

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZBAHADA KESİME SEVK EDİLEN İKTERUSLU
SIĞIRLARDAN LEPTOSPIROZUN VARLIĞI VE
PATOLOJİK BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

FATİH TÜRKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Doç. Dr. Mehmet TUZCU

KONYA-2021

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZBAHADA KESİME SEVK EDİLEN İKTERUSLU
SIĞIRLARDA LEPTOSPIROZUN VARLIĞI VE
PATOLOJİK BULGULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ**

FATİH TÜRKER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK PATOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Mehmet TUZCU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 3841-YL1-14 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

ÖNSÖZ

Leptospiroz sığırlarda abort, sepsisemi, nefritis, hemoglobüri, hepatitis, mastitis gibi bulgu ve semptomlar ile seyreden zoonoz bir enfeksiyondur. Bu çalışma hastalığın tanı ve teşhisinde histopatolojik bulgular ile immunohistokimyasal ve Levaditi yöntemlerinin karşılaştırılması ve hastalığın Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi belediye mezbahasındaki durumunun anlaşılması amacıyla yapılmış olup hastalığı önlemede gerekli önlemlerin alınması ve diğer çalışmalara kaynak oluşturması açısından önem taşımaktadır. Leptospiroz ile ilgili çalışmalar insan sağlığı açısından yapılacak çalışmalara da katkı sağlayacaktır.

Tez çalışmam ve üniversite öğrenciliğim süresince yaptığım tüm çalışmalarda destek olan, teşvik eden, bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren hocalarım Prof. Dr. M. Kemal ÇİFTÇİ'ye, Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU'na, Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI'ya, Prof. Dr. Ertan ORUÇ'a, Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e, Öğretim Üyesi Dr. Mehmet Burak ATEŞ'e, Araştırma Görevlisi Zeynep ÇELİK'e tez çalışmasının her aşamasında sağladığı destek, ilgi ve sabırları için teşekkür ederim.

Çalışmamın bütün aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Gökhan AKÇAKAVAK'a yardım, destek ve katkıları için teşekkür ederim.

3841-YL1-14 Numaralı proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığına teşekkür ederim.

Bu yoğun süreçte desteklerini esirgemeyen aileme gösterdikleri sabırdan dolayı da ayrıca teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DAB : Diaminobenzidine

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMJH : Ellingausen-McCullough- Johnson-Harris

H.E : Hematoxylin eosin

IF : İndirekt Flouresans

IHC : Immunohistokimya

MAT : Microscopic Agglutination Test

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

Real-time qPCR : Real-Time Quantitative PCR

WS : Warthin-Starry

İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ	1
1.1. İkterus	1
1.2. Leptospirozis	2
1.3. Hastalığın Tarihçesi	2
1.4. Etiyoloji	3
1.5. Epidemiyoloji	4
1.6. Epizootiyoloji	5
1.7. Patogenez.....	6
1.8. Klinik Bulgular	6
1.9. Patolojik Bulgular	8
1.10. Teşhis.....	8
1.10.1. Direkt Teşhis Yöntemleri	9
1.10.2. İndirekt Teşhis Yöntemleri	10
2.GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.BULGULAR	14
3.1. Makroskobik Bulgular	16
3.2. Mikroskobik Bulgular.....	16
4.TARTIŞMA	23
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	27
6.KAYNAKÇA	28

ÖZET

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mezbahada Kesime Sevk Edilen İkteruslu Sığırlarda Leptospirozun Varlığı ve Patolojik Bulguların Değerlendirilmesi

FATİH TÜRKER
Patoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2021

Eritrositlerin hemolizi ya da hepatositlerin dejenerasyon ve nekrozu veya safra akışının engellenmesi sonucu safra renkli maddelerin kanda birikerek dokuları sarıya boyaması ikterus olarak tanımlanmaktadır.

Leptospiroz, hayvan yetiştiriciliği açısından önemli zoonoz karakterli, abort, kısırılık ve süt verimi kayıplarına neden olan, bakteriyel bir enfeksiyondur. Leptospiroz akut septisemik veya kronik nefritik formlarda seyreder. Leptospirozlu hayvanlarda makroskopik olarak ikterusa bağlı organlar sarı renge boyanır. Karaciğer anemik, yumuşak ve büyüktür. Serozalarda kanamalar vardır. Böbrekler hafif şişkin ve açık kahve renkte olup kesit yüzlerinde siyahımtırak-kahve renkte küçük odakların bulunduğu gözlenir. Mikroskopik olarak, karaciğer parankiminde dejeneratif ve nekrotik değişiklikler ile portal alanda yangısal hücre infiltrasyonları görüldü. Remark hücre dizilerinde bozulmalar ve intrahepatik kolestaz gözlemlendi. Ayrıca Kupffer hücrelerinin hipertrofisi ve hiperplazisi belirgindi. Böbrekte tubul epitellerinde dejenaratif ve nekrotik değişiklikler, tubul lümenlerinde hiyalin silindirler gözlemlendi. Ayrıca böbrek intersitisyumunda yoğun yangı hücre infiltrasyonları görüldü.

Bu çalışmada Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi belediye mezbahasında 2020 yılında kesilen ve ikterus görülen 35 sığırdan patolojik ikterus gözlenen 11'i leptospirozis yönünden incelendi. Bu olgulardan alınan karaciğer ve böbrek örnekleri bilinen laboratuvar yöntemleri ile işlenerek immunperoksidaz ve levaditi boyama yöntemleri ile boyandı. Elde edilen sonuçların histopatolojik bulgular ile karşılaştırması yapıldı. Leptospirozisli ineklerde iç organların, seroza ve mukozalar ile karkasın sarı renge boyanmış olduğu görüldü. Karaciğerlerin sarımsı renkli, yumuşak kıvamlı ve büyümüş olduğu belirlendi. Böbreklerin hafif şişkin ve açık kahve renginde olduğu gözlemlendi. Levaditi boyama metoduyla 7 olguda pozitiflik tespit edilirken, immunhistokimyasal tanı yöntemiyle 11 olguda pozitif boyanma tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar leptospirozun spesifik ve erken tanısında immunhistokimyasal tanı uygulamasının etiyolojik açıdan uyumlu ve güvenli sonuçlar verdiği, ayrıca Levaditi metodunun da önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: İkterus, İmmunhistokimya, Leptospiroz, Levaditi, Sığır

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Presence of Leptospirosis and Evaluation of Pathological Findings in The Cattle With Icterus Referred to Slaughterhouse

Fatih TÜRKER

Department of Veterinary Pathology

MASTER THESIS/KONYA-2021

Icterus is defined as the accumulation of bile colored substances in the blood and staining the tissues yellow as a result of hemolysis of erythrocytes or degeneration and necrosis of hepatocytes or obstruction of bile flow.

Leptospirosis is a bacterial infection with an important zoonotic character in terms of animal husbandry, causing abortion, infertility, and milk yield losses. Leptospirosis progresses in acute septicemic or chronic nephritic forms. In leptospirosis, the organs are coloured yellow due to icterus. The liver is anaemic, soft, and large. There is bleeding in the serosa. It is observed that the kidneys are slightly swollen and light brown, and there are blackish-brown small foci on the cross-sectional faces of the kidneys. There is intrahepatic cholestasis. Hypertrophy and hyperplasia of Kupffer cells are evident.

In this study, 11 cattle with pathological icterus were examined in terms of leptospirosis among 35 cattle with icterus slaughtered in 2020 in the municipal slaughterhouse of Sarkikaraağaç district of Isparta province.. Liver and kidney samples taken from these cases were processed with known laboratory methods and stained with immunoperoxidase and levadite staining methods. The results obtained were compared with the histopathological findings.

It was seen that internal organs, serosa and mucous membranes and carcass were stained yellow in cattle with leptospirosis. It was determined that the livers were anemic, soft and enlarged. It was seen that kidneys were to be slightly swollen and light brown. While positivity was detected in 7 cases with the Levadite staining method, 11 cases with immunohistochemical diagnosis method. The results obtained in this study have revealed that the application of immunohistochemical diagnosis gives etiologically compatible and safe results in the specific and early diagnosis of leptospirosis and the importance of the Levaditi method.

Key Words: Icterus; Immunohistochemistry; Leptospirosis; Levaditi; Cattle

1. GİRİŞ

1.1. İkterus

Eritrositlerin hemolizi ya da hepatositlerin dejenerasyonu ve nekrozu veya safra akışının engellenmesi sonucu safra renkli maddelerin kanda birikerek dokuları sarıya boyaması ikterus olarak tanımlanmaktadır (Erer ve ark 2009). İkterus patolojik olarak üç grupta incelenir.

1. Prehepatik ikterus: Eritrositlerin aşırı hemolizi vardır. Karaciğer genellikle normaldir. Şiddetli hemoliz sonucu açığa çıkan fazla miktardaki bilirubini I'ı hepatositler işleyemez, yani bilirubin II'ye konjuge etmekte yetersiz kalır ve kanda birikmeye başlar, bunların tümü böbrekler yoluyla da atılamadığından bilirubinemi gelişir. Bu tip ikterusun görüldüğü başlıca hastalıklar; piroplazmozis, anaplazmozis, leptospirozis, atların anemik enfeksiyöz hastalığı, antraks ve basillerhemoglobinüridir. Ayrıca çeşitli kimyasal maddeler ve bitkisel toksikasyonlar ile yılan zehiri de hemolitik ikterus oluşturur (Erer ve ark 2009, Jubb ve ark 2012).

ii. İntrahepatik ikterus: Hepatositlerde gelişen hidropik veya yağ dejenerasyonu ile çeşitli enfeksiyöz-toksik hastalıklarda hepatositlerin nekrozu sonucu, eritrositlerin fizyolojik yıkımlanmasıyla açığa çıkan bilirubin-1 işlenemez, kanda birikir. Ayrıca toksik-enfeksiyöz hastalıklarda şişkinleşen hepatositler safra kapillarlarına da baskı yaparak yapılan safranın akışını engellemiş olur. Bu nedenle hepatotoksik ikterusta kanda hem bilirubin-I, hem de bilirubin-II birikir ve bilirubinemi oluşur. Bu tip sarılığın sebepleri; çeşitli bitki zehirlenmeleri, bir çok inorganik zehirlenmeler ve çok sayıda enfeksiyöz hastalıklardır (Erer ve ark 2009, Jubb ve ark 2012)

iii. Posthepatik ikterus: Hepatositlerde sentezlenen safranın normal akışının engellenmesi durumunda durgunluk ikterusu oluşur. Başlıca sebepleri; hepatitislerde hepatositlerin şişkinleşerek safra kapillarlarına baskı yapması, intra ve ekstrahepatik safra duktuslarının parazitler ile tıkanması, bilier sirozda artan bağdokunun intrahepatik safra duktuslarına baskı yapması, safra kanallarında taşların oluşması, safra duktuslarına dıştan basınç yapan tümör, apse ve granülom gibi kitlelerin oluşması, duodenum yangılarında papilla duodeni bölgesinde yer alan orifisyumun şişkinleşerek tıkanmasıdır.

Duodenuma akıtılamayan ve durgunlaşan safra önce hücreler arası dokuya, lenf damarlarına ve sonra da kana geçer (Erer ve ark 2009, Jubbe ve ark 2012).

1.2. Leptospirozis

Leptospirozis zoonoz karakterli, yavru ve verim kayıplarına neden olan, hayvan yetiştiriciliği açısından önemli bakteriyel bir enfeksiyondur (Bolin 2005). Leptospirozun akut septisemik veya kronik nefritik olmak üzere iki formu bilinmektedir. Hastalığı geçiren hayvanlar etkeni uzun süre idrarla sağlar (Türkütanıt ve ark. 2002, Villanueva ve ark. 2016). Hasta ile etken arasındaki ilişkinin kompleks yapısı ve enfeksiyonun değişim göstermesinden dolayı leptospirozun teşhisi güçtür (Bolin 2005).

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

Etken özellikle konakçı hayvanın böbrek tubuluslarında herhangi bir hastalığa neden olmadan yerleşir ve idrarla atılır. Ayrıca enfekte hayvanın plasenta veya doğum sıvıları gibi materyaller ile de atıldığı bilinmektedir. Etkenler alkali pH'lı sularda, haftalarca canlı kalırlar (Brooks ve ark, 2001).

Sığırlarda hastalık oluşturan serovarlar hardjo, pomana, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa ve canicola'dır (Amalredjo ve Campbell, 1975). Leptospirozis sığırlarda septisemi, hepatitis, mastitis, nefritis ve meningitis, gebelerde abort, ölü veya erken doğuma sebep olarak kayıplara yol açmaktadır (Maxie, 1993). Klinik olarak ateş, ikterus, hemoglobinüri, hematüri ve hemolitik anemi ile seyreden hastalık, her yaş grubunda, ancak özellikle buzağılarda ve genellikle de sonbahar ve kış aylarında görünür (Ametredjo ve Campbell, 1975). Ülkemizde 1949 yılında ilk sığır leptospirosiz olayı Akçay ve Pamukçu (1950) tarafından bildirilmiştir. 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.

1.3. Hastalığın Tarihçesi

Adolf Weil'in 1886 yılında dalak büyümesi, sarılık, böbrek yetmezliği, konjunktivit ve deri döküntüsü semptomları ile seyreden bir hastalık rapor ettiği

ve hastalığı “Weil Hastalığı” olarak isimlendirdiği bilinmektedir (Yener ve Keleş 2001).

Stimson 1907 yılında, sarılık nedeniyle ölen bir hastanın böbrek dokusunda spiroket kümeleri varlığını gümüşleme ile göstermiş ve etkeni *Spirochaeta interrogans* olarak isimlendirmiştir. Inado ve Ido adlı araştırmacılar Japonya’da maden işçileri arasında 1914 yılında görülen salgını incelemişler. Bu araştırmacılar bulaşıcı sarılığa sahip Japon madencilerin kanında hem spiroketleri hem de spesifik antikorları saptamış ve etkeni *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* olarak adlandırmışlardır. 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).

Çizmen ve ark. 1953 yılında, sığırlarda hastalığı serolojik olarak ortaya koyarken, Özgen ve Tunus 1954 yılında ülkemizde ilk kez *Leptospira bovis*’i izole ederek kültürünü yapmışlardır (Yener ve Keleş 2001).

1.4. Etiyoloji

Leptospirozisin etkeni *Leptospiraceae* familyasındaki 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 eksen etrafında dönme, aksiyal filament yardımıyla kasılıp gevşeme şeklindedir. Bir veya iki ucu çengel tarzında kıvrılmıştır. Bu nedenle C, S ve L şeklinde görülür. 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)

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. 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 hem de 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).

1.5. Epidemiyoloji

Leptospiroz, en sık görülen zoonoz hastalıklardan biridir. İnsanlarda yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda %2-12 arasında tespit edilmiştir. Dünyada hastalığın prevalansı üzerine yapılan çalışmalarda %2-46 arasında olduğu bildirilmiştir (Bisias ve ark 2009). Leptospiroz tarla fareleri başta olmak

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

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 oluşur. Özellikle çiftçiler enfekte idrarla temas halinde oldukları için büyük risk altındadır. (Bolin 2005, Lucheis ve Ferreira 2011, Turhan ve Hatipoğlu 2012, Scott 2018).

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, plaseenta, 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).

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 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).

1.6. Epizootiyoloji

Tüm dünyada hayvanlar arasında sıkça görülen leptospiroz, salgınlar ve sporadik vakalar şeklinde birçok ülkede bildirilmiştir. Hastalık, Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere, Avustralya, Yeni Zelanda, eski Sovyetler Birliği ülkeleri, Avrupa ve Asya'daki birçok ülkede resmi olarak bildirilmiştir.

Özellikle Orta ve Güney Amerika’da El Nino kasırgasından sonra görülen su baskınlarının ardından birçok vaka tespit edilmiştir (Levett 2001). Leptospirozis ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır. Erzurum yöresinde yapılan bir çalışmada, hastalığın sığırlarda %16, koyunlarda %0,04 oranında seyrettiği görülmüştür (Özkan ve ark. 1993).

1.7. Patogenez

İnkübasyon periyodu 3-20 gün arasında değişen leptospira etkenleri vücuda mukoza, deri, konjunktiva ve ürogenital sistemde açılan port antrelerden girer (Lilenbaum ve ark. 2008). İnkübasyon periyodunu takiben etkenin karaciğer, dalak, böbrekler, üreme sistemi, gözler ve merkezi sinir sistemine ulaştığı septisemi şekillenir. Leptospiraların kan dolaşımına girmesinden hemen sonra kan serumunda antikor tespit edilir. Bu dönem, etkenin opsonizasyonunu sağlayan spesifik immünoglobulinlerin kanda konsantrasyonları yükselene kadar yaklaşık 10 gün sürer. Konakçı bağışıklığının etkisiyle etkenin kan dolaşımında opsonizasyonu ile uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Bu aşamadan sonra leptospiruri ile karakterize ikinci dönem başlar. Bu dönemde etken böbrekte kalabilir ve aylarca idrar ile çevreye yayılabilir. (Faine ve ark. 1982, Levett 2001, Lucheis ve Ferreira 2011). Etkenler uzun süre böbrek ve genital sistemde canlı kalabilirler. Etken fötusa plasenta yolu ile geçer. Hayvanlar arasında bulaşma çiftleşme, temas yada kontamine çevre ile olmaktadır. Genellikle gebeliğin son üçte birlik döneminde abortus şekillenir. Fötüs otolize uğramış şekilde atılır. Plasenta ödemli, kotiledonlar atonik, gevşek, nekrotik ve kahve-sarımtırak renktedir. Fötusun deri altında ödem, vücut boşluklarında kanlı sıvı birikimi, karaciğerde büyüme ve fokal nekrozlar, yangısal böbrek değişiklikleri görülür. (Özdemir ve Erer 2018).

1.8. Klinik Bulgular

Leptospirozis asıl konaklarında düşük serolojik cevap, hafif dereceli klinik semptomlar ve kronik renal enfeksiyonlar oluşturur iken, rastlantısal konaklarında ağır klinik semptomlar, yüksek antikor titresi ile seyreden bir enfeksiyon oluşturur. Genç hayvanlar yaşlılara göre daha fazla duyarlıdır. Gebelik ve laktasyon periyodunda olmayan hayvanlarda hastalık subklinik seyreder ve genellikle kesim sırasında interstisyel nefritis lezyonlarının varlığı ile belirlenir (Loureiro ve ark 2013).

Hastalık sığırlarda ikter, anemi, hemoglobinüri, sepsisemi, organ ve dokularda peteşiyel 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 (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. (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, bilirubin 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. 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).

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).

1.9. Patolojik Bulgular

Nekropside yaygın peteşiyel kanamalar görülür. İkterusa bağlı olarak organlar sarı renge boyanır. Karaciğer anemik, yumuşak ve büyüktür. Serozalarda kanamalar vardır. Safra kesesinin dolgun, içeriği koyu ve kaba granüllü olduğu görülmektedir. Böbreklerinde hafif şişkin ve açık kahve renginde olduğu, ayrıca böbreklerin üst ve kesit yüzlerinde serpilmış olarak siyahımtırak-kahve renkte küçük odakların da bulunduğu gözlenir (Thompson J. C ve Manktelow 1989). Histopatolojik değişiklikler en fazla karaciğer, böbrekler, kalp ve akciğerlerde görülür. 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. 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 arterittir. Akciğerlerde nötrofil lökositlerin varlığı ve kanamalar en dikkat çekici bulgulardır. Alveollerde monosit ve nötrofillerinden oluşan infiltrasyon görülür. Ayrıca hiyalin membran oluşumu görülebilir. Dalak koyu renkli ve şişkindir. Lenf nodülleri ödemli ve kanamalıdır. Abort fötüsün plesantası kalın ve ödemlidir. İskelet kaslarında özellikle bacak kaslarında, histiyositlerin, nötrofillerin ve plazma hücrelerinin infiltrasyonu ve kas liflerinin fokal nekrozu gözlenir (Levett 2001).

1.10. 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). 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 (Flannery ve ark. 2001, Hamond ve ark. 2012, Picardeau 2013).

1.10.1. Direkt Teşhis Yöntemleri

Leptospiralar çok küçük mikroorganizmalar (10-20 µm) ve olmasına rağmen 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. Örneklerin alınma zamanı ve teknisyen hataları teşhis sonucunu değiştirebilir. (Ahmad ve ark. 2005).

Warthin-Starry gümüş boyama (WS) ve İndirekt flouresans (IF) ve İmmunhistokimya (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 edilmiş 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 ile etken izolasyonu altın standart tanı olarak kabul edilir. Ancak bakterinin yavaş üreme hızı ve toplanan örneklerin hemen besiyerine ekilmesi gerekliliği yöntemin dezavantajlarıdır. (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 süreyle kültürler kontrol edilmelidir. 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 uzayabilir (Loureiro ve ark. 2013).

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) tanı amaçlı olarak 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).

1.10.2. İndirekt Teşhis Yöntemleri

İmmun yanıtın tespit edilmesine dayanan serolojik yöntemler uzun yıllar kullanılmıştır. İmmun 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) insanlarda ve hayvanlarda leptospiroz tanısı için önerilen serolojik bir testtir (OIE 2018).

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 ayırım 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).

Bu çalışmada Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi belediye mezbahasında kesime sevk edilen ve ikterus gözlenen sığırlarda leptospirozun varlığının

araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla kesimden sonra karkas ve iç organlarda ikterus saptanan sığırların karaciğer ve böbreklerinden örnekler alınarak, makroskopik ve mikroskopik incelemeleri yapılmıştır. Yine bu dokulardan immuhistokimyasal ve Levaditi yöntemleri ile leptospira etkenlerinin varlığı belirlenerek histopatolojik değişiklikler ile kıyaslamaları yapılmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

Isparta ili Şarkikaraağaç ilçesi belediye mezbahasında 2020 yılında kesilen ve ikterus gözlenen 35 sığırdan patolojik ikterus gözlenen 11'ine ait karaciğer ve böbrekler çalışmanın materyalini oluşturdu. Bu olgulardan alınan karaciğer ve böbrek örnekleri bilinen laboratuvar yöntemleri ile işlenerek immunperoksidaz ve levaditi (gümüşleme) boyama yöntemleri ile elde edilen bulgular ile histopatolojik bulguların karşılaştırması yapıldı.

Çalışma kapsamında değerlendirilecek olgulara ait karaciğer ve böbrek dokularından hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen Eozin yöntemine göre boyanarak (Luna, 1968) ışık mikroskopunda incelendi. Bu organlarda gözlenen histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

Olgulara ait karaciğer ve böbrek dokularında leptospira antijenlerini belirlemek amacıyla dokulardan lizinli lama alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C ya da 60°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlanan kesitler, 3 kez 5'er dakika xylol serilerinden geçirilerek, iki kez her birinde 10 dakika tutmak kaydı ile alkol serilerinden geçirildi. %3'lük hidrojen peroksitte 20 dakika tutulan (3ml hidrojen peroksitte 97 ml methanol) preperatlar, 20 ml sitrat buffer 180 ml distile su karışımı içerisinde mikrodalga fırında 80 watta kaynatıldı, sonra bunu 40 watta düşürüp 15 dakika mikrodalga fırında bekletildi. Yirmi dakika dış ortamda sogutulan preperatlar başka bir kaba alınarak PBS ile 10 dakika süre ile yıkandı. Güneş almayan bir yerde PBS'ten çıkarıp preperatın altı ve etrafı iyice kurulandıktan sonra Blocking solution damlatılıp 10 dakika beklendi, preperatın üzerindeki blocking solüsyonunun etrafı kurulanıp, fazla kısmı döküldükten sonra üzerine tavşan anti Leptospira biflexa (hiperimmun serum) dökülerek 1 saat karanlık ortamda bekletildi. Daha sonra 2 kez 5'er dakika PBS ile çalkalanarak, etrafı kurulanıp Broad Spectrum Second Antibody damlatıldı, 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. On dakika PBS ile yıkama kurulumu uygulaması yapılarak ve HRP Streptavidin koyulup karanlık ortamda 10 dakika tutuldu. Tekrar 10 dakika PBS ile yıkanarak ve 1 ml DAB substrate, 1 damla DAB chromogen karıştırılarak kullanma solüsyonu hazırlanıp lamaların üzerine güneş almayan karanlık bir ortamda döküldü. Su ile yıkandı ve Mayer

Hematoksilende 3-5 dakika bekletilerek dokular su ile mavileşinceye kadar yıkandı. Alkol–xylol serilerinden geçirilip entellan ile lamel kapatıldı.

Olgulara ait karaciğer ve böbreklerden alınan dokular formol tespitini takiben 2 mm inceliğinde trimlenerek çeşme suyunda 1-3 saat süreyle yıkandı. 24 saat süreyle %96'lık alkolde tutuldu. Dokular, kabın dibine çökünceye kadar distile suda tutularak, taze hazırlanmış gümüş nitrat solüsyonu içine konulup, karanlıkta 37°C' de 3-5 günde bir solüsyon yenilenerek bekletildi. Distile su ile çalkalanarak, karanlıkta oda sıcaklığında, 1-3 gün indirgeme solüsyonunda bekletildi. Distile su ile çalkalanarak, %80, %96'lık alkol ve absolute alkollerde her birinde 30 dakika ve iki ksilol kabında 1'er saat tutuldu ve bu işlem sonunda iki parafin kabında da 45'er dakika bekletildi. Parafine gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında alınan doku kesitleri, ksilollerden geçirilerek üzerlerine lamel yapıştırıldı (Luna, 1968).

Mikroskopik incelemeler sonucunda gerekli olgulardan mikroskopik fotoğrafları (Olympus, DP12) çekildi.

3. BULGULAR

Çalışmada 2020 yılı içerisinde kesilen 1109 adet sığır incelenmiştir. 2020 yılında mezbahada kesilen ve kesim sonrası fizyolojik (Şekil 3.1) ve patolojik ikterus belirlenen sığırlar ile bu olgulardan leptospirozis teşhis edilenlerin aylara göre dağılımı tablo 3.1’de verilmiştir

Tablo 3.1. Çalışmada ikterus belirlenen sığırlar içerisinde patolojik sarılık ve leptospirozis görülenlerin sayıları ve aylara göre dağılımı.

Aylar	Kesilen Sığır Sayısı	Sarılık Görülen Sığır Sayısı	Fizyolojik Sarılık	Leptospira Harici Patolojik Sarılık	Leptospirozis
Ocak	92	1	1	0	0
Şubat	87	1	1	0	0
Mart	91	3	2	0	1
Nisan	96	4	1	0	3
Mayıs	94	9	2	4	3
Haziran	99	3	2	0	1
Temmuz	86	0	0	0	0
Ağustos	93	1	0	1	0
Eylül	95	3	2	0	1
Ekim	89	2	1	0	1
Kasım	96	7	2	4	1
Aralık	91	1	1	0	0
TOPLAM	1109	35	15	9	11

Çalışmada leptospirozis belirlenen sığırlarda gümüşleme ve immunhistokimya sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 3.2 de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada immunhistokimya ile leptospirozis belirlenen sarılıklı sığırlarda böbrek ve karaciğerde gümüşleme ve immunhistokimya pozitifliği.

Vaka No	İmmunohistokimya		Levaditi (Gümüşleme)	
	Böbrek	Karaciğer	Böbrek	Karaciğer
1	+	+	+	-
2	+	-	-	-
3	+	-	+	-
4	+	-	+	-
5	+	+	+	-
6	+	-	-	-
7	+	-	+	-
8	+	-	-	-
9	+	-	-	-
10	+	+	+	-
11	+	+	+	-
Toplam	11	4	7	0

Çalışmada leptospirozis pozitif olarak belirlenen numunelerinin menşelerine göre dağılımı Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.3. Çalışmada leptospirozis pozitif olarak belirlenen numunelerinin menşelerine göre dağılımı.

Çalışma Alanı	Kesim Sayısı	Leptospirozisli Sığır Sayısı
Şarkikaraağaç Merkez	571	2
Belceğiz Köyü	113	2
Çiçekpınar Köyü	192	3
Gedikli Köyü	75	2
Armutlu köyü	60	2

3.1. Makroskopik Bulgular

Çalışmada leptospira pozitif olarak belirlenen sığırlarda özellikle peritonda olmak üzere serozalarda peteşiyel kanamalar görüldü. Leptozipirozis belirlenen bütün olgularda perikart kesesinde sıvı birikimi ve perikartta peteşiyel kanamalar belirlendi. Bütün leptospirozisli sığırlarda iç organların, seroza ve mukozalar ile karkasın sarı renge boyanmış olduğu görüldü (Şekil 3.2). Karaciğerlerin sarımsı renkli, yumuşak kıvamlı ve büyümüş olduğu belirlendi (Şekil 3.3). Üç olguda safra kesesinin dolgun, içeriğinin koyu renkli ve granüler yapıda olduğu dikkat çekti (Şekil 3.4). Böbreklerin hafif şişkin ve açık kahve renginde olduğu (Şekil 3.5), ayrıca böbreklerin üst ve kesit yüzlerinde serpilmiş olarak siyahımtırak-kahve renkte küçük odakların da bulunduğu gözlemlendi. Dalaklar koyu renkli ve şişkin olarak belirlendi.

3.2. Mikroskopik Bulgular

Histopatolojik incelemelerde leptospirozlu hayvanlarda karaciğerde vena sentralislerin çevresinde rastgele dağılmış şekilde dejeneratif ve nekrotik hepatositler belirlendi (Şekil 3.6). Portal bölgelerde lenfosit, plazma hücresi ve makrofajlardan oluşan yángısal hücre infiltrasyonları belirlendi. Karaciğer kesitlerinde yoğun sarı yeşil safra pigmenti birikimlerine rastlandı (Şekil 3.7). Böbreklerde proksimal ve distal tubul epitellerinde yaygın dejenerasyon ve nekrozlar görüldü (Şekil 3.8). Tubul lümenlerinde dökülmüş epitel hücreleri ve hiyalin silindirleri (Şekil 3.9) ile intersitisyel bölgelerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi (Şekil 3.10).

Levaditi boyama metoduyla 7 sığırdá sadece böbrek dokusunda pozitiflik tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul epitellerinde ve lümenlerinde sarı zeminde siyah renkte boyanmış etkenler olarak görüldü (Şekil 3.11).

Çalışmada IHC yöntemiyle 11 örnekte pozitif boyanma tespit edildi. Boyanmalar böbrek tubul epitellerinde intrasitoplazmik kahverengi granüller halinde ve bazen de bazal membrana yakın kısımlarda hücre zarına yapışık vaziyette görüldü (Şekil 3.12). Pozitif boyanan 11 numunenin 4 tanesinde böbrek ve karaciğerde pozitiflik saptandı. Olguların tümünde böbreklerde pozitiflik vardı.



Şekil 3.1. Fizyolojik ikterus belirlenen karkaslar.



Şekil 3.2. Şiddetli ikteruslu karkas, Leptospiroz (A), Normal karkas (B).



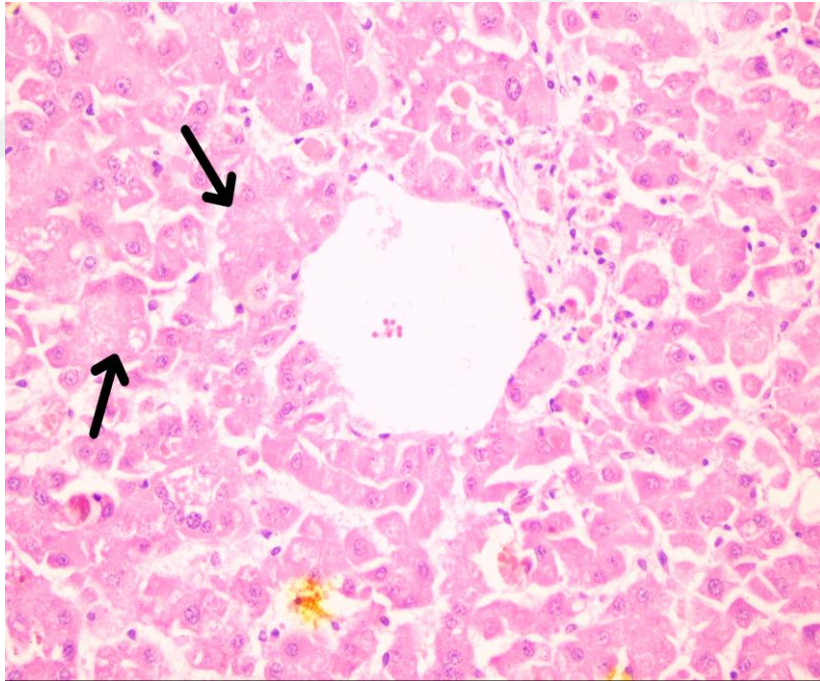
Şekil 3.3. Sarımsı renkli karaciğer ve büyümüş safra kesesi, Leptospirozis.



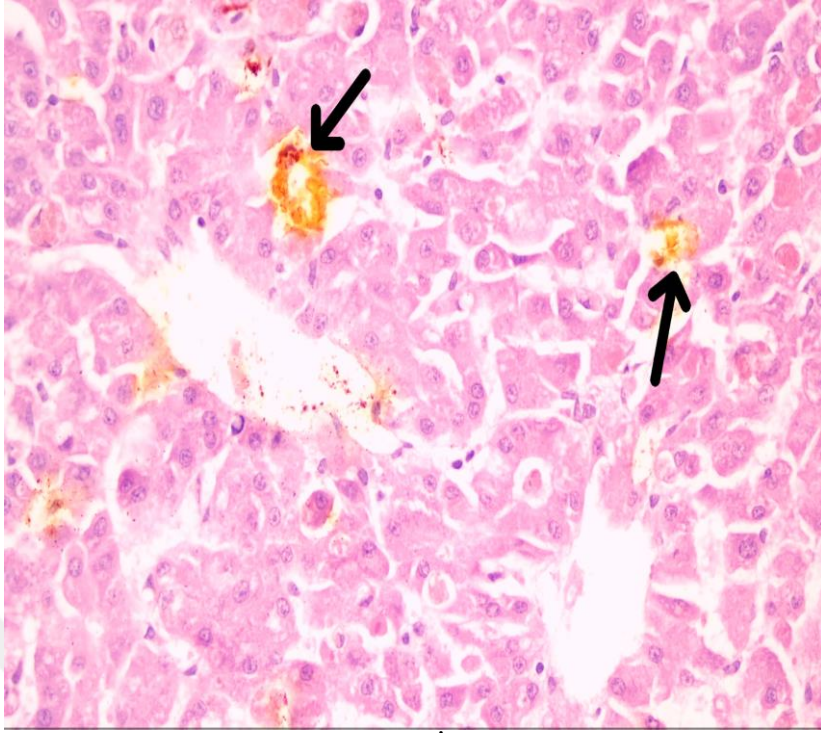
Şekil 3.4. Büyümüş safra kesesi, koyu renkli, pıhtı içeren safra, Leptospirozis.



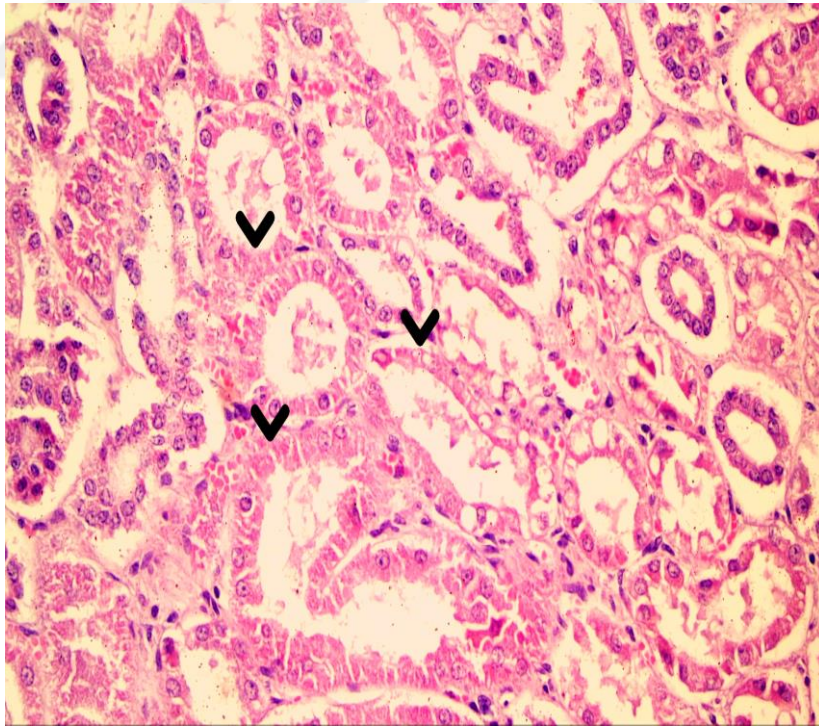
Şekil 3.5. İkteruslu böbrek, Leptospirozis.



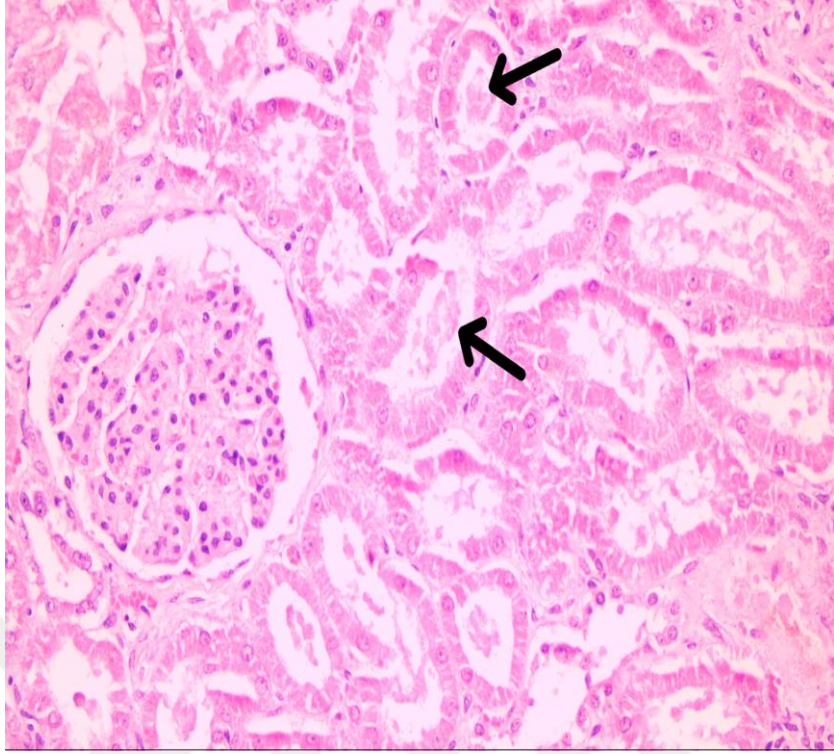
Şekil 3.6. Hepatositlerde nekroz (oklar) ve dejenerasyon, remark kordonlarında dissosiasyon, karaciğer, leptospirozis, H.E, X200.



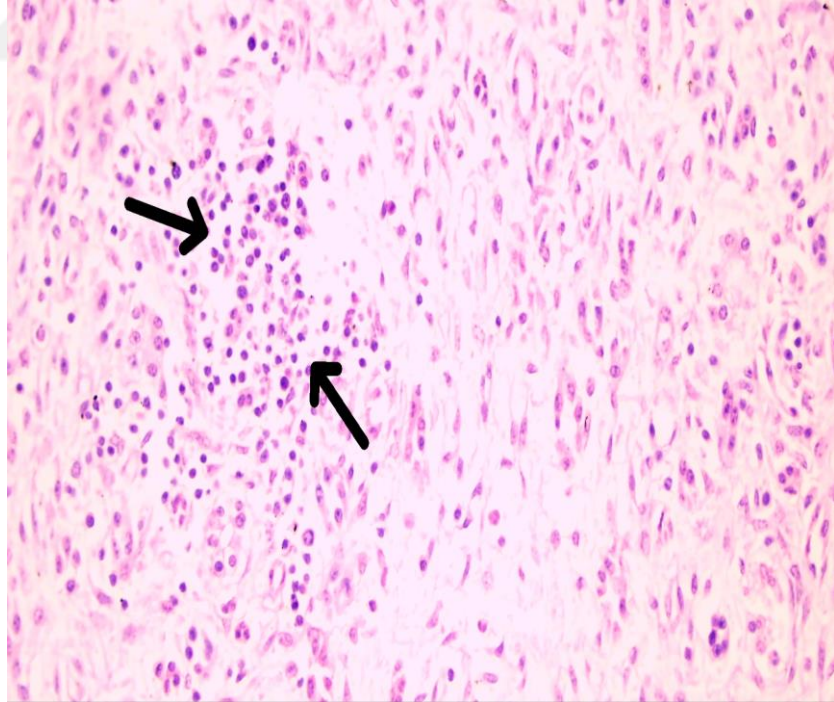
Şekil 3.7. Safra pigmenti (oklar), İntrahepatik kolestaz, karaciğer, leptospirozis. H.E, X200.



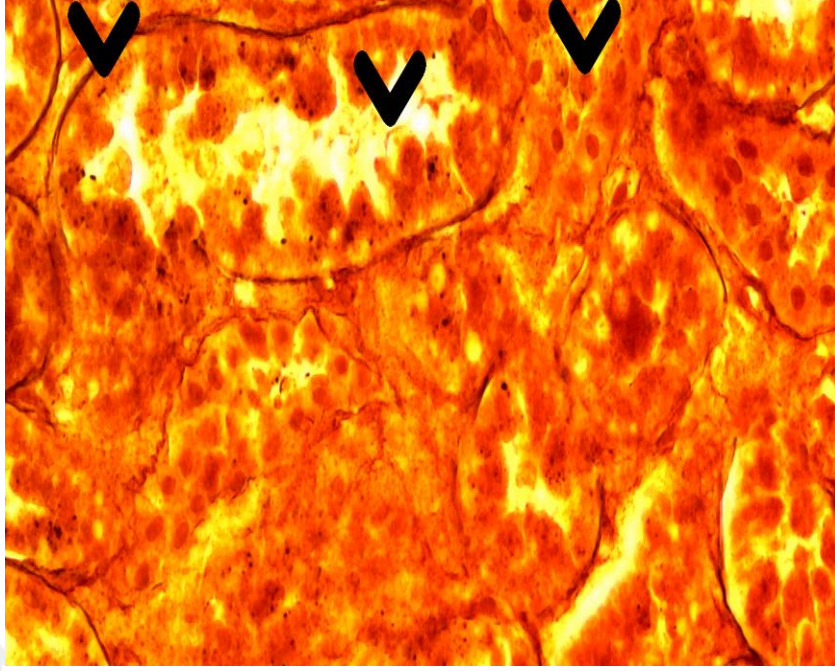
Şekil 3.8. Tubul epitellerinde dejenerasyon (oklar), böbrek, leptospiroz, H.E, x400.



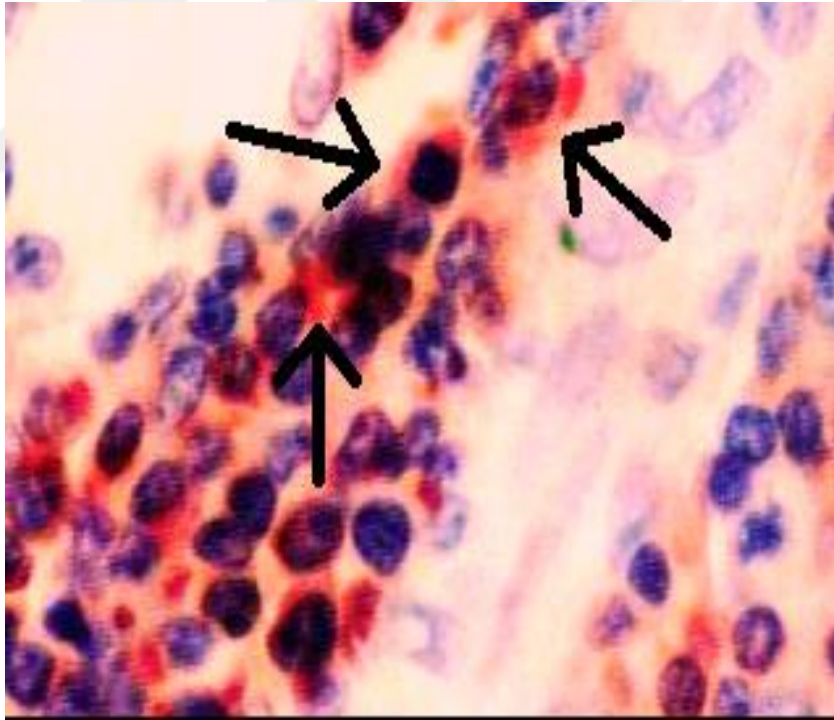
Şekil 3.9.Tubul lümenlerinde hiyalin silindirleri (oklar), böbrek, leptospiroz, H.E, x400.



Şekil 3.10.Yangısel hücre infiltrasyonları (oklar), böbrek, leptospiroz, H.E, X200.



Şekil 3.11. Tubulus epitellerinde bakteriler (ok başı), böbrek, Leptospirozis, Levaditi boyama, X600.



Şekil 3.12. Anti-Leptospira rabbit antiserumu ile tubul epitellerinde pozitif boyanma (oklar), böbrek, IHC, X400.

4.TARTIŞMA

Leptospiroz, hayvanlarda infertilite, ölü doğum, abort, ölüm ve süt veriminde düşüslere 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). Bu çalışmada mezbahane kesilen ve ikterus gözlemlenen sığırlardaki leptospirozis varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Treml ve Nesnalova (1995) bakteriyoskopi ve kültür çalışmalarında etkeni belirleyemedikleri çalışmalarında serolojik olarak Çek Cumhuriyetinde %7,4 pozitiflik rapor etmişlerdir. 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. Serolojik olarak da %49 oranında pozitiflik saptamışlardır. Erzurum bölgesinde Özkan ve ark. (1993)’ın yaptıkları çalışmada leptospirozisin sığırlarda %16, koyunlarda % 0,04 oranında görüldüğü bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma da mezbahada bir yıllık periyotta kesilen sığırların tamamı göz önünde bulundurulduğunda sarılık görölme oranının %3,1, leptospirozis belirlenme oranının %1, sarılıklı sığırlarda leptospirozis belirlenme oranının %31,43 olduğu patolojik sarılık olarak ayrılan sığırlar içerisinde ise leptospirozisin %55 oranında görüldüğü belirlendi. Diğer sarılık olgularının ise kan protozoonlarına bağıli şekillenmiş olabileceğı düşünöldü. Sonuçların Özkan ve ark (1993) göre farklı olmasının sebebi materyal sayısı ve coğrafi konumla ilişkilendirilmiştir.

İkterusta vücut yağları ve seröz membranlar sarı renkte görünürler. Bağ doku portakal sarısı veya yeşilimsi sarı renkte olup, çoğı vakada sarı renk oluşumuna gözde, tendolarda ve uzun kemiklerin kıkırdak dokularında da rastlanır (Erer ve ark 2009). Fizyolojik sarılık ise, genelde merada otlayan hayvanlar ile fazla miktarda mısır kırması ve havuçla beslenen hayvanlarda oluşur. Bunun nedeni bu tip bitkilerde bulunan klorofil, lipokrom ve karatinoid

benzeri maddelerdir. Fizyolojik sarılığa neden olan maddeler, safra pigmentlerinin aksine, oksijene fazla duyarlı oldukları için hava ile temas ettiklerinde belirli süre sonunda oluşan sarı renk azalır. Bu nedenle sarılık gösteren etler serin bir yerde 24 saat bekletilerek, sarı rengin azalıp azalmadığı veya tamamen kaybolup kaybolmadığına göre karar verilir (Yıldırım 1996). Patolojik sarılığı, fizyolojik sarılıktan ayırmak amacıyla laboratuvarında basit bir yöntem olan alkol ve eter deneyi yapılabilir. Bu amaçla sarılık semptomu gösteren karkasdan alınan yağ dokusu, küçük parçalar haline getirildikten sonra birinde % 50'lik alkol, diğerinde eter bulunan deney tüplerine konduktan sonra iyice çalkalanır ve 1-2 saat süreyle bekletildikten sonra değerlendirilir. Şayet bu sürenin sonunda alkol sarıya boyanmış ise patolojik sarılık, eter sarıya boyanmış ise fizyolojik sarılık olduğuna karar verilir (Yıldırım 1996). Bu çalışmada da kesim sonrası sarılık belirlenen sığır karkasları 24 saat süreyle bekletilerek ve yağ dokularından alınan örnekler eter alkol deneyine tabi tutularak 24 tanesinin fizyolojik sarılık olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu oran toplam sarılık vakalarının %68,5'ini içermesi açısından önemlidir. Bu durum ilçede yetiştirilen hayvanların çoğunun merada beslenmesine yorumlanmıştır.

Leptospirozla ilgili çalışmalarda sarılıkla birlikte serozalarda yaygın peteşiyel kanamalar bildirilmiştir (Thompson ve Manktelow 1989). Bu çalışmada da verilen literatürlere benzer şekilde leptospira pozitif olarak belirlenen sığırlarda özellikle periton olmak üzere iç organları örten serozalarda farklı şiddette peteşiyel kanamalar görüldü. Bu tablo hastalığın septisemik formuyla ilişkili olabileceği kanısına varıldı.

Çalışmada incelenen leptospirozisli ineklerde iç organların, seroza ve mukozaların ve karkasın sarı renge boyanmış olduğu ve karaciğerlerin büyük, solgun renkli ve anemik olduğu belirlendi. Yine incelenen olgularda böbreklerin hafif şişkin ve açık kahve rengine olduğu, böbreklerin üst ve kesit yüzlerinde serpilmiş olarak siyahımtırak-kahve renkte küçük odakların da bulunduğu gözlemlendi. Bu bulgular leptospirozisin patolojisinin raporlandığı çalışmalarla uyumludur (Thompson ve Manktelow 1989). Ayrıca, üç olguda belirlenen safra kesesinin dolgunluğu, koyu renkli içeriği ve içeriğin kaba granüllü oluşu literatür ile benzerdir (Thompson ve Manktelow 1989).

Histopatolojik incelemelerde Leptospirozlu hayvanlarda karaciğerde vena sentralislerin çevresinde daha fazla olmak üzere gelişigüzel dağılımlı dejeneratif ve nekrotik hepatositler görüldü. Nekrotik alanlarda ve portal bölgelerde lenfosit, plazma hücresi, makrofaj ile az miktarda nötrofil granülosit içeren yangısal hücre infiltrasyonları belirlendi. Böbreklerde proksimal ve distal tubul epitelinde yaygın nekrozlar görüldü. Tubul lümenlerinde dökülmüş epitel hücreleri ve hiyalin silindirleri ile intersitisyel bölgelerde fokal mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Bu bulgular benzer çalışmaların sonuçları ile uyumludur (Milli ve Hazıroğlu 1997, Ellis 1983, Scanziani 1991, Özdemir ve Erer 2018).

Sunulan çalışmada 2020 yılında Şarkıkaraağaç ilçe mezbahasında kesilen sığırlarda patolojik sarılık belirlenen sığırlar 20 adet immunhistokimyasal ve Levaditi yöntemleriyle incelendi. Çalışma sonucunda pozitif bulunan örnekler HxE boyama metoduyla karşılaştırıldı. Çalışmada 20 adet sığıra ait karaciğer ve böbrek dokusu kullanıldı. Anti-leptospira rabbit antiserumu kullanılarak yapılan IHC metodu ile 11 adedinde pozitiflik saptanırken, Levaditi boyama yöntemi ile 7 örneğe ait böbrekte leptospira etkenleri gözlendi. Sunulan çalışmada da Levaditi yöntemiyle sadece ikteruslu sığırların böbreklerinden etken tespiti yapılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar Hathaway ve ark. (1986) çalışması ile uyumludur. Benzer şekilde Akçay ve Pamukçu (1950) tarafından Atatürk Orman Çiftliğinde ateş, ikterus, anemi ve hemoglobininüri semptomları göstererek ölen, 1 yaş ve 1 yaş altı 3 dananın sadece böbreklerinde levaditi yöntemi ile etkeni tespit edebilmişlerdir.

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 görünümünde 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 ve ark 1991), hassasiyetin %78 ve doğruluğunun %100 olduğu bildirilmiştir (Scanziani ve ark 1991). Sağlam ve ark (2008) abort fötüslerinde, Yener ve Keleş (2001) ise

leptospira şüpheli sığırların dokularına yapılan Levaditi boyamalarında etkenleri tespit edemediklerini fakat immunperoksidaz boyamada leptospira antijenlerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Levaditi boyama ile sadece 7 vakada pozitiflik varken IHC boyamada patolojik ikteruslu vakaların hepsinde pozitiflik tespit edilmesi IHC yönteminin daha hassas ve güvenilir olduğunu ortaya koymuştur.

Leptospira etkenlerinin genelde böbrek tubuluslarının lumenlerine yerleştiği (Ellis 1983, Scanziani 1991) koyu kahverengi olduğu ve nefritis tablosu oluşturduğu bildirilmektedir (Maxie 1993, Milli ve Hazıroğlu 1997, Jones ve ark. 1997). Bu çalışmada anti-Leptospira rabbit antiserumu kullanımı ile böbrek tübül epitellerinde belirgin pozitiflik bulunması, sığır fötuslarında orta ve güçlü derecede antijen tespiti yapılan diğer çalışmalarla (Szeredi ve Haake 2006, Sağlam ve ark. 2008) uygunluk göstermektedir. Araştırmacılar (Szeredi ve Haake 2006, Sağlam ve ark. 2008) abortuslarda Leptospirozun immunhistokimyasal ve Levaditi yöntemleri ile tanıda başta böbrek olmak üzere karaciğerde etken tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da IHC yöntemiyle böbrek daha yoğun olmak üzere karaciğer 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. Bu çalışmada belirlenen 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 sitoplazmalarında tespit edildi.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma sonucunda Isparta ili Şarkikarağaç ilçesi mezbahasında bir yıllık periyotta kesilen sığırlarda ikterus oranı %3,1, leptospirozis oranı ise %1 olarak belirlenmiştir. Ayrıca ikteruslu vakalarda Leptospirozis oranı %31,43 olarak tespit edilmiştir.

Vakaların patolojik bulgularının önceki çalışmalarla benzer olduğu dikkati çekmiş, teşhiste IHC boyamanın daha etkili ve güvenilir olduğu ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar sığır leptospirozisinin teşhisinde Leptospira etkenlerinin izolasyon zorluğundan kaynaklanan durumlardan dolayı leptospirozun spesifik ve erken tanısında immunhistokimyasal tanı uygulamasının etiyolojik açıdan uyumlu ve güvenli sonuçlar verdiğini, ayrıca Levaditi metodunun da önemini ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKÇA

- 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.
- Akçay S, Pamukçu A, 1950. Leptospirosis in cattle in Turkey. Turk Veteriner Hekimleri Dernegi Dergisi, 20, 319-32.
- Amalredjo A, Campbell RSF, 1975. Bovine leptospirosis. Vet Bul, 43, 875-882.
- 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.
- Arslan, Z. 2019. Marmara Bölgesinde Ruminantlardaki Abort Olgularında Leptospirozisin Levaditi ve İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Teşhisi ve Histopatolojik Bulgularla Karşılaştırılması. SÜ Sağ. Bil. Ens. Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- 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, Orlando, Florida, 8-12.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA, 2001. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 20th ed, McGraw-Hill Comp., International Ed.
- Bulu AA, Dörterler R, Özkan Ö, Hoştürk F, 1990. Doğu Anadolunun bazı illerinde (Kars, Erzurum, Gümüşhane, Artvin) sığır ve koyunlarda leptospirosis vakaları, yayılımı ve serotipleri üzerine araştırmalar. Etlik Vet Mikrobiyol Derg, 6, 6, 50-61.
- Burriel AR, 2010. Leptospirosis: an important zoonotic diseases. In: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Ed Mendez-Vilas, Chapter 1, Formatex, Spain, p. 687-93.
- Ellis TM, Robetrson GM, Hustas L, Kirby M, 1983. Detection of leptospire In tissue using an immunoperoxidase staining procedure. Aust. Vet J, 12, 364-367.
- Erer H., Kıran MM., Çiftçi MK., 2009. Veteriner Genel Patoloji, 3. Baskı. Bahçıvanlar Basım Sanayi A.Ş. Konya.
- Faine S, 1982. Guidelines for the control of leptospirosis. World Health Organization, Geneva, p. 171.
- Falini B, Taylor CR, 1983. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med, 107, 105-17.
- 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 Clin Microbiol, 39, 9, 3303-10.
- 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 dairy 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 tests for equine leptospirosis. Onl J Vet Res, 16, 111-16.

- Hathaway S, Little T, Pritchard D, 1986. Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. The Veterinary Record, 119, 4, 84-6.
- Haziroğlu R, Milli ÜH, 2001. Veteriner Patoloji, Cilt II, Ed:Haziroğlu 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.
- Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, 2012. Pathology of domestic animals, Academic press, p.
- Kaufmann AF, Weyant RS, 1995. Leptospiraceae. In: Manual of Clinical Microbiology. Eds: Murray, PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, 6th ed, ASM Press, Washington DC, p. 621-25.
- Levett PN, 2001. Leptospirosis. Clin 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 Incl 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.
- Maxie MG, 1993. The Urinary System. In: Pathology of Domestic Animals, Eds. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Vol. 2, 4th ed, Academic Press Inc, San Diego, USA, pp. 480-520.
- Miller DA, Wilson MA, Beran GW, 1991. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. Am J Vet Res, 52, 1761-65.
- OIE, Terrestrial Manual, 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 eodemietens*, *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, Schrieffer 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 M, Markey BK, Garber GR, 1994. "Clinical Veterinary Microbiology". WoHe Plublishing, London, England.
- Russell CJ, Faine S, 1984. *Leptospira*. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I, Ed. Krieger, 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.
- 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.
- 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.
- Temur A, Sağlam YS, 2003. Sığır abortuslarında leptospirosis yönünden immunperoksidaz incelemeler. *Türk J Vet Anim Sci*, 27, 917-21.
- Thompson JC, Manktelow BW, 1989. Pathogenesis of renal lesions in haemoglobinemic and nonhaemoglobinemic leptospirosis. *J Comp Path*, 101, 2, 201-214.
- Treml A, Nesnalova E, 1995. Leptospirosis in slaughter 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*, 29,163-68.
- 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.
- 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.
- Yıldırım, Y., 1996. Et Endüstrisi (4.ed.), Remzi Ofset, Ankara.