Üremeleri için tiamin (B<sub>1</sub>) siyanocobalamin (B<sub>12</sub>), demir ve 15 veya daha fazla karbon içeren uzun zincirli yağ asitlerine gereksinim duyarlar (22). Patojen suşlar için besi yerlerine %10 sığır serum albumini (14,24) veya tavşan serumu ilave edilir. Stalheim (1966), sığır serum albumininin üreme ve antijenitedeki rolü üzerine yaptığı çalışmasında, özellikle yağ asitleri ile birlikte kullanılması gerekliliğini vurgulamıştır. Kültürler -196 °C'lik nitrojen tanklarında saklanabilir, liyofilize edilemezler (15, 25). Serotipler, biyokimyasal aktiviteleri ile ayrılabilirler (27).

Weil hastalığının etkeni olan Leptospiralann ilk olarak 1915 yılında Japonya ve Almanya'da aynı zamanda identifiye edilmiştir. Daha sonraki yıllarda da diğer leptospiralann bulunmaya devam etmiştir (11). Leptospiralann orijininin Rusya olduğu ve 1729 yılında kahverengi ratların gemilerle Baltık limanlarına ve İngiltere'ye taşındığı ve buralardan dünyaya yayıldığına inanılmaktadır (17). *L. interrogans* türü içindeki parazitik leptospiralann esas konakçıları rat, fare ve tarla faresi gibi kemiricilerdir. Etkenler, evcil hayvanlardan; sığır, domuz, köpek, koyun, keçi ve kedilerden de izole edilmiştir. Leptospira infeksiyonlarının kaynağı, genellikle infekte hayvanların kontamine ettiği mera, içme suyu, infekte idrarın bulaştığı yiyecekler, atık fötuslar ve infekte uterus akıntılardır. Bunların içinde en önemli bulaşma kaynağı idrardır (5).

Türkiye'de leptospirozisin varlığı ilk kez Filistin'e ihraç edilen sığırlarda seropozitifliğin saptanması ile anlaşılmış (1), Çizmen ve arkadaşları ise (1953), hastalığı sığırlarda serolojik olarak saptamışlardır. Türkiye'de sığırlardan ilk leptospira izolasyonu 1954 yılında Özgen ve Tunus tarafından gerçekleştirilmiş ve izolatları "*L. bovis*" adı verilmiştir.

Patojenik leptospiralann rezervuar hayvanların renal tubullerinden çevreye yayılır. Sığır ve domuzlar hastalığın klinik belirtisini göstermeksizin idrarlarının ml.sinde 10<sup>8</sup> mikroorganizma çıkarabilirler ve serumdaki antikor titreleri 1/10 gibi düşük veya tespit edileme-

yen değerde olabilir. 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 bulaşmanın, kontamine suların yüzeyi ve vektör keneler ise indirekt bulaşmanın hayvanlar arasındaki bilinen doğal yoludur (20, 26). İnsan ve hayvanlarda subklinik leptospira infeksiyonunun insidansı, hastalığın insidansından çok daha fazladır. Subklinik infeksiyonlu hayvanlar veya septisemik hastalıktan iyileşenler idrarları ile yedi yıla kadar leptospira çıkarabilirler. Genel olarak cinsiyet farkı önem taşımazken, yaş önemlidir. Genç hayvanlar yetişkinlerden daha duyarlıdır (4).

Besi hayvanlarının leptospiral infeksiyonları genellikle ömür boyu immunité ile sonuçlandığından bir sürüdeki infeksiyonun devamlılığı, duyarlı konakçıların varlığına bağlıdır. Hastalığın yayılması duyarlı hayvanların sayısı ile sınırlıdır. Toprak ve suyun nötr pH'ya sahip oluşu, sıcaklık ve nem gibi leptospiraların yaşamlarını sürdürebilecekleri çevresel faktörler idrarları ile çevreye leptospira saçanların sayısı leptospiraların yayılmasını etkileyen faktörlerdir. (18,26).

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 (4). Leptospiroziste inkubasyon periyodu 5-14 gün arasında değişir. Bu da vücuda giren patojenin sayısına, virulansına ve konakçının duyarlılığına bağlıdır (26).

Leptospirozisin iyileşme dönemi, kanda ve idrarda spesifik antikorların varlığı ve leptospiruri ile karakterizedir. Leptospiralar, insan ve hayvan idrarında, infeksiyondan iki hafta kadar sonra ilk kez görülürler. Birinci haftada sayıları çok fazla artar, daha sonra aralıklarla atılırlar. Bu da hayvan türüne ve serotipe göre değişir (15).

İnsan ve hayvanlardaki leptospirozisin teşhisi her zaman sorun olmuştur. Laboratuvar teşhisi ya etkenlerin kan, idrar, karaciğer ve böbrek gibi organlardan izole edilmesi ile direkt ya da dolaşımdaki spesifik antikorların ortaya konmasıyla indirekt olarak sağlanabilir (21).

Bakteriyoskopi ile kesin sonuca gidilememesi ve kültür sonuçlarının çok zaman alması nedeniyle leptospira antikorlarını belirlemede, aglutinasyon, komplement fiksasyon, hemolitik test ve floresan antikor tekniği gibi serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Mikroskopik Aglutinasyon Test (MAT), (12, 15) standart prosedür olarak kabul edilir ve serolojide en yaygın kullanılan yöntemdir. Test edilecek serumlarda ısı ile inaktivasyona gerek yoktur.

Leptospira kültürlerinden hazırlanan bakterinler, dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazen bunlar diğer hastalık etkenleri ve adjuvanlarla karıştırılırlar. Leptospiraların kimyasal ve fiziksel parçaları hayvanları hem klinik hem de taşıyıcı durumuna karşı korur (28). Hastalığı geçiren hayvanlar, uzun süre bağışık kalırlar ve hastalığa bir daha yakalanmazlar. Kazanılan bağışıklık, serotipe spesifiktir. Konakçılar başka serotiplere karşı duyarlı olurlar.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Örneklerin toplanması:** Türkiye genelinden 15596 adet sığırdan tesadüfi örnekleme metodu ile toplanılan kan serumları kullanıldı. Bu serumlar -20 °C'de korundu ve sırası ile MAT yönünden test edilecek olanlar +4 °C'ye alındı.

**Besiyerleri:** Suşların pasajları, antijen üretimi ve aşının hazırlanmasında modifiye Johnson sentetik besiyeri, sterilite testleri için thioglycollate, tryptone soya buyyon ve kanlı agar besi yerleri kullanıldı.

## Standart Suşlar ve Serumlar:

Antijen olarak, *L. interrogans* serotip grippotyphosa, *icterohaemorrhagiae* hardjo, *pomona*, *canicola*, *hebdomadis* ve *australis*'e ait standart suşlar kullanıldı. Pozitif kontrol (anti-*canicola*, anti-grippytyphosa, anti-icte-

rohaemorrhagiae, anti-pomona, anti-hardjo serumları) ve negatif kontrol serumları Hollanda'dan (Laboratory of Tropical Hygiene Dep. Of Biomedical Research, Royal Tropical Enstitute, Amsterdam) temin edildi. Aşı suşu olarak L. hardjo "Lely 607" ve eprüve suşu olarak L. hardjo "Bakker" aynı enstitüden sağlandı.

#### **Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT)**

**Mikroskopik aglutinasyon test antijeni:** Sıvı Johnson besiyerinde üretilen suşların bir seri pasajı yapıldı ve 4-14 gün 30 °C'de inkube edildi. Canlı leptospiraların sayısı Hawksley Thoma lamı ile  $1-2 \times 10^8$ /ml'ye ayarlandı. Kullanılacak antijenlerde spontan kümeleşmenin olmamasına dikkat edildi. Kümeleşme görülen antijenler, 1.2 µm porlu membran filtreden (Sartorius Minisart) süzülme ve tutunmalar giderildi. Serolojik testlerde antijen olarak canlı Leptospira organizmaları kullanıldı.

Mikroskopik aglutinasyon testinin yapılışı: Çalışmada fazla miktarda kan serumunun test edileceği düşünülerek, toplanan serumlar on'lu gruplar halinde birleştirildi ve 1/50 oranında sulandırıldı. Seçilen canlı leptospira kültürleri ile eşit miktarda karıştırıldı. Birer sıraya pozitif ve negatif kontrol serumları konuldu. Pleytler iyice çalkalandı ve 30 °C'de 3 saat inkube edildi. Sonuçlar karanlık saha mikroskopunda değerlendirildi. Negatif reaksiyon veren gruplar ayrıldı. Pozitif reaksiyon veren gruplardaki serumların tek tek 1/50'den 1/6400'e kadar sulandırması yapılarak hangi serotip/serotipler ile reaksiyon vermişler ise, o serotipe/serotiplere ait kültürler ile tekrar test edildiler. Pozitif kontrolden ve en yüksek sulandırmadan başlamak üzere, serum-antijen karışımından bir öze dolusu alınarak, bir lam üzerine konuldu ve 10X objektif ile lamel kapatmadan değerlendirildi. %50 aglutinasyon görülen son sulandırma, serum titresi olarak belirlendi. 1/100 ve üzerindeki sulandırmalarda %50 aglutinasyon görülmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi (12).

**Aşı suşunun seçimi:** Aşı suşunun belirlenmesi amacıyla, yurdumuzdan en son izole

edilmiş olan ve grippotyphosa serogrubuna ait 7 izolat (kurşunlu, dadaş, keskin, haymana, peçenek, fevziye ve şehitali), sejroe serogrubuna ait 2 izolat (lely 607 ve bakker) farelerde pasaja tabi tutuldu. Sonra bu suşlar, antikor oluşturma güçlerini belirlemek için kobaylara derialtı yolla verildi. Dört hafta sonra kobayların kan serumları toplanarak MAT ile antikor düzeyleri tespit edildi.

**Aşının üretimi:** Kobaylarda MAT ile antikor düzeyi en yüksek bulunan L. grippotyphosa serogrubundan Kurşunlu suşu ve L.sejroe serogrubundan hardjobovis Lely 607 suşu, bir seri tüpte 30 °C'de 7-10 gün boyunca inkübe edilerek üretildi. Karanlık saha mikroskopunda, üremeleri ve kontaminasyonları yönünden kontrol edildi. Besi yerlerinin miktarları artırılarak üretime devam edildi. Yeterli yoğunluğa ulaşan kültürlerin thioglycollate, tryptone soya buyyon ve kanlı agar besi yerlerinde (European farmakopi'ye göre) sterilite testleri yapıldı. Steril bulunan kültürlerin ml'deki mikroorganizma sayısı, karanlık sahada Hawksley-Thoma lamı ile belirlendi. Kültürler, 4500 devir/sn'de 30 dakika boyunca santrifüj edilerek yoğunlaştırıldıktan ( $1.5 \times 10^{10}$ ) sonra %1'lik merthiolate ile 1/10000 oranında inaktive edildi ve 24 saat boyunca shaking inkubatörde bırakılarak absorpsiyonu sağlandı. İnaktive edilen kültürler, tekrar Johnson besi yerlerine ekilerek canlılık yönünden muayeneleri yapıldı. Bu aşamadan sonra her iki suşa ait inaktive kültürler birbirine karıştırıldı ve % 10 oranında jel alimünyum hidroksitle muamele edildi.

**Toksisite testi:** Toksisite testi amacıyla, hazırlanan aşı, fare ve kobaylara sırasıyla 0.5 ml ve 2.0 ml ( $1.5 \times 10^{10}$ /ml) olmak üzere derialtı yolla verildi. Bu amaçla her gruptan üç hayvan kullanıldı. Fareler 7 gün ve kobaylar 10 gün boyunca gözlemlendiler.

**Potens testi:** Bu amaçla, üç aylıktan küçük 10 adet hamster, 21 gün ara ile iki kez olmak üzere, bir sığır dozunun ( $3.0 \times 10^{10}$ ) 1/100'ü oranında immunize edildi. Son aşılardan iki hafta sonra, deney grubundaki ve kontrol grubundaki (beş adet) hamsterler, daha önceden L. hardjo Bakker ve L. grippotyphosa Remzigül suşları ile infekte edilmiş

hamsterlerden alınan 0.5'er ml böbrek ve karaciğer emülsiyonlarıyla - intraperitoneal yolla - eprüve edildiler. Eprüvasyon öncesi, böbrek ve karaciğer emülsiyonları, karanlık saha mikroskobunda leptospiraların varlığı yönünden test edildiler.

**Sığırlarda bağışıklık tespiti:** Daha önceden leptospira yönünden seronegatifliği MAT ile tespit edilen 8-10 aylık kulak numaraları belli olan on adet erkek dana enstitümüzün deney hayvanları binasına konuldular. Bunlardan altı tanesine hazırlanan aşından 2 ml ( $3.0 \times 10^{10}$  adet leptospira) üç hafta ara ile iki kez olmak üzere derialtı yolla verildi. Son aşılama sonrakı beş ay boyunca değişik tarihlerde, hayvanlardan kan alınarak serumlarında MAT ile antikor titreleri tayin edildi. Daha sonra bu altı adet aşı ve dört adet kontrol dana, kas içi (5 ml) ve konjonktival yollardan ( bir damla), L. hardjo Bakker ve L. grippotyphosa Remzigül suşlarıyla eprüve edildiler. Kontrol olarak ayrılan ve eprüve edilen 1422 kulak no'lu boğa zincirine dolanarak bacağını kırarak, yatmadan kaynaklanan timpani sonucu asfeksiden öldü ve yakılarak imha edildi. Bütün danaların klinik yönden günlük kontrolleri yapıldı, vücut ısıları kaydedildi ve eprüvasyondan sonraki üçüncü haftada, hayvan başına 5ml olacak şekilde furosemid verilerek idrarları alındı ve karanlık saha mikroskobuyla leptospiraların varlığına bakıldı. Eprüvasyondan 40 gün sonra kesime sevk edilen danaların kanlarında MAT ile antikor düzeylerine bakıldı ve karaciğer, böbrek ve idrarlarından Johnson besi yerine ekimler yapıldı.

## BULGULAR

Kan serumlarının değerlendirilmesi: Türkiye genelinden toplanan 73 ile ait 15596 adet sığır kan serumundan 1254 adedi (%8.04) leptospirozis yönünden müspet, 14342 adedi (%91.96) menfi bulundu (Tablo 1). Müspet bulunan serumlardan 220 adedi ( %17.54) L. grippotyphosa ile, 1034 adedi (%82.46) L.hardjo ile çeşitli titrelerde (1/100-1/6400) reaksiyon verdi. Kullanılan diğer serotiplere karşı herhangi bir müspet reaksiyon gözlenmedi.

**Aşı suşunun seçimi ve üretimi:** Aşı suşunun seçimi amacıyla kobaylara verilen 7 yerli grippotyphosa izolatından ve Hollanda'dan gelen iki hardjobovis suşundan en yüksek antikor titresini, Kurşunlu suşu (1/1600) ve Lely 607 suşu (1/800) verdi (Tablo 2). Diğer izolatlar, daha düşük düzeylerde (1/100-1/800) antikor titreleri verdi. Bu nedenle bu iki suş aşı hazırlanmasında kullanıldı. Aşı suşlarının üretimi sonrası yapılan sterilite testlerinde herhangi bir kontaminasyon görülmedi.

**Toksosite ve potens:** Yapılan toksosite testlerinde, yedi-on gün boyunca gözlemlenen fare ve kobaylarda olumsuz bir reaksiyona rastlanmadı. Potens testlerinde ise, aşılama hayvanların hepsi eprüvasyon sonrası sağ kalırken, kontrol grubundaki hamsterlerden dördü, 6-8inci günler arası öldü; bir adedi ise sağ kaldı (European farmakopi esas alınmıştır).

**Sığırlarda bağışıklık testleri:** Aşılı hayvanlarda belirli aralıklarla alınan kan serumları incelendiğinde, her iki Kurşunlu (K) ve Lely 607 (L) antijenlerine karşı antikor düzeylerinin düşme eğiliminde olduğu ve eprüvasyondan sonraki titrelere ise genellikle yeniden arttığı gözlemlendi (Tablo 3a, 3b). Eprüvasyondan sonraki bir hafta boyunca, vücut ısıları alınan aşı hayvanlarda derece artışı gözlenmezken ( $38.5^{\circ}\text{C}$  - $39.0^{\circ}\text{C}$  ), kontrol grubundaki hayvanlarda yüksek beden ısıları tespit edildi ( $39.6^{\circ}\text{C}$ - $41.2^{\circ}\text{C}$ ). Eprüvasyondan sonraki 16 ve 24 üncü günlerde, kontrol grubundaki hayvanlardan steril koşullarda alınan idrarların karanlık saha ile muayenesinde leptospiralar görülürken, aşı hayvanlarda leptospiralara rastlanmadı. Kesim sırasında, aşı hayvanlardan alınan karaciğer ve böbreklerde yapılan makroskobik muayenede herhangi bir patolojiye rastlanmazken, aşı hayvanların böbreklerinin solgun olduğu ve üzerinde yoğun beyaz nekrotik odakların bulunduğu gözlemlendi. Yine bu organlardan ve idrar kesesinden yapılan karanlık saha mikroskobu incelemelerinde; aşı hayvanlarda leptospiralar görülürken, aşı hayvanlardan yalnızca 2176 ve 2156 kulak nolu olanlarda leptospiralar görüldü (Tablo 4). Mikroorganizmaları kültüre etmek için yapılan çalışmalar sonuçsuz kaldı.

Tablo 1. İllere göre serum sayıları ve serotiplere göre reaksiyon sonuçları

İLLER	Gelen Serum Sayısı	Müspet Serum		Serotiplere Göre Müspet Serum Sayısı									Menfi Serum Sayısı
				Grip.Moskova V		Sej. H. pratijno.		Aust. Ball.	Pom. Pom.	Can. Can.	İct. RGA	Heb. Heb.	
		Adet	%	Adet	%	Adet	%						
Adana	240	38	53.83	17	44.70	21	55.3	-	-	-	-	-	202
Adıyaman	110	11	10.0	11	100	-	-	-	-	-	-	-	99
Afyon	130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	130
Ağrı	245	105	42.85	-	-	105	100	-	-	-	-	-	140
Amasya	100	4	4.00	-	-	4	100	-	-	-	-	-	96
Ankara	240	17	7.08	1	5.80	16	94.2	-	-	-	-	-	223
Antalya	175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	175
Artvin	240	57	23.75	-	-	57	100	-	-	-	-	-	183
Aydın	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240
Balıkesir	240	22	9.16	22	100	-	-	-	-	-	-	-	218
Bilecik	100	6	6.00	-	-	6	100	-	-	-	-	-	94
Bingöl	180	24	13.33	-	-	24	100	-	-	-	-	-	156
Bitlis	180	9	5.00	-	-	9	100	-	-	-	-	-	223
Bolu	240	17	7.08	-	-	17	100	-	-	-	-	-	223
Burdur	210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	210
Bursa	240	8	3.33	8	100	-	-	-	-	-	-	-	232
Çanakkale	270	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	270
Çankırı	240	25	10.41	14	14.56	11	44	-	-	-	-	-	215
Çorum	180	15	8.33	8	53.30	7	47.7	-	-	-	-	-	165
Denizli	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240
Diyarbakır	130	34	26.15	-	-	34	100	-	-	-	-	-	96
Edirne	240	6	2.50	6	100	-	-	-	-	-	-	-	234
Elazığ	185	5	2.70	-	-	5	100	-	-	-	-	-	180
Erzincan	180	27	15.00	-	-	27	100	-	-	-	-	-	153
Erzurum	240	60	25.00	9	15	51	85	-	-	-	-	-	180
Eskişehir	50	6	12.00	-	-	6	100	-	-	-	-	-	44
Gaziantep	240	2	0.83	-	-	2	100	-	-	-	-	-	238
Giresun	240	4	1.66	-	-	4	100	-	-	-	-	-	236
Gümüşhane	245	15	6.12	-	-	15	100	-	-	-	-	-	230
Hakkari	195	39	20.00	-	-	39	100	-	-	-	-	-	156
Hatay	240	6	2.50	3	50	3	50	-	-	-	-	-	234
Isparta	175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	175
İçel	240	34	14.16	-	-	34	100	-	-	-	-	-	206
İstanbul	240	23	9.58	22	95.60	1	4.4	-	-	-	-	-	217
İzmir	240	4	1.66	-	-	4	100	-	-	-	-	-	236
Kars	245	84	34.85	-	-	84	100	-	-	-	-	-	161
Kastamonu	240	7	2.91	-	-	7	100	-	-	-	-	-	233
Kayseri	555	53	9.54	6	11.30	47	88.7	-	-	-	-	-	502
Kırklareli	240	17	7.08	5	29.40	12	69.6	-	-	-	-	-	223
Kırşehir	240	19	7.91	5	26.30	14	73.7	-	-	-	-	-	221
Kocaeli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Konya	240	20	8.33	-	-	20	100	-	-	-	-	-	220
Kütahya	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240
Malatya	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	150
Manisa	240	1	0.41	1	100	-	-	-	-	-	-	-	239
K.Maraş	240	13	5.41	2	15.30	11	84.70	-	-	-	-	-	227
Mardin	240	14	5.83	-	-	14	100	-	-	-	-	-	226

İLLER	Gelen Serum Sayısı	Müspet Serum		Serotiplere Göre Müspet Serum Sayısı									Menfi Serum Sayısı	
				Grip.Moskova V		Sej. H. pratijno.		Aust. Ball.	Pom. Pom.	Can. Can.	İct. RGA	Heb. Heb.		
				Adet	%	Adet	%							Adet
Muğla	240	4	1.66	-	-	4	100	-	-	-	-	-	-	236
Muş	240	63	26.25	41	65.00	22	35.00	-	-	-	-	-	-	177
Nevşehir	200	19	9.50	1	5.21	18	94.80	-	-	-	-	-	-	181
Niğde	150	3	2.00	-	-	3	100	-	-	-	-	-	-	147
Ordu	240	10	4.16	-	-	10	100	-	-	-	-	-	-	230
Rize	175	7	4.00	-	-	7	100	-	-	-	-	-	-	168
Sakarya	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240
Samsun	240	4	1.66	2	50	2	50	-	-	-	-	-	-	236
Siirt	196	10	5.10	-	-	10	100	-	-	-	-	-	-	186
Sinop	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	150
Sivas	295	30	10.16	-	-	30	100	-	-	-	-	-	-	265
Tekirdağ	240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	240
Tokat	170	15	8.82	6	40	9	60	-	-	-	-	-	-	155
Trabzon	240	9	3.75	-	-	9	100	-	-	-	-	-	-	231
Tunceli	80	18	22.50	-	-	18	100	-	-	-	-	-	-	62
Şanhurfa	240	40	16.66	17	42.50	23	57.5	-	-	-	-	-	-	200
Uşak	100	5	5.00	3	60	2	40	-	-	-	-	-	-	95
Van	65	8	12.30	-	-	8	100	-	-	-	-	-	-	57
Yozgat	240	9	3.75	7	77.70	2	22.3	-	-	-	-	-	-	231
Zonguldak	250	19	7.60	-	-	19	100	-	-	-	-	-	-	231
Aksaray	240	3	1.25	2	66.60	1	33.4	-	-	-	-	-	-	237
Bayburt	245	15	6.12	-	-	15	100	-	-	-	-	-	-	230
Karaman	170	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	170
Kırıkkale	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Batman	240	19	7.91	-	-	19	100	-	-	-	-	-	-	221
Şırnak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bartın	240	20	8.33	1	5	19	95	-	-	-	-	-	-	220
Ardahan	240	27	11.25	-	-	27	100	-	-	-	-	-	-	213
İğdr	240	46	19.16	-	-	46	100	-	-	-	-	-	-	194
<b>Toplam</b>	<b>15596</b>	<b>1254</b>	<b>8.04</b>	<b>220</b>	<b>17.54</b>	<b>1034</b>	<b>82.46</b>	-	-	-	-	-	-	<b>14342</b>

Tablo 2. Aşı süşunun seçimi için kobaylarda saptanan antikor titreleri.

Suş adı	Titre
Şehitali	1/400
Fevziye	1/800
Peçenek	1/200
Haymana	1/100
Dadaş	1/200
Kurşunlu	1/1600
Keskin	1/100
Leyl 607	1/800
Bakker	1/200

**Tablo 3a: Aşılı ve kontrol grubuna ait hayvanlarda 1/10 ile başlayan sulandırmadaki antikor düzeyleri**

Kulak No	Antikor Düzeyleri							
	Aşılardan sonra 2. ay		Aşılardan sonra 3. ay		Aşılardan sonra 5. ay		Eprüvasyondan Sonra 40. gün	
	K	L	K	L	K	L	K	L
2176-Aşılı	1/320	1/160	1/160	1/160	1/80	1/40	1/320	1/80
2226-Aşılı	1/320	1/160	1/320	1/40	1/80	1/20	1/320	1/80
1421-Aşılı	1/320	1/80	1/320	1/40	1/80	1/20	1/320	1/80
2156-Aşılı	1/320	1/160	1/320	1/80	1/160	1/80	1/160	1/80
2206-Aşılı	1/160	1/80	1/160	1/80	1/40	1/20	1/160	1/80
2286-Aşılı	1/160	1/80	1/160	1/40	1/80	<1/10	1/160	1/80
2256-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/1280	1/160
1423-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/1280	1/160
2456-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/320	1/80

**Tablo 3b: Aşılı ve kontrol grubuna ait hayvanlarda 1/25 ile başlayan sulandırmadaki antikor düzeyleri**

Kulak No	Antikor Düzeyleri							
	Aşılardan sonra 2. ay		Aşılardan sonra 3. ay		Aşılardan sonra 5. ay		Eprüvasyondan Sonra 40. gün	
	K	L	K	L	K	L	K	L
2176-Aşılı	1/400	1/200	1/200	1/200	1/100	1/50	1/400	1/100
2226-Aşılı	1/400	1/100	1/400	1/50	1/100	1/25	1/400	1/100
1421-Aşılı	1/200	1/100	1/200	1/50	1/100	1/25	1/400	1/100
2156-Aşılı	1/400	1/200	1/200	1/100	1/100	1/100	1/200	1/100
2206-Aşılı	1/200	1/100	1/200	1/100	1/50	1/25	1/200	1/100
2286-Aşılı	1/200	1/100	1/200	1/50	1/100	1/25	1/200	1/100
2256-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/1600	1/200
1423-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/1600	1/200
2456-Aşısız	-	-	-	-	-	-	1/400	1/50

**Tablo 4: Kesime sevk edilen aşılı ve aşısız hayvanların karanlık saha mikroskopuyla tetkikleri**

Kulak No	Karaciğer	Böbrek	İdrar Kesesi
2176 - Aşılı	+	+	-
2226 - Aşılı	-	-	-
1421 - Aşılı	-	-	-
2156 - Aşılı	-	+	-
2206 - Aşılı	-	-	-
2286 - Aşılı	-	-	-
2256 -Aşısız	+	+	+
1423 -Aşısız	Kontamine	+	+
2456 -Aşısız	Kontamine	+	+



## TARTIŞMA VE SONUÇ

Leptospirozis, sığırlardaki ekonomik önemi düşünüldüğünde dünyadaki hastalıkların sıralamalarında başlarda yer almaktadır. Sığırlardan 14 serogruba ait izolasyon yapılırken, bunlardan 7-8'i dünya çapında yaygınlık arz etmektedir. Ülkeler yaptıkları serolojik çalışmalar ile dominant serotiplerini belirlemişlerdir. Portekiz'de yapılan bir çalışmada, test edilen sığır serumlarında %15.3 oranında pozitif titre elde edilmiş ve Sejroe, Pomona ve Hebdomadis, dominant serogrup olarak bulunmuştur (30). Çekoslovakya'da sığırlarda yapılan bir başka çalışmada ise hastalığın prevalansı %7.4 olarak bulunmuş ve pozitif serumların da %61.8'i grippotyphosa, % 18.9'u ise sejroe olarak bildirilmiştir (33). Ülkemizin doğu illerinde yapılan bir çalışmada, sığır serumlarında %17.8 oranında müspet sonuç bulunmuş olup, dominant serogrup sejroe olarak tespit edilmiştir (10). Batı Anadolu ve Trakya'daki sığırlarda yapılan bir başka çalışmada ise müspet reaksiyon oranı %8.5 olarak tespit edilmiştir (34). Bizim tarafımızdan yapılan bu çalışma ise, tüm Türkiye genelinde yapılması sebebiyle bir ilk teşkil etmektedir. Bulunan %8.04'lük prevalans, diğer çalışmalarla paralellik göstermekle beraber, dominant serogruplar ve oranları yönünden diğer ülkelerle farklılık arz etmektedir (L.grippyphosa %17.54, L.sejroe %82.46). Hastalığın Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak oldukça yaygın olduğu ve diğer bölgelerde daha az yaygınlıkta görüldüğü tespit edilmiştir.

Leptospirozisde oluşan antikorların immunité ile ilişkisine dair değişik sonuçlar bildirilmiştir. Bazı laboratuvar çalışmalarında leptospirozise karşı humoral antikorlar yoluyla immunité oluştuğu saptanmıştır (16). Buna karşın diğer bazı çalışmalarda aşılardan hayvanlardaki antikor düzeyi ile korunma arasında doğru bir orantı gözlenmemiştir (7, 8). Benzer şekilde, bizim yaptığımız çalışmada da, aşıları hayvanlarda MAT ile tespit edilen antikor düzeyleri ile leptospiraların idrarla atılımı ara-

sında bir ilişki gözlenmemiştir. Aglutinasyon reaksiyonu, immunolojik korunmanın bir ölçüsü olarak kullanıldığında, bakterinlerin yeterince immunojenik olmadığı şeklinde yanlış yoruma varılabilir. Aglutinasyon ve korunma arasındaki farklılık, aşılama yoluyla antijenik stimulasyondan sonra oluşan immunoglobulinlerin farklı sınıf ve özelliklerinin sonucudur. Yüksek oranda bulunmalarından dolayı IgM antikorları oldukça etkin aglutininler iken, IgG antikorları, nötralize edici etkileri ve fagositozla daha yakın olarak ilişkilidir ve aglutinasyona kısmen katkı sağlarlar (19).

Aşı üretiminde proteinsiz veya düşük protein içeren besi yerleri tercih edilmekle beraber (2), aynı araştırmacılar daha sonra, proteinsiz ortamda üretilen leptospira aşılarının, sığır serumu içeren besiyerlerinde yapılanlara nazaran bir üstünlüğü bulunmadığını bildirmişlerdir (3). Serum proteinlerini içeren aşılar, homolog türlerden proteinler kullanılsa bile, hipersensitivite reaksiyonlarına yol açmaktadır. Fakat buna karşılık bazı araştırmacılar, leptospiral antijenlerin kendilerinin, hipersensitivite reaksiyonlarına sebep olabileceğini ileri sürmüşlerdir (9). Yapılan bu çalışmada da sığır albuminli besi yerleri kullanılmasına rağmen hipersensitivite reaksiyonları gözlenmemiştir.

Bu çalışmada kullanılan kontrol grubu deney hayvanlarında, epruvasyondan sonra leptospiralar, karanlık saha mikroskopuyla görülmelerine rağmen, laboratuvar koşullarında izolasyonu yapılamamıştır. Aşıları ve aşısız hayvanlardan, leptospiraların neden izole edilemediğine dair net bir görüş yoktur. Bolin ve ark.(1989a), yapmış oldukları çalışmada, aşıları hayvanların idrarlarında leptospiraları görmelerine rağmen, büyük çoğunluğundan leptospiraları izole etmede başarısız kalmışlardır. Bu duruma ilişkin nedenlerden birisi, aşıları hayvanların idrarlarındaki antikorlar (32) veya üremeyi engelleyici başka maddelerin varlığı olabilir. Ayrıca idrarda az sayıda leptospiraların bulunması invitro koşullarda üretilmesinin önünde bir engel olabilir (7).

#### KAYNAKLAR

- 1- **BERNKOPF H** (1948). *Report on bovine leptospirosis in Palestine. Government of Palestine bord for scientific industrial research, Jerusalem, P,1-23.* Hakioglu F. (1968). *Hayvanlarda leptospiral enfeksiyonlar ve memleketimizde yapılan araştırmalar*, Mikrobiyol Derg,1-2, 1-28.
- 2- **BEY R.F, JOHNSON R.C** (1978a). *Protein-free and low-protein media for the cultivation of leptospira*. J Clin Microbiol, 19,562-569.
- 3- **BEY R. F, JOHNSON R. C** (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.
- 4- **BLOBEL H, SCHLIEBER T** (1985). *Leptospira*. Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.
- 5- **BLOOD D.C, HENDERSON J.A** (1979). *Diseases caused by leptospira spp*. Vet Med, 5, 565-572.
- 6- **BOLIN C. A, THIERMANN A. B, HANDSAKER A. L, FOLEY J. W** (1989a). *Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle*. Am J Vet Res 50, 161-165.
- 7- **BOLIN C. A, ZUERNER R. L, TRUEBA G** (1989b). *Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine containing Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjo-bovis on type hardjo-bovis infection of cattle*. Am J Vet Res 50, 2004-2008.
- 8- **BOLIN C. A, CASSELLS J. A, ZUERNER R. L, TRUEBA G** (1991). *Effect of vaccination with a monovalent Leptospira interrogans serovar hardjo type hardjobovis vaccine on type hardjo-bovis infection of cattle*. Am J Vet Res 52, 1639-1643.
- 9- **BROUGHTON E.S, SCARNELL J** (1985). *Prevention of renal carriage of leptospirosis in dogs by vaccination*. Vet Rec, 117, 307-311.
- 10- **BULU A. A, DÖRTERLER R, ÖZKAN Ö, HOŞTÜRK F** (1990). *Doğu Anadolu'nun bazı illerinde (Kars, Artvin, Gümüşhane, Erzurum) sığır ve koyunlarda leptospirozis vakaları üzerine araştırma*. Etlik Vet Mikrobiol Derg, 6, 49-60.
- 11- **BUXTON A, FRASER G** (1977). *Leptospira*. Anim Microbiol, 1, 253-259.
- 12- **COLE J.R, SULZER C. R, PURSELL A. R** (1973). *Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test*. Appl Microbiol, 25, 976-980.
- 13- **ÇİZMEN F, ÖZGEN H, SUVAT S** (1953). *Yeni bir leptospira vak'ası*, Türk Vet Hek Dern Derg 78, 623. Hakioglu F. (1968). *Hayvanlarda leptospiral enfeksiyonlar ve memleketimizde yapılan araştırmalar*. Mikrobiol Derg,1-2, 1-28.
- 14- **ELLINGHOUSEN H. C, McCULLOUGH W.G** (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.
- 15- **FAINE S** (1982). *Guidelines for the control of Leptospirosis*. World Health Organisation-Geneva.
- 16- **FLINT S.H, LIARDET D. M** (1980). *A trivalent leptospiral vaccine with emphasis on a Leptospira interrogans serovar hardjo component to prevent leptosporia*. N Z Vet J, 29, 263-266.
- 17- **GSELL O** (1984). *The history of Leptospirosis: 100 Years*. Zbl Bakt Hyg, 257, 473-478.
- 18- **HANSON L.E** (1982). *Leptospirosis in domestic animals: The public health perspective*. J Am Vet Med Assoc, 181, 1505-1509.
- 19- **HARTMAN E.G** (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.
- 20- **HARTMAN E.G** (1984b). *Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands*. Zbl Bakt Hyg, 258A, 350-359.

**21- HARTMAN E.G, VAN HOUTEN M, VAN DER DONK J.A, FRIK J.F** (1984a). *Serodiagnosis of canine leptospirosis by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay.* Vet Immunol Immunopathol, 7,33-42.

**22- HOLT J. G, KRIEG N. R, SNEATH P. H. A, STALEY J. T, WILLIAMS S. T** (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Ed.* Williams & Wilkins, Baltimore.

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

**24- JOHNSON R. C, HARRIS V. G** (1967). *Differentiation of pathogenic and saprophytic Leptospira.* J Bacteriol, 94, 27-31.

**25- JOHNSON R. C, ROGERS P** (1964a). *5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospira.* J Bacteriol, 87, 422-426.

**26- MICHNA S. W** (1970). *Leptospirosis.* Vet Rec, 86,484-496.

**27- MOHN S. F, SANDVIK O** (1976). *Serological investigations of leptospiral deoxyribonucleases.* Acta Vet Scand, 17, 354-358. Blobel H., Schlieber T. (1985). *Leptospira.* Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

**28- MORRIS J. A, ORR H. S** (1979). *Immunity induced in hamsters vaccinated with a ribosome extract of L. interrogans serogrup icterohaemorrhagiae.* J Biol Standardisation, 7, 81-87. Blobel H, Schlieber T. (1985). *Leptospira.* Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, V, 90-154.

**29- ÖZGEN H, TUNUS M** (1954). *Türkiye'de ilk olarak Leptospira bovis suşunun kültürel geliştirilmesi.* Türk Vet Hek Dern Derg, 98, 1865-1866.

**30- ROCHA T** (1998). *A review of leptospirosis in farm animals in Portugal.* Rev Sci Tech, 17, 699-712.

**31- STALHEIM O. H. V** (1966). *Leptospiral selection, growth, and virulence in synthetic medium.* J Bacteriol, 92, 946-951.

**32- STUART R.D** (1956). *The importance of urinary antibodies in the diagnosis of leptospirosis.* Can J Microbiol, 2, 288-297.

**33- TREML F, NESNALOVA E** (1995). *Leptospirosis in slaughter cattle-serologic and bacterial study.* Vet Med (Praha), 40,305-309.

**34- 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.