T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANTLARDAKİ ABORT OLGULARINDA LEPTOSPİROZİSİN LEVADİTİ VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ VE HİSTOPATOLOJİK BULGULARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Zeynel ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU

KONYA-2019

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA BÖLGESİNDE RUMİNANTLARDAKİ ABORT OLGULARINDA LEPTOSPİROZİSİN LEVADİTİ VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE TEŞHİSİ VE HİSTOPATOLOJİK BULGULARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Zeynel ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU

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

KONYA-2019

ÖNSÖZ

Leptospiroz, abort, ölü doğum, erken doğum, infertilite, septisemi, nefritis, hemoglobinüri, hepatitis, mastitis gibi semptomlar ile seyreden zoonoz bakteriyel bir enfeksiyondur. Meydana gelen abortlar ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu gibi hayvan ve insan sağlığını da etkilemektedir. Bütün bu nedenler göz önüne alındığında hastalığın teşhisi önem kazanmaktadır. Bu çalışma hastalığın teşhisi ve histopatolojik bulgularla karşılaştırılması, hastalığın bölgedeki durumunun anlaşılması, gerekli önlemlerin alınması ve diğer çalışmalara kaynak oluşturması açısından önem taşımaktadır. Zoonoz bir hastalık olan Leptospiroz ile ilgili bu çalışmalar insan sağlığı açısından yapılacak çalışmalara da katkı sağlayacaktır.

Çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 18202048 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez çalışmamda her türlü desteği sağlayan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalındaki değerli hocalarım; Prof. Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI, Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR, Arş. Gör. Burak ATEŞ ve Kastamonu Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Dr. Öğr. Üyesi Funda TERZİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Dr. Fahriye SARAÇ ve Veteriner Hekim Dr. Esra SATIR'a yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen biricik eşim Selin ARSLAN ve canım oğlum Aden ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv
1. GİRİŞ 1
1. 1. Hastalığın Tarihçesi 2
1. 2. Etiyoloji 3
1. 3. Epidemiyoloji 5
1. 4. Epizootiyoloji 8
1. 5. Patogenez 9
1. 6. Klinik Bulgular 10
1. 7. Patolojik Bulgular 12
1. 8. Teşhis 13
1. 8. 1 Direkt Teşhis Yöntemler 15
1. 8. 2. İndirekt Teşhis Yöntemleri 17
1. 9. Tedavi 18
1. 10. Korunma 19
2. GEREÇ ve YÖNTEM 20
2. 1. Gereç 20
2. 2. Yöntem 20
2. 2. 1. Histopatolojik İnceleme 20
2. 2. 2. Levaditi Boyama 21
2. 2. 3. İmmunhistokimyasal Boyama 21
3. BULGULAR 23
3. 1. Makroskobik Bulgular 25
3. 2. Histopatolojik Bulgular 26
3. 3. Levaditi Bulgular 31
3. 4. İmmunohistokimyasal Bulgular 29
4. TARTIŞMA 35
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 39
6. KAYNAKLAR 40
7. EKLER (EK A) 44
(EK A) ETİK KURUL KARARI 44
8. ÖZGEÇMİŞ 45

SİMGELER VE KISALTMALAR

BRSV: Bovine Respiratory Sinsital Virus

BVDV: Bovine Viral Diarrhoea Virus

DAB : Diaminobenzidine

EMJH: Ellingausen-McCullough- Johnson-Harris

H&E : Hematoksilen-Eozin

IBR: Infeksiyoz Bovine Rhinotracheitis

IF: İndirekt Flouresans

IHC: Immunohistokimya

MAT: Mikroskopik Aglütinasyon Testi

PBS :Phosphate Buffered Saline

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PVKE: Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü

Real-time qPCR: Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

WS: Warthin-Starry

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Bölgesinde Ruminantlardaki Abort Olgularında Leptospirozisin Levaditi ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Teşhisi ve Histopatolojik Bulgularla Karşılaştırılması

Zeynel ARSLAN
Patoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2019

Leptospiroz, abort, ölü doğum, kısırlık ve süt verimi kayıplarına neden olan ve hayvancılık için ekonomik açıdan çok önemli, zoonoz karakterli, bakteriyel bir enfeksiyondur. Hastalığın bulaşması enfekte idrar, plasental sıvılar veya süt ile olur. Bulaşma enfekte hayvanlarla direkt temasla ya da enfekte hayvanların idrarı ile kirlenmiş su, toprak, gıda ve diğer maddelerle temas olarak indirekt şekilde gerçekleşir.

Bu çalışmada, 2013-2018 yılları arasında Marmara bölgesindeki il ve ilçelerden Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne getirilen ruminantlardaki abort olgularından Leptospirozun immunhistokimyasal ve levaditi yöntemlerle teşhisi ve histopatolojik bulgularla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal olarak 12 farklı ilden 750 kuzu, 218 oğlak ve 284 buzağı olmak üzere 1252 adet abort fötüs kullanılmıştır. Fötüslerin nekropsileri yapıldıktan sonra iç organlardan alınan örnekler rutin takipleri yapılarak, hematoksilen eozinle boyanmıştır. Ayrıca böbrekler, karaciğer ve akciğerlerden immunhistokimyasal (IHC) ve Levaditi yöntemleriyle Leptospira etkenleri aranmıştır.

Çalışmada, makroskobik olarak bazı fötüslerde deri altı ödemleri ve vücut boşluklarında sıvı birikimi, ikterus, karaciğerde miliyer nekroz odakları görülürken, çoğunda otolitik değişiklikler izlendi. Mikroskobik incelemelerde karaciğerde periasiner nekroz ve böbrek tubullerinde nekroz ve hiyalin silindirlerine rastlandı. IHC yöntemle yapılan boyamalarda 1252 adet fötus numunesinin 160 tanesinde ve IHC pozitif örneklerin Levaditi yöntemle boyamalarında ise 108 adet pozitif boyanma tespit edildi. Levaditi boyama metodu ile etken tespiti sadece böbrek dokusunda yapılırken, karaciğer ve akciğerde etken tespiti yapılamadı. Ancak IHC metodu ile karaciğer, böbrek ve akciğerde de pozitif sonuç verdi.

Sonuç olarak Marmara bölgesinde ruminantlarda Leptospiroza bağlı abort oranı %12,8 olarak belirlenmiştir. Leptospirozun teşhisinde, IHC metodunun Levaditi boyama yöntemine göre daha hassas olduğu gösterilmiştir. Ayrıca vaka sayılarının yıllar içersinde azalması aşılama çalışmalarına ve hayvan sahiplerinin hastalıkla ilgili bilgilendirilmesine bağlanmıştır. Çalışma sonucunda Marmara bölgesi için ruminantlarda Leptospirozun önemli bir abort sebebi olduğu ortaya konulmuş, hastalıkla ilgili farkındalığın arttırılması ve aşılamaların yapılmasının hastalıkla mücadelede çok etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Abort; İmmunohistokimya; Leptospiroz; Levaditi; Ruminant.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Diagnosis of Leptospirosis with Levaditi and Immunohistochemical Methods in Abortion Cases in Ruminants in Marmara Region and Comparison with Histopathological Findings

Zeynel ARSLAN
Department of Veterinary Pathology
MASTER THESIS/KONYA-2019

Leptospirosis is a bacterial infection of zoonotic character, which causes abortion, stillbirth, infertility and milk yield losses and is very important for livestock economically. The disease is transmitted by infected urine, placental fluids or milk. Transmission is by direct contact with infected animals or indirectly by contact with water, soil, food and other substances contaminated with the urine of infected animals.

In this study was aimed to diagnose and compare the abortion cases with leptospirosis in ruminants coming to Pendik Veterinary Control Institute from the provinces and districts of Marmara region between 2013-2018 by immunohistochemical and Levaditi methods and to compare with histopathological findings

A total of 1252 aborted fetuses; 750 lambs, 218 kids and 284 calves from 12 different provinces were used as materials. After the necropsies of the fetuses, the samples taken from the internal organs were routinely followed and stained with hematoxylin eosin. In addition, Leptospira agents were searched by immunhistochemical (IHC) and Levaditi methods from kidneys, liver and lungs.

In the study, macroscopically, some fetuses showed subcutaneous edema and fluid accumulation in body cavities, icterus and miliary necrosis foci in the liver, but most had autolytic changes. Microscopic examination revealed periaciner necrosis in liver and necrosis and hyaline cylinders in renal tubules. Positive staining was observed in 160 of 1252 fetus samples in IHC staining and Levaditi staining of IHC positive samples revealed 108 positive staining. Levaditi staining method was used to determine the agent only in kidney tissue, but not in the liver and lung. However, positive results were obtained in liver, kidney and lung by IHC method.

As a result, the abortion rate of Leptospirosis in ruminants was determined as 12,8% in Marmara Region of Turkey. In the diagnosis of leptospirosis, IHC method is more sensitive than Levaditi staining method. In addition, the decrease in the number of cases over the years has been attributed to vaccinations and informing the animal owners about the disease. As a result of this study, it has been shown that leptospirosis has an important place in abortions in ruminants in Marmara Region of Turkey and it is concluded that raising awareness about the disease and vaccination will be very effective in combating the disease.

Key Words: Abortion; Immunohistochemistry; Leptospirosis; Levaditi; Ruminant

1. GİRİŞ

Leptospiroz, abort, ölü doğum, kısırlık ve süt verimi kayıplarına neden olan, hayvancılık için ekonomik açıdan çok önemli, zoonoz karakterli, bakteriyel bir enfeksiyondur (Bolin 2005). Hastalık akut septisemik veya kronik nefritik formlarında gözlenir. Etken hastalığı geçiren hayvanların böbreklerinde mikrokoloniler halinde lokalize olur ve uzun süre idrarla atılır (Türkütanıt ve ark. 2002, Villanueva ve ark. 2016). Çiftlik hayvanlarında leptospirozun teşhis edilmesi oldukça zordur. Bu zorluğun nedeni teşhisindeki güçlükler, konakçı ve bakteri arasındaki ilişkinin kompleks yapısı ve enfeksiyonun değişim göstermesidir (Bolin 2005). Patojenik leptospira türleri, yabani ve evcil bir çok memeli türü tarafından taşınır. Direkt veya indirekt yollarla diğerlerine bulaştırılır (Villanueva ve ark. 2016). Ayrıca kuşlar, sürüngenler, amfibiler ve eklembacaklılardan da izole edilmiştir (Szeredi ve Haake 2006).

Leptospiroz, Leptospira genusunda bulunan patojenik spiroketler tarafından oluşturulan tüm dünyada yaygın olarak görülen, halk sağlığı ve hayvancılık üzerinde önemli etkileri olan zoonoz bir hastalıktır (Lucheis ve Ferreira 2011). Hastalığa ilgili oluşan üreme sorunları ve süt üretiminde düşüşler nedeniyle sığır ve koyun endüstrisinde ekonomik kayıplara yol açar. Ayrıca enfekte hayvanlarda kronik renal enfeksiyon gelişir. Enfekte hayvanlar idrarları ile etkeni diğer hayvanlara yayarak hayvansal üretim ve ilgili endüstrilerde çalışanlar için potansiyel zoonotik bir tehdit oluşturur (Fang ve ark. 2014).

Patojen leptospira türleri önceleri *L. interrogans* sınıfı altında toplanmıştır. Ancak son yapılan çalışmalarla Leptospira genusunun patojen ve patojen olmayan türler içerdiği ve 25 serogrupta 250'den fazla patojenik serovar tespit edildiği belirtilmiştir. Hastalık etkeni, insanlara ve diğer hayvanlara idrarla direkt temas ya da idrarla kontamine çevre yoluyla bulaşır (Bolin 2005, Villanueva ve ark. 2016, Vidal ve ark. 2017).

Leptospiroz tüm dünyada çiftlik hayvanları, pet hayvanları ve vahşi yaşamda yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Avustralya, Yeni Zellanda, Rusya, Avrupa ve Asya ülkelerinden sporadik vakalar ve salgınlar şeklinde bildirimler yapılmıştır (Hamali ve ark. 2012).

Leptospiroz sığırlarda genellikle infertilite, düşük fertilite oranı, abort, ölü doğum ve zayıf yavru doğumu gibi üreme sistemi problemlerine neden olur. Sığırlarda şiddetli subklinik infeksiyona neden olan serovar *L.hardjo*'dur (Vidal ve ark. 2017). Atlarda hastalığa neden olan başlıca serovarın *L.bratislava* olduğu düşünülmesine rağmen diğer birkaç leptospiral serovarın tesadüfi konakçısı olduğu görülmüştür. Atlarda tekrarlayan uveitis, ateş, hemoglobinüri, sarılık gebeliğin son üçte birlik kısmında abort görülür (Szeredi ve Haake, 2006). Köpeklerde, hastalık genellikle subakut ve kronik formda görülür. Subakut formda böbreklerde lenfoplazmasitik ve nötrofilik tubulointerstisyel neftritis, kronik formda ise interstisyel fibrozis ile görülen daha az şiddetli inflamasyon gözlenir (Rissi ve Brown 2014). İnsanlarda görülen leptospirozun en önemli bulaşma şekli enfekte hayvanların idrarıyla doğrudan ya da dolaylı yoldan temas etmesi ile olur. Yoğun yağışların ve su baskınlarının ardından salgınlar görülmüştür. Hamilelik dönemindeki kadınların enfekte olması düşüklere neden olur (Vidal ve ark. 2017).

1. 1. Hastalığın Tarihçesi

Leptospirozun tarihi, Adolf Weil'in 1886 yılında dalak büyümesi, sarılık, böbrek yetmezliği, konjuktivit ve deri döküntüsü semptomların rapor etmesi ile başlar. Bu semptomların görüldüğü hastalık "Weil Hastalığı" olarak isimlendirilmiş, ancak hastalığın etiyolojisi tam olarak açıklanamamıştı. Hastalığın birden bire ortaya çıktığı ve dışarıda özellikle pirinç tarlası çalışanları, madenciler gibi kontamine su ile temas halinde olan çalışanlarda daha sık görüldüğü tespit edildi. Stimson 1907 yılında, sarı humma nedeniyle öldüğü bildirilen bir hastanın böbrek tübüllerinde spiroket kümeleri mevcudiyetinin gümüş boyayla göstermiş ve etkeni *Spirochaeta interrogans* olarak adlandırmıştır. 1915 yılında Japonya ve Almanya'da hastalığın etiyolojisi tamamen ortaya konmuştur. 1914 yılında, Inado ve Ido adlı araştırıcılar Japonya'da maden işçileri arasında görülen salgını incelemişler ve 1745'de Majorka adalarında çıkan salgına çok benzetmişlerdir. Bu araştırmacılar bulaşıcı sarılığa sahip Japon madencilerin kanında hem spiroketleri hem de spesifik antikorları saptamış ve bu spiroketi *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* olarak adlandırmışlardır. İki grup Alman doktor bu tarihlerde "Fransız hastalığı" diye adlandırılan hastalık nedeniyle savaş sonrası terkedilen Alman askerlerini inceledi. Uhlenhuth ile Fromme ve Hubener ile Reiter 'dan oluşan iki grup doktor, enfekte askerlerin kanlarını gine

domuzlarına enjekte etmişler ve hayvanların dokularında spiroketleri saptamışlardır. İki grup araştırıcı etkene sırasıyla *Spirochaeta nodosa* ve *Spirochaeta icterogenes* adlarını vermişlerdir. Noguchi hastalığa neden olan bu spiroketi saprofit olan *Spirochaeta biflexa* ile biyolojik ve morfolojik benzerliklerini belirtmiş ve 1918' de leptospira cinsi olarak tarif etmiştir. İnsanlarda görülen enfeksiyon kaynağının fareler olduğu 1917'de keşfedilmiş ve köpeklerde leptospiral hastalık potansiyeli saptanmıştır. Ancak *L. interrogans serovars icterohaemorrhagia* ve *canicola* ile köpek enfeksiyonu arasındaki belirgin farkı ortaya koymak birkaç yıl almıştır. Çiftlik hayvanlarında leptospirozun tanımlanması bu tarihten sonra olmuştur (Fazlı 1970, Levett 2001, Lucheis ve Ferreira 2011, Turhan ve Hatipoğlu 2012, Adler 2015).

Türkiye'de ilk leptospiroz bildirimi 1949 yılında Akçay ve Pamukçu (1950) tarafından yapılmıştır. Atatürk Orman Çiftliğinde ateş, ikterus, anemi ve hemoglobinüri semptomları göstererek ölen, 1 yaş ve 1 yaş altı 3 dananın böbreklerinden Levaditi yöntemi ile etkeni tespit etmişlerdir. Daha sonra Berkin (1982) hamsterlarda deneysel enfeksiyon oluşturmuştur. Hamsterların akciğerlerdeki lezyonları ışık ve elektron mikroskopla incelemiştir. Çizmen ve ark. (1953), sığırlarda hastalığı serolojik olarak ortaya koyarken, Özgen ve Tunus (1954) ülkemizde ilk kez *Leptospira bovis*'i izole ederek kültürünü yapmışlardır (Yener ve Keleş 2001).

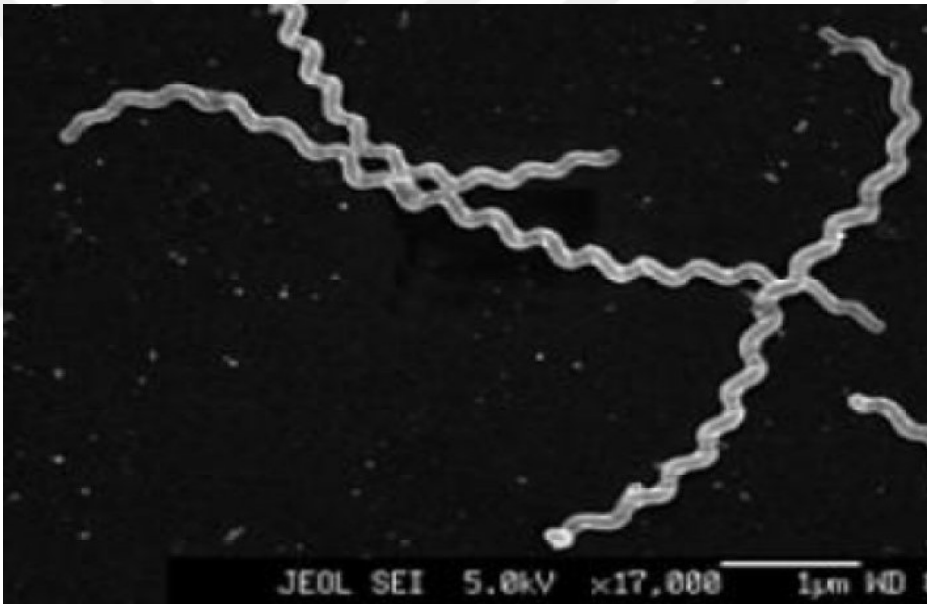
1. 2. Etiyoloji

Hastalık etkeni *Leptospiracease* familyasındaki bir spiroket olan çeşitli leptospira türleridir (OIE Manual 2018). Leptospiralar, 0.1-0.3 µm çapında ve 6-20 µm uzunluğunda ince sarmal biçimli, Gram negatif bakterilerdir. Bakteriyel hücrenin dış duvarı, bakteri hareketliliğini kolaylaştıran, dönme ve bükülme-uzama hareketlerine izin veren, periplazmik flagella ile tamamen kaplanmış bir zardan oluşur. Zorunlu aeroblardır ve besiyerlerinde yavaş ürerler (Lucheis ve Ferreira 2011).

Hareketleri uzun ekseni etrafında dönme, aksiyal filament yardımıyla kasılıp gevşeme şeklindedir. Bir veya iki ucu çengel tarzında kıvrılmıştır. Bu nedenle C, S ve L şeklinde görülür (Şekil 1.1.) Bazı leptospira türlerinde yapılan pasajlar nedeniyle bu kıvrık uçlar kaybolur. Anilin boyalarla iyi boyanmayan Leptospiralar, Giemsa ve

gümüşleme (Levaditi, Fontana) boyama yöntemleri ile boyanarak görünürler (Jones ve ark. 1997, Quinn ve ark. 1993, Lucheis ve Ferreira 2011).

Leptospiralar kurutmaya, donmaya, sudaki tuz oranına ve pH değişikliklerine karşı duyarlıdır. Bakteri pH 6'dan düşük veya pH 8'den büyük ortamlarda, çevre sıcaklığının 7 °C'den düşük veya 36 °C'den yüksek olduğu sıcaklıklarda, en az 15 dakika süreyle nemli ısı (121 °C) ve pastörizasyonla inaktive edilir. Ayrıca %1 sodyum hipoklorit, %70 etil alkol, glutaraldehit, formaldehit, deterjan ve asitler tarafından etkisizleştirilir. Leptospiralar, bakteriler için olan genel besiyerlerinde üremezler. Ayrıca kan, serum, B1 ve B12 vitaminleri, demir ve yağ asitlerine de gereksinimleri vardır (Kaufmann ve Weyant 1995, Levett 2001, Lucheis ve Ferreira 2011, OIE 2018).



Şekil 1.1. *L.interrogans*'ın elektron mikroskopta görüntüsü (http://www.news.cornell.edu/stories/Oct07/WCMC.leptospirozis.3 jpg).

Leptospiralar, 1989 yılına kadar iki grup altında toplanmıştı. Bu sınıflandırmaya göre patojenik olanlar *L. interrogans* türüne dahil edilirken, doğada yaygın olarak bulunan ve patojenik olmayanlar ise *L. biflexa'* ya dahil edilmiştir (Faine 1982). Günümüzde serolojik ve genotipik olmak üzere iki tür sınıflandırma vardır. Antijenik benzerlik ve çapraz reaksiyonu temel alan serolojik sınıflandırmaya göre 300 serovar tespit edilmiş ve bunların 200'den fazlası patojenik olarak tanımlanmıştır (Faine ve ark. 2000). DNA analizine dayanan taksonomik çalışmalar sonucunda ise sekiz patojenik Leptospira türü tanımlanmıştır. Bunlar; *Leptospira*

borgpetersenii, L. inadai, L. interrogans sensu stricto, L. kirschner, L. meyeri, L. noguchii, L. santarosai ve *L. weilii'*dir (Lucheis ve Ferreira 2011). Serolojik ve genotipik sınıflandırma arasında tam bir ilişki yoktur. Aynı serovarlar birden fazla türde bulunabilir veya bir tür hem patojenik hemde patojenik olmayan serovarları taşıyabilir (Loureiro ve ark. 2013).

Patojenik leptospiralar; hemolizin oluşturur, serumsuz ortamda üreyemez ve organizma dışında uzun süre yaşayamaz. Divalent bakır iyonlarına duyarlı, kimyasal maddelere dirençlidir. Lipaz ve oksidaz aktivitesi ile saprofit leptospiralardan ayrılır.

Saprofitik olanlar ise hastalık oluşturmaz, düşük ısıda ürer ve spesifik antikor-komplement ile kolayca ölür (Arda ve ark. 1997). Hayvanlarda hastalık oluşturan bazı önemli serotipler Çizelge 1.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Hayvanlarda hastalık oluşturan bazı serotipler (Arda ve ark. 1997).

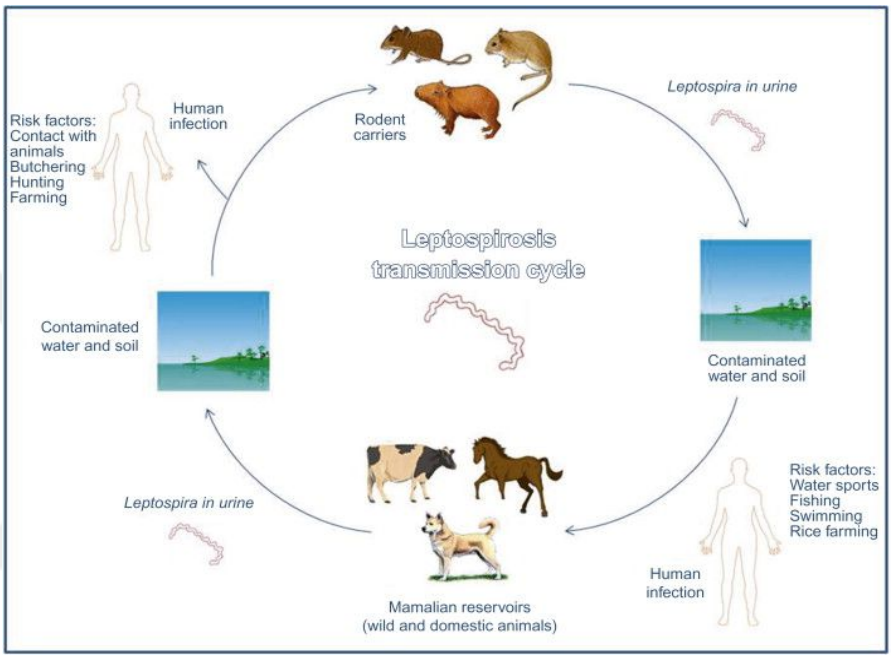
SEROTİPLER	Sığır	Koyun - Keçi	Köpek	At	Domuz	Kobay-Hamster
L. gripptyphosa	+	+		+		+
L. hebdomatis	+					
L. icterohemorrhagiae	+	+	+	+	+	+
L. pomona	+	+			+	
L. canicola		+	+		+	+
L. hyos					+	
L. hardjo	+	+				

1. 3. Epidemiyoloji

Leptospiroz, "Bataklık ateşi", "Stutgart disease", "Rice field fever", "Swamp fever", "Swineherd fever", "Yedi gün ateşi" ve "Weil hastalığı" gibi isimlerle anılan, dünyada en sık görülen zoonoz hastalıklarından biridir. Hastalığın dünyadaki insidansı, ılıman iklim görülen coğrafyalarda 0,1-1/100,000 tropik bölgelerde 10-100/100,000 salgın ve riskli gruplarda ise 100/100,000 olarak belirlenmiştir (Turhan ve Hatipoğlu 2012). İnsanlarda yapılan seroepidemiyolojik çalışmalarda %2-12 arasında tespit edilmiştir. Dünyada hastalığın prevalansı üzerine yapılan çalışmalarda %2-%46 arasında olduğu tespit edilmiştir (Bisias ve ark 2009).

Leptospiroz, kemiriciler başta olmak üzere hayvanlarda ve insanlarda görülen bir hastalıktır. Özellikle tarla fareleri olmak üzere kemiricilerin doğal

enfenksiyonudur. Kemiriciler dışında başka yabani ve evcil hayvanlar etkeni böbrek tübüllerinde taşıyarak idrarla dış ortama saçarlar. Böylece su, besin maddeleri ve toprak kontamine olur. Kontamine su insanlara bulaşmada en önemli araçtır. Hastalık etkeni deniz suyunda 24 saat canlılığını korur. Hastalığa en fazla rastlanılan mevsimler ilkbahar, sonbahar ve erken kıştır. Özellikle tropikal bölgelerde yağmurlu sezonlar hastalığın en fazla görüldüğü zamanlardır (Bolin 2005, Burriel 2010, Lucheis ve Ferreira 2011).



Şekil 1. 2. Leptospiraların yaşam döngüsü (Zoonotic and vector borne disease, http://www.nicd.ac.za).

Hastalığın bulaşması enfekte idrar, plasental sıvılar veya süt ile olur. İki şekilde bulaşma görülür. Bunlar; direkt temasla ya da hayvanların idrarı ile kirlenmiş su, toprak, gıda ve diğer maddelerle temas olarak indirekt şekilde olur. İnkübasyon periyodu sonunda septisemi (leptospiremi) oluşur. İnsanlarda influenza benzeri semptomlar görülür. Özellikle çiftçiler enfekte idrarla temas halinde oldukları için büyük risk altındadır. Bazı ülkelerde maden işçileri, laboratuvar çalışanları, pirinç tarlasında çalışanlar, su, kanalizasyon işçileri ve bazı durumlarda askerler için meslek hastalığıdır (Şekil 1.2.). Ayrıca bu nedenlerle erkeklerde kadınlardan daha sık görülür (Bolin 2005, Lucheis ve Ferreira 2011, Turhan ve Hatipoğlu 2012, Scott 2018).

Her coğrafyada ve her hayvan türünde farklı leptospira serotipleri vardır Sığırlarda en sık görülen serovarlar *L. grippotyphosa, L. pomona, L. hardjo, L. hebdomanis* ve *L. icterohaemorrhagiae*'dir. Tüm dünyadaki sığırlarda en fazla hastalık oluşturan serovar *L. hardjo*'dur. Etken özellikle karaciğer, böbrek, akciğer, plesanta, meme ve serebrospinal sıvıda bulunur (Temur ve Sağlam 2003). Kuzey Amerika, Güney Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'daki sığırlarda *L.hardjo* ve *L.pomona* serovarları en sık olarak görülürken, Avrupa'da ise en sık görülen serovar *L.hardjo*'dur. Diğer serovarlar nedeniyle oluşan hastalık tablosu daha az olarak görülür (Bolin 2005). Çeşitli ülkelerde yapılan serolojik çalışmalar koyunlarda hastalığın sık olarak görüldüğü ve hastalık vakalarının çoğundan *L.hardjo* serovarının izole edildiği tespit edilmiştir. Etken koyunlarda yavru atımına neden olur. Diğer serovarlar da koyunlarda hastalığa neden olabilir (Lucheis ve Ferreira 2011).

Klinik semptomların görülmesi ve ciddiyeti, konakçı ve enfekte olan serovar arasındaki etkileşime bağlıdır. Bazı serovarlar, konakçıya adapte olurlar ve konakçı türünde kronik ve sıklıkla subklinik hastalığa neden olurken, adapte olmamış serovarlar ise genellikle akut ve ağır hastalığa neden olurlar. Konağa adapte olmuş serovarlar; köpeklerde *L. canicola*, atlarda *L. bratislava*, domuzlarda *L. pomona*, ruminantlarda *L. hardjo* ve sıçanlarda *L. icterohaemorrhagiae'*dır (Suepaul ve ark. 2011, Sykes ve ark. 2011, Loureiro ve ark. 2013). Rastlantısal serovarlara örnek olarak ise tropik bölgelerde yaşayan köpeklerde görülen *L .icterohaemorrhagiae* ve *L. copenhageni* kaynaklı leptospirozlar örnek gösterilebilir (Goldstein 2010). Sığırlarda genellikle üreme bozuklukları, abort, zayıf doğum ve fetal mumifikasyonla seyreden enfeksiyon konağa adapte serovarlar tarafından oluşturulur. Adapte olmayan serovarlar, sığırlarda kısa zamanda çok sayıda hayvanın etkilendiği ciddi salgınlara neden olur (Çizelge 1.2.). Hastalık genç sığırlarda ateş, sarılık ve hematüri gibi semptomlarla oldukça ağır olarak seyreder ve yüksek oranda mortalite görülür (Grooms ve Bolin 2005, Martins ve ark. 2012).

Atlarda konağa adapte olan serovar tarafından oluşturulan "ay körlüğü" olarak da tanımlanan hastalık tablosu tekrarlayan üveitistir. Adapte serovarlardan olan *L. bratislava* abort, ölü ve prematüre doğum gibi üreme bozukluklarına da neden olur (Gilger ve ark. 2008).

Çizelge 1. 2. Hayvan leptospirozunda konakta adapte ve rastlantısal enfeksiyonların karşılaştırılması (Loureiro ve ark. 2013).

Adapte Serovarlar	Rastlantısal Serovarlar
Etkilenen türler rezervuarlardır	Diğer türlerden bağımsız
Sık görülür	Seyrek görülür
Endemik	Epidemik
Çevresel faktörler az etkili	Çevresel faktörlerden bağımsız
Kronik veya subklinik	Akut
Semptomlar belirgin değil	Bir çok semptom gözlenir
Düşük İmmun yanıt	Yüksek İmmun yanıt
IgG baskındır	IgM baskındır

1. 4. Epizootiyoloji

Tüm dünyada, evde, vahşi yaşamda ve çiftlik hayvanları arasında sıkça görülen leptospiroz, salgınlar ve sporadik vakalar şeklinde birçok ülkede bildirilmiştir (Şekil 1.3.). Hastalık, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Avustralya, Yeni Zellanda, eski Sovyetler Birliği ülkeleri, Avrupa ve Asya'daki bir çok ülkede resmi olarak bildirilmiştir. İran'da yapılan bir çalışmada %25-42 arasında *Leptospira spp*. seropozitifliği saptanmıştır (Hamali ve ark 2012).



Şekil 1. 3. İnsan ve hayvan leptospiroz vakalarının dünyada dağılımı (Koizumi ve Watanabe 2009)

Leptospiroz Nikaragua, Brezilya, Hindistan, Güneydoğu Asya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde salgınlara neden olmuştur. Özellikle Orta ve Güney Amerika'da El Nino kasırgasından sonra görülen su baskınlarının ardından birçok vaka tespit edilmiştir (Levett 2001). Leptospiroz ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda Doğu Anadoludaki bazı illerde sığırlarda %17,8 ve koyunlarda %2,8 oranında serolojik olarak saptanmıştır (Bulu ve ark. 1990). Erzurum yöresinde yapılan bir çalışmada, hastalığın sığırlarda %16, koyunlarda %0,04 oranında seyrettiği görülmüştür (Özkan ve ark. 1993). Seroepidemiyolojik olarak tespit edilen insan ve hayvan leptospiroz vakalarının tüm dünyadaki dağılımı Şekil 1.2 'de gösterilmiştir.

1. 5. Patogenez

Leptospiralar zarar görmüş ya da bütünlüğü bozulmuş, aşınmış mukoza, deri, konjuktiva ve genito-üriner bölgeden vücuda girer (Lilenbaum ve ark. 2008). İnkübasyon periyodu 3-20 gün arasında değişir. İnkübasyon periyodu sonunda leptospiremi şekillenir. Leptospiremi döneminde etken karaciğer, dalak, böbrekler, üreme sistemi, gözler ve merkezi sinir sistemine girer ve çoğalır. Leptospiraların kan dolaşımına girmesinden hemen sonra serumda antikorlar tespit edilir. Bu faz, spesifik immünoglobulinlerin kanda konsantrasyonları yükselene kadar yaklaşık 10 gün sürer. Bu immunglobulinler etkenin opsonizasyonunu sağlar. Konakçı bağışıklık tepkisi, etkenin kan dolaşımından çıkarılmasında etkili olur. Bu aşamadan sonra esas olarak leptospirüri ile karakterize edilen ikinci faz başlar. Bu dönemde etken böbrekte kalabilir ve aylarca haftalarca idrar ile çevreye yayılabilir. Konakçı türlere ve enfekte edici serovara bağlı olarak, bu kronik evre birkaç yıl sürebilir. Ayrıca bu dönemde etken genital kanalda, daha az olarak beyin omurilik sıvısında ve gözde yerleşebilir (Faine ve ark. 2000, Levett 2001, Lucheis ve Ferreira 2011). İkterus, hemoglobinuri, organ ve dokularda kanamalar, abortus, mastitis, septisemi ile seyreder. Olguların %25-30'unda abortus vakası görülür. *L. hardjo* ve *L. pomana* abortus ve infertilitenin önemli serovarlarıdır. Etkenler uzun süre böbrek ve genital sistemde canlı kalabilirler. Etken fötusa plasenta yolu ile geçer. Hayvanlar arasında bulaşma çifleşme, temas yada kontamine çevre ile olmaktadır. Genellikle gebeliğin son üçte birlik döneminde abortus şekillenir. Fötus otolize uğramış şekilde atılır. Plasenta ödemli, kotiledonlar atonik, gevşek, nekrotik ve kahve-sarımtırak renktedir. Plasenta ve kotiledondaki

bulgular hastalığın karakteristik belirtileridir. Fötusun deri altında ödem, vücut boşuklarındaki kanlı sıvı birikimi, karaciğerde büyüme ve fokal nekrozlar, yangısel böbrek değişiklikleri ve retikülohistiositer infiltratlar görülür. (Özdemir ve Erer 2018).

1. 6. Klinik Bulgular

Leptospiroz ile ilişkili klinik bulgular serovar ve konağa bağlı olarak değişkenlik gösterir. Hastalık asıl konakçılarında düşük serolojik yanıt, hafif derecede akut klinik semptomlar ve kronik taşıyıcı renal enfeksiyonla karakterizedir. Rastlantısal konaklarda ise ciddi hastalık tablosu, yüksek antikor titresi ve kısa bir süre renal taşıyıcılık görülür. Klinik bulgular konağın duyarlılığına göre de değişiklik gösterir. Genellikle genç hayvanlar yaşlılara göre daha ciddi şekilde etkilenir. Gebelik ve laktasyon periyodunda olmayan hayvanlarda hastalık subklinik seyreder. Bu hayvanlarda hastalık kesim sırasında interstisyel nefrit lezyonlarının varlığı ile tespit edilir (Loureiro ve ark 2013).

Leptospiralar farklı türlerde farklı hastalık sendromlarına neden olur. Hastalık sığırlarda ikter, anemi, hemoglobinüri, septisemi, organ ve dokularda peteşiel kanamalar, abortus, mastitis ve ölümle karakterizedir. Hastalık görülen sığırlarda gebeliğin 6. ayından itibaren abortlar görülür. Sığırlarda abort oranı % 25-30'dur. *L. hardjo* ve *L. pomana* serotipleri infertilitenin önemli nedenlerindendir. Hastalık etkeni uzun süre böbrek, meme, uterus, ovidukt, testisler ve veziküler bezlerde canlı kalır. Bakteri, deri sıyrıklarından, suda yumuşamış ayak derisinden ya da bağırsak, genital kanal, burun ve göz mukozalarından girer. Enfekte inekten fötusa plasenta yolu ile geçer. Hayvanlar arasındaki bulaşma ise, çiftleşme, temas ya da bulaşık çevre ile olur (Özdemir ve Erer 2018).

Perakut formda ilk klinik belirtiler görüldükten 15-25 saat sonra ölüm şekillenir. Hastalığın bu formu genellikle 1-2 aylık buzağılarda görülür Enfeksiyondan kurtulan hayvanların iyileşmesi uzun sürer. Hayvanlar eski kondüsyonu ve verimine dönemez (Arda ve ark. 1997, Jones ve ark. 1997, Hazıroğlu ve Milli 2001, Levett 2001).

Sığırlarda görülen akut leptospirozda, yüksek ateş anoreksia, mukozalarda peteşiyel kanamalar, akut hemolitik anemi, hemoglobinüri, anüri, sarılık ve

mukozalarda solgunluk vardır. Enfekte idrarda hemoglobin, albümin, biluribin ve ürobilinojen saptanır. Ayrıca solunum güçlüğü görülür (Jones ve ark.1997). Süt ineklerinde 2-10 gün süren bu dönemde, süt üretiminde belirgin bir düşüş görülür. "Milk Drop Sendromu" olarak adlandırılan akut durumda süt, kolostruma benzer yapıda, kalın pıhtılı, sarı lekeli ve yüksek somatik hücreye sahiptir. Meme çok yumuşak bir yapıdadır. Leptospiral "Milk Drop Sendrom", sürülerde epizootik enfeksiyondan, yaygın bir endemik enfeksiyona kadar değişir. İleri gebe hayvanlar bu dönemde yavru atar. Bazı hayvanlarda etken eklemlere yerleştiği için topallama vardır (Arda ve ark. 1997, Bolin 2005, Scott 2018).

Subakut form genellikle erişkin hayvanlarda görülür. Sarılık, ateş, anoreksi, depresyon ve hemoglobinüri vardır. Bulguların şiddeti akut forma göre daha azdır. Süt verimi azalmıştır ve abortlar görülür. Bu form 1-3 hafta sürebilir (Hazıroğlu ve Milli 2001) Sığırlarda hastalığın akut veya subakut formu, en sık rastlantısal konakçı enfeksiyonlarında görülür ve enfeksiyonun leptospiremik fazında ortaya çıkar (Bolin 2005).

Kronik enfeksiyonlarda ise abort ve ölü doğum nedeniyle üreme kaybı vardır. Kronik leptospiroz genellikle erişkin hayvanlarda serovar hardjo ile şekillenir. Dişi genital yolunun kronik enfeksiyonunda, serovar hardjo ile enfekte olmuş sığırlarda kısırlık vardır. Gebe ineklerde ölü doğum, zayıf ya da prematüre doğum ve abortlara neden olur. Kısırlık, aşılanmış veya tedavi edilmiş sürülerde görülebilir. Bu form aylarca sürebilir (Hazıroğlu ve Milli 2001, Jones ve ark. 1997, Bolin 2005).

Serovar pomona ile enfekte olan buzağılarda nadir olarak şiddetli akut hastalık görülür. Klinik bulguları arasında yüksek ateş, hemolitik anemi, hemoglobinüri, sarılık, akciğer enfeksiyonu, menenjit ve ölüm vardır. Emziren ineklerde görülen rastlantısal enfeksiyonlarda, az miktarlarda kanlı idrar tespit edilir ve iyileşme uzun sürer (Bolin 2005).

Leptospirozda görülen süt veriminde düşüş ve abort semptomları birçok hastalıkla karışabilir. Süt veriminde düşüş görülen hastalıklar; beslemede yapılan ani değişiklikler, Bovine Viral Diarrhoea Infection (BVDV), akciğer kurtları, Bulaşıcı Infeksiyoz Bovine Rhinotracheitis (IBR), Sığır Solunum Sinsityal Virüsü (BRSV), Influenza A ve Salmonellosis'dir. Leptospirozun karıştığı abortla seyreden hastalıklar

ise *Neospora caninum*, Salmonellosis, *Bacillus licheniformis* ve *Campylobacter*'dir (Scott 2018).

Koyunlarda leptospiroz, akut ve kronik seyirli bir hastalık olduğundan, çoğu vaka asemptomatiktir ve esas olarak konağa adapte olmuş bir serovardan kaynaklanır. Klinik belirtilerin görüldüğü vakalar, konakçılara adapte olmayan serovarlar tarafından oluşturulur. Koyunlarda görülen klinik semptomlar genellikle böbrek, karaciğer ve üreme sistemindedir. Ölüm, kısırlık, abort, ölü doğum ve süt üretiminde düşme gibi klinik semptomlardan dolayı ekonomik kayıplara neden olur. Leptospiroz, koyun ve sığırlarda benzer semptomlar gösterir. Hastalık ateş, anoreksi, şiddetli sarılık, hemoglobinüri, anemi, sinirsel belirtiler ve ölüm ile karakterizedir. Gebeliğin son üçte birinde abort, zayıf yavru doğumu, ölü doğum ve kısırlık gibi üreme sorunları ortaya çıkar Akut leptospirozda koyunlarda, ateş, apati, dyspnea, septisemi, zayıflık ve ölüm görülür. Üreme kayıplarının çoğu, *L.hardjo* ve *L.pomona* ile ilişkilidir. Az sayıda vakada *L.ballum* ve *L.grippotyphosa* tespit edilmiştir. Hastalığın kronik formunda görülen en belirgin semptom hayvanın kilo kaybetmesidir. Etken sinir sistemini etkilediğinde ensefalit tablosu görülür. Koyunlarda klinik leptospiroszda en sık görülen serovar pomona'dır (Lucheis ve Ferreira 2011).

Keçilerde leptospiroz akut ve subklinik formda seyreder. Akut formda iştahsızlık, sinirsel semptomlar, ishal, abort, milk drop sendrom ve opak kürk yapısı en belirgin semptomlardır. Genç kuzu ve oğlaklarda hastalık şiddetli seyreder. Hastalığın şiddetli seyretmesi *L.pomona, L.ballum, L. icterohaemorrhagiae* veya *L. grippotyphosa* gibi rastlantısal serovarlarla ilişkilendirilir. Subklinik enfeksiyonlarda infertilite, gebe kalmada zorluk, abort, ölü doğum ve zayıf oğlak doğumları görülür (Lilenbaum ve ark. 2008, Martins ve Lilenbaum 2013)

1. 7. Patolojik Bulgular

Leptospiroz; vaskülit, endotel hasarı ve monositik hücreler, plazma hücreleri, histiyositler ve nötrofillerden oluşan yangısel infiltrasyonların gelişimi ile karakterizedir. Genel muayenede geniş ve yaygın peteşiyel kanamalar görülür. Organlar gelişen ikter derecesine bağlı olarak renk değiştirir. Histopatolojik olarak en fazla değişim karaciğer, böbrekler, kalp ve akciğerlerde görülür. Ancak diğer organlarda enfeksiyonun ciddiyetine göre etkilenebilir. Karaciğer anemik, yumuşak

ve büyüktür. Serozalarda kanamalar vardır. İntrahepatik kolestaz vardır. Kupffer hücrelerinin hipertrofisi ve hiperplazisi belirgindir (Levett 2001).

Böbrekler şişkindir. Böbreklerde nötrofil ve monositlerden oluşan yoğun bir hücresel infiltrasyonun eşlik ettiği interstisyel nefritis tablosu en belirgin bulgudur. Etken renal tübüllerde görülebilir. Elektron mikroskobide tubüler hücrelerin fırçamsı kenarlarında dökülmeler, mitokondrial azalma ve tubüler membran tabanında kalınlaşma izlenir. Ayrıca glomeruluslarda da küçük değişimler gözlenir (Levett 2001).

Kalp solgundur ve peteşiyel kanamalar gözlenir. Kalpteki patolojik bulgular, belirgin olarak lenfosit ve plazma hücrelerinin infiltrasyonu ile oluşan interstisyel miyokardit, epikardiyumda mononükleer infiltrasyon, peteşiyel kanamalar, perikardiyumda sıvı birikimi ve koroner arterit'tir. Akciğerlerde nötrofil lökosit ve kanamalar en dikkat çekici bulgulardır. Alveollerde monosit ve nötrofillerinden oluşan infiltrasyon görülür. Ayrıca hiyalin membran oluşumu görülebilir. Leptospiralar, interalveolar bölgedeki endotel hücreleri içerisinde görülebilir ve kapiler endotel hücrelerine bağlanabilir. Dalak koyu renkli ve şişkindir. Lenf nodülleri ödemli ve kanamalıdır. Abort fötusün plesantası kalın ve ödemlidir. İskelet kaslarında özellikle bacak kaslarında, histiyositlerin, nötrofillerin ve plazma hücrelerinin infiltrasyonu ve kas liflerinin fokal nekrozu gözlenir (Levett 2001).

1. 8. Teşhis

Hastalığın teşhisi etken izolasyonu, serolojik ve histopatolojik muayenelerle yapılır. Ancak son yıllarda immunperoksidaz tekniği ile formolde tespit edilip parafinde bloklanan doku kesitlerinde bakteriyel antijenin saptanmasıyla tanıya gidilmektedir (Temur ve Sağlam 2003).

Gebeliğin son üçte birlik döneminde rastlanan abortuslarda enfeksiyon sonucu ölen fötüs otolize olarak atılır. Plesanta ödemlidir ve leptospira kümeleri görülür. Kotiledonlar atonik, gevşek, nekrotik ve kahve-sarımtırak renktedir. Plasenta ve kotiledonlardaki tespit edilen bu bulgular hastalığın teşhisinde önemli karakteristik belirtilerdir. Abort fötüsde ise deri altında ödem, vücut boşluklarında kanlı sıvı birikimi, karaciğerde büyüme, yangısel böbrek değişikleri ve retikülohistiositer

infiltratlar tespit edilir. Fötüse ait böbrek, karaciğer, akciğer dokuları ve plasentadan yapılan frotilerde Leptospiralar saptanır (Özdemir ve Erer 2018).

Leptospirozun laboratuvar tanısı, klinik örneklerin doğrudan incelenmesine, etkenin izole edilmesine, serolojik testler yoluyla anti-leptospiral antikorların tespit edilmesine veya etken DNA'sının moleküler yöntemlerle tespit edilmesine dayanır. Mikroskopik aglütinasyon testi (MAT), leptospirozun serolojik teşhisi için referans test olarak kabul edilmiştir. Ancak bu test leptospiraların varlığını tespit etmez, bu nedenle aktif enfeksiyonu doğrudan göstermez veya konağın taşıyıcı veya yayma durumunu saptamaz (Bisias ve ark. 2009, Fang ve ark. 2014). Bu hastalığın teşhisinde pahalı ve zor bir yöntemdir. İyi bir laboratuvar altyapısı ve uzmana ihtiyaç olduğu gibi, çok sayıda serovara da ihtiyaç vardır (Bisias ve ark. 2009). Ayrıca doğal enfeksiyon ve aşı ile oluşan antikorlar arasındaki farkı göstermez. Ayrıca, yakın ilişkili serovarlar arasındaki çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Kültür, çeşitli örneklerden bakteri izole edilmesi nedeniyle önemli tanımlayıcı bir teşhistir. Ancak uzun zaman alması, zahmetli olması ve diğer etkenlerle kontamine olması nedeniyle zordur. Ayrıca bazı serovarların (örneğin, Hardjo bovis) kültürü doğal olarak zordur (Fang ve ark. 2014).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri, 1990'lardan bu yana leptospirozun tanısında güvenilir ve hızlı moleküler yöntemler olarak kullanılmaktadır. PCR'ler kültür gibi geleneksel testlerden daha duyarlıdır. PCR özellikle hayvanın enfekte edici serovar'a immün tepkisi zayıf olduğunda faydalıdır. Sığırlarda *L.hardjo* enfeksiyonunun saptanması için MAT duyarlılığı yetersiz olduğundan PCR uygun bir tekniktir. Son yıllarda geliştirilen qPCR konvansiyonel PCR'a göre çok daha hızlı ve kontaminasyon riski daha azdır (Lucheis ve Ferreira 2011, Fang ve ark. 2014).

Bulaşıcı hastalıkların etkin kontrolü için hassasiyeti ve özgüllüğü yüksek, uygulanabilir, pratik tanı yöntemleri kullanmak esastır. Bununla birlikte, hayvan leptospirozunun tespiti için ideal bir laboratuvar testinin olmayışı, tanı ve sürveyansın önündeki en büyük engel olmaya devam etmektedir. Ayrıca hastalığın doğal seyri, hangi teşhis testinin seçilmesi gerektiğini ve toplanması gereken klinik örneklerin türünü doğrudan etkilemektedir. Leptospiremi sırasında (akut ve başlangıç aşaması), etken tam kan numunelerinde ve beyin omurilik sıvısında kolayca tespit edilebilir.

Ancak bu aşamada humoral immün yanıt henüz oluşmamıştır ve serolojik testlerde saptanabilir, serolojik titreler tespit edilmez. Bu arada, leptospirüri varsa, etken aralıklı olarak idrarla atılır ve kanda zorlukla tespit edilir. Bu durumda, hayvanda serolojik testlerle saptanabilir bir immun yanıt oluşur (Loureiro ve ark. 2013).

Hayvan öldüğünde karaciğer, akciğer, beyin ve böbreklerden analiz için örnekler toplanabilir. Abortlarda, belirtilen numunelerin yanı sıra, kanda, beyin omurilik sıvısında ve mide suyunda leptospiralar tespit edilir. Hastalığın teşhisinde seçilen metot önemlidir. Akut hastalık sırasında, seçilen tanı yöntemi, antikorların saptanmasından önce kesin bir tanı elde etme yeteneğine sahip olmalıdır. Bu durumda tedavi daha etkili olabilir. Bu durumda, PCR gibi etkenin gösterilmesine yönelik bir yöntem serolojik testlerden daha uygundur. Leptospiroz hayvancılıkta sürü düzeyinde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Bu nedenle serolojik testler sürü taramasına daha uygundur (Loureiro ve ark. 2013).

1. 8. 1. Direkt Teşhis Yöntemler

Mikroskopi

Leptospiralar çok küçük mikroorganizmalardır (10-20 μm) ve ancak Gram veya Giemsa boyama gibi geleneksel boyama yöntemleriyle görülür. Etken karanlık saha mikroskobunda parlak renkli olarak görülür (Fain ve ark. 2000). Boyama ile teşhiste yanlış pozitiflikler ve yanlış negatiflikler olabilir. Ayrıca bakterinin görülebilmesi için alan başına yaklaşık 10^4 leptospira/ml gereklidir. Numunenin alınma zamanı ve hazırlamadaki hatalarda teşhis sonucuna etki eder (Ahmad ve ark. 2005). Kandaki Leptospiralar hastalığın başlangıcındaki birkaç günde tespit edilebilir. Kan veya idrarın karanlık alan mikroskopisi ile doğrudan incelenmesi, fibrin ipliklerinin, diğer proteinlerin kazayla ortamda bulunan diğer maddelerin leptospira diye yanlış sınıflandırılmasına neden olabilir. Bu nedenle, bu kesin bir laboratuvar testi olarak değil, diğer tanı yöntemlerine ek olarak kullanılmalıdır. Warthin-Starry gümüş boyama (WS) ve İndirekt flouresans (IF) ve Immunhistokimya (IHC) teknikleri, klinik örneklerde bakterilerin bütün halde doğrudan görülmesine izin verir. IF'nin sınırlamaları, doku morfolojisi hakkında bilgi eksikliği, sonuçları koruma zorluğu ve özel floresan mikroskopi ekipmanı ihtiyacıdır. Buna karşılık, IHC özel bir mikroskop gerektirmez ve doku bölümlerinde antijenin dağılımını ve lokalizasyonunu

inceleme fırsatı sunar. Ayrıca, bu yöntem formalinle fikse ve parafine gömülmüş doku örneklerini kullanarak geriye dönük çalışmaları mümkün kılar (Ahmad ve ark. 2005, Loureiro ve ark. 2013). Levaditi boyamada, sarı zemin üzerinde siyah boyanmış spiral etkenler görülür. Etkenin iyi boyanabilmesi için dokunun tespit edilmeden önceki tazeliği büyük önem arz etmektedir. Aksi durumlarda etkenin görünümünde değişimler olduğu belirtilmiştir (Falini ve Taylor 1983, Russell ve Faine 1984).

Bakteriyolojik Kültür

Etken izolasyonu altın standart tanı olarak kabul edilir ancak bakterinin yavaş üreme hızı ve toplanan örneklerin hemen besiyerine ekilmesi gerekliliği yöntemin dezavantajlarıdır. Bir diğer dezavantajı ise örneklerin toplandıktan hemen sonra etkene özel besiyerine ekilmesi gerekliliğidir (Levett 2001, Adler ve Moctezuma 2010). Leptospiralar kan, beyin omurilik sıvısı, idrar ve post-mortem doku örnekleri gibi materyallerden izole edilir. Etkenin üremesini sağlayan spesifik besiyerleri Ellingausen-McCullough- Johnson-Harris (EMJH), modifiye Korthof ve yarı-katı Fletcher'dır. Numunelerin ekildiği besiyerleri 28-30 °C'de inkübe edilir ve haftalık olarak kontrol edilir. Karanlık saha mikroskobu ile negatif sonuç vermek için 20 hafta bakılmalıdır. Bu nedenle kültür, araştırma çalışmaları için rutin bir teşhis testi olarak etkili değildir. Yüksek özgüllüğe rağmen, hassasiyeti düşüktür ve negatif bir sonucun verilmesi üç aya kadar sürebilir (Loureiro ve ark. 2013).

Moleküler Analizler

Hayvanlarda leptospiroz tanısında son yıllarda giderek artan oranda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılmaktadır. Bu tekniğin en önemli avantajı sürüde taşıyıcı tespiti ve erken teşhistir. Bu teknik, çeşitli biyolojik numunelerde minimum miktarda mikroorganizma DNA'sının hızlı bir prosedürde amplifikasyonunu sağlayan yüksek hassasiyet ve özgüllük sunar. Bazı moleküler sistemler örneğin mililitresindeki 10 veya 100 genom kopyasını bile tespit edebilmektedir. Son zamanlarda, Real-time kantitatif PCR (qPCR) kullanılmaktadır. Bu test konvansiyonel PCR'dan daha hızlı ve kontaminasyona karşı daha az hassastır (Ahmad ve ark. 2005, Pinna ve ark. 2011, Loureiro ve ark. 2013).

Tiplendirme Analizleri

İzole edilen bir Leptospira suşunun tiplendirilmesi taksonomik sorunlar nedeniyle oldukça güçtür. Her ne kadar serolojik sınıflandırma taksonomik bir değere sahip olmasa da rezervuarları belirlemek ve önleyici stratejiler geliştirmek için yararlıdır (Salaün ve ark. 2006). Saha suşlarının tiplendirilmesi için hem serolojik hem de moleküler metodların kombine edilmesi gerekir. Son yıllarda dünyada Variable-NumberTandem-Repeat (VNTR) ve Multi Locus Sequence Typing (MLST) metodları kullanılmaktadır (Loureiro ve ark. 2013).

1. 8. 2. İndirekt Teşhis Yöntemleri

Antikor Tespiti-Seroloji

Enfekte canlıda immun yanıtın tespit edilmesine dayanan serolojik yöntemler uzun yıllar kullanılmıştır. Immun yanıt sonucunda oluşan antikorlar enfeksiyondan yaklaşık on gün sonra kanda tespit edilir. Bu sürede, leptospiraların kanda tespit edilme ihtimalinin düşük olması nedeniyle serolojik yöntemler tercih edilir. Bazı durumlarda leptospirüri fazında bile direkt metotlar ile etkeni tespit etmek zor olabilmektedir (Faine ve ark. 2000, Levett 2001, Adler ve Moctezuma 2010).

Mikroskobik aglütinasyon testi (MAT)

İnsanlarda ve hayvanlarda leptospiroz tanısı için önerilen serolojik bir testtir (OIE 2018). Test serum antikorları ile canlı leptospiraların dış membran antijenleri arasındaki aglütinasyon reaksiyonlarının saptanmasına dayanır. Yaygın olarak kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları vardır. Leptospira serovarlarının bir paneli, laboratuvar çalışanları için tehlike içermeyen sıvı ortamda canlı tutulmalıdır. Paneldeki eksiklikler yanlış negatifliğe neden olabilir. Ayrıca test zahmetli ve aglütinasyonun okunması subjektiftir. Ayrıca serovarlar arasındaki çapraz reaksiyon nedeniyle yanlış sonuçlar çıkabilir. MAT hem M hem de G antikorları algılar ancak mevcut, yeni veya geçmiş enfeksiyonlar arasında ayrım yapamaz ve oluşan antikorların aşıdan mı doğal enfeksiyondan mı olduğunu gösteremez. MAT için aktif enfeksiyonun göstergesi olan kriterler, akut ve iyileşen serumlar arasında titrede dört kat artış olmasıdır (Ahmad ve ark. 2005, Tokoyawa ve ark. 2011, Loureiro ve ark. 2013).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

MAT'ın bazı dezavantajları nedeniyle anti-Leptospira immünoglobülinlerini saptamak için insan ve hayvanlar için farklı olmak üzere ELISA geliştirilmiştir. Bu testin avantajları, spesifik immünoglobülin IgM veya IgG'nin (ve sonunda IgA'nın) tespiti ile akut ve kronik enfeksiyon arasında ayrım yapabilmesi ve MAT ile karşılaştırıldığında yüksek hassasiyet ve özgüllük ve yüksek tekrarlanabilirliğinin olmasıdır. Ancak, kullanılan antijene bağlı olarak, ELISA'da pozitif bir sonuç, enfekte serovar/serogrup hakkında bilgi vermez ve bir leptospiroz vakasını teşhis etmek için yeterli değildir, PCR veya kültür ile doğrulanması gerekir (Flannery ve ark. 2001, Hamond ve ark. 2012, Picardeau 2013).

1. 9. Tedavi

Leptospiroz tedavisinde, özellikle penisilin grubunun antibiyotikleri ilk seçenek tedavi olarak kabul edilir. Sefalosporinler, kloramfenikol, doksisiklin ve azitromisin gibi diğer antibiyotiklerin etkileri de birkaç klinik çalışmada incelenmiştir. Ancak antibiyotiklerin tedavi üzerinde kesin etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (Charan ve ark. 2013). Streptomisin kolayca böbreklere nüfus etmesi ve böbrek tübüllerindeki bakterileri tahrip etmesi nedeniyle en çok tercih edilen antibiyotiktir. Saldanha ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada streptomisinin sığırlardaki üreme fonksiyonlarını % 92 oranında geri getirdiğini saptamışlardır (Gerritsen ve ark. 1994)

Tedavideki ana amaç etkenin böbreklerde ve karaciğerde kalıcı hasar vermeden kontrol altına alınması ve sürüye yayılmasını önlemektir (Lucheis ve Ferreira 2011). İntramüsküler olarak 1 ila 5 gün dihidrostreptomisin (25 mg / kg), veya oksitetrasiklin (40 mg / kg) ve / veya tylosin (44 mg / kg), günde bir kez, 3 ila 5 gün boyunca uygulanması önerilmektedir (Radostits ve ark. 2007). Sığırlarda milk drop sendromda saçılımı önlemek ve zoonotik riski azaltmak için 25 mg/kg'a tek bir intramüsküler streptomisin/dihidrostrepomisin enjeksiyonu önerilir (Scott 2018). Tedavi etkinliği hastalığa neden olan serovarla ilişkilidir. Ancak her durumda hayvanlara kan transfüzyonu, antimikrobiyollerle tedavi ve destek tedavisi önerilir (Lucheis ve Ferreira 2011).

1. 10. Korunma

Hastalıktan korunmak için öncelikle hayvanların yaşadığı ortamların hijyenine dikkat etmek gerekir. Ayrıca hayvanları kontamine ortamlardan uzak tutmak ve enfekte vahşi hayvanlarla temastan kaçınmak gerekir. Korunmada mücadele stratejileri iyi belirlenmelidir. Mücadele stratejisinin 3 önemli basamağı vardır. Bunlar; enfeksiyon riskini azaltma, uygun antibiyotik tedavisi ve aşılamadır. Ayrıca önlem olarak suni tohumlama merkezlerindeki spermlere antibiyotik ilave edilebilir. Ancak aşılama hastalıktan korunma için en iyi yoldur. Aşı idrar ile enfeksiyon saçılımını, milk drop sendrom ve abortları önler. İlk aşılamada 4 hafta arayla iki aşı yapılır ve her yıl tek doz aşı tekrar edilir (Zelski 2007, Scott 2018, Lucheis ve Ferreira 2011). Sürüye yeni hayvan katılırken mutlaka karantina koşulları uygulanmalıdır. Boğalarda dahil olmak üzere yeni hayvanlar 3 hafta süre ile karantinada tutulmalı ve sürü katımından 10-14 gün önce iki kez streptomisin 25 mg / kg ile tedavi edilmelidir (Scott 2018, Lucheis ve Ferreira 2011).

Akut *L. hardjo* enfeksiyonu görülen sürülerde, enfeksiyonun yayılma riski göz önünde bulundurularak tüm sürüye antibiyotik tedavisi yapılmalıdır. Enfeksiyonun endemik olarak seyrettiği ve abort vakalarının görüldüğü sürülere yılda bir kez aşılama yapılmalıdır. Ayrıca yeni düve katımında düvelerin aşı programının tamamlanmış olmasına dikkat edilmelidir (Zelski 2007, Scott 2018, Lucheis ve Ferreira 2011).

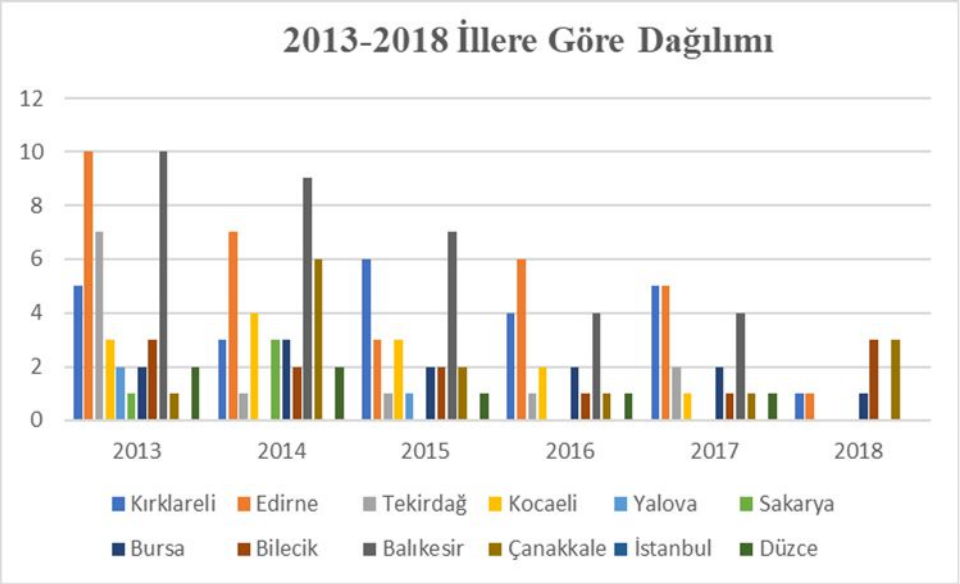
Sunulan çalışmada, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne Marmara Bölgesi'ndeki illerden 2013-2018 yılları arasında getirilen ruminantlara ait abort olguları içerisinde Leptospirozun teşhisinde kullanılan Levaditi ve immuhistokimyasal yöntemlerinin karşılaştırması ile bu olgularda gözlenen histopatolojik değişikliklerle uygunluğu araştırılarak teşhiste hangi yöntemlerin güvenli olarak kullanılabileceği amaçlanmıştır. Ayrıca, tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz hayvancılığı için önem teşkil eden Leptospirozun Marmara bölgesindeki 2013-2018 yılları arasında durumunun ortaya konması hedeflenmiştir. Elde edilecek sonuçlar ile ruminantlardaki abort olguları içerisinde leptospirozun oranının ortaya konularak önemli ekonomik kayıplara neden olan leptospiroza bağlı abort olgularının önlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınması ile ülke ekonomisi ve hayvancılık sektörüne katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2. 1. Gereç

Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nin farklı il ve ilçelerinden 2013-2018 yılları arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne gönderilen 1252 adet sebebi bilinmeyen veya leptospiroz şüpheli abort fötuslerin (koyun fötus, keçi fötus, sığır fötus) nekropsileri yapılarak doku örneklerinin incelemeleri yapıldı. İllere göre gelen örnek sayılarının grafiği Şekil 2.1'de verildi.

Çalışma için Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü Yerel Etik Kurulunun 03/04/2018 tarih ve 186 sayılı yazısı ile izin alındı.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan örneklerin illere göre dağılımı.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Histopatolojik inceleme

Soğuk zincir şartlarında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'ne kargoyla veya elden getirilen fötus numunelerine ait örnekler, Enstitü nekropsi salonunda nekropsisi yapıldıktan sonra, akciğer, karaciğer ve böbrekten alınan örnekler % 10 luk tamponlu nötral formalinde 48 saat süreyle tespit edildi. Trimleme işlemlerinden sora kasetlere alınan örnekler 1 gece çeşme suyunda yıkandı. Daha sonra doku takip cihazında (Shandon) alkol, ksilol ve parafin serilerinden geçirilen örnekler blok parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Bu bloklardan mikrotomla 4-5 µm kalınlığında

kesitler alındı. Deparafinizasyon ve rehidrasyon aşamalarından sonra hematoksilen eozinle boyanarak (Luna 1968) ışık mikroskobunda incelendi.

2. 2. 2. Levaditi Boyama

Formol tespitini takiben 2 mm inceliğinde trimlenen doku örnekleri, çeşme suyunda 1-3 saat süreyle yıkandı. 24 saat süreyle % 96'lık alkolde tutuldu. Doku, kabın dibine çökünceye kadar distile suda tutuldu. Taze hazırlanmış gümüş nitrat solüsyonu (% 3) içine konuldu ve karanlıkta 37 ^{o}C'de 3-5 gün solüsyon yenilenerek bekletildi. Distile suda çalkalandı. Karanlıkta oda sıcaklığında, 1-3 gün indirgeme solüsyonunda bekletildi. Distile suda çalkalandı. %80, %96'lık alkol ve absolut alkollerden her birinde 30 dakika ve 2 ksilol kabında 1'er saat tutularak geçirildi ve 2 parafin kabında 45'er dakika bekletildi. Parafine gömüldükten sonra 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri, ksilollerden geçirilerek üzerlerine lamel yapıştırıldı.

2. 2. 3. İmmunhistokimyasal Boyama

İmmunhistokimyasal boyamalar BioSite Histo HRP Kit (Novex, BioSite, KDB-10016) prosedürüne göre yapıldı. Lizinli lama alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C'de veya 60 °C'de 1 saat inkube edildi. İnkubasyonu tamamlanan kesitler 3 kez 5'er dakika xylolde tutuldu. Alkol serilerinden 2 kez 10 dakika geçirildi. Antijen retrieval için sitratlı tamponda (pH 6.0) mikrodalgada 800 watta 15 dk kaynatıldı. Bundan sonra aynı tampon içerisinde 400 watta 15 dakika mikrodalgada bekletildi. Sonra 20 dakika dış ortamda bekletildi. % 3' lük hidrojen peroksitte 20 dakika tutuldu (3 cc hidrojen peroksitt 97 cc methanol). Sonra preperatları başka bir kaba alıp PBS ile (Fosfat tampon çözeltisi pH 7.6) 10 dakika bekleyerek yıkama yapıldı. Karanlık ortamda PBS'den çıkarıp preperatın altını ve etrafını kuruladıktan sonra Blocking solution (Protein Bloklama Çözeltisi) damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Preperatın üzerindeki blocking solution, etrafını kuruladıktan ve fazlalığını dökdükten sonra üzerine Rabbit anti Leptospira antibody (İnvitrogen, PA1-7228) döküldü ve 1 saat karanlık ortamda bekletildi. 2 kez 5 er dakika PBS ile yıkandı. Etrafını kurulayıp Broad Spectrum Seconder Antibody damlatıldı. 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. Tekrar 10 dakika PBS yıkama kurulama aşamasından sonra HRP Streptavidin karanlık ortamda 10 dakika tutuldu. Sonra tekrar 10 dakika PBS ile yıkandı. Kromojen olarak (karanlık ortamda her preparat için 200 µl) DAB damlatıldı

ve 10 dk beklendi. Distile suda yıkandıktan sonra Mayer Hematoksilende 3-5 dakika bekletilip, suda mavileşinceye kadar yıkandı. Alkol–Xylol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

3. BULGULAR

2013-2018 yılları arasında Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen toplam abort numunesi ve Leptospira ile seyreden pozitif numune sayısı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan örneklerin toplandığı yıllara göre toplam ve IHC pozitif numune dağılımı.

YIL	TOPLAM NUMUNE	IHC POZİTİF NUMUNE
2013	217	42
2014	153	38
2015	190	27
2016	190	22
2017	264	22
2018	238	9
TOPLAM	**1252**	**160**

Çalışmada 2013-2018 yılları arasında gelen 1252 adet fötus numunesi incelenmiştir. İncelenen ruminant fötus örneklerinin türlere göre dağılımı ve saptanan pozitiflik oranı Çizelge 3.2. verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Çalışmada kullanılan örneklerin türlere göre dağılımı

Toplam numune sayısı	Ruminantlar arası dağılımı	Pozitiflik oranı
1252 adet fötus	750 adet koyun fötus	76 adet koyun fötus
	218 adet keçi fötus	26 adet keçi fötus
	284 adet sığır fötus	58 adet sığır fötus

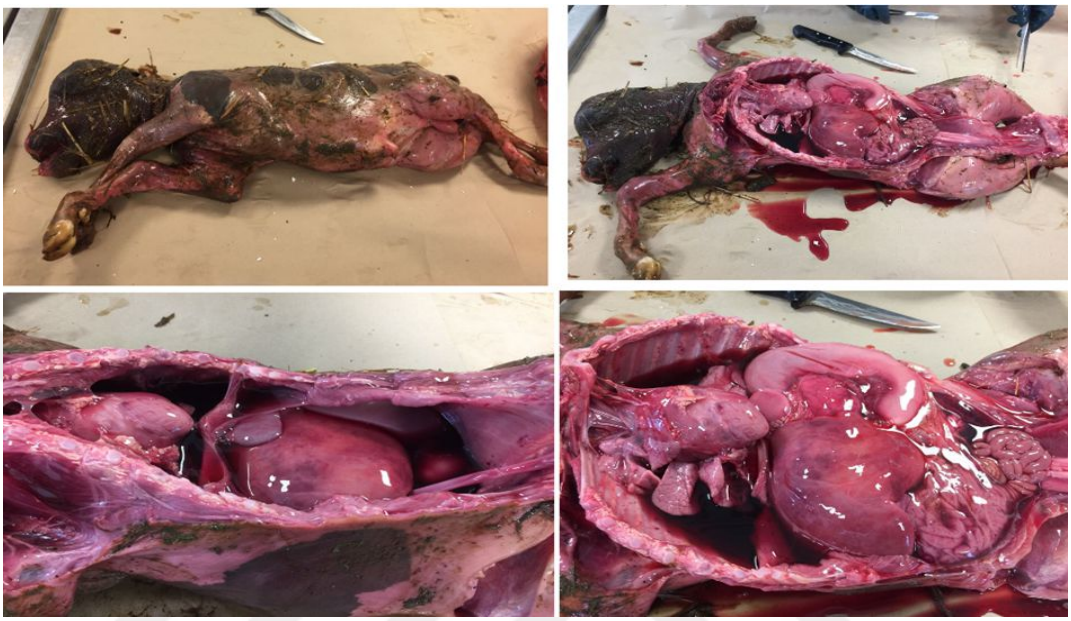
Çalışma sonucunda elde edilen pozitif fötus numunelerinin Marmara bölgesindeki illere göre dağılımı Çizelge 3.3. verilmiştir.

Çizelge 3.3. Pozitif fötus numunelerinin Marmara bölgesindeki illere göre dağılımı

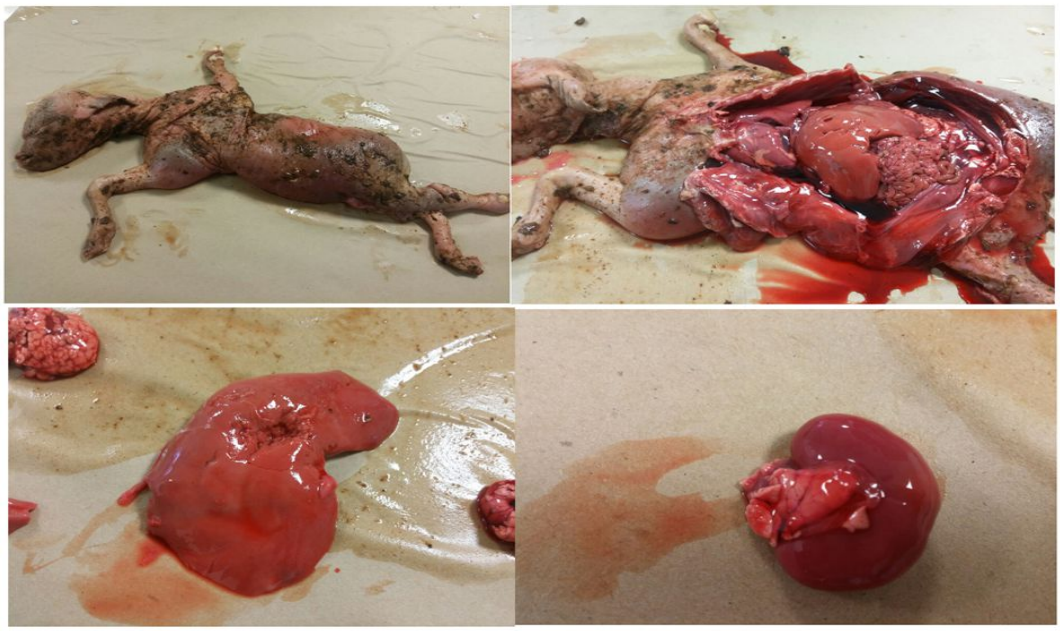
		Kırklareli		Edirne		Tekirdağ		Kocaeli		Yalova		Sakarya		Bursa		Bilecik		Balıkesir		Ç.kale		İst.		Düzce	
		Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif	Örnek	Pozitif
2013	**Koyun**	15	1	23	4	14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

3. 1. Makroskobik Bulgular

Nekropsisi yapılan ruminant fötuslarının bazılarında vücut boşluklarında kanlı eksudat, deri altı ödemleri, böbreklerde şişkinlik ve peteşiyel kanamalar, karaciğerde nekroz odakları (Şekil 3.1) ve otolitik değişiklikler (Şekil 3.2) vardı.



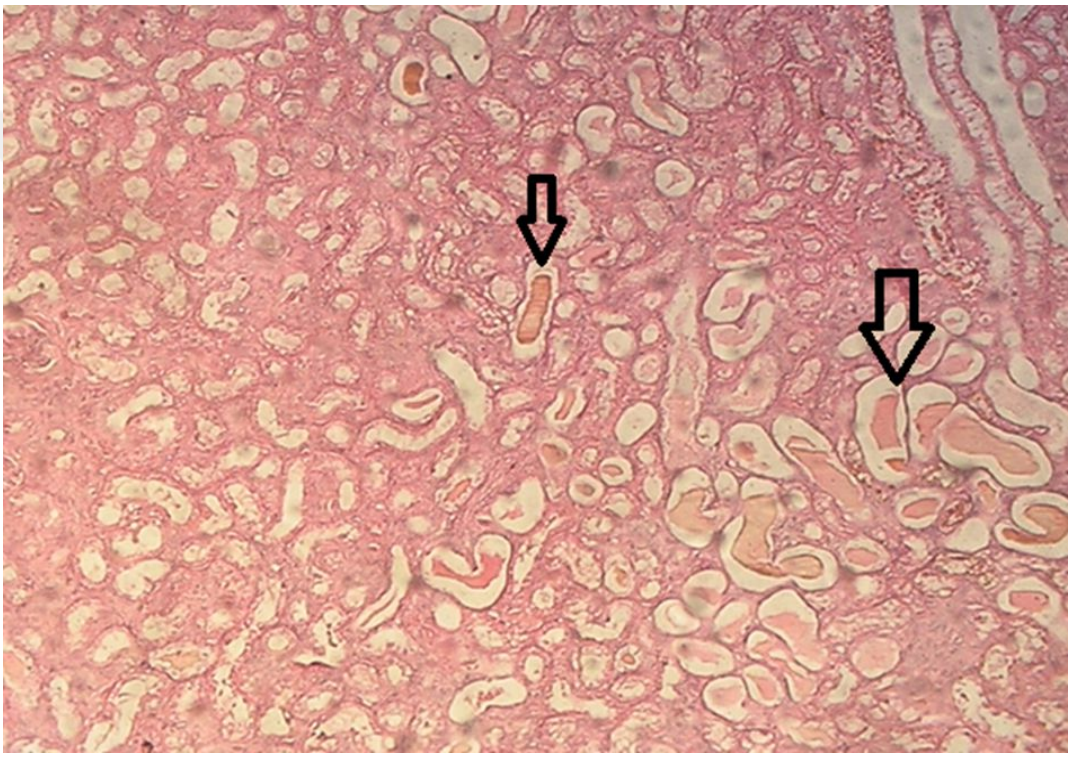
Şekil 3.1. Sığır fötus vücut boşluğunda kanlı eksudat ve karaciğerde nekroz odakları (PVKE Patoloji Lab. Arşivi).



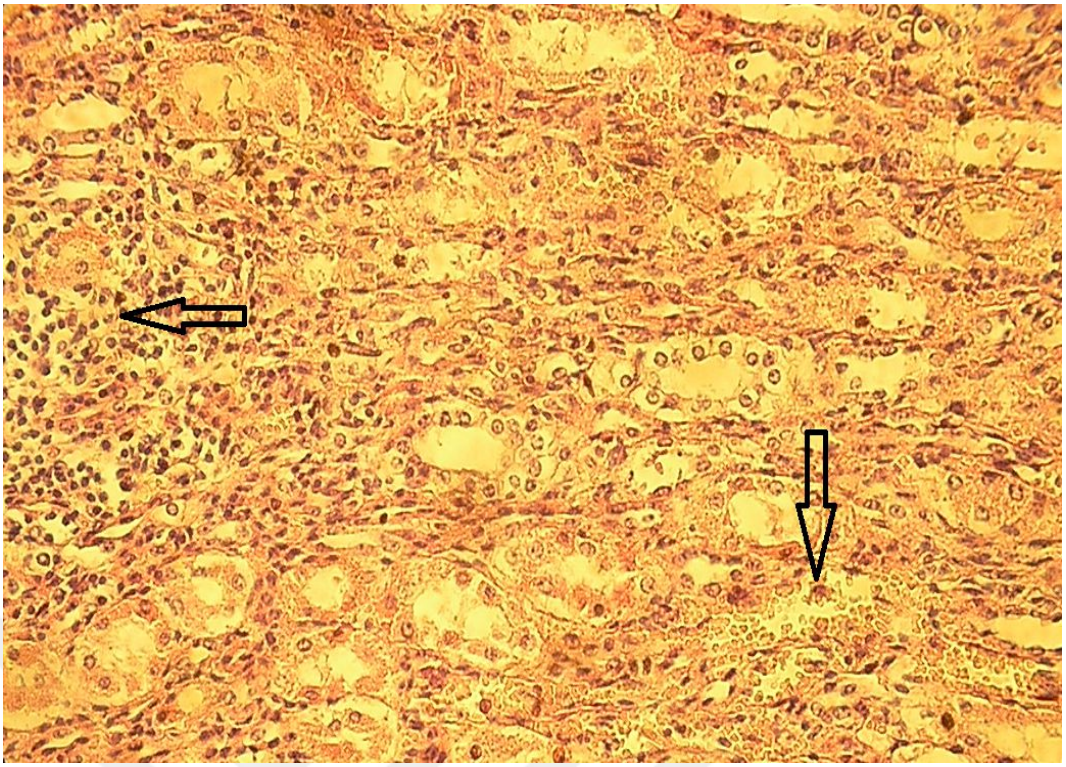
Şekil 3.2. Abort kuzuda otolitik değişiklikler. Koyun fötusunda deri altında biriken ödem ve kanlı eksudat, karaciğer anemik, yumuşak ve büyüktür. Böbrekte şişkinlik (PVKE Patoloji Lab. Arşivi)

3. 2. Histopatolojik Bulgular

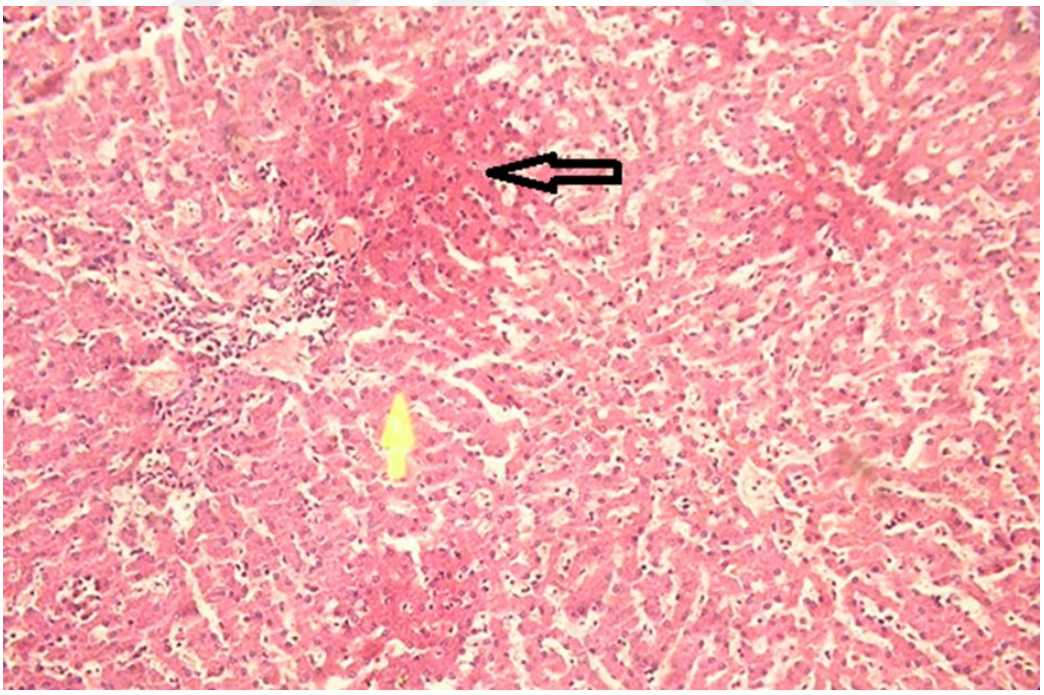
Çalışılan numunelerden hazırlanan doku örneklerinin histopatolojik incelemelerinde en belirgin değişiklikler sırasıyla böbrek, karaciğer ve akciğerde gözlendi. Böbreklerin tubulus lümenlerinde hiyalin silindirleri (Şekil 3.3), tubulus epitellerinde nekroz, interstisyumda yaygın kanama alanları ve nötrofil lökosit infiltrasyonları tespit edildi (Şekil 3.4). Karaciğerde periasiner nekroz (Şekil 3.5), ve hepatositlerde dejenerasyon saptandı. Akciğerlerde bronş ve alveol epitellerinde dökülme ile lümenlerinde nötrofil lökosit infiltrasyonu gözlendi (Şekil 3.6-3.7).



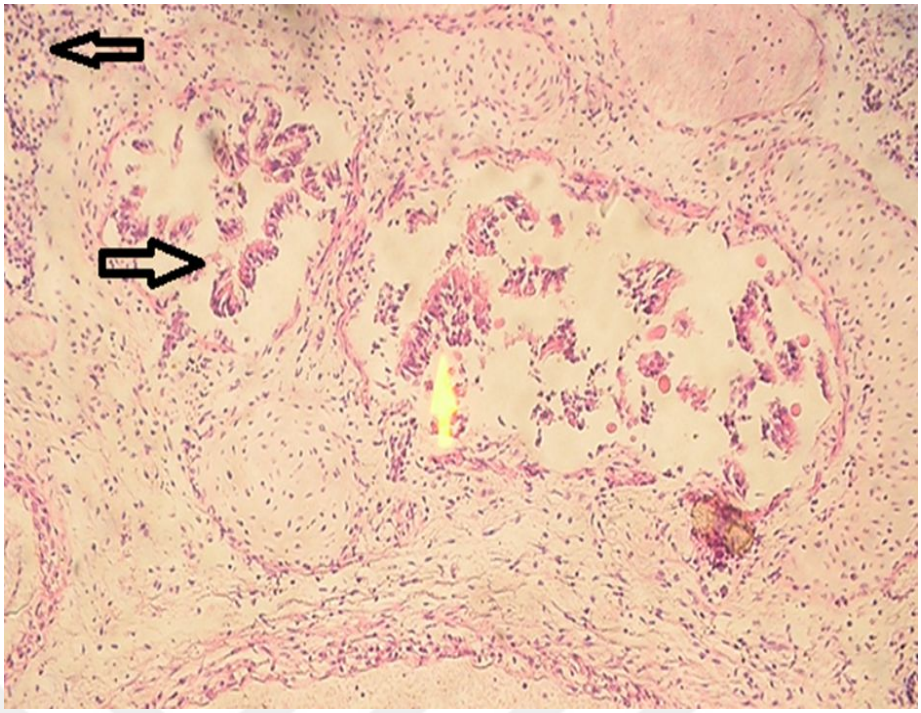
Şekil 3.3. Renal medulla tubul lümenlerinde hiyalin silindirleri (oklar), H&E, X200.



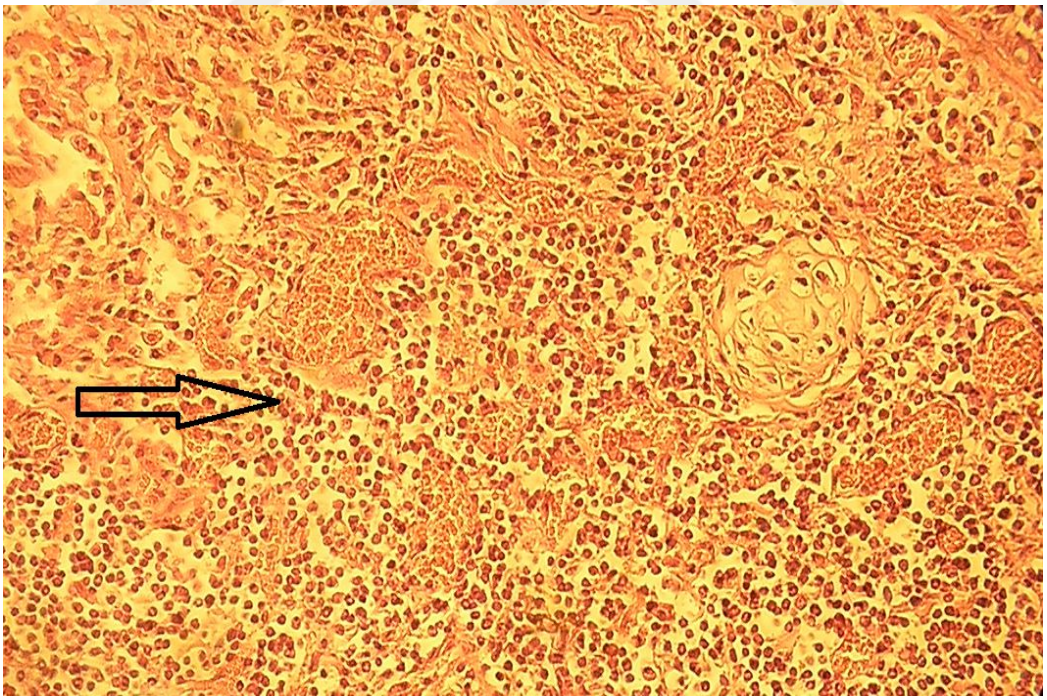
Şekil 3.4. Böbrek tubulus epitellerinde nekroz (oklar) ve yaygın kanama alanları ve nötrofil lökosit infiltrasyonları H&E, X400.



Şekil 3.5. Karaciğerde periasiner nekroz (ok) ve hepatositlerde dejenerasyon, H&E, X200.



Şekil 3. 6. Akciğerde bronş epitellerinde dökülme (oklar) ve nötrofil lökosit infiltrasyonu H&E, X200.



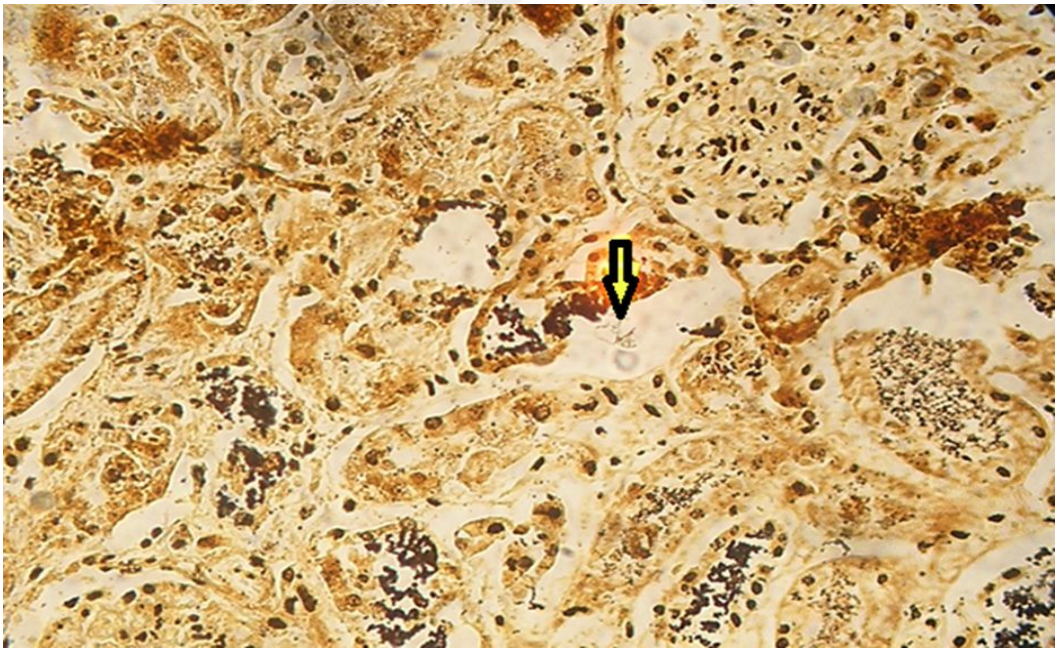
Şekil 3.7. Akciğerde alveoller içerisinde nötrofil lökosit infiltrasyonu (oklar), H&E, X400.

3. 4. Levaditi Bulgular

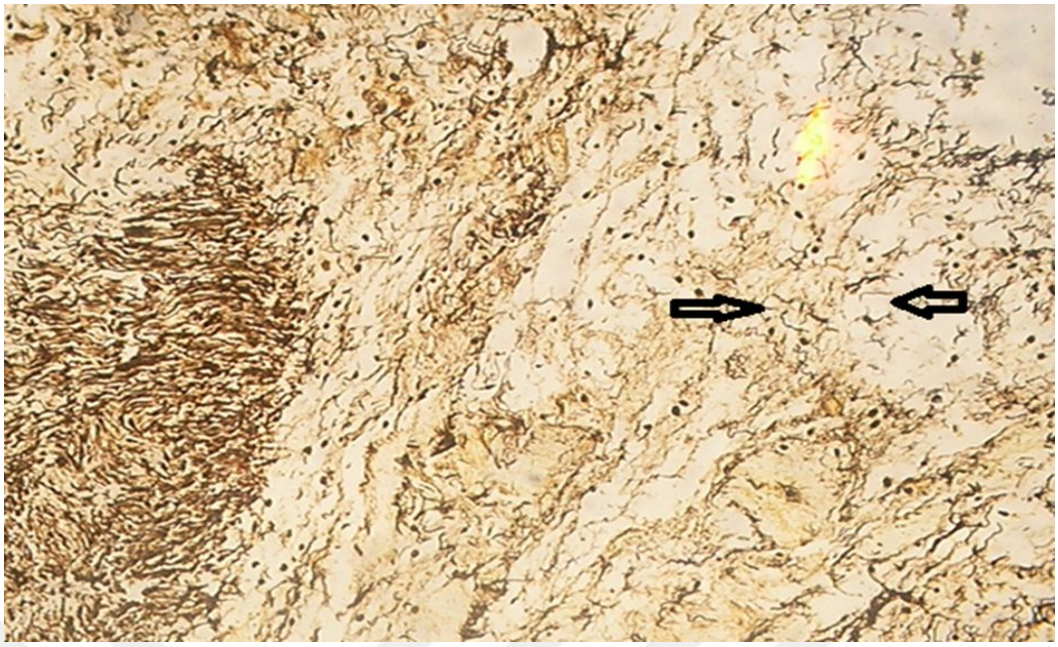
Gümüşleme (Levaditi boyama) metoduyla 108 numunede ve sadece böbrek dokusunda pozitiflik tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul epitellerinde ve lümenlerinde sarı zeminde siyah renkte boyanmış spiral etkenler olarak görüldü (Şekil 3.8-11). IHC ve Levaditi boyanma sonuçları Çizelge 3.4.'de verildi.

Çizelge 3.4. IHC ve Levaditi yöntemleriyle elde edilen pozitifliklerin tespit edildikleri organlara göre dağılımı

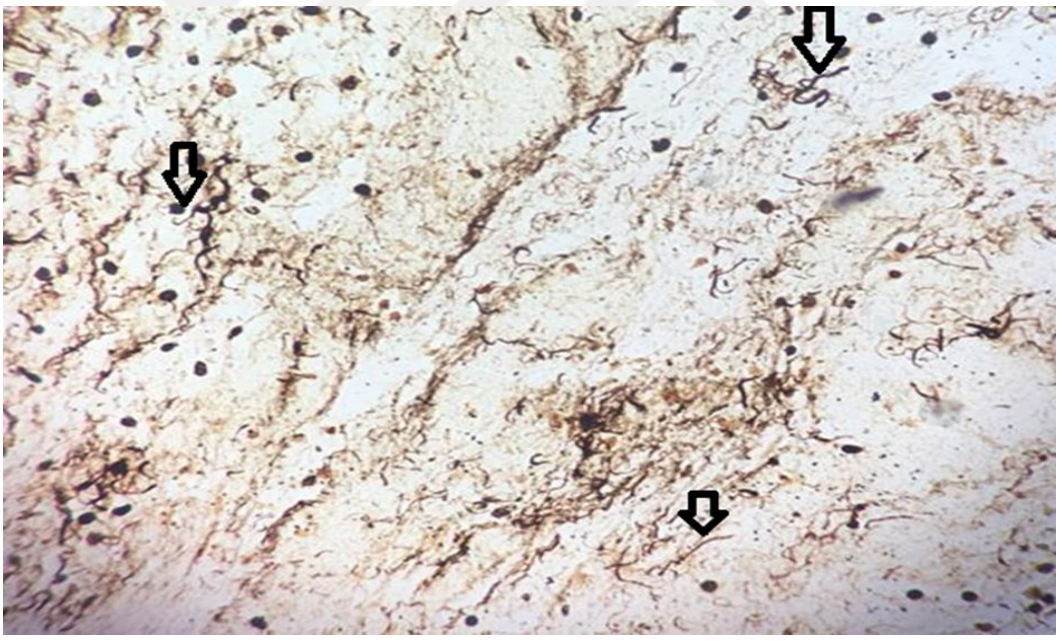
	Toplam Pozitif Numune	Böbrek	Böbrek+Karaciğer	Böbrek+Akciğer	Böbrek+Akciğer +Karaciğer
IHC	**160**	**125**	**15**	**13**	**7**
Levaditi	**108**	**108**	**-**	**-**	**-**



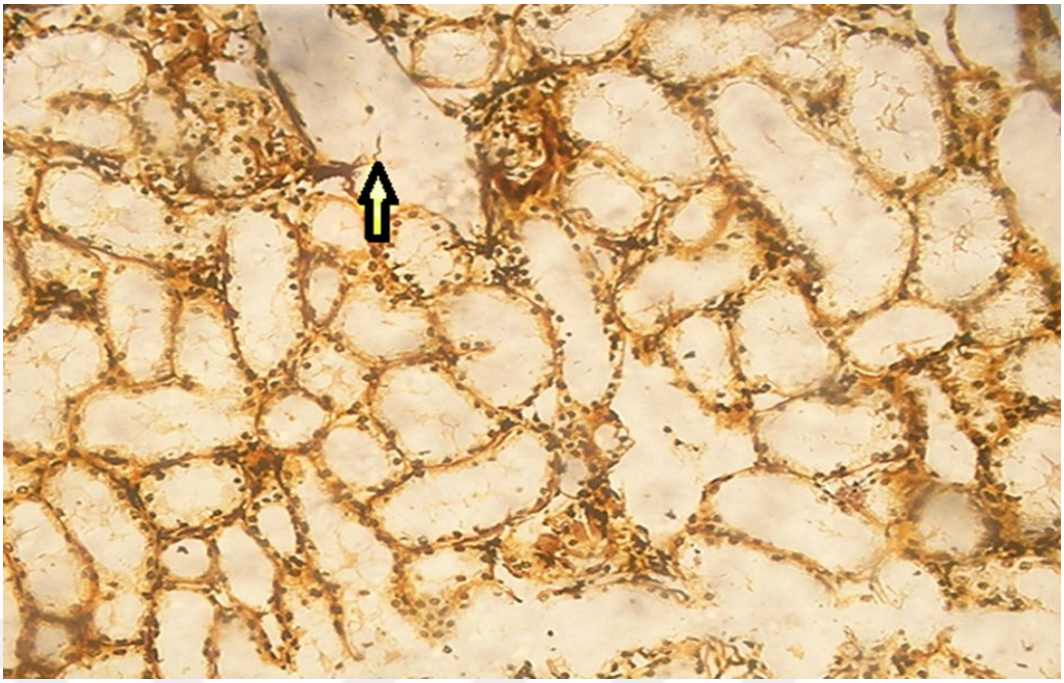
Şekil 3.8. Böbrek tubulus lümenlerinde spiral bakteriler (ok), Levaditi boyama, X400.



Şekil 3.9. Böbrek korteks tabakasında spiral bakteriler (oklar), Levaditi boyama, X400.



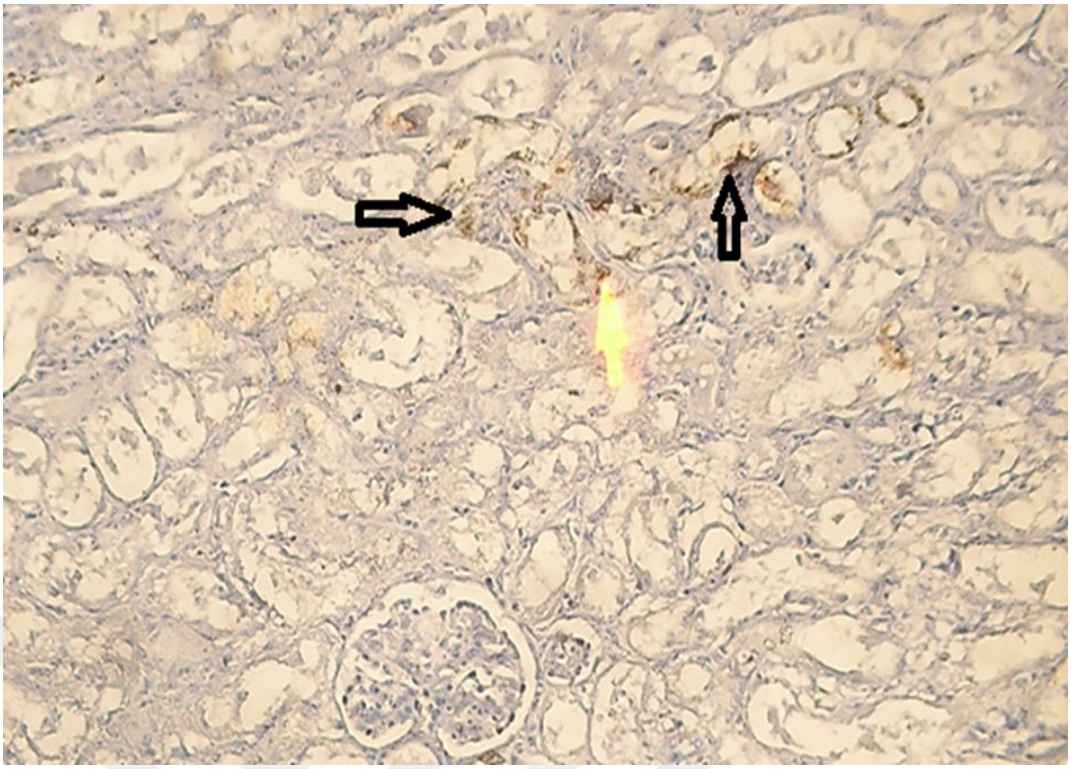
Şekil 3.10. Böbrek korteksinde yaygın spiral bakteriler (oklar), Levaditi boyama, X200.



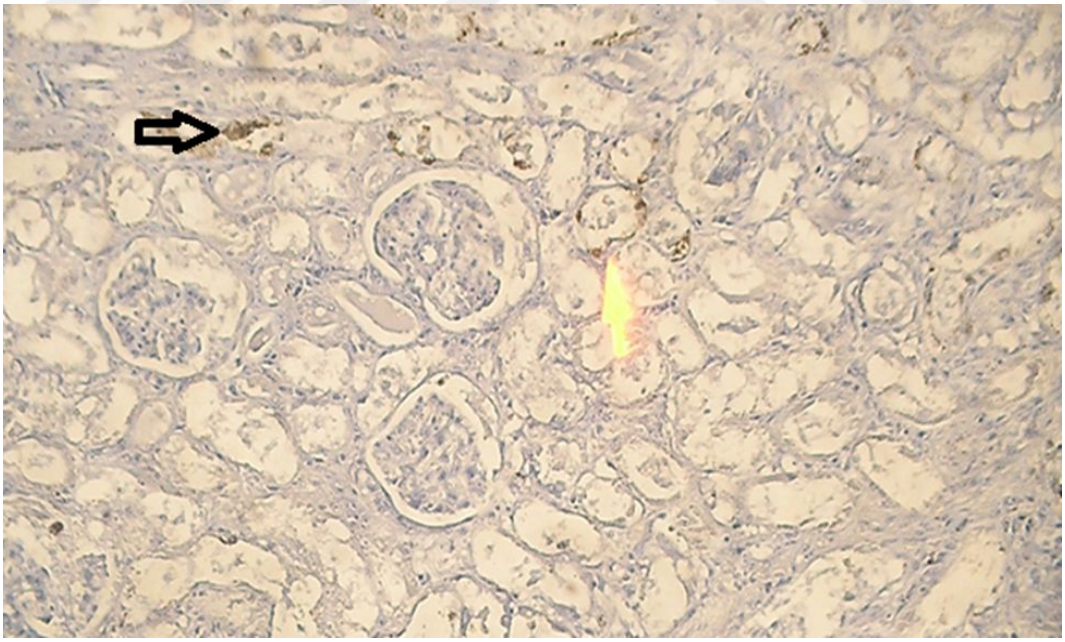
Şekil 3. 11. Böbrek tubulus lümeninde spiral bakteriler (ok), Levaditi boyama, X200.

3. 3. İmmunohistokimyasal Bulgular

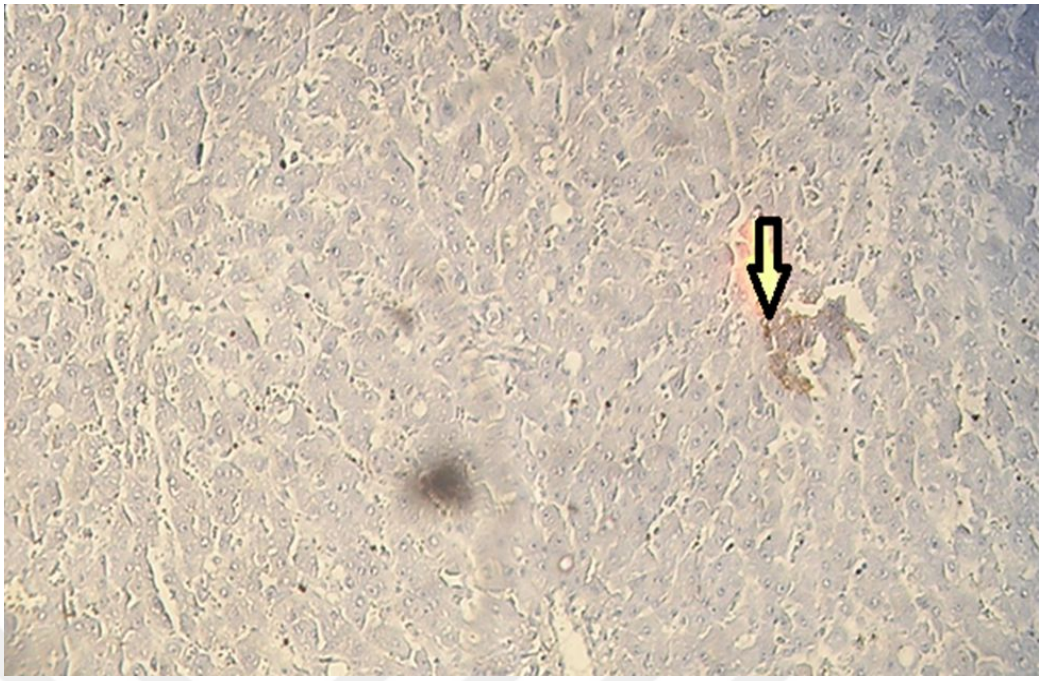
Çalışmada IHC yöntemiyle 160 örnekte pozitif boyanma tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul epitellerinde intrasitoplazmik kahverengi granüller halinde ve bazende bazal membrane yakın kısımlarda hücre zarına yapışık vaziyette görüldü (Şekil 3.12-17). Pozitif boyanan 160 numunenin 125 tanesinde sadece böbrekte pozitiflik saptanırken, 15 tanesinde böbrek ve karaciğerde (Şekil 3.12-14), 13 tanesinde böbrek ve akciğerde (Şekil 3.15-17), 7 tanesinde de böbrek, akciğer ve karaciğerde aynı zamanda pozitiflik saptandı. Olguların tümünde (160) böbreklerde pozitiflik vardı.



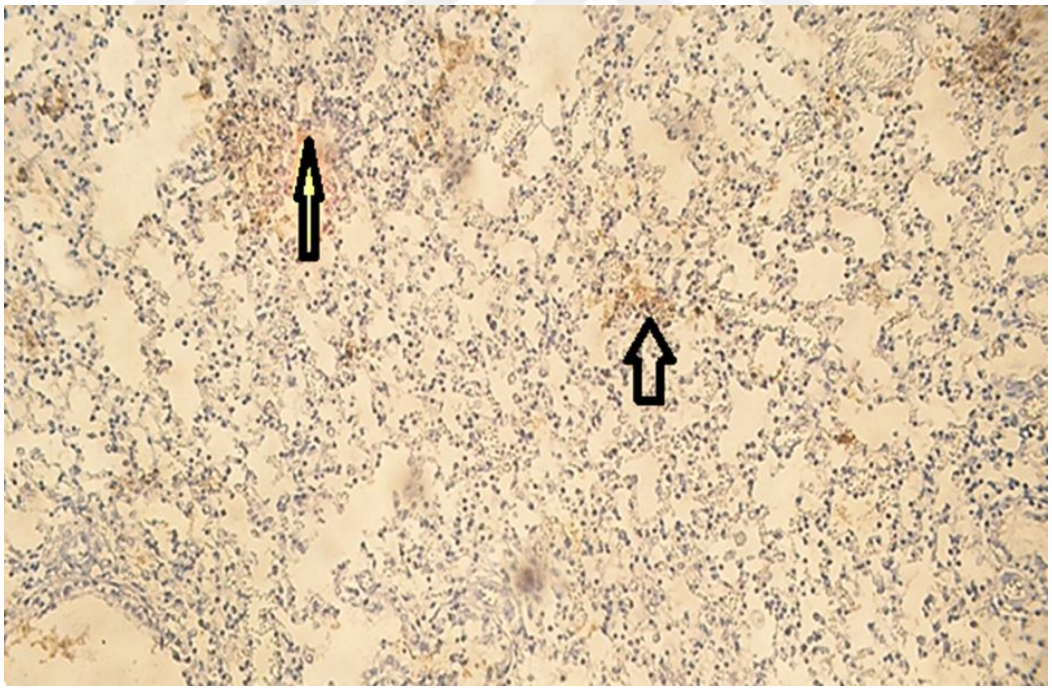
Şekil 3.12. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile tubul epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinde granüler boyama (oklar), böbrek, IHC, X200.



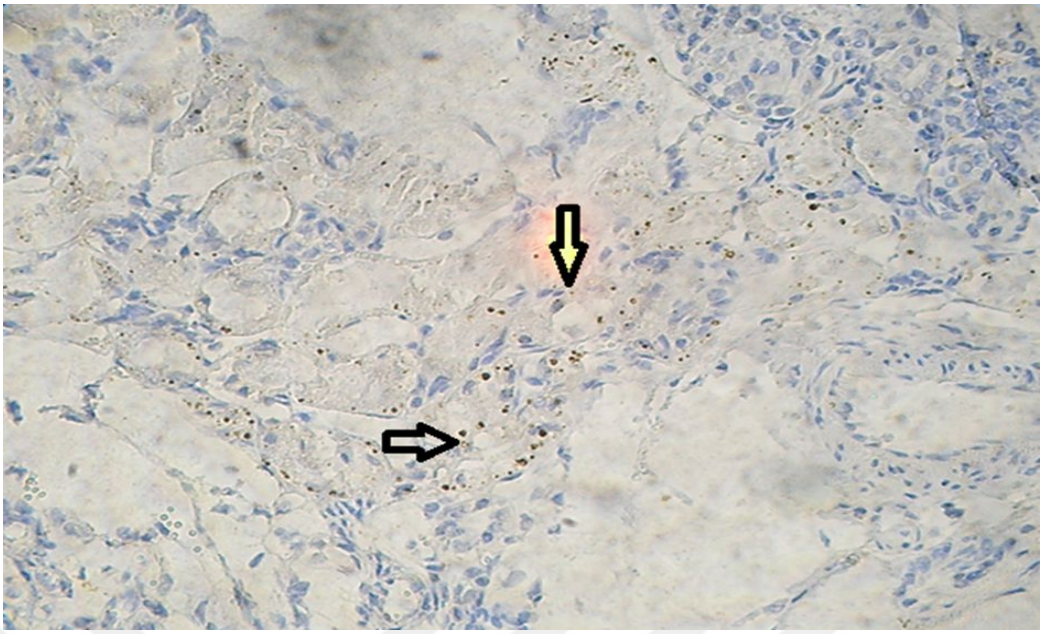
Şekil 3.13. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile tubul epitel hücrelerinin luminal yüzeylerinde granüler boyama (ok), böbrek, IHC, X200.



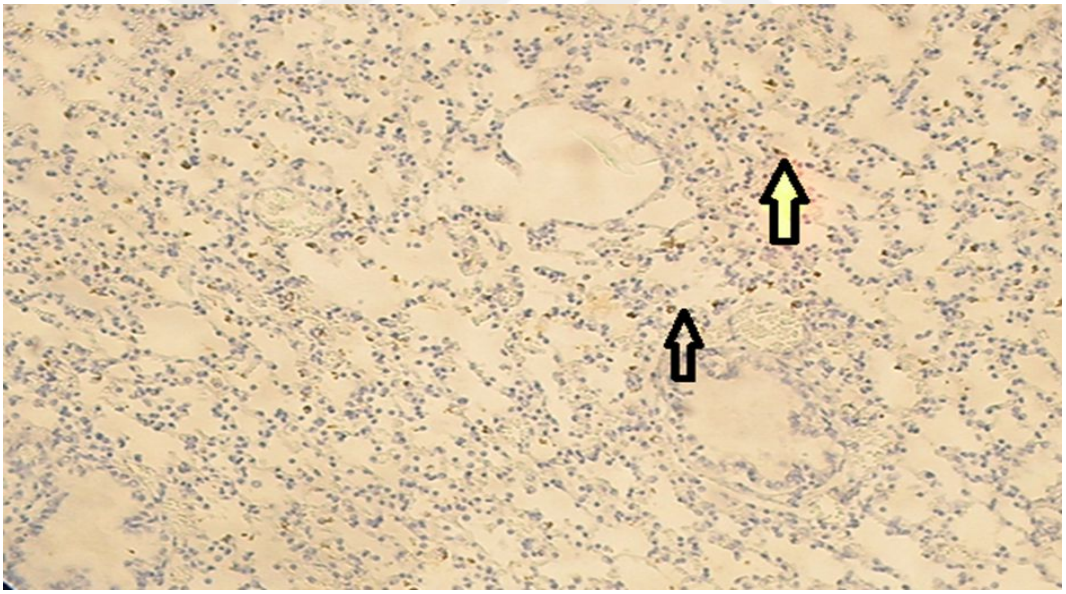
Şekil 3. 14. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile hepatositlerde granüler boyama (ok), karaciğer, IHC, X200.



Şekil 3.15. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile alveolar hücre içi granüler boyama (oklar), akciğer, IHC X200.



Şekil 3. 16. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile alveolar hücre içi granüler boyama (oklar), akciğer, IHC, X200.



Şekil 3. 17. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile alveolar hücre içi granüler boyama (oklar), akciğer, IHC, X200

4. TARTIŞMA

Leptospiroz, abort, ölü doğum, erken doğum, infertilite, septisemi, nefritis, hemoglobinüri, hepatitis, mastitis gibi semptomlarla karakterize zoonoz bakteriyel bir enfeksiyondur. Hayvanlarda infertilite, ölü doğum, abort, ölüm ve süt veriminde düşüşlere neden olduğu için hayvancılık ekonomisi açısından çok önemli bir hastalıktır (Bolin 2005). Hastalık akut septisemik veya kronik nefritik formlarında gözlenir. Etken hastalığı geçiren hayvanların böbreklerinde mikrokoloniler halinde lokalize olur ve uzun süre idrarla atılır (Türkütanıt ve ark. 2002, Villanueva ve ark. 2016).

Çiftlik hayvanlarında leptospirozun teşhis edilmesi oldukça zordur. Teşhisteki başlıca güçlükler, konakçı ve bakteri arasındaki ilişkinin karmaşık yapısı ve enfeksiyonun değişim göstermesidir (Bolin 2005). Patojenik leptospira türleri, yabani ve evcil bir çok memeli türü tarafından taşınır. Bulaşma direkt veya indirekt yollarla olur (Villanueva ve ark. 2016).

Leptospiroz, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Avustralya, Yeni Zellanda, eski Sovyetler Birliği ülkeleri, Avrupa ve Asya'daki bir çok ülkeden bildirim yapılmıştır. İran'da yapılan bir çalışmada % 25-42 arasında *Leptospira spp*. seropozitifliği saptanmıştır (Hamali ve ark 2012). Hastalığın prevalansına yönelik yapılan bilimsel çalışmalar sonucunda Portekiz'de %15, Nijerya'da %14, Zimbabve %10, Çek Cumhuriyetinde %7 olarak bildirilmiştir (Hamali ve ark 2012). Ayrıca Nikaragua, Brezilya, Hindistan, Güneydoğu Asya ve Amerika Birleşik Devletlerinde salgınlara neden olmuştur. Özellikle büyük su baskınlarından sonra bir çok ülkede hastalık salgınlara neden olmuştur. El Nino kasırgasından sonra özellikle Orta ve Güney Amerika'da bir çok vaka tespit edilmiştir (Levett 2001).

Treml ve Nesnalova (1995), Çek Cumhuriyetinde yaptıkları çalışmada, %7,4 oranında leptospiralara karşı antikor saptadıklarını belirtmişleridir. Ayrıca bakteriyoskopi ve kültür çalışmalarında etkeni tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Miller ve ark. (1991) yılında Amerika Birleşik Devletlerinin 49 eyaleti ve Porto Rico'da yaptıkları çalışmada böbrek ve kan serumu örneklerini incelemişler ve çalışma sonucunda böbreklerin %1,7'sinde leptospiraları izole etmişlerdir. Kan serumu analizleri sonucunda %49 oranında pozitiflik saptamışlardır. Ayrıca çalışma

sonucunda en sık görülen serovarların *L.hardjo, L.pomona* ve *L.grippotyphosa* olduğunu bildirmişlerdir.

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de leptospirozun tanısı, baskın serovarları ve prevalansı üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Ulaş ve Alver'in (1973) yılında yaptıkları çalışmada Batı Anadolu ve Trakya'da MAT testiyle *L.grippotyphosa*'ya karşı %5,09, *L.sejreo'*ya karşı %3,4 ve *L.icterohaemorrhagiae'*ye karşı %0,104 pozitiflik bildirmişlerdir.

Şahin ve ark. (2000), Kars ve Ardahan'da ELISA ve MAT testi ile çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda MAT testi ile %33,63'ünde, ELISA testi ile %36,26'sında *L.hardjo* ve *L.grippotyphosa* serovarlarına karşı antikor saptamışlardır

Ertaş ve ark. (2000), Doğu Anadolu bölgesindeki illerinde MAT ve ELISA ile çalışma yapmışlar ve çalışma sonucunda *L.hardjo, L.pomona, L.hebdomadis* ve *L.icterohaemorrhagiae*'ye karşı spesifik antikorlar tespit etmişlerdir. MAT testi ile %16 ve ELISA ile %23.3 oranında antikor saptamışlardır. Bu çalışma sonucunda ELISA spesifitesinin %84 ve sensitivitesinin %68 olduğunu bildirmişlerdir.

Doğu Anadolu'daki bazı illerde hastalık sığırlarda %17,8 ve koyunlarda %2,8 oranında serolojik olarak saptanmıştır (Bulu ve ark. 1990) Erzurum yöresinde yapılan bir çalışmada (Özkan ve ark. 1993), hastalığın sığırlarda %16, koyunlarda % 0,04 oranında seyrettiği görülmüştür.

Dünyada yaygın olarak görülen leptospiroz ile ilgili birçok bilimsel çalışma yapılmıştır. Hathaway ve ark. (1982), MAT testini kullanmışlar ve pozitiflik saptadıkları örneklerden de izolasyon çalışması yapmışlardır. Abort sığır fötüslarının böbrek, akciğer, karaciğer ve kan örneklerinden yaptıkları çalışma sonucunda, sadece abort fötüs böbreklerinden leptospira izole etmişlerdir. Sunulan çalışmada da Levaditi yöntemiyle sadece aborte fötüslerin böbreklerinden etken tespiti yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Hathaway ve ark. (1982) çalışması ile uyumludur.

Sunulan çalışmada 2013-2018 yılları arasında Marmara bölgesinden Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsüne gelen büyükbaş ve küçükbaş ruminant fötüsları Immunhistokimyasal ve Levaditi yöntemleriyle incelenmiştir. Çalışma sonucunda pozitif bulunan örnekler H&E boyama metoduyla karşılaştırıldı. Çalışmada 1252

adet abort fötüs örneği kullanıldı. Anti-leptospira rabbit antiserumu kullanılarak yapılan IHC metodu ile 160 adetinde (%12,77) pozitiflik saptanırken, Levaditi boyama yöntemi ile 108 örnekte (%8,6) leptospira etkenleri gözlendi.

IHC metodu ile yapılan incelemelerde, 750 adet koyun fötüs numunesinden 76 adedinde (%10,13), 218 adet keçi fötus numunesinden 26 adedinde (%11.92) ve 284 adet sığır fötus numunesinden 58 adedinde (%20.42) leptospiroz pozitif olarak tespit edildi.

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

Dokulardan etken izolasyonunun yapılabildiği, fakat etkenin hızla ölmesi ve örneklerin taze olmaması izolasyon aşamasında güçlük çıkarmaktadır (Maxie 1993, Ellis 1983, Pope ve ark. 1997).

Gümüşleme teknikleri ile etkenin iyi boyanabilmesi için dokunun tespit edilmeden önceki tazeliği önem arz etmektedir. Aksi durumlarda etkenin görünümlerinde değişimler olduğu belirtilmektedir (Falini ve Taylor 1983, Russell ve Faine 1984). Oluşan böyle güç durumlar karşısında immunperoksidaz metodu ile leptospiroz tanısını koymak daha kolay (Milli ve Hazıroğlu 1997, Ellis 1983, Scanziani 1991), hassasiyetin %78 ve doğruluğunun %100 olduğu bildirilmiştir (Scanziani 1991).

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

Abortusların tanısını koyabilmek açısından serolojik testlerin yeterli olamayacağını, bu çalışmaların immunperoksidaz gibi yöntemler ile desteklenmesi gerektiği (Kıran ve ark.1997) belirtilmiştir.

Leptospira etkenlerinin genelde böbrek tubuluslarının lumenlerine yerleştiği (Ellis 1983, Scanziani 1991) koyu kahverengi olduğu ve şiddetli nefritis tablosu oluşturduğu bildirilmektedir (Maxie 1993, Milli ve Hazıroğlu 1997, Jones ve ark. 1997).

Bu çalışmada anti-Leptospira rabbit antiserumu kullanımında koyun fötuslarında hafif, orta, keçi fötuslarında orta ve güçlü derecede, sığır fötuslarında orta ve güçlü derecede antijen tespiti yapılan diğer çalışmalarla (Szeredi ve Haake 2006, Sağlam ve ark. 2008) uygunluk göstermektedir.

Araştırıcılar (Szeredi ve Haake 2006, Sağlam ve ark. 2008) abortuslarda Leptospirozun immunhistokimyasal ve Levaditi yöntemleri ile tanıda başta böbrek olmak üzere karaciğer, akciğer, plasentada antijen ve etken tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da IHC yöntemiyle böbrek yoğun olmak üzere karaciğer ve akciğerde antijen pozitifliği tespit edilirken, Levaditi yöntemiyle sadece böbreklerde etkenlere rastlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda, anti-Leptospira rabbit antiserumu ile boyanma tarzının, dalga formunda ve kümeler şeklinde olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda da hem dalga formunda hem de yoğun antijen kümelenmeleri şeklinde boyanmalar diğer çalışmalarla (Szeredi ve Haake 2006, Sağlam ve ark. 2008) uyumludur.

Sunulan çalışmada IHC yöntemiyle yapılan boyamalarda leptospira antijenleri, böbrekte tubulus epitel hücreleri, karaciğerde hepatositlerin sitoplazmaları, akciğerde interalveolar ve interlobüler septumda tespit edildi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak büyük ve küçükbaş abortuslarında Leptospira enfeksiyonlarının izolasyon zorluğundan kaynaklanan durumlardan dolayı leptospirozun spesifik ve erken tanısında immunhistokimyasal tanı uygulamasının etiyolojik açıdan uyumlu ve güvenli sonuçlar verdiği, ayrıca Levaditi metodunun da önemini ortaya koymaktadır. Marmara bölgesinde büyük ve küçükbaş ruminant abortuslarında Leptospira enfeksiyonlarının önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

Ülkemiz ve dünyada önemli bir zoonoz hastalık olan Leptospiroz ile mücadelede aşılamanın, kemiricilerle mücadelenin ve hastalıkla ilgili olarak toplum farkındalığının arttırılmasının çok önemli olduğu kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Adler B, 2015. History of Leptospirosis and Leptospira. Curr Top Microbiol Immunol, 387, 1-9.

Adler B, Moctezuma AP, 2010. Leptospira and Leptospirosis. Vet Microbiol, 140, 287–96.

Ahmad SN, Shah S, Ahmad FMH, 2005. Laboratory diagnosis of leptospirosis. J Postgrad Med, 51, 3, 195-200.

Arda M, Aydın N, Ilgaz A, Minbay A, Kahraman M, İzgür M, Leloğlu N, Akay Ö, Diker KS, 1997. Spiroketler. In: Özel Mikrobiyoloji, Ed. Arda M, Medisan, Ankara, s.257-274.

Bisias G, Burriel A, Boutsini S, Kritas S, Leontides L, 2009. A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. The Inter J Vet Med, 8, 2.

Bolin CA. 2005. Leptospirosis in cattle: Disease review and update. Proceeding of the NAVC North American Veterinary Conference. 8-12, Orlando, Florida.

Bulu AA, Dörterler R, Özkan Ö, Hoştürk F, 1990. Doğu Anadolunun bazı illerinde (Kars, Erzurum, Gümüşhane, Artvin) sığır ve koyunlarda leptospirosis vakaları, yayılışı ve serotipleri üzerine araştırmalar. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 6, 6, 50-61.

Burriel, AR, 2010. Leptospirosis: an important zoonotic diseasesis. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Ed Mendez-Vilas ,Chapter 1, Formatex, Spain, p. 687-93.

Charan J, Saxena D, Mulla S, Yadav P, 2013. Antibiotics for the treatment of leptospirosis: systematic review and meta-analysis of controlled trials. Int J Prev Med, 4,5, 501–10.

Ellis TM, Robertson GM, Hustas L, Kirby M, 1983. Detection of leptospires in tissue using an immunoperoxidase staining procedure. Aust Vet J, 60, 364-67.

Ertaş HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H, Özdemir V, Yazıcıoğlu N, 2000. Sığırlarda leptospirozisin tanısında MAT ve ELISA'nın kullanımı. IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, s.46.

Faine S, 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Genava, p. 171.

Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P, 2000. Leptospira and Leptospirosis. 2.ed, MedSci, Austrália, p 271.

Falini B, Taylor CR, 1983. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med, 107, 105-17.

Fang F, Collins-emerson JM, Heuer C, Hill FI, Tisdall DJ, Wilson PR, Benschop J, 2014. Interlaboratory and between-specimen comparisons of diagnostics tests for leptospirosis in sheep and cattle. J Vet Diag Invest, 1-14.

Fazlı A, 1970. Leptospiroloji'de son gelişmeler ve şimdiye kadar Türkiye'de tespit edilen leptospira serotipleri. Türk Mikrobiyoloji Bülteni, 04, 215-30.

Flannery B, Costa D, Carvalho FP, Guerreiro H, Matsunaga J, Da Silva ED, Ferreira AG, Riley LW, Reis MG, Haake DA, Ko AI, 2001. Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. J Clinic Microbiol, 39, 9, 3303-10.

Gerritsen MJ, Koopmans MJ, Dekker TC, De Jong MC, Moerman A, Olyhoek T, 1994. Efective treatment with dihydroestreptomycin of naturally infected cows shedding Leptospira interrogans serovar Hardjo subtype Hardjobovis. Am J Vet Res, 55, 339-43.

Gilger BC, Salmon JH, Yi NY, Barden CA, Chandler HL, Wendt JA, Colitz CMH, 2008. Role of bacteria in the pathogenesis of recurrent uveitis in horses from the southeastern United States. Am J Vet Res, 69, 10, 1329-35.

Goldstein RE, 2010. Canine leptospirosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 40,1091-101.

Grooms DL, Bolin CA, 2005. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhea virus and Leptospira spp.. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 21,2, 463-72.

Hamali H, Joozani J, Abdollahpour R, 2012. Serodiagnosis and molecular survey on leptospiral abortions in the diary cattle of Tabriz. Iran J Vet Res, 13, 2, 39.

Hamond C, Martins G, Diniz R, Penna B, Lilenbaum W, 2012. Comparison of rapid-slide versus microscopic agglutination testsfor equine leptospirosis. Onl J Vet Res,16, 111-16.

Hathaway SC, Little TWA, Stevens AE, 1982. Isolation of Leptospira interrogans serovar hardjo from aborted bovine fetuses in England. Vet Rec, 111:58.

Hazıroğlu R, Milli ÜH, 2001. Veteriner Patoloji, Cilt II, Ed:Hazıroğlu R, Milli ÜH, Tamer Matbaacılık, Ankara, s.433-538.

Jones TC, Hunt RD, King NW, 1997. Veterinary Pathology. 6th Edition, Lippincott Wilkins, p:467-469.

Kaufmann AF, Weyant RS, 1995. Leptospiraceae. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Yolken. 6th ed, ASM Press,Washington DC, p. 621-25.

Kıran MM, Baysal T, Gözün H, Güler L, Gündüz K, Kuyucuoğlu Ö, Küçükayan U, 1997. Konya yöresinde koyun abortusları üzerine patolojik, bakteriyolojik ve serolojik çalışmalar. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 9, 109-28.

Koizumi N, Watanabe H, 2009. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases. D.T. Barrett Lawrence, Stanberry,1st ed, Academic Press.p.1-1488.

Levett PN, 2001. Leptospirosis. Clinic Microbiol Rev. 14, 2, 296-326.

Lilenbaum W, Varges R, Brandão FZ, Cortez A, de Souza SO, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA, 2008. Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. Theriogenology, 15,69, 837-42.

Loureiro AP, Martins G, Thomé S, Lilenbaum W, 2013. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. R Bras Ci Vet, 20, 3, 119-26.

Lucheis SB, Ferreira RS, 2011. Ovine Leptospirosis in Brazil. J of Venom Anim and Tox Includ Trop Dis. 17, 4, 394-405.

Luna LG 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd Edition, McGraw-Hill, New York. p.32-39.

Martins G, Brandão FZ, Hamond C, Medeiros M, Lilenbaum W, 2012. Diagnosis and control of an outbreak of leptospirosis in goats with reproductive failure. The Vet J 193, 600–01.

Martins G, Lilenbaum W, 2013. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. Trop Anim Health and Prod, 46, 1, 11–17.

Maxie MG, 1993. The Urinary System. In: Pathology of Domestic Animals, Eds. Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. Vol. 2, 4th ed., Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp. 480-520.

Milli ÜH, Hazıroğlu R, 1997. Veteriner Patoloji, Cilt I, Eds: Milli ÜH ve Hazıroğlu R, Tamer Matbaacılık, Ankara, s.1-230.

Miller DA, Wilson MA, Beran GW, 1991. Survay to estimate prevalance of Leptospira interrogans infection in mature cattle in the United States. Am J Vet Res, 52, 1761-65.

OIE, Terrestrial Manuel, 2018. Leptospirosis. Erişim Tarihi, 2018, Erişim Adresi, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.12_LEPTO.pdf

Özdemir Ö, Erer H, (2018). Dişi Genital Sistem, In: Veteriner Sistemik Patoloji, II. Cilt, Eds: Erer H, Çiftçi MK, 3.Baskı, Konya, Güler Ofset, p.199-242.

Özkan Ö, Dörterler R, Hoştürk F, 1993. Erzurum ili ve yöresindeki sığır ve koyunlarda sarılık ve kan işeme semptomlarıyla seyreden hastalıklarda Clostridium eodemetiens, Leptospira ve kan protozoonlarının insidansının belirlenmesi. Etlik Vet Mikrobiol Derg, 7, 4, 97-104.

Picardeau, M, 2013. Diagnosis and Epidemiology of leptospirosis. Méd et Malad Infect, 43, 1, p. 1-9.

Pinna AE, Martins G, Hamond C, Lilenbaum W, Medeiros MA, 2011. Molecular diagnostic of Leptospirosis in horses is becoming increasingly important. Vet Microbiol, 153:3-4, 413.

Pope V, Larsen SA, Schreiefer M, 1997. Immunologic methods for diagnosis of spirochetal diseases, In: Manual of Clinical Laboratory Immunology, Ed; Rose, NR, et. al. Fifth Edition, ASM Press,Washington, p.510-25.

Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GE, 1993. The Spirochaetes, In: Clinical Veterinary Microbiology. Harcourt Publishers Ltd, USA, p 292-99.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcli KW, 2007. Clínica veterinária: um tratado de doençcas dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 874-87.

Rissi DR, Brown CA, 2014. Diagnostic features in 10 naturally occuring cases of acute fatal canine leptospirosis. J Vet Diag Invest, 26, 6, 799-804.

Russell CJ, Faine S, 1984. Leptospira. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I, Ed. Krierg, R., Hold, J.G.,Williams& Wilkins, London, p.62-7

Sağlam YS, Yener Z, Temur A, Yalcin E, 2008. Immunohistochemical detection of leptospiral antigens in cases of naturally occurring abortions in sheep. Small Rum Res, 74, 1, 119-22.

Salaün L, Mérıen F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M, 2006. Application of multilocus variable-number tandemrepeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. Journal of Clinic Microbiolog, 44, 11, 3954-62.

Saldanha GB, Cavazini NC, Silva AS, Fernandes MB, Badke MRT, Pivetta CG, 2007. Sorologia positiva para Leptospira butembo em bovinos apresentando problemas reprodutivos. Ciênc Rural, 37, 4, 1182.

Scanziani E, Luini M, Fabbi M, Pizzocaro P, 1991. Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnostic of renal leptospirosis of pigs. Res Vet Sci, 50, 229-32.

Scott P, 2018. Leptospirosis in Cattle. National Animal Disease Information Service. Erişim tarihi, 2018. Erişim Adresi, www.nadis.org.uk

Suepaul SM, Carrington CV, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA, 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. Trop Anim Health Prod, 43, 2, 367-75.

Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE, 2011. 2010 ACVIM Small Animal Consensus Statement on Leptospirosis: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Prevention, J Vet Intern Med, 25, 1, 1–13.

Szeredi L, Haake DA, 2006. Immunohistochemical identification and pathologic findings in natural cases of equine abortion caused by Leptospiral infection. Vet Pathol, 43, 5, 755–61.

Şahin M, Aydın F, Özdemir V, Genç O, Güler MA, 2000. Kars ve Ardahan illerinde sığır Leptospirozisinin kültürel ve serolojik yöntemlerle araştırılması. IV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, s:48.

Temur A, Sağlam YS, 2003. Sığır abortuslarında leptospirosiz yönünden immunperoksidaz incelemeler. Türk J Vet Anim Sci, 27, 917-21.

Treml A, Nesnalova E, 1995. Leptospirozis in slaugter cattle–serological and bacteriological examinations. Vet Med, 40,10, 305-9.

Turhan V, Hatipoğlu M, 2012. Leptospiroz: Yeni fark edilen eski bir enfeksiyon hastalığı. J Exper Clinic Med, 29,163-168.

Türkütanıt SS, Sağlam YS, Arslan MÖ, Bozoğlu H, Dinler U, 2002. Sarılık görülen koyun ve sığırlarda kan protozoonları ve leptospirosis üzerine etiyopatolojik incelemeler. Etlik Vet Mikrob Derg, 13, 1, 45-55.

Ulaş H, Alver H, 1973. Batı Anadolu ve Trakya'da Sığırlarda Leptospira İnsidensi ve Etken İzolasyonu üzerine araştırma. Pendik Vet Mikrobiyol Derg, VI, 41-9.

Vidal S, Kegler K, Greub G, Aeby S, Borel N, Dagleish MP, Posthaus H, Vincent P, Rodriguez-Campos S, 2017. Neglected zoonotic agents in cattle abortion: tackling the difficult to grow bacteria. BMC Vet Res, 13, 373.

Villanueva MA, Mingala CN, Balbin MM, Nakajima C, Isoda N, Suzuki Y, Koizumi N, 2016. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira spp*. Among large ruminants in the Philippines. J Vet Med. Sci, 78, 11, 1649-55.

Yener Z, Keleş İ, 2001. Sığırlarda Leptospirosis Üzerinde Klinik ve Patolojik İncelemeler, Vet Bil Derg, 17, 1, 21-26.

Zelski R. 2017. Leptospirosis in cattle herds. Department of Primary Industries. Primefacts. Erişim tarihi, Şubat 2017. Erişim adresi ,www.dpi.nsw.gov.au

7. EKLER

EK A: Etik Kurul Belgesi

T.C.

GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI

PENDİK VETERİNER KONTROL ENSTİTÜSÜ HAYVAN DENEYLERİ

YEREL ETİK KURULU

Sayı:186 06.04.2018

Karar No:06/2018

Başvuru Tarihi: 03.04.2018

Sayın Zeynel ARSLAN

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **"Marmara Bölgesinde Ruminantlardaki Abort Olgularında Leptospirozisin Levaditi ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Teşhisi ve Histopatolojik Bulgularla Karşılaştırılması "** isimli çalışmanız kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul kapsamı dışında olduğundan Etik Kurul kararına gerek olmadığı kararı verilmiştir.

Dr. Rüçhan ALP
PEVHADYEK Başkanı

Dr. Ümit ÖZDEMİR
Başkan Yardımcısı

Dr. Ayşe ATEŞOĞLU
Üye

Gülseren YILDIZ ÖZ
Üye

Uzm. Vet. Hek. Ali ÖZKARA
Üye

Vet. Hek. Ahmet ŞİMŞEK
Üye

Dr. Canan ALTINEL
Üye

Vet. Hek. M. Ergun MALAL
Üye

Dr. Esra SATIR
Üye

Dr. Arıkan GÜREL
Üye

8. ÖZGEÇMİŞ

Zeynel ARSLAN 1980 yılında Amasya/Merzifon'da doğdu. İlk ve orta öğretimini Merzifon'da, lise eğitimini ise İstanbul Selimiye Veteriner Sağlık Meslek Lisesinde tamamladı. 2006 yılında Uludağ Veteriner Fakültesi'nden mezun oldu. 2015 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı. 1998 yılında girdiği Tarım ve Orman Bakanlığı Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsünde halen Patoloji Laboratuvar şefi olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.