

Aşılı Köpeklerin İdrarlarında *Leptospira* spp. Varlığının PCR Yöntemi ile Araştırılması*

Özgür Akgül¹, Özer Akgül², Naciye Yakut Özgür¹

¹*İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyoloji AD, İstanbul*

²*İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul*

Geliş Tarihi / Received: 26.08.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 29.11.2019

Özet: Leptospiroz; Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik bir bakteri olan *Leptospira* spp.'nin neden olduğu çoklu organ tutulumları ile seyreden zoonoz bir enfeksiyon hastalığıdır. Leptospiroz teşhisi için; klinik/otopsi bulguları, mikroskopi, kültür, hayvan deneyleri, seroloji ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada, İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine getirilen leptospiroza karşı aşılanmış köpeklerin idrar örneklerinde *Leptospira* spp. varlığının hızlı ve duyarlı bir yöntem olduğu bildirilen real-time PCR tekniği ile saptanması ve *Leptospira* spp. pozitifliği ile idrar yoluna ait semptomlar, yaş ve cinsiyet gibi değişkenlerin istatistiksel ilişkisinin karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, idrar yolu semptomu olan ve olmayan toplam 100 aşılı köpekten (56 dişi, 44 erkek) alınan idrar örnekleri randomize olarak dahil edilmiştir. *Leptospira* spp. varlığının belirlenmesi amacı ile alınan idrar örneklerinde DNA ekstraksiyonu ve real-time PCR yöntemi uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen 100 köpeğe ait idrar örneklerinin 7 (%7) tanesi *Leptospira* spp. varlığı açısından pozitif bulunmuştur. Saptanan pozitifliklerin gruplara göre düzensiz dağılımı ve olgu sayısının istatistiksel anlamlılığa etki edecek düzeyde yeterli olmayabileceği gibi nedenlerden dolayı; yaş, cinsiyet farklılığı gibi demografik veriler ve semptomu olan veya olmayan köpeklerin PCR pozitiflikleri istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunamamıştır. Leptospirozun günümüzdeki öneminin daha açık bir şekilde anlaşılabilmesi, teşhisinde kullanılacak en uygun yönteminin belirlenebilmesi, aşılanmanın önleyici etkilerinin değerlendirilebilmesi gibi amaçlar ile; daha çok olgu sayısını içeren, prospektif ve tedavi seçeneklerinin de değerlendirildiği geniş araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Aşı, *Leptospira* spp., PCR

Investigation of the Presence of *Leptospira* spp. PCR in Urine Sample of Vaccinated Dogs

Abstract: Leptospirosis is a zoonotic infectious disease with multiple organ involvement caused by *Leptospira* spp., a Gram-negative, non-spore-free, non-capsular and aerobic bacterium. For the diagnosis of leptospirosis; clinical/autopsy findings, microscopy, culture, animal experiments, serology and PCR (Polymerase Chain Reaction) methods are used. In this study, the presence of *Leptospira* spp. in urine samples of dogs vaccinated against Leptospirosis brought to private veterinary clinics in İstanbul province was determined by a real-time PCR technique which was reported to be a fast and sensitive method, and a comparative evaluation of *Leptospira* spp. positivity with urinary tract symptoms, age and gender were compared. Urine samples from 100 vaccinated dogs (56 females, 44 males) with and without urinary tract symptoms were randomly included in the study. In order to determine the presence of *Leptospira* spp., DNA extraction and real-time PCR were performed in urine samples. Of the 100 dogs included in the study, 7 (7%) were positive for the presence of *Leptospira* spp.. Due to the irregular distribution of the positives determined by the groups and the number of cases may not be sufficient to affect the statistical significance; demographic data such as age, sex differences and PCR positivity of dogs with or without symptoms were not found statistically significant. To understand the current importance of leptospirosis more clearly, to determine the most suitable method for diagnosis, to evaluate the preventive effects of vaccination; more studies including prospective and treatment options are needed.

Key words: *Leptospira* spp., PCR, Vaccine

Giriş

Leptospiroz Gram negatif, sporsuz, kapsülsüz ve aerobik spiroket şekilli bir bakteri olan *Leptospira* türlerinin neden olduğu bir hastalıktır. Dünyada

yaygın olarak görülen leptospiroz, köpeklerde grip benzeri lezyonlarla karakterize anikterik formdan ikterik forma (Weil Hastalığı) kadar geniş kliniğe sahip bakteriyel kökenli bir zoonotik enfeksiyon

* **Etik Kurul Onayı:** İlgili araştırma, T. C. İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.07.2010 tarih ve 121 numaralı karar ile incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 13965 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

Yazışma adresi / Correspondence: Özgür Akgül (ORCID: 0000-0002-2019-5621), Forvet Veteriner Kliniği Yalı Mah. Şehit Nedim Özpölat Sok. Maltepe Stadı No:2/B Maltepe, İstanbul E-posta: akgulozer@hotmail.com

hastalığıdır (Ellis 2015). Köpeklerde bu hastalığa sıklıkla *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira pomona*, *Leptospira bratislava* ve *Leptospira hardjo* türleri neden olmaktadır (Schuller ve ark. 2015). *Leptospira* türlerinin bulaşı genellikle kontamine meralar, içme suları, atık fütuslar, uterus akıntıları ve en önemlisi de infekte idrarla temas yolu ile gerçekleşmektedir. Enfeksiyon başta tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkeler olmak üzere, canlıların yaşadığı tüm bölgelerde görülebilmektedir (Pinto ve ark. 2017). Leptospiroz için olası risk grupları arasında tarım işçileri, maden işçileri, lağım/kanal temizleyenler, kasaplar, hayvan yetiştiricileri, veteriner hekimler, avcılar, çöp toplayıcılar ve endemik bölgelerde bulunan askerler yer almaktadır. Bu nedenle, leptospiroz uzun süre çiftçiler, veteriner hekimler, kanalizasyon işçileri için mesleki bir hastalık olarak düşünülmüştür (Bergman ve ark. 2017b).

Bildirimi zorunlu olmayan ve tanısındaki zorluklar nedeniyle, leptospiroz için global olarak bildirilmiş güvenilir bir epidemiyolojik veri bulunmamaktadır. Ancak, Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) bağlı Leptospirosis Burden Epidemiology Grubu dünya genelinde yıllık 48.600 ölüme neden olan toplamda 873.000 leptospiroz vakası olduğunu tahmin etmektedir (WHO 2019). Genellikle böbrek proksimal tübülüsüne kolonize olan ve klinik belirti göstermeyen *Leptospira* türleri rezervuar konaklar tarafından idrarla birkaç gün veya yaşam boyunca atılabilmektedir. Böylece bakteri indirekt olarak çevresel nem, nötral toprak ve ılık iklim koşulları gibi faktörlere bağlı olarak bulaşabilmektedir (Knöpfler ve ark. 2017). Leptospiroz tanısının hızlı bir şekilde konması uygun tedavi ve infekte köpeklerin zoonotik açıdan risk oluşturması nedeniyle önem kazanmaktadır. Günümüzde Mikroskobik Aglutinasyon Testi (MAT) kısıtlılıklarına rağmen (erken enfeksiyonda negatif, aşıya bağlı antikolar nedeniyle pozitif sonuç alınması) köpeklerdeki leptospiroz için hala önerilen doğrulama testi olarak kabul edilmektedir. Bazı merkezlerde Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi, IgG ve IgM antikoları arasında sahip olduğu ayırım yeteneği ile mevcut enfeksiyon ve aşılama durumlarını ayırt edebilen bir test olarak tercih edilmektedir. *Leptospira* spp. DNA'sını saptama temelli ve duyarlılık/özgüllük oranları diğer tanı yöntem-

lerine kıyasla daha yüksek olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler ise son yıllarda kabul görmekte ve bu yöntemlerin sağladıkları avantajlar nedeniyle leptospiroz tanısında kullanımları artış göstermektedir (Bergman ve ark. 2017a).

Antibiyotik tedavisi olarak doksisisiklin ve penisilin seçenekleri başta gelmekte ve tedavinin ilk 3-4 gün içinde başlanması durumunda daha etkili olduğu kabul edilmektedir. Leptospiroz kontrolündeki en temel nokta, *Leptospira* spp. için kaynak konumundaki hayvanlardan ve/veya onların idrarları ile kontamine olan bölgelerden uzak durmaktır. Bunun yanı sıra kemirgen kontrolü, taşıyıcıların tedavisi, mesleki hijyen ve sağlıklı hayvanların rutin olarak aşılması da önerilen diğer kontrol yöntemleri arasında yer almaktadır (Murphy 2018).

Bu çalışmada, İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine getirilen leptospiroza karşı aşılansız köpeklerin idrar örneklerinde *Leptospira* spp. varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, köpeklere rutin olarak uygulanan aşının (Vanguard plus 5L4) *Leptospira* spp. yayılımını engelleme başarısının değerlendirilebilmesi ve aşı içeriğinde bulunmayan serovarların idrarla yayılma olasılıklarının anlaşılabilmesi nedeniyle aşılansız köpekler dahil edilmiştir. Ayrıca, düşük deteksiyon limiti (≥ 10 hücre), yüksek duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip olması (Smythe ve ark. 2002), hızlı sonuç alınabilmesi ve aşılama kaynaklı yalancı pozitifliklerin oluşmayacağına gösterilmiş olması (Midence ve ark. 2012) nedenleri ile aşılı köpeklerdeki *Leptospira* spp. DNA'sını Real-time PCR tekniği ile moleküler düzeyde araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Dahil Edilen Örnekler

Çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (İstanbul Üniversitesi -HADYEK2010-121). Çalışma için gerekli etik kurul onayı alındıktan sonra, araştırmaya İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerine gelen ve Leptospiroza karşı aşılansız toplamda 100 köpek (56 dişi; 44 erkek) dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklere ait yaş, cinsiyet ve ırk gibi sosyodemografik veriler ile köpeklerdeki sistemik muayene ve/veya anamnezde saptanan idrar yolu hastalıkları semptomları (disüri, hematüri, oligoüri

veya poliüri) kaydedilmiştir. Spontan ürinyasyon ile aseptik koşullar altında steril kaplarda toplanan idrar örnekleri santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan sediment DNA ekstraksiyonu yapılanaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

DNA Ekstraksiyonu

Elde edilen sediment örnekleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ile 260 nm ve 280 nm'deki Optik Dansite (OD)'leri, NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) cihazı ile ölçülmüştür. Firmanın önerileri doğrultusunda, uygun konsantrasyon aralığı (ng/ μL cinsinden) ve uygun saflıkta (A 260/280 oranına göre) bulunan ekstraktlar PCR yapılacağı zamana kadar -20°C 'de saklanmıştır.

DNA Amplifikasyonu

DNA miktar uygunlukları belirlenen ekstraktlar Real-time PCR yöntemiyle LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Almanya) cihazında üretici firmanın önerileri doğrultusunda amplifiye edilmiş

ve *Leptospira* spp. varlıkları C_T (Cycle Threshold) değerlerine göre kantitatif olarak tespit edilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan primer ve probalar, önceki yayınlarda (Smythe ve ark. 2002, Appelt ve ark. 2014) tariflendiği şekli ile GenBank nükleotid sekans veritabanından *Leptospira* spp. 16S rDNA kısmi sekans verileri sıralı olarak dizilerek hazırlanmıştır. Primerlerin hazırlanması Primer Express™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, ABD) programı ile hazırlanan primerler ve probun Leptospiral dizileri belirleme yetenekleri ise Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı (Altschul ve ark. 1990) ile değerlendirilmiştir. Leptospiral DNA amplifikasyonunda, 45 μL TaqMan PCR Mastermix (parti no:4304437, Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) karışımına 5 μL DNA eklenerek son konsantrasyonun herbir primer için 3 pmol/ μL ve probe için 2 pmol/ μL olması sağlanmıştır. Ayrıca, olası DNA kontaminasyonlarının belirlenmesi için karışımı içeren şablonuz kontrol (NTC) eklenmiştir. Amplifikasyon döngüsü ise, her biri 95°C 'de 15 saniye ve 60°C 'de 1 dakikalık sürelerden oluşan toplamda 40 döngülük bir program ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan primer ve probe dizilimleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Leptospira* spp. saptanması için kullanılan primer ve probe sekansları

Forward primer	5 → 3	CCC GCGTCCGATTAG
Reverse primer	5 → 3	TCCATTGTGGCCGRA/GACAC
Probe	5 → 3	FAM-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-TAMRA

İstatistiksel Analizler

Çalışmaya dahil edilen köpeklerin sosyodemografik ve semptomatolojik verileri ile *Leptospira* spp. PCR pozitiflik ve negatiflik durumları arasındaki ilişki Statistical Package for the Social Science (SPSS) versiyon 17.0 paket programı (IBM, SPSS Inc, Chicago, IL) kullanılarak değerlendirilmiştir. Normallik denetimi Shapiro Wilk testi, Histogram, Q-Q plot ve box plot grafikleri ile kontrol edilmiştir. Grup varyanslarının homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Kategorik değişkenler ki-kare, Yates düzeltmeli ki-kare ve Fisher'in kesin olasılık testleriyle değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları ortalama, standart sapma, ortanca değer, en küçük değer, en büyük değer, frekans ve/veya yüzde şeklinde verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ ve çift yönlü olarak ele alınmıştır.

Bulgular

İstanbul ilindeki özel veteriner kliniklerindeki *Leptospira* spp.'ye karşı aşılı 56 (%56)'sı dişi; 44 (%44)'ü erkek cinsiyetten toplamda 100 köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplamda 100 köpeğin en küçüğünün 6 aylık en büyüğünün ise 12 yaşında olduğu ve köpeklerin ortalama yaşlarının $4,36 \pm 2,45$ yıl olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen dişi köpeklerin yaş ortalamalarının $4,46 \pm 2,41$ yıl; erkek köpeklerin ise $4,23 \pm 2,5$ ortalama yaş değerinde olduğu hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen köpekler idrar yollarına ait bir semptom (disüri, hematüri, oligoüri veya poliüri) varlığı açısından incelendiğinde toplamda 39 (%39) köpekte idrar yollarına ait bir semptom olduğu; dişi köpeklerin 20'sinin (%35,7), erkek köpeklerin ise 19'unun (%43,2) idrar yollarına ait bir

semptomu sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya ait semptom varlığını gösteren veriler Tablo 2’de alınan köpekler için yaş, cinsiyet ve idrar yollarına sunulmuştur.

Tablo 2. Çalışmaya dahil edilen köpeklerin sosyodemografik ve semptomatolojik verileri

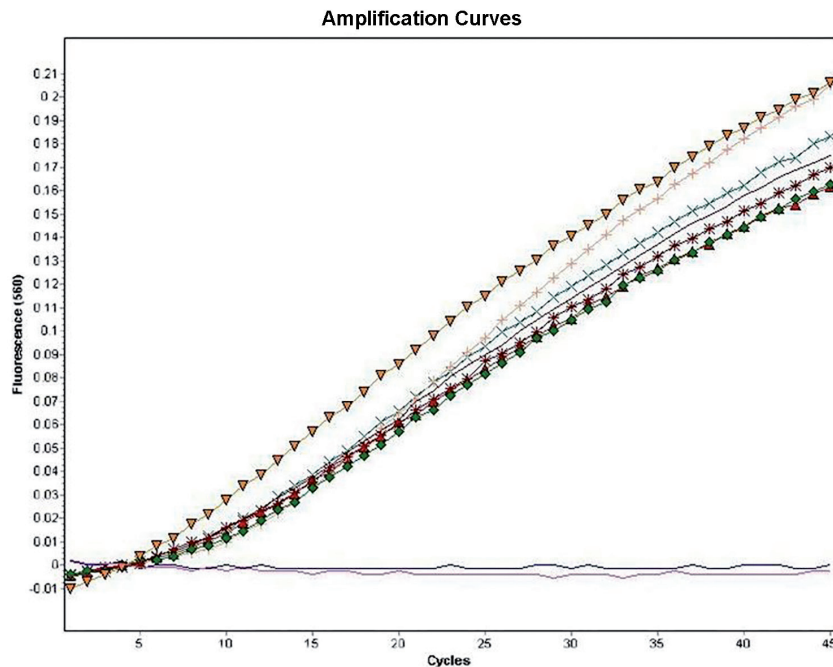
		Yaş (yıl)	İdrar yolu semptom varlığı
		Ortalama±Standart sapma (min – max)	n (%)
Cinsiyet	Dişi	4,46 ± 2,41 (1 – 11)	20 (%35,7)
	Erkek	4,23 ± 2,5 (1/2 – 12)	19 (%43,2)
Toplam		4,36 ± 2,45 (1/2 – 12)	39 (%39)

Çalışmaya dahil edilen toplamda 100 köpeğin 7 (%7)’sinde real-time PCR yöntemi ile *Leptospira* spp. saptanmıştır. Pozitiflik saptanan 7 örneğin 7,98 ile 34,91 arasında değişen C_T değerlerinin ortalaması $13,26 \pm 8,94$ olarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklerin yaş, cinsiyet ve idrar yolu

semptomlarına ait verilerin bu örneklere uygulanan *Leptospira* spp. PCR test sonucu ile istatistiksel olarak karşılaştırılması Tablo 3’te sunulmuştur. PCR yöntemi ile pozitif olarak belirlenen örneklerin *Leptospira* spp. DNA’larına ait amplifikasyon eğrileri Şekil 1’de sunulmuştur.

Tablo 3. *Leptospira* spp. PCR sonuçları ile sosyodemografik ve semptomatolojik verilere ait karşılaştırmalı istatistiksel sonuçlar

Değişken n (%)		<i>Leptospira</i> spp. PCR negatif	<i>Leptospira</i> spp. PCR pozitif	p değeri
Cinsiyet	Dişi	53 (%94,6)	3 (%5,4)	0,468
	Erkek	40 (%90,9)	4 (%9,1)	
Yaş	<1 yıl	9 (%100)	0 (%0)	0,528
	1 – 7 yıl	73 (%93,2)	5 (%6,8)	
	>7 yıl	11 (%88,2)	2 (%11,8)	
İdrar yolu semptomu	Yok	56 (%91,8)	5 (%8,2)	0,557
	Var	37 (%94,9)	2 (%5,1)	



Şekil 1. *Leptospira* spp. DNA pozitif örneklerin PCR amplifikasyon eğrileri

Tartışma ve Sonuç

Köpeklerde görülen leptospiroz büyük önem taşımakta ancak hastalık genellikle asemptomatik seyrettiğinden, hastalığın teşhisinde zorluklar yaşanmaktadır. Dünyada ve ülkemizde halen yaygın bir hastalık olmaya devam eden bu patojenin teşhisinin zamanında yapılabilmesi ve baskın serovarların saptanarak daha etkin tedavi ve koruma politikalarının geliştirilmesini amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır (Fraune ve ark. 2013, Rojas ve ark. 2010). *Leptospira* türlerinin PCR ile belirlenmesinde köpeklerden elde edilen kan örnekleri, idrar örnekleri, semen örnekleri, formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku örnekleri kullanılmıştır (Fraune ve ark. 2013, Bal ve ark. 1994, Kim ve ark. 2006, Murphy 2018). Günümüzde, diğer tüm patojenlerde olduğu gibi *Leptospira* spp. tanısında ölü bakterileri de tespit edebilmesi, daha yüksek duyarlılık/özellik oranlarına sahip olması ve kolay uygulanabilmesi gibi avantajlar nedeniyle PCR yöntemine bir eğilim bulunmaktadır (Saad ve ark. 1997).

İnsanlarda *Leptospira* spp. antikorlarının araştırıldığı çalışmalarda çeşitli ülkelerde farklı prevalanslar saptanmıştır. Örneğin Hindistan'da %21,3, İtalya'da %6,36, Tayland'da %11'lik *Leptospira* spp. pozitifliği bildirilmiştir (Venkataraman ve ark. 1992, Cerri ve ark. 2003, Meeyam ve ark. 2006). Leptospiroz prevalansındaki bu majör farklılığın olası nedeni olarak, bakterinin dış ortamda canlı kalabilmesi için en uygun iklimin tropikal iklim olması ve bu koşullarda da en yüksek prevalansın yağışlı mevsimde görülmesi gösterilmiştir (Ward ve ark. 2002). Köpeklerde PCR ile *Leptospira* spp. varlığının incelendiği çalışmalarda Amerika'da %8,8 ve İran'da %22 oranında pozitiflik saptanmıştır (Harkin ve ark. 2003, Zakeri ve ark. 2010). Bizim araştırmamız ile benzer olarak Rojas ve ark. (2010) tarafından 525 köpeğin idrar örneklerini *Leptospira* spp. varlığı açısından PCR ile incelendiği bir çalışmada 37 köpekte (%7,05) pozitiflik saptanmıştır. Ülkemizde leptospiroz ile ilgili araştırmalar genellikle hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalar veya insan olgu sunumları niteliğindedir. Çeşitli ülkelerde yapılan bu çalışmalar, leptospirozun halen global olarak köpek popülasyonunda yaygın olarak bulunduğunu ve zoonoz potansiyelini vurgulamaktadır.

Köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliğinin yaşa bağlı olarak dağılımının köpeklerdeki cinsel olgunluğa erişme dönemi ile ilişkili olarak değiştiği düşünülmektedir. Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada, bir yaşından küçük köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliği %24, bir yaşından büyük köpeklerde ise %27,5 olarak belirlenmiştir (Ülgen ve ark. 1997). Global olarak ise bir yaşından büyük köpeklerde seropozitiflik oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Arimitsu ve ark. 1989, Venkataraman ve ark. 1992). *Leptospira* spp. seropozitifliği ve yaş arasında saptanan farklı sonuçların, yapılan çalışmalarda genel olarak kabul gören birinci yaş döneminin genellikle cinsel olgunluk kriteri olarak kabul edilmesine karşın, sokak köpeklerinin bir yaşından birkaç ay önce çiftleşebilecekleri ve hayvanların bir yaş öncesi ve sonrası ayrımının yapılmasının zor olabileceği nedenleri ile ilişkili olabileceği unutulmamalıdır. Bu çalışmada, leptospiroz pozitifliği 1 yaş altı köpeklerde hiç saptanmazken, 1-7 yaş aralığında %6,8 ve 7 yaşından büyük köpeklerde %11,8 oranında *Leptospira* spp. DNA'sı PCR yöntemi ile saptanmıştır. Ancak, köpeklerin yaşları ile pozitiflik oranları arasında olgu sayısının azlığı gibi olası nedenler ile istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,528$).

Köpeklerde *Leptospira* spp. seropozitifliğinin cinsiyete bağlı dağılımlarının incelendiği çalışmalarda genel olarak erkek cinsiyetteki köpeklerde daha yüksek pozitiflik oranları belirlenmiştir. Ülkemizde konu ile ilgili yapılan araştırmalarda erkek köpeklerde %30,2 ve %6,5 oranlarında, dişi köpeklerde ise %19,5 ve %13,7 oranlarında seropozitiflik saptanmıştır (Özdemir 1998, Ülgen ve ark. 1997). Global literatür verileri incelendiğinde, dünyada yapılan çalışmalarda erkek ve dişilerdeki seropozitiflik oranı sırasıyla %47 - %38 (Everard ve ark. 1987), %27,6 - %18,9 (Arimitsu ve ark. 1989), %68,3 - %31,7 (Hartman 1984) olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda erkeklerdeki seropozitiflik oranının dişi köpeklere göre daha yüksek olarak belirlenmesinin araştırmacılar tarafından, erkek köpeklerin genital bölgeyi koklama ve yeni yapılan idrarı yalama eğilimleri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Hartman 1984). Literatür verileri ile uyumlu olarak bu çalışmada *Leptospira* spp. PCR pozitifliği erkek köpeklerde (%9,1) dişi köpeklere (%5,4) kıyasla daha yüksek olarak belirlenmiştir ($p=0,468$).

Leptospira spp. seropozitifliğinin semptom gösteren veya herhangi bir semptom göstermeyen köpeklerde karşılaştırıldığı çalışmaların az bulunması nedeniyle, yapılan literatür araştırmasında konu ile ilgili anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Semptomatik olan köpeklerin, asemptomatik köpekler ile *Leptospira* spp. varlığı açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada; retrospektif olarak 159 leptospiroz ön tanı köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Bunların 20 tanesinde *Leptospira* spp. pozitifliğinin belirlenmiş pozitif kabul edilenlerin 16 tanesi semptomatik; 4 tanesi ise asemptomatik olarak değerlendirilmiştir (Mastrorilli ve ark. 2007). Prospektif temelde dizayn edilen bu çalışmada ise, PCR ile *Leptospira* spp. taşıyıcısı olduğu belirlenen köpeklerden ikisi (%5,1) semptomatik (hematüri, disüri), 5'i (%8,2) ise asemptomatik olarak değerlendirilmiştir (p=0,557).

İmmünolojinin en büyük keşiflerinden olan ve yıllardır güvenilir olarak uygulanan aşılama programlarının patojen yayılımını engellemedeki başarısı kabul gören bir gerçektir. Ancak, ticari olarak piyasada bulunan leptospiroz aşıları; sığır, domuz ve köpekler için genel olarak kullanılabilir durumda olmakla birlikte bu aşılardan, bağışıklığı kısmi oranlarda artırabilmesi ve içeriklerinde yalnızca potansiyel olarak etkin serovarların bulunması nedenleri ile kısmen etkili oldukları saptanmıştır. Köpek aşıları genellikle, serovar *canicola* ve *icterohaemorrhagiae* içermektedir. Aşılar genellikle hastalığa ve deneysel koşullarda renal saçılıma karşı koruma özelliği gösterse de, aşılanmış köpeklerden insanlara serovar *icterohaemorrhagiae* bulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca, aşılanmış köpekler ticari aşılardan içerisinde bulunan serovarlar dışındaki bir serovar ile de infekte olabilmektedir (Prescot 2008). Bu nedenle, son yıllardaki aşılarda geleneksel aşı suşlarına ek olarak serovar *grippotyphosa* ve *pomona* serovarlarını da içermektedir (Adler ve Moctezuma 2010). Çalışmaya dahil edilen köpekler *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* ve *Leptospira pomona* suşlarını içeren Pfizer® firmasının "Vanguard plus 5L4" markalı aşısıyla son bir sene içerisinde aşılanmıştır.

Yapılan bu çalışmada aşılı köpeklerde PCR yöntemi ile %7 oranında *Leptospira* spp. pozitifliği saptanmış ve leptospirozun bir yaşından büyük erkek hayvanlarda daha yüksek oranlarda olduğu

belirlenmiştir. Bu veriler, köpeklerin *Leptospira* spp. için önemli bir kaynak olduğunu ve insanlara bulaşmada etkin rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca, rutinde uygulanan tek doz leptospiroz aşısının, hayvanların çoğunda yeterli bağışıklığı sağlamadığı düşünülmüştür. *Leptospira* türlerinin günümüzdeki önemini anlaşılabilmesi, bu patojeni saptamak amacı ile kullanılacak olan uygun tanı yöntemlerinin belirlenmesi, aşılamanın saçılım üzerine olan önleyici etkilerinin değerlendirilebilmesi ve temelde zoonoz karakterli olan bu infeksiyon etkeninin, insan sağlığını tehdit edecek yönlerinin anlaşılabilmesi amacı ile; daha çok olgu sayısını içeren, prospektif temelde dizayn edilmiş ve tedavi seçeneklerinin de değerlendirildiği daha geniş araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Kaynaklar

1. Adler B, Moctezuma AP. (2010). *Leptospira* and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology*. 140, 287-296.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 215, 403-410.
3. Appelt S, Armougom F, Le Bailly M, Robert C, Drancourt M. (2014). Polyphasic analysis of a middle ages coprolite microbiota, Belgium. *PLoS One. Public Library of Science*. 9 (2), e88376.
4. Arimitsu Y, Fukumura K, Shingaki Y. (1989). Distribution of leptospirosis among stay dogs in the Okinawa Islands, Japan: Comparison of the microcapsule and microscopic agglutination tests. *Br Vet J*. 145, 473-477.
5. Bal AE, Gravekamp C, Hartskeer RA, Meza-Brewster D, Korver H, Terpstra WJ. (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 32, 1894-1898.
6. Bergmann M, Llewellyn JR, Hartmann K. (2017). Diagnosis of leptospirosis in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 45(3), 170-177.
7. Bergmann M, Llewellyn JR, Hartmann K. (2017). Epidemiology and prevention of leptospirosis in dogs. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*. 45(3), 163-168.
8. Cerri D, Ebani V, Fratini F, Pinzauti P, Andreani E. (2003). Epidemiology of leptospirosis: observations on serological data obtained by a diagnostic laboratory for leptospirosis from 1995 to 2001. *New Microbiol*. 26, 383-389.
9. D'Andrea A, Martine YZ, Alduina R, Monteverde V, Molina CF, Vitale M. (2012). Comparison of two PCR methods for detection of *Leptospira interrogans* in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107, 85-88.
10. Ellis WA. (2015). Animal leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387, 99-137.

11. Everard COR, Jones CJ, Inniss VA, Carrington DG, Vaughan AW. (1987). Leptospirosis in dogs on Barbados. *Isr J Vet Med.* 43, 288-295.
12. Fraune C, Schweighauser A, Francey T. (2013). Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc.* 242, 1373-1380.
13. Harkin KR, Roshto YM, Sullivan JT, Purvis TJ, Chengappa MM. (2003). Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 222(9), 1230-1233.
14. Hartman EG. (1984). Epidemiological aspects of canine leptospirosis in the Netherlands. *Zbl Bakt Hyg.* 258, 350-359.
15. Kim S, Lee DS, Suzuki H, Watarai M. (2006). Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in Canine Semen by Multiplex Nested PCR. *J Vet Med Sci.* 68, 615-618.
16. Knöpfler S, Mayer-Scholl A, Luge E, Klopfeisch R, Gruber AD, Nöckler K, Kohn B. (2017). Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract.* 58(10), 582-588.
17. Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. (2007) Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira interrogans Australis* Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001–2004). *J Vet Intern Med.* 21, 3–10.
18. Meeyam T, Penperon T, Petchanok B, Pichpol D, Padungtod P. (2006). Seroprevalance and risk factors associated with leptospirosis in dogs. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 37, 148-153.
19. Midence JN, Leutenegger CM, Chandler AM, Goldstein RE. (2012). Effects of Recent *Leptospira* Vaccination on Whole Blood Real-Time PCR Testing in Healthy Client-Owned Dogs. *J Vet Intern Med.* 26, 149–152.
20. Murphy K. (2018). Dealing with leptospirosis in dogs. *Vet Rec.* 183(12), 384-385.
21. Özdemir V. (1998). Köpek serumlarının Leptospiroz yönünden mikroskopik aglütinasyon testi ve ELISA ile incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
22. Pinto PS, Libonati H, Lilenbaum W. (2017). A systematic review of leptospirosis on dogs, pigs, and horses in Latin America. *Trop Anim Health Prod.* 49(2), 231-238.
23. Prescott JF. (2008). Canine leptospirosis in Canada: A veterinarian's perspective. *Canadian Medical Association Journal.* 178, 397-398.
24. Rojas P, Monahan AM, Schuller S, Miller IS. (2010). Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29, 1305-1309.
25. Saad A, Phuong T, Pamela S, Howard CJ. (1997). A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Leptospira* spp. in Bovine Semen. *J Vet Res.* 61, 15-20.
26. Schuller S, Francey T, Hartmann K, Hugonnard M, Kohn B, Nally JE, Sykes J. (2015). European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 56(3), 159-79.
27. Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB. (2002). A quantitative PCR (Taq-Man) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis.* 2, 13.
28. Ülgen M, Çetin C, Özdemir V, Büyükcoban M. (1997). Bursa İlindeki Sokak Köpeklerinde Leptospirozun Seroprevalansı. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg.* 9, 109-114.
29. Venkataraman KS, Nedunchellian S, Ramadass P, Ramkrishna J. (1992). Serodiagnosis of canine leptospirosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet Med.* 12, 37-38.
30. Ward MP, Glickman LT, Guptill LE. (2002). Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 1, 53-58.
31. World Health Organization (WHO). (2019). Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG). Erişim adresi: <https://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/>, Erişim tarihi: 20.08.2019.
32. Zakeri S, Khorami N, Ganji ZF, Sepahian N, Malmasi AA, Gouya MM, Djadid ND. (2010). *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect Genet Evol.* 10(2), 273-277.