

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**LEPTOSPIROSİS TANISINDA LipL32, OmpL1 ve 16S
rRNA GEN BÖLGELERİNDEKİ SPESİFİK DİZİLERİ
HEDEF ALAN PCR-RFLP YÖNTEMLERİNİN
DUYARLILIKLARININ TESPİTİ**

Vet. Hek. Ayben SOYAL

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA 2013

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**LEPTOSPIROSİS TANISINDA LipL32, OmpL1 ve 16S
rRNA GEN BÖLGELERİNDEKİ SPESİFİK DİZİLERİ
HEDEF ALAN PCR-RFLP YÖNTEMLERİNİN
DUYARLILIKLARININ TESPİTİ**

Vet. Hek. Ayben SOYAL

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL**

**Bu çalışma TF2009 D1 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA 2013

TEŞEKKÜR

Tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof Dr. Fatih KÖKSAL' a, ayrıca eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylasan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT' e, Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında birlikte çalışmaktan kıvanç duyduğum asistan arkadaşlarıma, eğitimim boyunca hiçbir yardımı esirgemeyen bölüm sekreterimiz Sn. Suna GÖKMEN' e ,Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tropikal Hastalıklar Araştırma Uygulama Merkezi ve Adana Bölge Tüberküloz Laboratuvarının tüm çalışanlarına ve Ankara Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Spiroket Hastalıkları Laboratuvar Şefi Vet.Hek. Erdinç ATABEK' e değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca doktora eğitimime başlamamda en büyük desteği veren ve her zaman yanımda hissettiğim annem Makbule SOYAL' a, halen her durumda varlığı ile bana dayanak olarak bu günlere gelmemde büyük payı olan sevgili babam Av. Osman SOYAL' a ve bitmeyen enerjisi ile bana yaşama sevinci veren biricik kızım Duru Su' ya teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Taksonomi ve Sınıflandırma	3
2.3. Leptospiraların Ekolojik Özellikleri	6
2.3.1. Doğal Vektör ve Rezervuarlar	6
2.3.2. Doğal Ekolojik Ortamda Leptospira Yayılımı	7
2.3.3. Coğrafi ve iklimsel faktörler	8
2.4. Leptospiraların Morfolojik Özellikleri	8
2.4.1. Hücre duvarı	9
2.4.2. Protoplazmik Silindir	11
2.4.3. Flagella	11
2.5. Hücre Bölünmesi	12
2.6. Genetik Kompozisyon	12
2.7. Fizyolojik özellikler, Metabolizma ve Kültür karakterleri	13
2.8. Antijenik Özellikler	14
2.8.1. Protein Antijenler	14
2.8.2. Lipopolisakkaritler (LPS)	16
2.9. İmmun Cevap	17
2.10. İnsanda Hastalığın Klinik Özellikleri	18

2.10.1. Anikterik Leptospiroz	19
2.10.2. İkterik Leptospiroz	20
2.11. Patoloji ve Patogenez	21
2.12. Leptospirozun Laboratuvar Tanısı	22
2.12.1. Direkt Tanı Yöntemleri	22
2.12.1.1. Direkt Mikroskopik İnceleme	22
2.12.1.2. Leptospira Kültürü	23
2.12.1.3. Moleküler Metodlar	24
2.12.1.3.1. Nükleik Asit Prop ve Hibridizasyonu	24
2.12.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	25
2.12.2. Serolojik Yöntemler	26
2.12.2.1. Mikroskopik Aglütinasyon Testi (MAT)	26
2.12.2.2. Hızlı Lateks Aglütinasyon Testi	26
2.12.2.3. Enzim Bağlı İmmunoSorbent Testi (ELİSA)	27
2.12.2.4. Lepto-Dipstikler	27
2.12.2.5. İndirekt İmmuno-Florasın Antikor Testi (IFA)	28
2.13. Leptospirozda Tedavi	29
2.14. Leptospiral Enfeksiyonlarda Epidemiyoloji	30
2.15. Koruma ve Kontrol	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Hasta Örneklerinin Toplanması	37
3.2. Mikro Aglütinasyon Testi (MAT)	38
3.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemi	39
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu	40
3.3.2. 16S rRNA gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve RFLP	40
3.3.3. OmpL1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	41
3.3.4. LipL32 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu	43
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	65
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1. <i>L. interrogans sensu lato</i> Serogrubuna ait bazı serovarlar	4
Tablo 2. Leptospiralarda Genomo-türlere göre serogrupların dağılımı	5
Tablo 3. Birden fazla tür içinde sınıflanmış olan serovarlar	6
Tablo 4. Hayvan türlerine göre ilişkilendirilmiş serovarlar	7
Tablo 5. Leptospiroz tedavisinde ve korunmasında önerilen antibiyotikler ve dozları	30
Tablo 6. Çeşitli populasyonlarda leptospiroz seroprevalans çalışmaları	34
Tablo 7. Türkiye’de 2001-2010 yılları arasında bildirilen leptospiroz Olguları	37
Tablo 8. Kullanılan primerlere göre pozitif sonuç vermesi beklenen Serogruplar	42
Tablo 9. KAM’ de elde edilen leptospira ile uyumlu morfolojik görünüm oranları	45
Tablo 10. Hayvan ve insan örneklerinin MAT ile değerlendirilmesi	46
Tablo 11. Örneklerin MAT testinde elde edilen seropozitiflik değerleri	48
Tablo 12. Serum örneklerinde KAM/MAT uyumu	49
Tablo 13. 16SrRNA Nested-PCR ve PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen sonuçlar	50
Tablo 14. Serum örneklerinde LipL32 Nested-PCR yöntemi ile <i>L.interrogans</i> tespiti	50
Tablo 15. 16SrRNA Nested-PCR sonuçları ile LipL32 Nested-PCR sonuçlarının karşılaştırılması	53
Tablo 16. OmpL1 spesifik A serogrubunda yer alan <i>L.interrogans</i> türlerine ait hedef dizilerin tespiti	54
Tablo 17. OmpL1 spesifik B serogrubunda yer alan <i>L.interrogans</i> türlerine ait hedef dizilerin tespiti	56
Tablo 18. OmpL1 spesifik gen dizilerinin A ve B serotiplerinin tespitinde amplifikasyon oranları	57
Tablo 19. Serum örneklerinde 16SrRNA Nested-PCR, LipL32 Nested-PCR ve OmpL1 PCR sonuçlarının karşılaştırılması	58
Tablo 20. Serum örneklerinde 16SrRNA Nested-PCR ve MAT testi sonuçlarının karşılaştırılması	59
Tablo 21. 16SrRNA Nested-PCR ve MAT test sonuçları için spesifikite ve sensitivite değerlendirmesi	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1. Leptospiraların elektron mikroskobunda görüntüsü	10
Şekil 2. Leptospiraların karanlık saha mikroskobisinde görünümü	14
Şekil 3. Leptospiraların vücutta oluşturduğu immun cevap	18
Şekil 4. Floresan işaretli antikorlarla tespit edilen etkenlerin floresan-mikroskop altında görüntüsü.	29
Şekil 5. Leptospira etkenlerinin doğal döngüsü	32
Şekil 6. MAT testi plağı	38
Şekil 7. Pozitif değerlendirilen aglitünasyon	39
Şekil 8. Negatif değerlendirilen aglitünasyon	39
Şekil 9. 16S rRNA Nested-PCR sonunda alınan 289 bp'lik bantların görüntüsü.	51
Şekil 10. 16S rRNA Nested-PCR sonunda alınan 289 bp'lik hedef dizinin ApoI enzimi ile hidrolizi	51
Şekil 11. LipL32 Nested-PCR sonucunda pozitif örneklerde 497 bp'lik bant görüntüsü	52
Şekil 12. OmpL1 A grubu primerlerle elde edilen 396 bp'lik bantların görüntüsü.	55

KISALTMALAR DİZİNİ

A, T, U, G, C	: adenine, thymine, uracil, guanine ve cytosine nucleotid bazları
Ab	: antibody
Ag	: antigen
AP	: alkaline phosphatase
bp	: base çifti
BSA	: bovine serum albumin
cm	: santimetre
°C	: santigrat derece
dATP	: deoxyadenosine triphosphates
dCTP	: deoxycytosine triphosphates
dGTP	: deoxyguanosine triphosphates
dNTP	: deoxynucleotide triphosphates
DDS	: deiyonize distile su
DNA	: deoxyribonucleic acid
dTTP	: deoxythymidine triphosphates
DS	: distile su
EDTA	: ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
EMJH	: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris besi yeri
F	: forward
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
Hsp	: heat shock proteins
KAM	: karanlık alan mikroskopisi
LPS	: lipopolisakkarit
M	: Marker
OE	: dış zarf
OMP	: dış membran proteinleri
OM	: dış membran
ORF	: açık okuma bölgeleri

PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
R	: reverse
RNA	: ribo nükleik asit
tRNA	: taşıyıcı RNA
rRNA	: ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi
TLR	: Tool benzeri reseptör
UV	: Ultra viyole

ÖZET

Leptospirosis tanısında LipL32, OmpL1 ve 16S rRNA gen bölgelerindeki spesifik dizileri hedef alan PCR-RFLP yöntemlerinin duyarlılıklarının tespiti

Leptospiroz, tüm dünyada ılıman ve yağışlı iklim özelliği gösteren bölgelerde görülen en önemli zoonozlardandır. Oldukça geniş bir spektrumda klinik tabloya sebep olan leptospirosis'de olguların sadece %10'unda görülebilen hematürinin de spesifik bir semptom olmaması sebebi ile Leptospirosis'in klinik tanısı son derece zordur. Leptospirozlu vakaların çoğu ya tanı almadan nonspesifik olarak ampirik tedavi almakta veya hastalık spontan iyileşme ile sonlanmaktadır. Ancak son ikterik dönemdeki hastalar araştırma hastanelerine zorunlu olarak başvurmakta ve idrar ve kan örneklerinin karanlık alan mikroskopisi ile değerlendirilmesi ile non-spesifik ve düşük sensitivitede tanı almaktadır.

Bu çalışmada konvensiyonel tanıdaki yetersizliklere alternatif olmak üzere, şüpheli hastaya ait klinik materyallerde; a- leptospira varlığı, b- *L.interrogans* ve *L.biflexa* tür tayini yapabilecek, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip ve hızlı sonuç üretebilen PCR bazlı tanı kiti geliştirilmesi amaçlandı.

Karanlık Alan Mikroskopisi ve MAT' ne göre daha sensitif, spesifik ve hızlı bir alternatif tanı testi oluşturmak üzere 16SrRNA Nested-PCR RFLP, OmpL1 PCR ve LipL32 Nested-PCR testlerinin kullanılabilirliğini belirlemek amacı ile, Çukurova bölgesinde klinik olarak leptospirosis şüphesi olup Ç.Ü Tıp Fakültesi hastanesi ile SB Adana Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniklerine başvuran 38'i yetişkin 9'u 18 yaş altı hastalardan alınan 47 kan örneği ile bölgemizde hematüri ve ikter bulguları olan 86 büyükbaş hayvana ait kan örneği 47'si insan 86'sı hasta hayvanlara ait olmak üzere toplam 133 serum/plazma örneği değerlendirildi.

Karanlık alan mikroskobisinde (KAM) incelenen 22 insan ve 34 hayvan örneğinde leptospira ile uyumlu görüntü elde edilirken, 7 farklı *L.interrogans* suşu ve *L. patoc* suşunun antijen olarak kullanıldığı MAT ile değerlendirilmesi sonucunda ise insan serum örneklerinin 21'i ile hayvan serum örneklerinin 69'unda en az 1/50 titrasyonda bir antijene karşı seropozitiflik görüldü. 16S rRNA Nested-PCR-RFLP ile 77'si *L.interrogans* 15'i de *L.biflexa* olmak üzere, toplam 92 örnekte hedef diziler tespit edilirken, sadece *L.interrogans* türlerinde bulunan LipL32 geni spesifik primerlerin kullanıldığı PCR ile örneklerin 77'sinde, serotip düzeyinde *L.interrogans* ayırımına imkan veren OmpL1 PCR ile ise toplam 67 örnekte pozitiflik elde edildi.

Bölgede en sık karşılaşılan serotipin %2,1'i insan %25,6'sı hayvan örneklerinden olmak üzere %17 oranı ile *L.hardjo* olduğu, bu serotip dışında, sırası ile *L.grippotyphosa*, *L.Bratistava* ve *L.ichteriohaemorrhagia* gibi serotiplerin görüldüğü tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *L.interrogans*, PCR, 16SrRNA, OmpL1, LipL32

ABSTRACT

Detection of sensitivity, PCR-RFLP methods, targeted specific sequence in LipL32, OmpL1 and 16S rRNA gene regions for diagnosis Leptospirosis.

Leptospirosis is one of the most important zoonosis, seen in regions with temperate and rainy climate, including our region. Causing a wide clinical spectrum, clinical diagnosis of Leptospirosis is extremely difficult because only 10 % of cases with nonspecific symptoms can be seen. Most of the cases of Leptospirosis are either non-specific empirical treatment without diagnosis, or disease terminated with spontaneous recovery. However, with patients in the last icteric period, it is necessary to admit them to research hospitals, and evaluate them via non-specific and low sensitivity methods with blood and urine samples through dark field microscopy.

This study is aimed at developing alternative methods for identifying deficiencies in conventional diagnosis methods, diagnostic kit based PCR-RFLP, which belong to the suspect patient clinical materials; a- to show existence leptospira, b- identification of *L.interrogans* and *L.biflexa* types, with high sensitivity and specificity and can produce rapid results.

A total of 47 human patients, 38 adults and 9 under of 18 age, were admitted to Ç.U. Faculty of Medicine and The Department of Infectious Disease of Adana State Hospital of Health Ministry, and blood samples of 86 cattle belongs to Çukurova region which showed hematuria and icter symptoms, were investigated with 16S rRNA Nested-PCR RFLP, OmpL1 PCR and LipL32 nested-PCR tests, to create more sensitive, specific and rapid alternative diagnostic tests to determine the usability of DFM and MAT.

While positivity rates in all samples analyzed in DFM methods, 22 human and 34 animal, sera appearance were obtained by *Leptospira* compatible images, the result of the MAT samples from 7 different *L.interrogans* strains and *L.patoc* strain were used as an antigen to evaluate, 21 human and 69 animal serum samples seropositivity were detected in at least 1/50 via antigen titration. The target sequences within 16SrRNA gene were found to be positive in 92 patients, of which 77 belonged to the *L.interrogans* and 15 *L.biflexa* by using 16S rRNA-specific nested-PCR-RFLP which allows the separation of pathogenic and non-pathogenic strains. And the result of LipL32 gene specific primers PCR in 77 samples of all samples *L.interrogans* was found, and by using OmpL1 PCR which allows separation of the level of serotype to *L.interrogans*, 67 samples were found to be positive

L.hardjo have been identified as the most common serotypes in the region with rate is 17% including 2,1% of people and 25,6% of animal samples and except for this serotype, *L.grippotyphosa*, *L.bratistava* and *L.ichteriohaemorrhagia* respectively have been seen as the serotypes identified.

Key words: *L.interrogans*, PCR, 16SrRNA, OmpL1, LipL32

1. GİRİŞ

Leptospirosis, *Leptospira* cinsi spiroketlerin neden olduğu muhtemelen dünyanın en yaygın ve önemli zoonotik infeksiyonlardan birisidir. Başta yağmurların bol olduğu tropikal ve subtropikal iklim kuşağında yer alan ülkeler olmak üzere, tüm dünya da yaygın halde görülen leptospirosis mevsimsel salgınlara sebep olmaktadır. İnsanlarda, hafif grip benzeri semptomlarla seyreden ve spontan sonlanan anikterik bir hastalıktan, hepato-nefrit ile karakterize çoklu organ tutulumu görülen fatal hemorajik, ikterik malign form olan Weil hastalığına kadar değişen farklı klinik tablolarla seyreder. Weil hastalığında, antibiyotik kullanımına rağmen mortalite %10'un üzerine çıkabilir. Bu sebeple hastalığı anikterik dönemde iken tanısı ve özgül tedavi hayat kurtarıcıdır. Ancak leptospiraların biyolojik özellikleri sebebi laboratuvar tanıları problemlidir. Hücre duvarı yapısı sebebi ile diğer bakterilerin gösterildiği anilin boyalarla boyanmadıkları için direkt mikroskopik inceleme leptospiraların tanısında kullanılamaz. Floresan antikor veya immunperoksidaz gibi immuno-histokimyasal boyalar veya Warthin Starry gibi gümüşleme teknikleri gibi daha komplike özel boya yöntemleri ise ancak gelişmiş ve epidemik bölgelerde hizmet verem tanı laboratuvarları için bir alternatiftir. Karanlık alan mikroskopisi, daha az komplike bir yöntem olmakla beraber, duyarlılığı ve özgüllüğünün düşük oluşu, sonuçlarının tecrübeli personele rağmen yoruma açık olması, pozitif sonuç için örnekte en az 10^4 leptospira /ml spiroket olması zorunluluğu sebebi ile direkt mikroskopi tanı için yeterli bir alternatif olarak kabul edilemez. Leptospiraların diğer bakteriler gibi nutrisyonel besiyerlerinde üretilmemeleri, leptospireminin hastalığın semptomlarının ortaya çıkışından sonra kısa süre görülüyor olması, kan, vücut sıvıları ve BOS'un ilk hafta içerisinde alınmasını zorunlu kılar. İdrar örneği ikinci haftada alınabilir ancak duyarlılığı son derece düşüktür. Birkaç damla kan örneğinin 5-flourourasil ihtiva eden 10 ml semisolid besiyerlerine inoklasyonu veya radiometrik bazlı kültür sistemlerinin kullanılması halinde izolasyon mümkün gibi görünsede negatif sonuçların 13 hafta bekletilmesi, yani sonuçların geç elde edilmesi ve sistem kurulumunun pahalı olması sporadik vaka görülen bölgeler için bu metodları da tanıda alternatif olmaktan çıkartmaktadır. Diğer taraftan klinik materyalde leptospira antijenlerinin gösterildiği Radioimmunassay (RIA) ve Enzim-Linked Immunosorbent

Assay (ELISA) testlerinin güvenilir özgüllükte sonuçlar üretmelerine karşılık duyarlılıklarının 10^4 - 10^5 leptospira/ml olması antijen arayan testlerin duyarlılığının düşük olmasına yol açmaktadır. Son yıllarda geliştirilen immunomagnetic assay ile duyarlılık 10^2 leptospira/ml kadar düşürülmüştür. Ancak bu testlerde gelişmiş laboratuvarlarda pahalı ekipmanları gerektiren pahalı testler olmaları sebebi ile rutin tanıda alternatif olarak kabul edilememektedir. Micro-kapsül agglutination test (MCAT), mikroskopik ağıltınasyon testi (MAT), LEPTO Dipstick, Makroskopik lam agglutination test (Macroscopic SAT), LEPTO Lateral flow, Indirekt hemaglutinasyon testi (IHA) ve LEPTO Dri Dot test ve dot-ELISA gibi hastalığın akut döneminde ortaya çıkan IgM türü cevabı ölçen hızlı testlerin yanı sıra Kompleman birleşmesi reaksiyonu (KBR) gibi epidemiyolojik amaçlı sonuçlar üreten antikor bazlı serolojik testler tanı amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin duyarlılıkları ve özgüllükler düşüktür. Mikrobiyolojik tanıda yaşanan bu yetersizlikler, sıklıkla hastaların tanı almadan non-spesifik tedavi edilmelerine yol açmaktadır. Bu sebeple tanıda, daha güvenilir, daha özgül, sahada uygulanabilir ve ucuz yöntemlerin yaratılması çabalarını artırmıştır. Bu bağlamda birçok viral ve bakteriyel enfeksiyonun tanısında başarı ile uygulanan moleküler tanı yöntemlerinin çeşitli modifikasyonları leptospiralar için de denenmiştir. Mesela klinik örneklerde leptospira DNA segmentleri için geliştirilen ^{32}P proplarının kullanıldığı dot-blotting ve in-situ hibridizasyon yöntemlerinin duyarlılıklarının 10^2 leptospira/ml olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan kültür kadar özgül ama kültürden daha duyarlı sonuçların birkaç saat içerisinde elde edildiği, leptospiraların konservatif gen bölgelerindeki spesifik dizileri hedef alan in house spesifik primer-PCR, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting, arbitrarily primed PCR (APPCR), tek nokta nükleotid polimorfik DNA-PCR, repetitive extragenic PCR (REP-PCR) ve FAFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism) gibi PCR bazlı çok sayıda test geliştirilmiştir.

Bu çalışmada leprospirozlu hastalarda klinik tanıyı destekleyecek ve tedaviyi yönlendirecek güvenilir bir metod olarak; ompL1-PCR ile LipL32-PCR yöntemlerinin uygulanabilirlik ve kabul edilebilirliklerinin tespiti amaçlanmıştır. Çalışmanın bir diğer amacı da 16SrRNA PCR-RFLP ile *L.interrogans* türü içerisinde tip tayini yaparak, bölgede egemen suşların, tip düzeyinde tanımlanmalarını sağlamak, bölgenin epidemiyolojik haritasını çıkartmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Renal yetmezlikle beraber görülen ikterik leptospiroz olgusu ilk kez *A.Weil* (1886) tarafından *Weil Sendromu* olarak tanımlanmıştır¹. Ancak klinik materyallerde leptospiralar gösterilememiştir. Benzer klinik materyalden hazırlanan preparatlarda karanlık alan mikroskopisinde Leptospiraları gösteren *Stimson* (1907) bu spirallere *Spirochaeta interrogans* adını vermiştir².

Patojenik leptospiraların kültürü ilk olarak Almanya'da *Uhlenhuth* ve *Fromme* (1916) tarafından yapılmıştır³. *Noguchi* (1918) leptospiralarla ilgili mikroskopik ve kültür çalışmalarını son derece detaylı bir şekilde yayınlamış ve leptospiraların diğer spiroketlerden farklı, ince spiralli yeni bir tür olması gerekliliğini savunmuştur⁴. Bu yayından sonra tüm dünyada leptospiralarla ilgili çalışmalar hızla artmış ve bu çalışmalarda çok sayıda yeni tür/serotip ve vektör/rezervuar hayvan tespit edilmiştir^{5,6}. Elektromikroskopi çalışmaları ile leptospiraların morfolojik özellikleri detaylı olarak incelenebilmiştir.

Türkiye'de leptospiroz ile ilgili ilk makale Reşat Rıza Bey (1915) tarafından yayınlanmış, ilk hayvan deneyleri ise Hüsameddin Şerif Bey (1922) tarafından yapılmıştır⁷. Daha sonra Plevnelioğlu II. Dünya Savaşı sırasında (1947) Batı Trakya'da askerler arasında iki leptospiroz vakasını kesin olarak ispatlamıştır⁸.

2.2 Taksonomi ve Sınıflandırma:

Leptospiralar; *Spirochaetales* takımında, *Leptospiraceae* ailesinde, *Leptospira* cinsinde yer alırlar. Cins içerisinde 1967'ye kadar çok sayıda tür yerleştirilmekle beraber, nükleik asit düzeyindeki çalışmalar leptospiraların diğer bakteriler gibi cins ve türlere ayıramayacağını göstermiştir. Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) *Leptospira* alt komitesi leptospiraları, hastalığın epidemiyolojisine de ışık tutmak üzere yüzey antijenik yapılarını dikkate alarak insan ve hayvanlar için patojen türleri içeren 300 den fazla serotipten oluşan *Leptospira interrogans sensu lato* grubu ve çevresel saprofitik türleri içeren 45 kadar sero tipi olan *Leptospira biflexa sensu lato* grubu olmak üzere iki ana grupta toplamıştır. Bu iki ana grup, farklı sayıda serotip içeren sero gruplara ayrılır.

Coğrafi bölgelerin iklim şartları, toprağının yapısı ve infeksiyon kaynağı olan hayvan türlerinin farklılıkları nedeni ile *Leptospira* suşları arasında bölgeler, ülkeler ve kıtalar arası farklılıklar bildirilmiştir. Ancak deniz taşımacılığı ile kemiricilerin kıtalar arası taşınmaları suşların coğrafi sınırlarını ortadan kaldırmıştır.

Tablo 1. *L. interrogans sensu lato* Serogrubuna ait bazı serovarlar⁹

Serogroup	Serovarlar (Serotipler)
<i>İcterohaemorrhagiae</i>	<i>Icterohaemorrhagiae, copenhagen, zimbabwe</i>
<i>Hebdomadis</i>	<i>hebdomadis, jules, kremastos</i>
<i>Autumnalis</i>	<i>autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>pyrogenes</i>
<i>Bataviae</i>	<i>bataviae</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>grippotyphosa, canalzonae, ratnapura</i>
<i>Canicola</i>	<i>canicola</i>
<i>Australis</i>	<i>australis, bratislava, lora</i>
<i>Pomona</i>	<i>pomona</i>
<i>Javanica</i>	<i>javanica</i>
<i>Sejroe</i>	<i>sejroe, saxkoebing, hardjo</i>
<i>Panama</i>	<i>panama, mangus</i>
<i>Cynopteri</i>	<i>cynopteri</i>
<i>Djasiman</i>	<i>djasiman</i>
<i>Sarmin</i>	<i>sarmin</i>
<i>Mini</i>	<i>mini, georgia</i>
<i>Tarassovi</i>	<i>tarassovi</i>
<i>Ballum</i>	<i>ballum, aroborea</i>

Son yıllarda DNA-DNA hibridizasyon temeline dayalı olarak yapılan genetik sınıflandırmada ise *leptospira* genom dizilimine göre 16 genom türe ayırır.

Tablo 2. Leptospiralarda Genomo-türlere göre serogrupların dağılımı⁹⁰

Genomo-türler	Sero-gruplar
<i>L. interrogans</i>	<i>Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri</i>
<i>L. meyeri</i>	<i>Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica</i>
<i>L. fainei</i>	<i>Hurstbridge</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae, Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Sejroe Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao,</i>
<i>L. weilii</i>	<i>Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica</i>
<i>L. inadai</i>	<i>Turneria</i>
<i>L. parvac</i>	<i>Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini</i>
<i>L. alexanderi</i>	<i>Codice</i>
<i>L. wolbachii</i>	<i>Semarang, Andamana</i>

Genom sınıflandırma yöntemi genel olarak antijenik sınıflandırma ile uyum gösterse de birkaç serovar genom sınıflandırma ile farklı grupta bulunmuştur. Bununla birlikte Brenner ve Feresu bazı serovارların birden çok tür ile genomik olarak benzerlik gösterdiklerini tespit etmişlerdir.

Tablo 3. Birden fazla tür içinde sınıflanmış olan serovارlar⁹⁰.

Serovar	Türler
<i>Bataviae</i>	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
<i>Bulgarica</i>	<i>L.interrogans</i> , <i>L. kirschneri</i>
<i>Grippotyphosa</i>	<i>L. kirschneri</i> , <i>L.interrogans</i>
<i>Hardjo</i>	<i>L.borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> , <i>L.meyeri</i>
<i>İcterohaemorrhagiae</i>	<i>L. İnterrogans</i> , <i>L.inadai</i>
<i>Kremastos</i>	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i>
<i>Mwogolo</i>	<i>L. kirschneri</i> , <i>L.interrogans</i>
<i>Paidjan</i>	<i>L. kirschneri</i> , <i>L.interrogans</i>
<i>Pomona</i>	<i>L. İnterrogans</i> , <i>L.noguchii</i>
<i>Pyrogenes</i>	<i>L. interrogans</i> , <i>L. Santarosai</i>
<i>Szwajizak</i>	<i>L. interrogans</i> , <i>L. Santarosai</i>
<i>Valbuzzi</i>	<i>L.interrogans</i> , <i>L. Kirschneri</i>

2.3. Leptospiraların Ekolojik özellikleri.

Leptospiralar kutuplarda dahil bütün coğrafi bölgelerde gösterilmişlerdir. Tabiatı vektör ve rezervuarları yabani kemiricilerdir. Ancak bu hayvanların idrarları ile kontamine olmuş tatlı su kaynakları, toprak, çamur birikintileri, sebze ve meyvelerde leptospiralar için hem kaynak hemde taşıyıcı görevi üstlenirler.

2.3.1 Doğal Vektör ve Rezervuarlar

Her leptospira serotipinin belirli bir taşıyıcısı olduğu düşünülmüştür. Mesela; serovar copenhageni fare ile, serovar canicola köpek ile, serovar hardjo sığırla bir anılmıştır. Ancak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, bir vektörün birden fazla

serotipe ev sahipliği yapabileceği gibi bir serotipin birden fazla vektörünün de olabileceği gösterilmiş, konak seçiciliğinin çok kesin bir kuralı olmadığı anlaşılmıştır. Kronik leptospirosis gelişen hayvanlar hastalık süresince hiçbir semptom vermeksizin idrarları ile mikroorganizmayı yayarlar.

Tablo 4. Hayvan türlerine göre ilişkilendirilmiş serovarlar¹².

Rezervuar taşıyıcı	Serovar
Domuz	<i>pomona, tarassovi</i>
Sığır	<i>hardjo, pomona</i>
At	<i>bratislava</i>
Köpek	<i>canicola</i>
Koyun	<i>hardjo</i>
Rakun	<i>grippotyphosa</i>
Rat	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
Fare	<i>ballum, arborea, bim</i>
Keseliler	<i>grippotyphosa</i>
Yarasa	<i>cynopteri, wolffi</i>

2.3.2. Doğal Ekolojik Ortamda Leptospira Yayılımı :

Enfekte hayvanların idrarları ile kirlenmiş tatlı su kaynakları başta olmak üzere bütün doğal çevre leptospiralar için hayat alanıdır. Leptospiralar, özellikle güneş ışığından uzak ıslak veya nemli alanlarda, enfekte idrar ile kontamine olmuş pH'sı 6.7-7.4 olan tatlı su birikintileri ve çamur içerisinde 11 gün kadar, tuz konsantrasyonu % 3.78 ila 3.85, pH'sı da 6,5-6,8 olan deniz sularında ise çok kısa süre canlılıklarını sürdürebilirler.

L. australis A serotipinin pH 'sı 6,1-6,2 olan toprakta enfektif gücünü 32-45 gün, *L. pomona*'nın da nemliliği %15,2-31,4 ve pH'sı 6,7-7,2 olan toprakta canlılığını 74 gün kadar koruyabildiği gösterilmiştir^{13,14}. Non-patojen leptospiralar ve acı ve tuzlu sulardan izole olan halofilik suşlar da, durgun sular, yeraltı suları, toprak ve çamurdan izole edilebilir. Çeltik tarlaları, baraj suları ve göletler de doğadaki devamlılığını koruması

için önemlidir. *L. australis* A serotipinin bir çeltik tarlasında, pH 7,0-7,8 de ve 1-30°C arasındaki ısıda 7-14 gün canlı kaldığı gösterilmiştir. Isının 42°C 'ye çıkması halinde ise mikroorganizmaların 3 saat içerisinde öldüğü görülmüştür¹⁵.

2.3.3.Coğrafi ve İklimsel Faktörler :

Leptospiraların taşıyıcı olmadan vücut dışı ortamda varlıklarını sürdürebilmeleri özellikle ortamın nem ve asiditesine bağlıdır. Çevrenin nemlilik oranını ve ne süre ile nemli kalacağını ortamdaki; yağış, toprak kalitesi ve dip suyu, gibi jeolojik faktörler ile yüzeyin eğimi, ağaçlandırma ve bitki örtüsü ile sıcaklık belirler. Bu faktörler sadece leptospiroz bulaş faktörlerini ve doğal ortamdaki canlılık süresini belirlemekle kalmaz aynı zamanda insanların sosyal ve kültürel yaşantısını, muhtemel vektörlerin görülme sıklığı ve tür dağılımı gibi ekolojik özelliklerini de etkiler. Bu nedenle leptospiraların toprakta ve suda bulunma yoğunluklarını ve popülasyonlarını etkileyen en önemli etmenler coğrafik ve iklimsel faktörlerdir.

2.4. Leptospiraların Morfolojik Özellikleri

Leptospiralar 0.1 x 6-20 µm boyutlarında, sıkı spiralli, uçları çengel şeklinde kıvrık görünümde, iki uçtan çıkan birer adet endoflagellaları yardımı ile oldukça hareketli, oksidaz pozitif, zorunlu aerobik, gram negatif, sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir¹⁶. Por büyüklüğü 0.45µm olan filtre kağıdından geçebilirler. Leptospiralarda anatomik oluşumlar üç temel başlık altında değerlendirilebilir. Bunlar; 1-organizmayı kuşatan membran kompleksi veya örtü, 2-homojen hareket organı olan aksial filament veya endoflagella veya periplazmik flagella ve 3-spiral şeklindeki protoplazmik silindir ve içyapı elemanlarıdır. Leptospiralar çift membran yapısına sahip bakterilerdir. Sitoplazmik membran ile peptidoglikan bir biri ile yapışık denecek kadar iç içedir ve bu membran kompleksi bir dış membran veya dış zarf olarak tanımlanan kılıf tarafından sarılır. Flagella membran kompleksi ile dış membran arasında yer alır. Dış membran yapısında yer alan lipopolisakkarit (LPS)'de leptospiralara hücre duvarı antijenik özelliği kazandırır. Bu yapısal olarak gram negatif mikroorganizmaların LPS'sine benzer. Ancak spirallerin sık ve ince oluşu gram boyama ile morfolojik özelliklerin gösterilmesini güçleştirir. Bu sebeple görüntüleme, ya metal artefaktın hücre duvarında prespitasyonu esasına dayalı gümüşleme yöntemiyle veya

immunoperoksidaz ya da immunofluoresan gibi immuno-histokimyasal yöntemlerden birisi ile hazırlanmış preparatlarla yapılabilir. Protoplazmik silindirin ince kesitlerinde tubüler yapıya sahip olduğu, osmofilik granüller içerdiği ve granüler tarzda çıkıntılarının olduğu tespit edilmiştir. Protoplazmik silindiri saran ve distile su veya serum fizyolojikle yıkama ile kolaylıkla uzaklaştırılabilen soğan şeklindeki kabarık non-granüler örtü mevcuttur¹⁷.

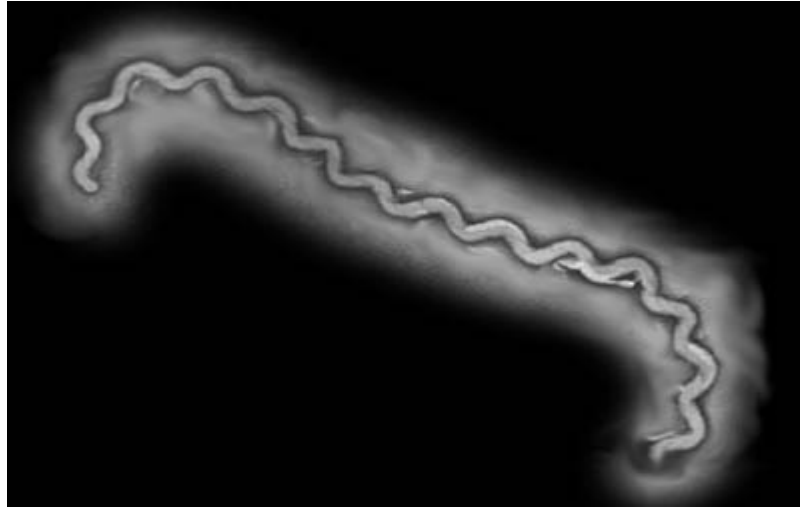
2.4.1. Hücre Duvarı

Bu yapı 3-5 tabakalı dış zarf (OE) ve çift membran yapısı özelliği gösteren peptidoglikan-stoplazmik membran kompleksinden oluşur. Leptospiralarda stoplazmik membran ve peptidoglikan yapı birbiri ile yakın ilişkilidir ve membran geçişini sağlayan porinleri bulunduran OE ile çevrilidir. OE'nin yapısını; somatik LPS yapı, LipL32, LipL21 ve LipL41 gibi lipoproteinler ve OmpL1 gibi integral membran proteinlerinden oluşan porin proteinlerinin oluşturduğu patogeneze de önemli rol oynayan dış membran proteinleri (OMPs), glikokaliks proteinler ve fosfolipitler gibi birçok protein kompleksi oluşturur. Hücre yüzeyinde yer alan proteinler lokasyonlarının gereği olarak konak ile leptospira arasındaki ilişkinin düzenlenmesinde, hücre dışı matrikse adezyon, kolonizasyon, immunsistemin uyarılması ve immun sistemden kaçış gibi önemli roller üstlenirler. Besiyerinde üreyen leptospira kültürlerinde, proteinler her zaman adheziv karakter gösterirler. Protein miktarı ancak santrifüj yıkama ile belirlenebilir seviyelere düşebilir; ancak gerçekte herhangi bir yıkama adherent materyal ile birlikte OE'yi de kaldırır¹⁸.

Bu güne kadar yapılan çalışmalarda Lsa24/Len ailesi proteinler, LigA/LigB, Lsa21, LipL32, TlyC, Lp30, Lp95, Lsa63, OmpL37, LIC10258, LIC11834, LIC12238, LIC12253, LIC12880 ve LIC12895 genlerinde kodlanan hücre dışı matrikse bağlanan yüzey proteinleri genom düzeyinde tanımlanmıştır. Leptospiral surface-adhesin olarak adlandırılan Lsa63 laminin ve kollajen IV'e bağlanırken LIC12238, LIC12880 geninde kodlanan Lp30 ve LIC10258 geninde kodlanan yüzey proteinleri plazminojene, LipL32; kollajenI, kollajenV, laminin, kollajenIV ve plazma fibronektinine bağlanır. LIC11834 ve LIC12253 genleri tarafından kodlanan Lsa33, Lsa25, LIC12895 geninde kodlanan Lsa27 proteinlerinde laminine ve plazminojene bağlandığı gösterilmiştir.

Son çalışmalarda bu dış membran proteinlerinin dışında membranla ilişkili olup fonksiyonları tam olarak aydınlatılamamış olan OmpL36, OmpL37, OmpL47 ve OmpL54 ile duyarlı hücreye saldırı ve invazyonla ilişkili yeni bir ompA benzeri protein, Lsa66, varlığı da tespit edilmiştir^{19,20}.

LPS leptospiraların major yüzey antijenidir ve yapısındaki varyasyonlar 250 den fazla olan serovarların ayırımında kullanılır²¹.



şekil.1. Leptospiranın elektron mikroskopunda görüntüsü

Düşük konsantrasyondaki ethanol, deterjanlar ya da tripsin gibi proteazlar OE'ı hızlıca denatüre eder ve sarmal yapı kademeli olarak açılır. OE'ın yıkımı ile bazı antijenik yapıları ve muramik asiti içeren içi boş bir tp yapı ortaya çıkar. Bu aşamada fibriller spiral yapıya sarılmış halde görülebilir. Peptidoglikan, fagositoz mekanizmasının uyarılmasında ve monositlerden TNF-alfa sitokini salınmasında rol oynar²².

Leptospira peptidoglikanı, endotel hücrelere yapışmaya neden olduğundan polimorfonükleer lökositler için sitotoksiktir²³. Hücresel yapışmada endotelial hücre bağımlı stimlasyon, leptospiroz patolojisinde önemli rol oynar.

Leptospiraların hücre membranında oransal olarak yüksek total lipit miktarı ve farklı yağ asitleri bulunur²⁴. Total lipitin %14-26 'sı olan kuru ağırlığının %50-70 kadarı fosfolipitlerden oluřur²⁵.

2.4.2. Protoplazmik Silindir.

Protoplazmik silindir içerisinde, pasif hareketli stoplazma, nükleer materyal, ribozom, fibriler materyal ve mezozom ile bazen elektron-yoğun yuvarlak enerji granülleri olduğu tahmin edilen inklüzyonlar görülür. Halofilik leptospiralar içerisinde çok fazla sayıda sodyum klorid içeren inklüzyon cisimcikleri bulunur.

2.4.3. Flagella

Leptospiralarda her iki uçtan başlayan ve peptidoglikan kompleksden köken alan FlaA ve FlaB proteinlerinden oluşan 2 tane periplazmik flagella görülür. *L.biflexa* flaB mutant suşlarda flagella olmamasına rağmen spiral yapı korunur. Bu, borellia'lardan farklı olarak, leptospiralarda flagellanın spiral yapının oluşması veya korunması için değil sadece hareket için gerekli olduğunu gösterir²⁶. Nitekim leptospiralar özellikle sıvı fazda flagelları ile son derece hızlı yüzerler. Hareket de leptospiralar için önemli bir virulans faktörüdür. Bu organizma sıvı fazın yanı sıra bağ-doku gibi jel benzeri yarı katı matriksde de yüzme hareketi yapabilir. Hareket, deterjanlar ve etanol gibi hücre yüzeyini bozan ajanlar, fiksatifler, halojen iyonlar, lipazlar, pH 6.4 dan düşük asidik pH ve pH 9.8 üstü alkali ortamlarda bozulur.

Leptospiralar bölündüklerinde yeni oluşan hücre kendisine hemen yeni bir kamçı daha geliştirir. Yapısal olarak flagella diğer gram negatif bakteri flagellaları ile benzer yapı gösterir. Bakteri proksimal ucunda, hücre duvarı tabakaları arasına giren disklerin kasılması sonucu, kanca yapı oluşturur²⁷. Karanlık alan mikroskopisinde çok net olarak izlenilebilen hareketlilik, spiroketin periplazmik zarfı içerisindeki uç kısımlardan başlayan ve ortasında sonlanan aksial filamentinin kasılıp gevşeyerek oluşturduğu hareket, uzun eksen etrafında dönme sonucu oluşan hareket ve kayma hareketi ile 3 şekilde oluşur. Aksiyal filamentin kasılması sonucu bakterinin ucu Türk hançeri olarak da tanımlanan, etek askısı şeklinde içe doğru kıvrık kanca görünümünü alır. Hareketli leptospiralar karanlık alan mikroskopisinde, kancalı uç sebebi ile C, S, L, T harflerine, sperme ve 8 rakamına benzer görüntüler izlenebilir. Besiyerinde pasajlama sayısı arttıkça kıvrık uçlu görüntü azalır.

2.5. Hücre Bölünmesi

Leptospiralar sıvı besi yerinde, orta eksen boyunca ortadan ikiye bölünerek çoğalırlar. Leptospiral hücre uzamada maksimum boya ulaştığı zaman, protoplazmik slindirdeki bölünmeyi başlatan ve her yeni hücrenin uçlarına doğru uzanan bir yapı görülür. Genellikle bölünme tamamlanmadan önce iki leptospira bir süre bağlı kalır ve bağımsız dönüşe devam ederler. Bazen ayrılma gecikir ve birbirine bağlı 10 veya daha fazla bakteriden oluşan olağanüstü uzamış leptospira şekilleri görülebilir²⁸.

Kesin olmamakla birlikte, yeni oluşan hücrenin sonuna doğru, yeni bir kamçı motor elemanı oluşturulur veya bölünme tamamlanmadan önce yeni hücrenin motor elemanı organize edilir. Bu kökten sentezlenen yeni kamçı orijinal uzunluğuna ulaşana kadar leptospiranın merkezine doğru büyür. Leptospiraların hücre bölünme olayının düzenleme ve entegrasyon hakkında kesin olarak bilinen çok az şey vardır²⁸.

2.6. Genetik Kompozisyon

L. interrogans türlerinde birisi 4.332.241 baz çifti (bp) (CI) büyük, diğeri de 358.943 bp (CII), büyüklüğünde küçük olmak üzere toplam 4,691,184 bp uzunluğunda iki sirküler DNA'dan oluşur. Diğer spiroketlerle kıyaslandığında, 1.138.006 bp olan *T. pallidum* ve 1.519.857 bp büyüklüğünde olan *B.burgdorferi* genomundan, oldukça büyüktür bir yapıdır. Leptospiralarda G+C oranı % 35-40 oranında olup bu oran *L.interrogans* için ortalama %36 'dır. Bu gruba ait türlerde genomun % 78.40 (%73-77)'ı açık okuma bölgeleri (ORF) olup yaklaşık olarak 4727 'si fonksiyonel proteinler olmak üzere 4768 kadar proteini kodlanır. *L.patoc* suşunda ORF oranı %92.5 olup yaklaşık olarak 3560 protein kodlanır. *L.interrogans* türlerindeki ORF dizilerinden, 37'si tRNA, 4 tanesi de rRNA alt ünitelerinin kodlamak üzere, toplam 41'i yapısal proteinler ile ilgili genlerdir. Fonksiyonel genlerden 4360 'ı CI üzerinde kodlanırken 367'si CII den kodlanır. Yapısal 41 genin yani, rRNA and tRNA genlerinin tamamı CI sarmalında kodlanır. *L.interrogans* genomunda yapısal ve fonksiyonel genler dışında *IS1500*, *IS1501*, *IS1533* ve *ISLin1* ailesi mensubu gibi insersiyon segmenlerinden oluşan toplam 30-41 kadar tekrarlayan kısa dizi yer' alır^{29,30,31,32}.

L.biflexa ve *L.interrogans* türlerinin tamamı, birbiri ile büyük ölçüde benzerlik gösteren iki ribozomal 23S rRNA içerir. *L.interrogans* sv *Canicola*' da, her biri diğeri RNA geninden uzak yerleşik olarak ikişer adet 23SrRNA ve 16SrRNA genleri

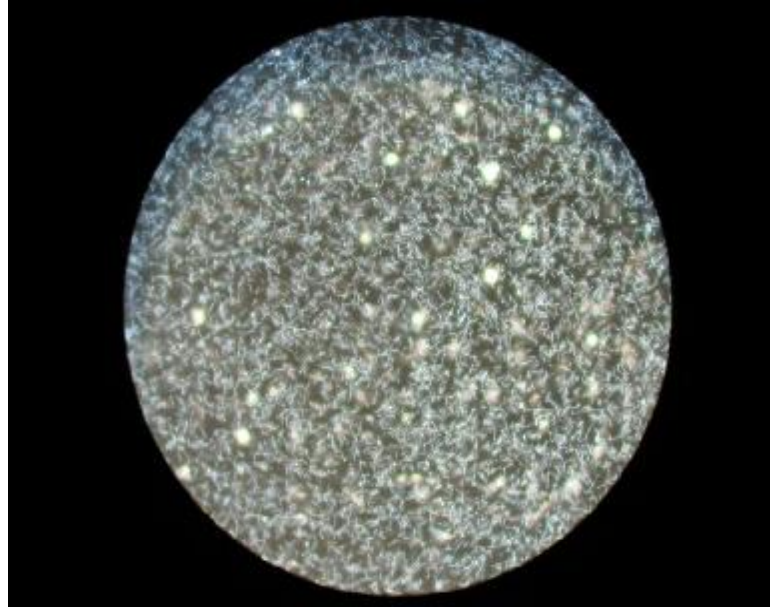
bulunurken, genomda sadece bir tane 5SrRNA geni kodlayan bölge bulunur³³. Bütün öbakterlerde olduğu gibi bu gen bölgesi atasal suşdakine benzer şekilde iyi korunmuş olup türler arasında benzerlik gösterir.

2.7. Fizyolojik özellikler, Metabolizma ve Kültür karakterleri

Leptospiralar kemo-heterotropik zorunlu aerob bakterilerdir. Karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanamazlar. Nitrojen kaynağı olarak amonyağı, enerji metabolizmalarında, beta oksidasyon yolağında, karbon kaynağı olarak da uzun zincirli yağ asitlerini kullanırlar. Leptospiralar hücre yapılarındaki yağ asitlerini sentezleyemediğinden üreme ortamlarında yağ asitlerinin mutlaka olması gerekir. Ancak yağ asitlerinin toksik yapısından dolayı üreme ortamlarına; %10 tavşan serumu ya da %1 sığır serum, B1 ve B12 vitaminleri ve oleic asit ve polysorbat ile diğer uzun zincirli yağ asitlerinin yanı sıra albümin de ilave edilmelidir. Leptospiralar diğer bakterilerden farklı olarak yağları, palmitovasenik, linoleik ve oleik asitler gibi glikoprotein fraksiyonları içerisinde bazı lipidleride hidrosilaurik, palmitik ve oleik asitler gibi LPS ve lipopolisakkarit benzeri yapılar içerisinde uzun zincirli yağ asitleri olarak depolarlar. Leptospiralarda LPS'nin yapısı da alışılmışın dışındaki özel metillenmiş fosfat grupları içeren yağ asitleri kompozisyonu sebebi ile diğer gram negatif bakterilerden kesinlikle farklılık gösterir. Lipit A yapı ve fonksiyonel özellikleri ile diğer bakterilerden farklıdır.

Leptospiraların optimal üreme ısısı 28-30 °C derece ve optimal pH değeri de 6.8-7.4 arasındadır. Diğer bakterilerin aksine, Leptospiralar nükleik asit yapımında pirimidin bazının dış kaynaklarını kullanmazlar. Bu sebeple leptospiralar, pirimidin analog 5-fluorourasil de etkili antibakteriyal etkinliklere dirençlidirler. Bu nedenle leptospiraların ızalasyonunda, kontaminasyonun engellenmesinde neomisin sülfat, polimiksin B, rifampisin ve vankomisin gibi, bu tür seçici antibiyotikler kullanılabilir. Genellikle besi yeri olarak %1 lik sığır serum albümini ve Tween 80 içeren Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) besi yeri kullanılır. Yine, serum içeren Korthof ve Fletcher gibi sıvı veya yarı sıvı besi yerleri kullanılabilir. Kültürler ekimden 3-4 gün sonra kontaminasyon varlığı açısından kontrol edilmelidir. İlk izolasyonda, kültürler 4-5 hafta inkubasyonda tutulmalıdır. Bu süreden sonra organizmaların canlılıklarının korunması için 21 günde bir pasajlanması gereklidir.

Patojenik ve saprofitik leptospiralar, morfolojik ve kültür özellikleri bakımından benzerlik gösterir. Saprofit leptospiraları patojen formdan ayıran en açık özellik, 13 °C derece ve 8-azaguanin (225 µg/ml) varlığında üreyebilmeleridir. Ayrıca 1M NaCl içinde hücre yapılarını koruyamaz ve dormant (küresel hücre) forma dönerler.



Şekil 2. Leptospiraların karanlık saha mikroskopisinde 200' lük büyütmede görünümü

2.8. Antijenik özellikler

Leptospiraların hücre duvarında bakterisidal antikorların hedefi olan başta LPS olmak üzere dış membran proteinleri, lipoproteinler, integral membran proteinleri ve glikoproteinlerden oluşan çok sayıda antijenik molekül yer alır.

2.8.1. Protein Antijenler

Leptospiraların hücre yüzeyinde konak hücreye bağlanmadan sorumlu ve enfeksiyon süresince immunc cevabı uyara bilecek çok sayıda dış membran proteini (OMPs) yer alır. Patojenik suşların genom dizi analizleri sonucu in-silico yöntemi ile 200 den fazla dış membran proteininin varlığı tespit edilmiştir. Bu proteinlerden çoğunun, yapısal, fonksiyonel, antijenik ve genomik özellikleri detaylı olarak çalışılmıştır. Total genom çalışmalarında *L.interrogans* türlerinde 6 sı hem dış ve hem iç membranda yerleşik integral proteinler olmak üzere toplam 12 membran proteinini

kodlayan gen bölgesi tanımlanmıştır. *Leptospira* genusu içerisinde yer alan 300'e yakın serotipin antijenik farklılaşmasında, LPS'nin yanı sıra dış membranda yer alan bu protein ve lipoproteinlerin (OmpL) özellikle de OmpL1, LipL32 ve LipL41'in yapısal farklılıklarının rolü vardır. Lipoproteinler, amino-terminal uçlarında sistein rezidü taşıyan proteinler olup yağ asitleri tarafından dış membrana (OM) bağlanmıştır³⁴. SDS-PAGE çalışmaları patojen leptospiraların hücre duvarında yer alan en fazla eksprese edilen ve immunojen olan OMP'nin %75 oranı ile LipL32 olduğu bunu LipL36 ile yüzeyde yer alan LipL41 ve LipL21 proteinlerinin izlediği görülmüştür. Bu antijenlerin humoral immunitede major hedefler olduklarıda tespit edilmiştir.

OmpL1 geni tarafından kodlanan OmpL1 proteini, immunopresipitasyon testleri ile tanımlanan ilk leptospiral yüzey antijeni olup sadece patojen suşların yüzeyinde yer alan, 320 aminoasit rezidüden oluşan, 31 kDa ağırlığında bir integral membran proteinidir. Bir porin proteini olan OmpL1'in yapısında tahminen 10 tabakalı transmembran segmentleri yer almaktadır³⁵. Hidrofilik maddelerin periplazmik alana transferinde rol oynayan OmpL1'e karşı ortaya çıkan antikor cevabının koruyucu olduğu gösterilmiştir.

LipL32, leptospiral proteinler arasında en iyi bilinen proteindir ve insan leptosirozunda immunodominant antijendir³⁶. OmpL1 ve LipL41 gibi sadece patojen türlerde gösterilmiştir. LipL32 hem kültürde üremede hem de enfeksiyon süresince yüksek seviyelerde tespit edilebilir. Kültürde erken üreme fazında LipL36 bol miktarda görülürken, orta üreme fazında miktarında azalma görülür.

İmmunopresipitasyon yöntemi ile yapılan çalışmalar LipL41'in de OmpL1 gibi hücre duvarında yer aldığını, OmpL1 gibi patojen leptospira türlerinde iyi korunmuş membran proteinlerinden olduğu ve koruyucu immün cevabı provoke ettikleri göstermiştir. Leptospiralarda, ısı şok proteinleri (heat shock proteins-Hsp) olan GroEL (p62) ve DnaK (p76)'sınıfı şeparon proteinlerinin de dominant immuno-reactive proteinler oldukları gösterilmiş ve bu proteinlerin genom, yapı ve fonksiyonları irdelenmiştir. Leptospiralarda sayıları türler arasında değişmek üzere çok sayıda Hsp sentezledikleri tespit edilmiştir. Mesela; *L.biflexa*'da 9 farklı Hsp sentezlenirken, *L.interrogans* 'da 7 farklı Hsp sentezlenir³⁷. *GroEL* and *DnaK* proteinlerinin memeli hücrelerde kolonize suşlardaki ekspresyonu ısı artışına paralel olarak arttığı, in-vivo çalışmalarda ısının 37-42 °C'ye çıkartılması ile üretimin en yüksek düzeye ulaştığı

gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Hsp58 ve Hsp10'un 2.7 kb'lık *GroEL* operonu benzeri bir DNA fragmentinde kodlandığı, tavşanlarda yapılan immunizasyon çalışmaları sonunda Hsp58'e karşı elde edilen antikorların, çeşitli leptospira türlerine ait hücre lizatlarının SDS-PAGE ile elde edilen protein fraksiyonların ile karşılaştırıldığında yaklaşık 65 kDa'luk bir proteini tanıdığı, türler arasındaki çapraz reaksiyonun da yapılan dizi analizi sonucunda bu proteini kodlayan genlerin homolojisinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Leptospirozlu hasta serumlarında Hsp58-ELISA ile %82 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir. Diğer taraftan İmmunoblot yöntemi ile yapılan bir çalışmada akut dönemde toplanan serum örneklerinin %45'inde sadece GroEL antijeni belirlendiği, bu oranın daha yüksek immunojen olduğu düşünülen LipL32 (37%) den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak akut ve konvelesan dönemde serolojik yönden serum örneklerinin değerlendirilmesinde *GroEL*'in serokonversite oranının %16'da kalmasına karşılık LipL32 ye karşı serokonversiyonun %50'nin üzerinde olduğu gösterilmiştir. Konvelesan dönemdeki düşük serokonversiyon oranı GroEL proteinlerin diğer bakteri türlerine ait GroEL proteinlerle düşük homojenite göstermesi ve bu sebeple çapraz reaksiyonlar sonucu ortaya çıkacak cevabı etkilememesi ile izah edilmiştir. Delezyon analiz çalışmaları ile Hsp58 geni içerisindeki 360-380 aminoasitlik bir bölgenin, humoral immun cevabı provoke eden fragmenti oluşturduğu, bu aminoasit dizilerinin de humoral immun cevap için major hedef olduğu gösterilmiştir.

2.8.2. Lipopolisakkaritler (LPS)

Lipopolisakkaritler (LPS) leptospiraların hücre yüzeyinde yer alan major antijenik yapıdır. Leptospira türünde LPS' lerin yapılarında ramnoz, fruktoz, riboz, arabinoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, glukoz, galaktozamin, glukozamin, 4-0 metil mannoz, glukoz-6-fosfat ve mannoz-6-fosfat gibi özgün şekerler ve amino şekerler yer alır. Bu şekerler LPS'ye antijenik özellik kazandırır ve enfeksiyon süresinde açığa çıkan humoral ümmün cevaba sebep olur. LPS'ye karşı oluşan antikorlar opsonizan özelliğe sahip olup koruyucu immunitiyi sağlarlar. Serotipik identifikasyon LPS antijenlerindeki farklılık temel alınarak oluşturulmuştur. Ancak bazı serotipler arasında ve bazı enterobactereceae ailesi üyeleri ile çapraz reaksiyonlar görülür. Bu çapraz reaksiyonlar serotipe dayalı sınıflandırmanın zayıf tarafıdır. Tanı amaçlı olarak da kullanılan ve

LPS'yi hedef alan serolojik yöntemlerde kros-reaktif serotiplerde daha spesifik antijenik determinantlara karşı ortaya çıkan antikorların tespiti için absorpsiyon bazlı, mesela mikroskopik-agglutination test (MAT) gibi, yöntemler kullanılır. lipopolisakkaritin (LPS) kimyasal yapısını büyük ölçüde rhamnose, galactose, arabinose ve xylose gibi şeker rezidüleri oluşturur. Şekerlerin miktarı antijenik farklılığı belirlerken sınırlı sayıda şeker olması çapraz reaksiyonların sebebi olarak kabul edilebilir.

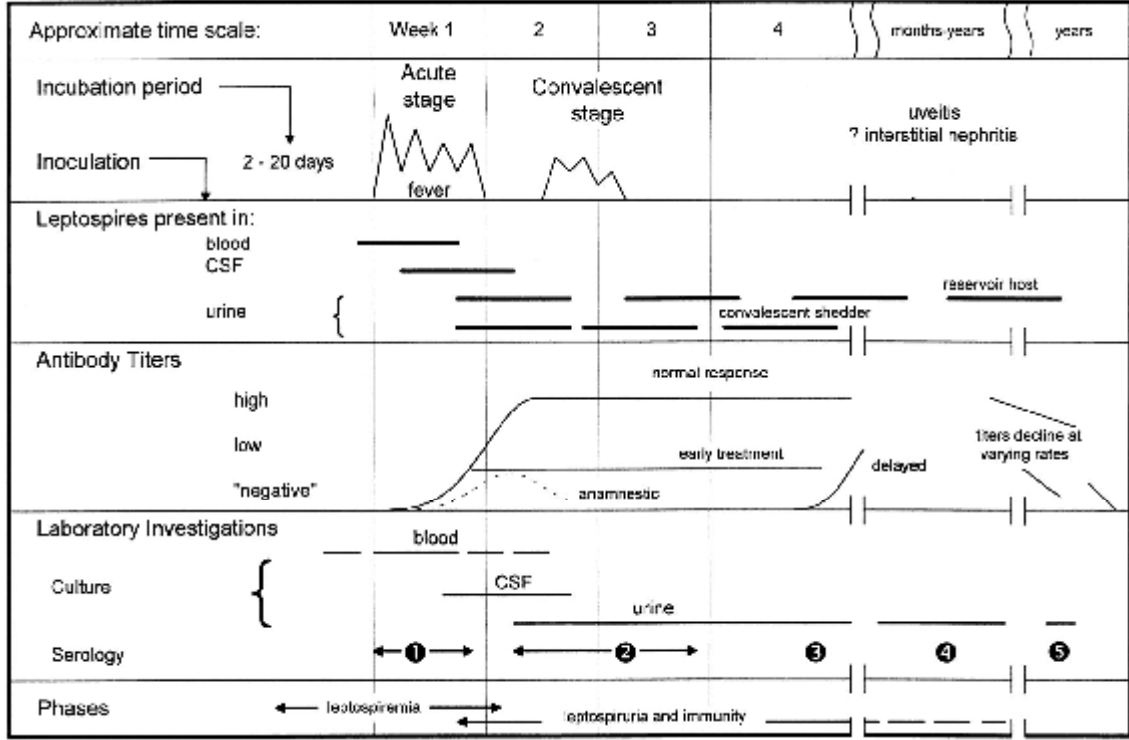
Leptospiral LPS, makrofajlarda toll-benzeri reseptör 2 (TLR2) tarafından tanınan major dış membran komponentidir³⁸. Leptospiral LPS karbonhidrat bileşenine karşı kazanılmış immün cevap, serotip-spesifik bağışıklığı sağlar.

2.9.İmmun Cevap

Leptospiralara karşı hem humoral hemde hücresel immün cevap oluşur. Ancak oluşan cevabın tamamına yakınında humoral bağışıklık ile leptospiralara karşı oluşan antikorlar rol oynar. Organizmaların vücuda girmesi B ve T-hücre bağımlı immunitiyi uyarır. İlk eliminasyon fagositler tarafından, fagositoz yolu ile yapılır. Fagosit yapan hücrelerin en büyük kısmını makrofajlar oluşturur. Leptospiralar fagosit vakuolu içerisinde birçok enzim tarafından sindirilir. Polimorfonükleer hücreler fagositoz aktivasyonunu uyarmak için opsonizing antikorlar tarafından uyarılır. Leptospiralar için oluşan hücresel yanıtın, özellikle renal lokalizasyonu önlemede önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Ölü aşı uygulaması yapılan sığırlarda in vitro CD4 + T hücreleri ve $\gamma\delta$ T hücrelerindeki artış ve antijen preparatı uygulamasından sonra interferon γ üretimindeki artışın görülmesi hücre-aracılı bağışıklığın rolünü göstermektedir³⁹.

Enfeksiyonunun ilk 2 ayında hasta serumunda yüksek düzeyde IgM türü antikorlar gözlemlenebilir. Bu süre içerisinde IgG türü antikorlar açığa çıkar ve hızla titresini artırır. IgG türü antikorlar IgM türü antikora göre daha uzun süreli ancak değişken ve belirli dönemlerde tespit edilemeyen bir immün cevap oluşur. Ayrıca, hastalığın 5. günde IgA türü antikorları tespit edebilir ve 9 aya kadar devamlılığını sürdürebilir. Bu yönleri ile IgG antikorlarına göre seroepidemiolojik çalışmalarda daha faydalı bir marker oldukları düşünülür. Tür-spesifik antikorlar genellikle ilk ortaya çıkar ancak daha hızlı düşer. Fakat serotip-spesifik antikorlar geç görünür ve daha uzun süre ölçülebilir seviyelerde kalır. Enfeksiyonun iyileşme döneminde litik ve opsonik

antikorların varlığı ve ayrıca kan ve dokularda fagositik aktivitenin devamlılığı görülebilir⁴⁴.



Şekil 3. Leptospiraların vücutta oluşturduğu immun cevap⁹⁰.

2.10. İnsanda Hastalığın Klinik Özellikleri

Leptospiroz semptomları hastalar arasında farklılık gösterir ve klinik tablo basit gripal bir enfeksiyondan ciddi multiorgan tutulumlu hastalığa kadar oldukça geniş bir spektrum sergileyebilir. Klinik olarak bifazik bir tablo ile seyreden leptospirosis de vakaların % 85-90'ında kendiliğinden düzelen anikterik dönemi, yine vakaların % 10-15'inde, multiorgan tutulumunun görüldüğü klasik ikterik Weil sendromu tablosu izler⁴⁰.

Leptospirosis için kuluçka süresi 2 ila 20 gün arasında değişmekle beraber genellikle 7 ila 12 gündür. Kuluçka süresi serotipleri arasında anlamlı derecede farklılık göstermez ve prognostik önem taşımaz. İnkübasyon periyodu vücuda ve dolaşıma giren organizma sayısı ile bağlantılıdır⁴¹. İkterik dönemde leptospiremiye BOS tutulumu ve retikuloendotelial sistem tutulumu eşlik eder. Bu dönemde klinik tabloyu, pseudo-

menenjizm, hepatomegali ye bağlı ikter ve med  lladaki damar endotelindeki hasara bağlı sekonder olarak ge i en hemat  ri şekillendirir.

2.10.1. Anikterik Leptospiroz

 nk basyon döneminin sonunda, aniden     me, titreme ile 39-40 C'ye kadar yükselen ateş, halsizlik, şiddetli ba  ağrısı ve kas ağrıları ile influenza benzeri klinik tablo oluşur. Baş ağrısı frontal veya temporal bölgeye lokalize olup analjeziklerle kontrol altına alınamayabilir. Özellikle sırt, karın ve baldır kaslarını tutan myalji, leptospira enfeksiyonunun önemli bir özelliğidir. Öyle ki bu kasların üzerindeki deriye hafifçe basmakla bile hasta şiddetli ağrı duyar. Hastalarda genellikle bulantı, kusma vardır. İlave olarak ishal veya kabızlık da olabilir. Birçok olguda öksürük, göğüs ağrısı, daha az hastada ise hemoptizi akciğer tutulu- munun bulguları olarak görülebilir. Fizik muayenede en sık saptanan bulgu ate tir. Ayrıca konjunktivada hiperemi, hepatomegali, splenomegali, yaygın batın hassasiyeti, sarılık, döküntü olabilir. Akut dönemde kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve dokulardan leptospira izole edilebilir. BOS'ta mikroorganizma saptanabildiği halde menenjit bulguları ön planda değildir. Bu akut dönem 3-7 gün kadar sürdükten sonra kendiliğinden geçer. Bakterinin lipopolisakkaridlerine karşı ge i en IgM grubu antikorlar enfeksiyonu sınırlar. Bunu izleyen 1-3 günlük asemptomatik dönemden sonra hastalık tekrarlar. Hastalığın bu ikinci dönemine immün faz adı verilmektedir. Bu dönemde hastada özgül antikorlar olu mu , leptospiralar BOS ve kandan kaybolmuştur. Ancak idrarda mikroorganizma saptanabilmektedir. Imm n fazda ateş daha azdır. Şiddetli ba  ağrısı devam eder, sıklıkla ge i en aseptik menenjit ile ilgilidir.

Olguların yaklaşık %80'inde semptomlu veya semptomsuz aseptik menenjit ge i ir. Ciddi mental değişiklikler nadirdir. Ancak orta şiddette deliryum gözlenebilir. Bulantı, kusma, karın ve kas ağrıları da devam etmektedir. Semptomlar birkaç günde kaybolur, nadiren birkaç hafta sürebilir. Anikterik leptospiroz olgularının %90'ında BOS'ta pleositoz mevcuttur ve bunların yarısında aseptik menenjit kliniği vardır. Aseptik menenjit olgularının %5-13' nden *L.interrogans* sorumlu tutulmaktadır. Menenjit, genellikle bir kaç günde sonlanır ve anikterik olgularda fatal seyretmez.

Imm n dönemin en önemli fizik muayene bulguları; taşikardi, servikal veya yaygın lenfadenopati (LAP), döküntü, kas duyarlılığı, hepatosplenomegali ve göz

bulgularıdır. Gözlerde ağrı, fotofobi, konjunktival hiperemi veya kanamanın yanı sıra iridosiklit, korioretinit, üveit gelişebilir. Üveite ikincil olarak göz içi basıncı artabilir. Hastalarda maküler, makülopapüler, eritematöz, purpurik döküntüler görülebilir. Döküntüler esas olarak gövdede olup kendiliğinden geçer. *L.autumnalis* ve daha az oranda *L.pomona* serovarlarının etken olduğu Fort Bragg ateşinde pre-tibial bölgede 1-5 cm çaplı eritematöz döküntülerin olması karakteristiktir. Bu olguların çoğunda splenomegali saptanır. Anikterik formun iyi huylu bir seyri vardır ve hastalar bir ay içinde iyileşirler. Leptospiroz klinik bulgular kaybolduktan sonra iki hafta veya aylarca devam edebilir.⁹³

2.10.2. İkterik Leptospiroz

Leptospirozun ölümcül seyredebilen bu ciddi formu daha çok *L.interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* infeksiyonlarında tanımlanmıştır. Ancak diğer serovarlar da Weil sendromuna neden olabildiği gibi leptospiranın diğer serotiplerinde de görülebilmektedir. Hastalık esas olarak böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu, kanama, kollaps, bilinç bozukluğu ile karakterizedir. Akut başlayan hastalığın 1–3 gününden itibaren 40°C'nin üzerinde ateş, karaciğer hasarı, böbrek yetmezliği, kalpte ritm bozuklukları, hemorajik pnömoni, dolaşım yetmezliği gelişebilir. Sağ üst kadranda hassasiyet ve hepatomegali sık görülür. Serum transaminaz seviyeleri nadiren 200 U/L'nin üzerine çıkar. Bilirübin değerleri ise 20 mg/dL'nin altındadır. Nadiren hipoprotrombinemi oluşur. K vitamini uygulaması ile protrombin zamanı normale döner. İyileştikten sonra kalıcı bozukluk olmaz. Akut olarak ikter gelişen hastada, serum transaminaz düzeyleri orta derecede yükselmişken kreatinin fosfokinaz (CPK) düzeyinin belirgin artmış olması leptospirozun diğer akut hepatitlerden ayırt edilmesinde yardımcı olur. Ayrıca akut viral hepatitten farklı olarak leptospirozda ateş daha uzun sürer, konjunktival kızarıklık ve baş ağrısı vardır. Akut böbrek yetmezliği; hastalığın ikinci haftasında ani başlayan üremi ve oligüri ile karakterizedir. Renal kan akımındaki bozulmaya bağlı olarak akut tübüler nekroz gelişebilir. Başlangıçta kan üre azot (BUN) düzeyleri 100 mg/dL, kreatinin 8 mg/dL'nin altındadır. Ancak hastalığın ilerleyen döneminde BUN düzeyi 300 mg/dL'ye, kreatinin seviyesi ise 18 mg/dL'ye yükselebilir. Bu dönemde dializ gerekebilir. İyileşen olgularda kalıcı böbrek hasarı gözlenmez.

Hastalığın ikinci haftasında pulmoner tutulum görülebilir. Hemorajik pnömoni ve akut solunum sıkıntısı, öksürük, dispne, hemoptizi olabilir. Öldürücü komplikasyon olarak respiratuar distress sendromu yanında konjestif kalp yetmezliği, hemorajik myokardit, aritmi gelişebilir. Nadir gözlenen adrenal kanama da ani ölüme neden olabilir. Gebelikte leptospiroz geçiren annelerin bebeklerinde konjenital bir anomali saptanmamıştır. Ancak spontan düşüklükler olabilir. İyileşen hastalarda diürez tekrar başlar, sarılık azalır. Konvelesan dönem 1-2 ay sürer. Bu dönemde birkaç günlüğüne de olsa ateş, baş ağrısı, myalji, genel halsizlik tekrar ortaya çıkabilir.⁹³

2.11. Patoloji ve Patogenez

Leptospirozun patojenik mekanizmaları, bakterinin patojenitesinin derecesi ve enfeksiyon konağının immün cevabı doğrultusunda şekillenir. Leptospiralar bütünlüğü bozulmuş deriden veya mukozalardan kolaylıkla vücuda girebilirler. Girişten 24 saat sonra, spiroketler doku makrofajları aracılığı ile lenf dolaşımına, periferel kılcallar aracılığı ile de genel dolaşıma katılırlar. Yaklaşık olarak 2-4 gün içinde maksimum üreme hızına ulaşan mikroorganizmalar 7 gün kadar süren bir bakteriyemi döneminden sonra ya kandan temizlenirler veya hızla çeşitli dokulara dağılırlar⁴². Primer lezyon iyi tanımlanmamış leprospira yüzey elemanları veya toksik sekresyonların damar endotelinde açtığı hasra bağlı olarak gelişen kanama ve buna sekonder olarak görülen iskemi ile ilişkili doku ve organ patolojileridir. Doku penetrasyonu ve işgali tahminen, bir çift ekstenel filamentinin sağladığı burrowing hareketi ve hiyalüronidaz salınımı aracılığıyla gerçekleştirilir⁴³. Bakteri özellikle böbrek, böbrek üstü bezleri, karaciğer ve akciğer zarlarına lokalize olma eğilimindedir. Bu bağlamda renal tubular nekroz, hepatosellüler ve pulmonar hasar, meningitis, myositis ve placentitis en sık karşılaşılan organ yetmezlikleridir⁴⁴. Trombosit yetmezliği ve endotel hasarına bağlı kanama, sarılık tablosunun derinleşmesine yol açar. Patojenite, serovarlar arasında farklılık gösterirken, aynı serovarin farklı suşları arasında da değişebilir⁴⁵. Patogeneze etki eden farzi faktörler arasında adezyon ve fagositozdan kaçıştan sorumlu 36 kDa büyüklüğündeki fibronektin bağlayan protein, sayıları 8-10 arasında değişen adeziv OMP'ler, konak hücre endoteli arasındaki sıkı bağları tahrip ederek bütünlük bozulması ve inflamatuvar cevaptan sorumlu hyalorinidaz, bir B – hücre mutajeni olan LPS, özellikle toksik Lipid-

A, eritrosit membranında porlar oluşturarak lizise sebep olan spingomyelinaz, benzer aktivite gösteren ve ShpA geninde kodlanan ShpH proteini sayılabilir.

2.12. Leptospirozun Laboratuvar Tanısı

Leptospirozun değişik klinik görünümlere sahip olması, tanıda kültür, direkt mikroskopik inceleme ve moleküler yöntemler gibi laboratuvar yöntemlerinin önemini artırır. Laboratuvar tanıda direkt ve indirekt yöntemlerden faydalanılır.

2.12.1. Direkt Tanı Yöntemleri

Şüpheli vakalarda leptospiraların kesin teşhisi için direkt tanı yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Ancak moleküler yöntemler dışında bu yöntemler ile elde edilecek sonuçların zaman alıcı, pahalı, tecrübeye dayalı, geç sonuç veren veya düşük spesifite ve sensitiviteye sahip olmaları tanı değerlerini düşürür. Bu bağlamda klinik ile korele edilmek şartı ile tecrübeli personel ve doğru örnek ile yapılan karanlık alan mikroskopisi incelemesi tedavi protkollerinin düzenlenmesinde önemlidir.

2.12.1.1. Direkt Mikroskopik İnceleme

Hastalığın ilk 10 gününde özellikle 3-7 günler arası leptospiralar kan, idrar gibi klinik materyallerde karanlık alan mikroskopisi ile direkt gözlenebilir. Mikroskopik inceleme ancak etkenlerin gözlenebildiği hastalığın ilk günlerinde değer taşır. Leptospira etkenleri pozitif şüpheli materyalin karanlık alan mikroskobu altında incelemesinde hızlı hareket eden beyaz çizgiler olarak tespit edilebilir. Karanlık alan mikroskopisi ışık mikroskopundan sadece kondansatör farklılığı nedeniyle ayrılır. En çok paraboloid kondansatörler kullanılmaktadır. Orta kısmı kapatılmıştır. Işık kaynağından gelen ışınları oblik olarak yansıtarak preparatın yüzeyinde, tepesi aşağıda, yayvan bir ışınsal koni oluşturulabilen nitelikteki kondansatörlerdir. Işınlar yanlara doğru yansıtılıp objektife doğru yansıtılmadıklarından mikroskoba bakıldığında görüntü alanı karanlık görülür. İncelenen preparatta bulunan hareketli mikroorganizmalar kendilerine gelen ışınları yukarı yansıtıklarından, ancak bu ışınlar objektif ve okülerden geçip göze ulaşarak, mikroorganizmalar siyah zeminde parlak olarak görünür hale gelirler.

Bu yöntem artifaftlar nedeniyle sık sık hatalara yani yalancı pozitif sonuçların alınmasına yol açabilir. Tanıda histolojik incelemelerde giemsa veya gümüş boyama gibi çeşitli boyalarla hazırlanmış yayma preparatlarda kullanılmasına rağmen bu metodlarında sensitivite ve spesfitelerinin düşük olması kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır.

Doku kesitleri ve çevresel örnek incelemesinde bir diğer değerli alternatif İmmunofloresan (DFA) veya İmmunperoksidaz (IP) gibi immunohistokimyasal yöntemlerin kullanılmasıdır. Bu yöntemlerin ortak dezavantajları; uygun numuneler gerektirmeleri ve sonuçların yoruma dayalı olmasıdır.

2.12.1.2.Leptospira Kültürü

Kültür metodu ile leptospira izolasyonu kullanılan örneğe ve hastalığın aşaması bağlıdır. Kültür için kullanılan klinik materyaller, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kandır. Hastalığın ikinci ve üçüncü haftalarında Kan ve BOS örnekleri kültür için kullanılabilir⁴⁴. Patojen Leptospiralar için kültür uygulamaları son yıllarda değişiklik göstermiştir. Steril tekniklerle toplanan venöz kan kültür için kullanışlıdır. Bu amaçla 1-2 damla kan yarı-katı besi yeri içerisinde inokule edilir. Diğer organizmaların kontaminasyonunu engellemek için inokulum içerisine 5-fluorourasil eklenebilir. BOS örneklerinden inokulasyon, örnekten alınan 0.5 ml, uygun özellikte yarı katı besi yerine ekilerek yapılabilir. Kan ve BOS örnekleri heparinli veya sodyum oksalatlı tüplerle toplanılıp oda sıcaklığında taşınabilir. Ancak sitratlı tüpler Leptospiralar için inhibitör etkilerinden dolayı kullanılmamalıdır⁴⁶.

İnsanda leptospirozun ilk 1 haftasından sonra kandaki antikor artışı artar ve hastalığın bu aşamasında leptospiraların izolasyonu için en uygun materyal idrardır. Bu amaçla taze orta akım idrar toplanıp hemen inoküle edilmelidir. Çünkü leptospiralar insan idrarında uzun süre canlılıklarını koruyamazlar. Kontaminasyonu önleme amaçlı 5-fluorourasil içeren yarı katı besi yerine ekim için 1 damla idrar örneği genellikle yeterlidir. Kültürler aerobik koşullarda, 28-30 C° de karanlık ortamda saklanmalıdır ve 4-6 aylık periyotlarla üremenin varlığı kontrol edilir. Kültür yöntemi çok zaman alıcı ve zahmetli bir iştir. Bu nedenle kültür yöntemi tanı testi olarak kullanımda tercih edilmezken, epidemiyolojik araştırmalarda ve aşı üretiminde değer taşır. Ayrıca leptospira duyarlılık testlerinde kültür kullanılır⁴⁷.

2.12.1.3. Moleküler Metodlar

Günümüzde, izolatların tanı ve kimliklendirilmesinde DNA tabanlı yeni yöntemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Moleküler yöntemler klinik materyalden hızlı ve sensitif şekilde leptospiral DNA'nın tespitine olanak veren yeni bir yaklaşım sağlamıştır.

2.12.1.3.1. Nükleik Asit Prop ve Hibridizasyonu

Moleküler klonlama tekniği gen-spesifik prob hazırlanması ile mümkün hale gelmiş ve klinik örneklerden etken teşhisi için hibridizasyon teknikleri kullanımını sağlamıştır. Bu amaçla radyoaktif veya radyoaktif olmayan moleküle etiketlenmiş gene özel prop kullanılır. Hazırlanan spesifik prob, örnekten tamamlayıcı tek iplikli DNA'yı yakalayabilir ve sonuçlar radyoaktif olmayan malzeme ile etiketlenmiş olanlarda kolorimetrik ölçüm, radyoaktif madde ile işaretli prob ise otoradyografi tarafından izlenebilir.

İlk olarak 1986 yılında, Terpestra ve ark leptospira enfeksiyonunun erken tespiti için DNA hibridizasyonunu, ³²P ve biyotin ile işaretli preparatlarla leptospiral DNA'nın gösterilmesi amacı ile kullandılar⁴⁸. Bir yıl sonra, Terpestra ve arkadaşları dokularda kullanım için DNA hibridizasyon yöntemini geliştirerek ve bu tekniğin kısa zamanlı ve yüksek spesifik sonuç alınabilen bir yöntem olduğunu raporlamıştır. Yine aynı yıl Miller ve arkadaşları DNA hibridizasyonu ile biyolojik sıvılarda leptospiraların tespit olabildiğini göstermiştir⁴⁹.

Terpestra ve arkadaşları sığır idrarında patojenik *Leptospira* tespiti için DNA hibridizasyon, bakteriyolojik kültür ve MAT tekniklerini karşılaştırdı ve DNA hibridizasyon tekniğinin sırasıyla, MAT ve kültürel yöntemden daha yüksek spesifite ve duyarlılığa sahip olduğu sonucuna vardı⁵⁰. Ramadass ve arkadaşları 1990 ve 1992 yıllarında; *L. interrogans* serovarları arasındaki yakınlığı gösterdi ve yeni bir tür olan *L. kirshemeri* 'yi slot-blot DNA hibridizasyon yöntemi ile tespit etti⁵¹. Shen ve Baoman, genomik kütüphaneden alınmış Southern hibridizasyonu ile serovarları belirlenmiş 20 leptospira suşu ile farklı bant dizilimlerini ayırt etmek amacıyla rekombine prop düzenledi⁵². Vankatesha, her serovarda bulunan unique dizilerin DNA hibridizasyonunu sağlamak için düzenlenecek yeni bir probun, serovarların tespitinde etkili ve kullanılabilir olduğunu ileri sürdü⁵³. DNA hibridizasyonu, kültür ve biyokimyasal testleri sonuçlanmadan önce tanı teyidi sağlayabilmesi açısından, tanıda önemlidir.

2.12.1.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PCR yöntemi hedef DNA dizisinin, termostabil DNA polimeraz yardımıyla in-vitro enzimatik çoğaltılması yöntemidir. Çoğaltmak için aranılan ilgili dizilim için bir çift kısa DNA fragmanı hazırlanmıştır. Bu yöntem ile çoğaltılan DNA parçaları, etidyum bromür ile boyanan agaroz jel üzerinde UV transilluminator ile kolayca görüntülenebilir. PCR yöntemi, içerisinde en az 10 leptospira etkeni bulunduran farklı birçok klinik örnekten leptospiral DNA 'yı algılayabilir⁵⁴. Leptospiralarda bu amaçla ana hedef olarak 16SrRNA ya da 23SrRNA ve dış membran proteini genleri, en sık kullanılan bölgelerdir⁵⁵.

Leptospira tespiti için PCR ilk olarak Van Eys ve arkadaşları tarafından 1989 yılında, enfekte hayvanların idrar örneğinde kullanılmış ve mililitresinde en az 10 leptospira içeren idrar örneklerinde pozitif sonuç alınmıştır⁵⁶. Merien ve arkadaşları tarafından, üveitli bir hastanın humor aquous sıvısından alınan örnekte leptospiral DNA tespit edilmiştir⁵⁷.

Sonrasında, Shukla ve arkadaşları patojen ve patojen olmayan Leptospiraların ayırımını sağlamak için PCR amplikasyonda kullanılabilecek, 16S rRNA geninine ait yeni bir bölge tespit etmişler⁵⁸, Savio ve arkadaşları tarafından PCR ile *L. interrogans* serovarlarını belirlenmiştir⁵⁹. Çalışmada kullanılan PCR primerleri, genomda tekrarlanan elemanları içeren, klon 590 pL bölgesinin bir dizi parçasına göre seçilmiştir. Çalışmanın sonucunda yöntemin, *L.interrogans* serovarları arasında ayırıcı olabildiği bildirilmiştir.

Haake ve arkadaşları 2000 yılında leptospiral major dış membran proteini olan LipL32 gen bölgesindeki, 32-kDa'luk lipoproteini kodlayan gen bölgesini klonlamıştır⁵⁵. Çalışmada leptospiral protein profilindeki en önemli protein olarak, LipL32 gen bölgesi tanımlanmış. LipL32 geni yalnız kültürasyon boyunca değil, aynı zamanda memeli enfeksiyonu sırasında da kodlanmaktadır ve gen dizilimi ve kodlaması patojen *Leptospira* türleri arasında iyi korunmuştur. Bu bulgular ışığında LipL32 gen bölgesinin leptospirozun patogenezi ve tanısında önemli olabileceği belirtilmiştir.

2.12.2. Serolojik Yöntemler

Immünojik yöntemler laboratuvarlarda genel tanı araçları olarak kullanılmaktadır. Ayrıca hastalığın prognozu ve epidemiyolojisi ile ilgili bilgi almak için kullanılabilir. Bu yöntemlerin etkinliği, enfeksiyonda leptospiralara karşı antikorların oluştuğu zamanına bağlı olarak değişir. Genellikle antikorlar enfeksiyonun başlangıcından itibaren 7 ila 10 gün sonra tespit edilebilir ve varlığını aylar hatta yıllar boyunca koruyabilir. Kalıcı antikorlar retrospektif diagnoz için önemlidir. Bununla birlikte, leptospirozu belirlemede sonucun güvenilirliği açısından antikor titresi belirlerken, serokonversiyon veya 4 kat yükselen titrenin belirlenmesinde aynı hastadan 2 serum örneği kullanılmalıdır.

2.12.2.1. Mikroskopik Aglütinasyon Testi (MAT)

Mikroskopik aglütinasyon testi (MAT) yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle leptospiroz tanısında altın standart yöntem olarak kabul edilir⁶⁰. MAT serumda antikorları aglütinasyon ile belirler ancak sonuçlar yoruma bağlı olduğundan uzman ve laboratuvarlar arasında değişkenlik gösterebilir. MAT testinin pozitif yorumlanabilmesi için standart kriter antikor titresindeki 4-kat artış veya seronegatif serumda 1/100 ya da üzeri bir titrenin belirlenmesidir. Bu test, leptospiral serovar veya serogrupları belirlemek için de kullanılmaktadır. MAT testi canlı kültür ya da nötralize formaldehit ilavesi ile öldürülen süspansiyon kültürleri ile gerçekleştirilir. MAT testinin sağlıklı yapılabilmesi; titizlikle hazırlanmış leptospira serovar kültür koleksiyonu ve antijen olarak kullanılacak alt-kültürlerin düzenli kontrolü, kullanılan süspansiyonların sağlığı, ve aglütinasyonu değerlendirecek nitelikli eğitimli çalışanlar, güvenilirlik için uygulanan rutin kalite kontroller gibi bir çok unsura bağlıdır. Akredite teşhis laboratuvarlarında mevcut kullanılan standardize edilmiş leptospira suşları, merkez referans laboratuardan temin edilmektedir⁶¹.

2.12.2.2. Hızlı Lateks Aglütinasyon Testi

Hızlı lateks aglütinasyon testi, serum örneğinde Leptospira spesifik antikorların tespit edilmesi için dizayn edilmiştir. Hızlı ve uygulamada özel ekipman gerektirmeyen bir testtir. Testinin prensibi, spesifik antikorları bağlamak üzere Leptospira antijeni ile kaplanarak hazırlanmış mavi lateks partiküllerin çöktürülmesini esas alır.

Naigowit ve arkadaşları. leptospiroz hastalığının serodiagnozunda kullanmak üzere, lateks aglutinasyon (LA), test yöntemini kullanarak leptospiral antikorları tespit etmeye yönelik bir tarama yöntemi geliştirmiştir⁶². Toplanan serum örnekleri LA, ticari Strip ve IFA testleri ile incelenmiştir. LA testi, üç test arasında en yüksek (%94.7) duyarlılık oranına sahip bulundu. Çalışma sonucunda Naigowit ve ark., leptospiroz serodiagnozunda LA testini, özel ekipman ve beceri gerektirmeyen, basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olarak kullanışlı ve tavsiye edilir buldular.

2.12.2.3. Enzim Bağlı İmmuno-Sorbent Testi (ELISA)

ELISA, günümüzde insan ve hayvanlarda yaygın olarak kullanılan tür-spesifik bir tarama testidir. Testte genel olarak IgM tespitine yönelik cins-spesifik antijenler kullanılır. ELISA hastalığın erken döneminde IgM antikorları tespit edebilir. Ancak, IgM sınıfı antikorların birkaç yıl boyunca kanda tespit olabileceğini akılda tutmak gerekir. Bu nedenle elde edilen pozitif sonuç; geçmiş veya yeni leptospirozu gösterebilir. Tür-spesifik ELISA testi, hastalığa özgü antikorları MAT testine göre daha erken (semptom başlangıcından genellikle 5 gün sonra) tespit edebilmektedir⁶³. Testte Cins-spesifik antijen için, tek bir antijen kullanır ve akut fazda leptospiroz ön laboratuvar tanısında kullanışlıdır. Akut örneklerde yaklaşık %70 sensitivite oranıyla ELISA, akut ve iyileşme dönemindeki serum örneklerinde tanı için en elverişli test olarak düşünülmektedir.

ELISA testinin hem peroksidaz hem de üreaz etiketli konjugatları kullanılmaktadır. Rutin testin temelini gözle okunabilen stabil belirteçler oluşturur. Ancak ELISA testi teknik olarak hatalı sonuçlar verebildiğinden sadece bir ön test olarak tercih edilmelidir. ELISA iyi bir tarama testidir fakat bu testin dezavantajı endemik bölgelerde yaşayan hayvan rezervuarlarındaki düşük titrede antikorlar için yalancı pozitif sonuç verebilmesidir.

2.12.2.4. Lepto-Dipstikler

Lepto-dipsticklerin çalışma prensibi, leptospiral antijen ile işaretli stiklerle serum örneklerindeki spesifik IgM antikorlarının yakalanması temeline dayanır. Hızlı ve özel malzeme gerektirmeyen bir testtir. İnsan serum örneğinde Leptospira spesifik IgM antikorlarının varlığı durumunda oluşacak olan antijen-antikor bileşiğine, ortamda

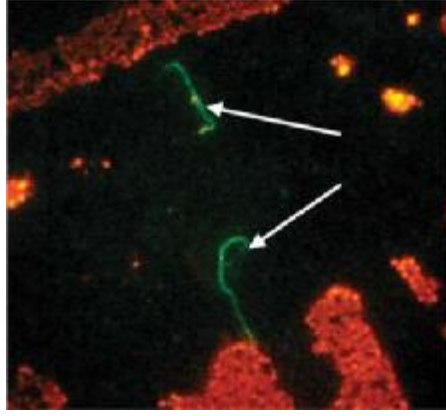
bulunan özel anti-insan IgM boya konjugatı bağlanarak gözle izlenebilen antijen grup boyanması (pozitif sonuç) oluşmaktadır. Kullanılan geniş spektrumlu Leptospiral antijen, farklı birçok tür leptospiral enfeksiyonun tespitine olanak sağlar. Ancak, dipstick tahlil yöntemi ile; HIV, Hanta virüsü, Toksoplazma enfeksiyonu, Lyme borreliyozu, meningokok menenjit ve Hepatit A enfeksiyonları olan hastaların serumlarında çapraz reaksiyon bildirilmiştir. Yine IgM tespiti yapılan ELISA testi ile serumda bu çapraz reaksiyon gözlemlenmemiştir⁶⁴. Dolayısıyla, elde edilen pozitif sonucun onaylanması için MAT ve/veya IgM ELISA gibi başka bir tahlil daha yapılması gereklidir.

2.12.2.5. İndirekt İmmüno-Florasan Antikor Testi (IFA)

İndirekt immüno-floresan antikor testi (IFA) leptospiral antikor düzeylerinin belirlenmesinde hızlı ve güvenilir bir yoldur. Leptospiral IFA testi, antijen olarak, leptospiralar arasında genel belirleyiciliği olan L.biflexa serovar Patoc strain Patoc suşunu kullanan cins spesifik bir testtir. Leptospire bu tek geniş reaktif suşu kullanılmasının nedeni genellikle farklı bir gruba bir patojen ve diğerine karşı antikorlar arasında oluşan çapraz reaksiyon olmasıdır. IFA testi, bu şekilde geniş belirleyici olma özelliğinden dolayı ELISA testi ile karşılaştırılabilir.

Leptospiralar mikroskop lamı üzerine kaplanır ve serum dilüsyonları bir mikropipet ile antijen noktalarına uygulanır. Antijene bağlanmış anti-Leptospiral antikorlar, floresan-konjuge sınıfı spesifik antikor ile boyanır ve sonuç floresan mikroskop altında gözlenir. IFA test sonuçları ELISA testi ile benzerlik gösterir.

Appassakij ve arkadaşları insan leptospirozu tanısında MAT ile immünofloresan antikor testinin tanı değerini araştırdıkları çalışmalarında akut serum üzerinde uygulanan testlerde, IFA titresi $\geq 1:100$ olan serumda 0.97 spesifite bulmuşlar ve daha karmaşık ve daha az duyarlı olan MAT testinin yerine kullanılmasının uygun olduğunu belirtmişlerdir⁶⁵.



Şekil 4. Floresan işaretli antikorlarla tespit edilen etkenlerin floresan-mikroskop altında görüntüsü.

IFA testinin avantajı, enfeksiyon duyarlı ve spesifik bir serolojik gösterge olmasıdır. En büyük dezavantajı ise floresan mikroskop gerektirmesidir.

2.13. Leptospirozda Tedavi

Leptospiroz tedavisinin amacı hastalığın ağır formu olan Weil sendromuna bağlı ölümleri engellemektir. Hastalığın yayılımının önlenmesinde taşıyıcı hayvanların belirlenmesi önemlidir. İnsan leptospirozunda, hastalığın ilk 4 gün içinde belirlenip antibiyotik kullanımına başlanması, semptom görülme süresini azaltacaktır. Yapılan çalışmada, 7 gün süre ile günde 2 kez oral 100mg doksisiklin veya yine 7 gün boyunca 2.400.000-3.600.000 U/gün dozda oral penisilinin gün içinde bölünerek uygulanması klinik semptomların görülme süresini etkili olarak kısaltmıştır⁶⁶.

Tablo 5. Leptospiroz tedavisinde ve korunmasında önerilen antibiyotikler ve dozları⁹²

Endikasyon	İlaç	Doz
Hafif leptospiroz olgularının tedavisi	Doksisiklin	100 mg oral 12 saat ara ile günde iki kez
	Ampicillin	500-750 mg oral 6 saat ara ile günde dört kez
	Amoxicillin	500 mg oral 6 saat ara ile günde dört kez
Orta-ağır leptospiroz olgularının tedavisi	Penicillin G	1.5 MU IV 6 saat ara ile günde dört kez
	Ceftriaxone	1 g IV günde bir kez
	Ampicillin	0.5-1 g IV 6 saat ara ile günde dört kez
Kemoprofilaksi	Doksisiklin	200 mg oral haftada bir kez

Doksisiklin kısa süreli kemoprofilaksik tedavide oldukça kullanışlı bulunmuş ve önerilmiştir. Böbrek ve karaciğer yetmezliğinin ön planda olduğu Weil hastalığı tedavisinde penisilin intravenöz kullanımının erken olması ve uygun destek tedavisi (böbrek yetmezliğinde dializ, elektrolit dengesinin düzenlenmesi, kanama, trombositopenide steroid tedavisi) hastalığın ilerlemesinde ve mortalitenin kontrolünde önemlidir⁶⁷.

Penisilin, kloramfenikol ve tetrasiklin leptospiroz tedavisinde etkili ajanlardır. Hafif olgularda doksisiklin 2x100 mg veya ampisilin 4x500-750 mg veya amoksisilin 4x500 mg dozda etkilidir. Orta-ağır ve şiddetli olgularda ise penisilin G 4x1.5 milyon MU, seftriakson 1x1 g IV veya ampisilin 4x 500-1000 mg IV önerilir (Tablo-5). Penisilin tedavisi sırasında nadiren Jarish-Herxheimer reaksiyonu gelişebilir.

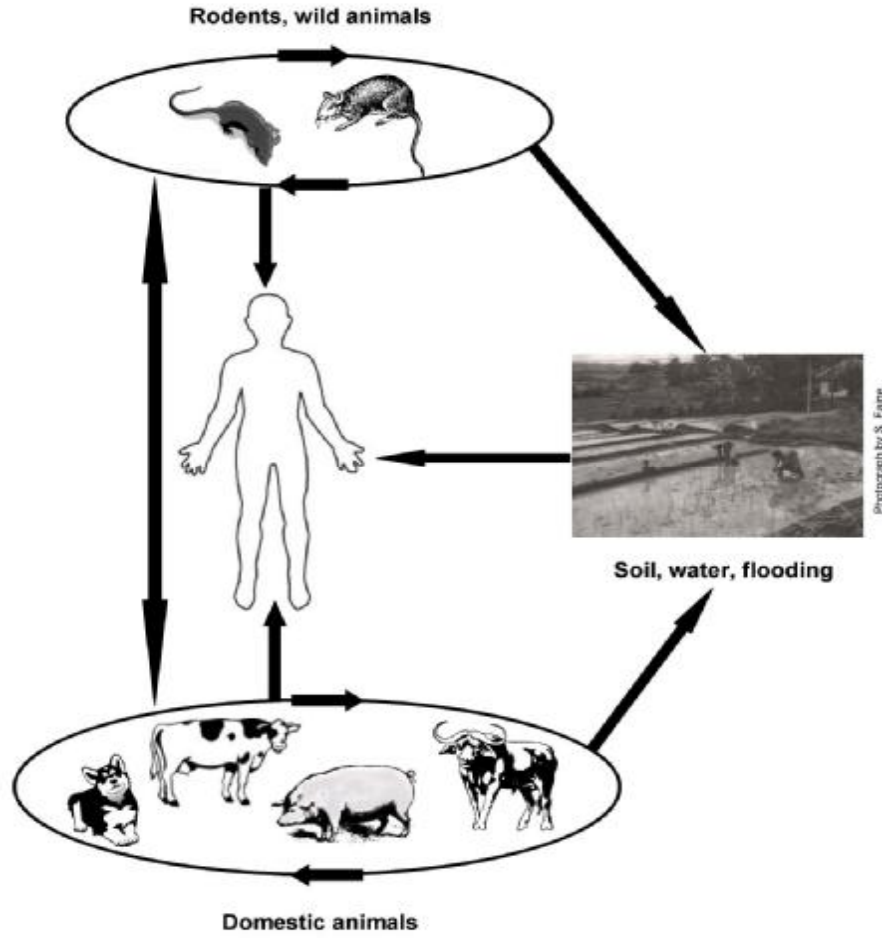
2.14. Leptospiral Enfeksiyonlarda Epidemiyoloji

Şiddetli yağmurlarla ilişkili leptospiroz salgınları Hindistan, Salvador ve Brezilya gibi gelişmekte olan ülkelerde hem endemik hem de epidemik olarak görülebilir. Değişen iklim, su baskınları topraktan organizmaların hareketini veya yüzey sularına kanalizasyon karışımını kolaylaştırır. Hastalık kimi zaman hafif semptomlarla veya subklinik geçirildiğinden tanı koyulamamakta ve bu nedenle dünyada hastalığın görülme insidans rakamları sağlıklı olarak bilinmemektedir⁶⁸. Ancak insidans sıcak iklim ülkelerinde belirgin şekilde artmaktadır⁶⁹.

Tropikal bölgelerde özellikle yağmurlu mevsimlerde leptospiroz nedeni bilinmeyen ateşin en önemli sebebidir. Bazı tropikal ülkelerde lokal serovarlarla antikor prevalans oranları geçirilmiş veya yakın zamanda enfeksiyon için %80'lere çıkabilir. ABD'de oran %0.5 iken Havai'de %1.8 olarak belirlenmiştir. Tayland'da yıllık insidansı 100.000'de 0.3, İrlanda'da milyonda 1.3, Seyşel adalarında 100.000 de 45, Barbados'da 19.2 olarak tanımlanmıştır. Bangladeş çalışmasında kontrol grubu olarak seçilen 30 kişinin % 48 'inde leptospira antikor pozitifliği saptanmıştır.

Leptospiroz köpek, koyun, sığır, domuz ve at gibi evcil memeli hayvanlar ve insanlarda görülmekle beraber doğada asıl rezervuar görevi gören hayvanlar kokarcalar, rakunlar, ratlar gibi vahşi kemirgenlerdir⁷⁰. Ayrıca artropodlardan, amfibialardan, kanatlılardan ve sürüngenlerden de leptospira izole edilmiştir⁶⁹. Leptospira'lar taşıyıcı hayvanların böbrek tübüllerine yerleşirler ve enfekte hayvanların idrarları ile çevreyi sürekli olarak kontamine ederler. Su içerisinde 1 ay kadar canlı kalabilirler. İnsanlara bulaş, genellikle enfekte hayvanların idrarı ile direkt veya indirekt yollarla bulaşık hale gelmiş suların kullanımı yoluyla olmaktadır⁴⁴. Patojenik leptospiralar genellikle deri üzerindeki yaralardan, mukozal yüzeylerden, konjiktival yollardan veya enfekte aerosollerin direkt solunması ile vücuda alınır⁷¹.

İnsanda Leptospiroz, patojenik Leptospiralar ile doğrudan veya dolaylı temas yoluyla oluşmaktadır. Doğrudan bulaş, akut enfekte hayvanların organizmaları içeren kan veya vücut sıvılarıyla veya enfekte hayvanların idrarıyla temas sonucu olmaktadır.



Şekil 5. Leptospira etkenlerinin doğal döndüsü⁹⁰

Diğer taraftan, daha çok dolaylı bulaş görülmekte ve kontamine atık su veya leptospirozlu idrarla bulaşık toprak yolu ile ortamda bulunan canlılara geçtiği düşünülmektedir⁷². Kontaminasyon genellikle bütünlüğü bozulmuş deri veya mukozalardan geçiş yolu ile olur. Kontamine su ile temas, uzun süreli ve sürekli ise sağlam deri yoluyla gerçekleşebilir. Konjonktival yolla, kontamine aerosollerin inhalasyonu ile, taşıyıcı hayvanların ısırıkları veya çiftleşme ilede bulaş görülebilir⁷³. Kronik enfeksiyonlu hayvanlar taşıyıcı görevi görürler. Kronik asemptomatik renal enfeksiyonlarda etken idrar ile atılmaya devam eder. Bazı akut enfeksiyonlu hayvanlarda hastalığın yayılımında tetikleyici olabilir. Organizmanın vucuda girmesi hayvanlarda antikor yapımını uyarır. Oluşan antikorlar iyileşmeyi başlattığı gibi serolojik kontrollerde enfeksiyonun tanınmasına yardımcı olur. Ancak renal tubüllerde

enfeksiyon oluşmadan etkeni taşıyan hayvanlarda antikor oluşmadığından serolojik testlerle belirlenemez, ancak haftalık yapılan idrar testleri ile etken gösterilebilir

Elverişli toprak tipi ve asit oranlarında, leptospiralar uzun süre canlı kalabilirse de kuru topraklarda uzun süre canlılıklarını koruyamazlar. Benzer şekilde, leptospiralar özellikle yüzey sularında, su birikintilerinde, kanalizasyon ve diğer atık sularda, bataklık, dere ve nehirlerde uzun süre yaşayabilir. İnsana bulaş genellikle bulaşık sular ya da hayvanlar yoluyla olmasına karşılık insan-insan bulaşına da *L.interrogans* türünde emzirme yolu ile anneden bebeğe geçiş olarak rastlanmıştır⁷⁴. Leptospirozun insanlarda görülmesi genellikle, iklim, nüfus yoğunluğu ve bakım ve taşıyıcı ile kişinin temas derecesi gibi çevresel faktörlere bağlıdır. Günümüzde, leptospirosis kırsaldan şehre doğru olan yaygın göç nedeniyle kırsal kesimden şehirlere yayıldı. Özellikle altyapısı yetersiz gecekondü semtlerinde kanalizasyon suları kontaminasyonu ve kontrol altına alınamayan kemirgenler yoluyla şehirlerde Leptospiroza maruz kalma olasılığı artmıştır⁷⁶.

Türkiye’de leptospiroz ile ilgili çalışmalar sıklıkla hayvanlarda yapılan seroepidemiolojik araştırmalar ile insanlarda olgu sunumları niteliğindedir. Türkiye’de leptospiroz insidansı ve prevalansının bildirildiği geniş seri çalışmalar yoktur. Pirinç ekimi yapılan Çukurova bölgesi, Bursa’da Karacabey harası, Karadeniz bölgesinde enfeksiyonun sıklığı bildirilmiştir⁹¹. İnsanlarda sero-epidemiolojik çalışmalarda %2-12, hayvanlarda ise %3.5-63 oranlarında bulunmuştur. Türkiye’de *L.icterohaemorrhagiae*, *L.grippotyphosa*, *L.bovis*, *L.hebdomatis*, *L.autumnalis*, *L.sejroe*, *L.pomona*, *L.butembo* ve diğer serotiplerin izole edildiğini bildirilmiştir⁷⁵.

Türkiyede leptospiroz ile ilgili ilk yazı 1915 yılında Reşat Rıza bey tarafından yayımlanmış, hayvan deneyleri ise 1922 yılında Hüsameddin Şerif bey tarafından yapılmıştır. Daha sonra Plevnelioğlu Batı Trakya’da askerler arasında II. Dünya savaşı sırasında 2 leptospiroz vakasını kesin olarak kanıtlamıştır⁷. Unat ve ark 1960’lı yıllarda leptospira şüpheli hastaların kanlarında %9 oranında *L.icterohaemorrhagiae*, *L.grippotyphosa* ve *L.bovis*’e karşı antikor belirlemiştir^{77,78,79}. Fazlı’nın orta ve güneydoğu Anadolu bölgesinde kemiricilerde yapmış olduğu çalışmada *L.grippotyphosa* sık olmakla birlikte *L.autumnalis*, *L.djasiman*’a karşı antikor bulunmuştur. Fazlı leptospira şüpheli insanların serumlarında leptospira antikor pozitifliğini %3 oranında bildirmiştir^{80,81}. Vakaların yarısında *L.butembo* belirlenmiş,

ayrıca *L.icterohaemorrhagiae* ve *L.grippotyphosa* 'ya karşı da antikor mevcuttur. Vardar ve ark. hayvanlardan *L.grippotyphosa* 'yı izole etmişlerdir. 1972 yılında Tuncel ve ark. Erzurum ve çevresinde hayvan teması olan kişilerde leptospira antikorlarının yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Walter ve ark. Çukurova bölgesinde hayvanlarda *L.hebdomatis*'e karşı %61 ve *L.grippotyphosa*'ya karşı %26 oranında antikor belirlemişlerdir⁸². Yine aynı bölgede 1995 yılında Sadr ve arkadaşlarının seroepidemiyolojik çalışmasında hayvancılıkla uğraşan asemptomatik kişilerin serumlarında sıklıkla *L.icterohaemorrhagiae* ve daha az oranda *L.grippotyphosa*'ya karşı antikor bulunmuştur⁸³. Trakya ve Batı Anadolu'da Ulaş ve ark.nın 1973 yılında yaptıkları çalışmada hayvanlarda *L.grippotyphosa*, *L.sejroe* ve *L.icterohaemorrhagiae*'ya karşı antikorlar bulunmuştur⁷⁵. Sümbül ve ark Karadeniz bölgesinde farelerde *L.interrogans* 'ı doku ve organlarda belirlemiştir⁸⁴. 1999 yılında Şencan ve ark Orta Karadeniz bölgesinde risk grubu kişilerde leptospira antikor pozitifliğini %4, kontrollerde ise %0.05 olarak bildirmişlerdir⁸⁵. 2001 yılında Refik saydam Hıfzısıhha Merkezinin Ankara'da mezbaha işçilerinde yaptığı çalışmada *L.australis*'e karşı %2 oranında antikor bulunmuştur.

Tablo 6. Çeşitli hayvan populasyonlarında leptospiroz seroprevalans çalışmaları⁹⁴.

Bölge	Zaman	Hayvan türü	Toplam sayı	Sero-prevalans (%)	Tarama testi
Ankara	2005	Sahipsiz Köpek	116	43,96	MAT
Orta Karadeniz	1998-1999	Alandan toplanmış Sıçan	59	32,2	MAT
Hatay	2003	İlçe ve köylerden Sığır	512	8,8	MAT
Kars ve Ardahan	2000	30 yerleşim biriminden Sığır	990	33,63	MAT
Kayseri	2005-2006	Merkez ve ilçelerden Sığır	2395	25,95	MAT

Weil hastalığı ile ilgili bildirilen olgu sunumları ise sıklıkla Çukurova, Karadeniz, Marmara bölgelerini içermektedir. Saltoğlu ve ark. Çukurova bölgesinde; Leblebicioğlu, Sümbül ve ark. Orta Karadeniz bölgesinde; Çaylan ve ark Doğu Karadeniz bölgesinde; Hamsan ve ark İstanbul’da Weil hastalığı tanısı almış olguları bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda MAT ve ELISA testi ile sıklıkla *L.icterohaemorrhagiae* ’ya karşı antikor pozitifliği bulunmuştur.

Halk Sağlığı Uzmanları Derneği’ nin (HASUDER) 2012 Türkiye Sağlık Raporu verilerine göre; 2005–2010 yılları arasında bildirilmiş olan toplam 71 olgunun, 12’si (%16.9) kadın, 59’u (%83.1) erkektir. Erkeklerde daha fazla görülüyor olması mesleki kontaminasyon ile ilişkilendirilebilir. 2010 yılında bildirilen toplam 26 olgunun 4’ü 15-19; 5’i 20-29; 9’u 30-44; 5’i 45-64; 3’ü 65 üzeri yaş grubundadır. 2010 yılında Adana’dan yedi olgu, Antalya, Diyarbakır ve Samsun illerinden 4’er olgu bildirilmiştir.

Olgu sayıları son 10 yılda değişkenlik göstermekle birlikte 2010 yılından diğer yıllara göre bir artış görülmüştür. Ancak bu artışın olgu sayısında mı yoksa bildirim mi bağlı olduğunu değerlendirmek zordur. Bununla birlikte hayvanlarda yapılan çalışmalarda seroprevalansların yüksek olması durumun ciddiyle takip edilmesi gerektiğini göstermektedir. Kırsal alanda su kaynaklarının sağlıksız oluşu ve kemirici mücadelesinin etkili yapılamıyor olması leptospiroz olgularının önümüzdeki yıllarda artabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 7. HASUDER verilerine göre Türkiye’de bildirilen leptospiroz olguları

<i>Yıl</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>İnsidans</i> (yüzbinde)	<i>Yıl</i>	<i>Olgu Sayısı</i>	<i>İnsidans</i> (yüzbinde)
2001	14	0,02	2006	6	0,01
2002	13	0,02	2007	12	0,02
2003	6	0,01	2008	8	0,01
2004	11	0,02	2009	12	0,02
2005	7	0,01	2010	26	0,04

2.15. Koruma ve Kontrol

Leptospiralar dünyanın, çöller dışında hemen her bölgesinde görülebilen ve birçok hayvan türünde hastalık oluşturma yeteneğine sahip spiroketlerdir. Ayrıca semptom göstermeden etkeni böbrek tubüllerinde taşıyan hayvanlarca sessiz yayılım görülebilmektedir. Vahşi ve evcil birçok hayvan türünde ve insanlarda görülebilmesi koruyucu tedavide takibini güçleştirmektedir. Hayvan-hayvan ya da hayvan-insan bulaşının yanında kontamine sular gibi çevresel etmenlerle de bulaş gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle korumada 3 hedefin takip edilmesi önem taşır. Bunlar;

- a) Enfeksiyon kaynağı
- b) Enfeksiyon kaynağı ve insan arasındaki bulaş yolu,
- c) İnsanda taşıyıcı enfeksiyonlardır.

Enfeksiyona maruz kaldığı düşünülen yüksek risk gruplarında doksisisiklin (200mg/hafta) ile erken başlanılan antibiyotik tedavisi, olası leptospiroz salgınlarını önleyebilir⁸⁶. Ancak bu koruyucu tedavi kısa süre uygulanmalıdır. Küba gibi bazı bölgelerde deneysel olarak insan üzerinde yapılan aşılama ile immunizasyon çalışmalarında, uygulama yapılan grupta % 100 koruma elde edilirken herhangi bir yan etki görülmediği rapor edilmiştir⁸⁸. Bununla birlikte, insan için koruyucu aşılanmanın; aşının olası yan etkileri, ölü bakteri kullanıldığında oluşan bağışıklığın kısa süreli ve yetersiz olması, ve üveit gibi otoimmün hastalıklara sebebiyet verebilmesi gibi zararlı etkileri olabilmektedir⁸⁹. Ancak, günümüzde sığır ve domuzlarda leptospirozun kontrolünde aşılama, etkili bir yöntem olarak görülmekte ve kullanılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

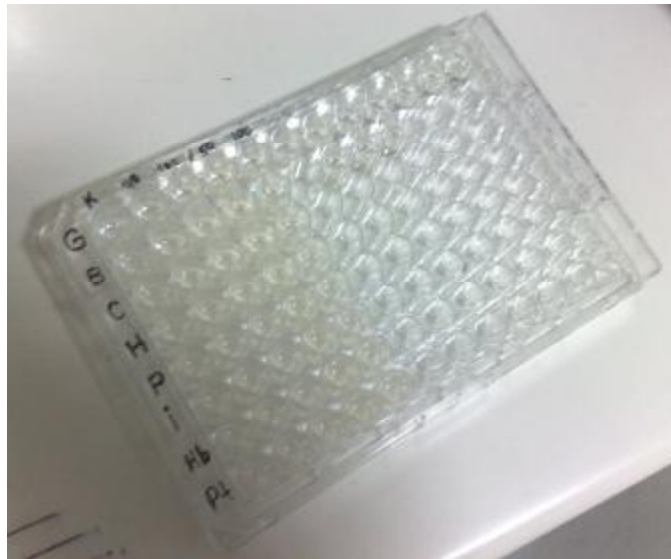
Bu çalışma ile koruyucu immunitede major rol oynadığına inanılan leptospira dış membran proteinleri ompL1 ve LipL32'yi kodlayan gen fragmentleri ile 16S rRNA geni üzerindeki spesifik dizileri hedef alan primerlerin kullanıldığı Nested-PCR ve PCR-RFLP yöntemlerinin leptospirosis de konvensiyonel yöntemler olan MAT ve karanlık alan mikroskopisi (KAM) e karşı tanı değerleri sorgulanmıştır. Bu amaçla Çukurova bölgesinde klinik olarak leptospirosis şüphesi olup Ç.Ü Tıp Fakültesi hastanesi ile SB Adana Devlet Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniklerine başvuran 38'i yetişkin 9'u 18 yaş altı hastalardan alınan 47 kan örneği ile bölgemizde hematüri ve ikter bulguları olan 86 büyükbaş hayvana ait kan örneği değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol olarak Tarım Bakanlığı Merkez Etlik Veteriner Araştırma Laboratuvarından sağlanan *L.ichterohemorogica copenhageni wjinberg*, *L.bataviae bataviae swart*, *L.javanica javanica veldrat batavia 46*, *L.canicola canicola hondutrecht IV*, *L.tarassovi tarassovi prerpeletsin*, *L.cynopteri cynopteri 3522C*, *L.pyrogenes pyrogenes salineu*, *L.pomona pomona pomona*, *L.pomona mozdok 52621*, *L.autumnalis autumnalis akiyami A*, *L.hebdomadis hebdomadis hebdomadis*, *L.seroje hardjo hardjoprajitno*, *L.australis bratislava jezbratislava*, *L.grippothyphosa moskva V*, *L.ichterohemoragica RGA*, *L.australis australis ballico*, *L.semaranga patoc patoc I* suşları kullanıldı.

3.1. Hasta örneklerinin toplanması.

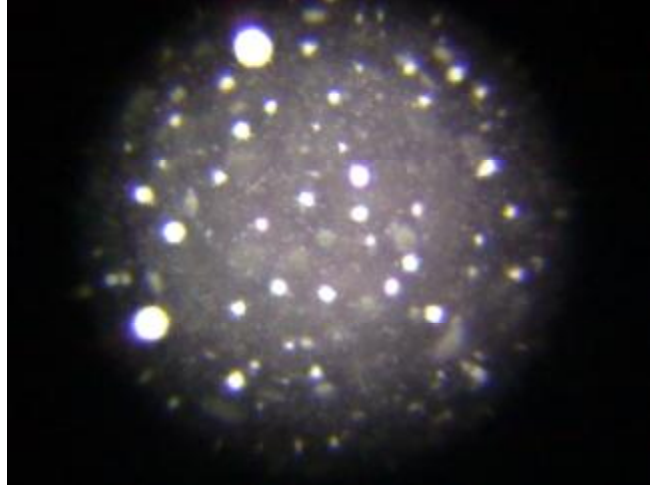
Kliniklere yatırılan veya polikliniklerden takip edilen leptospirosis şüpheli her hastadan venöz kan örnekleri hazırlanan hasta bilgi formları (ek belge 1) doldurulduktan sonra steril enjektör yardımı ile alınarak, birisinde 500 µl sodyum okzalat bulunan diğeri ise kuru olan 2 tüpe 3 er ml olarak paylaştırıldı. Düz tüplerdeki kan örneklerinden elde edilen serum MAT ile değerlendirilene kadar -20C de saklandı. Okzalatlı tüplerdeki kan örnekleri ise 3000g de 5 dakika santrüfuj edildikten sonra süpernatant kısmından dikkatlice 10-20 µl alınarak lama yayıldı ve üzerine lamel kapatılarak KAM'ile değerlendirildi. Artan süpernatant örnekleri PCR ile hedef dizilerin amplifikasyonu için kullanılabilecek kadar -80°C de saklandı.

3.2. Mikro Aglitünasyon Testi (MAT):

Serumların işlenmesi için ilk olarak iki ayrı cam tüp kullanıldı. İlk tüpe 2400 µl FTS alınıp üzerine serum örneğinden 100 µl eklendi. İkinci cam tüpe ise 1000 µl FTS ve 1. tüpteki 1/25 oranında sulandırılmış olan serumdan 1000 µl eklenerek 1/50 serum derişimi hazırlandı. Testte antijen olarak Etlik Veteriner Merkez Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden alınan canlı *L.grippothyphosa*, *L.bratislava*, *L.canicola*, *L.Hardjo*, *L.pomona*, *L.hebdomadis*, *L.ichterohemmoragica*, *L.patoc-I* suşlar kullanıldı. Her bir derişimden 100'er µl test plağının ayrı gözlerine alındı ve üzerlerine yine 100'er µl antijen eklendi. Test sonucu, 37C° de bekletilen plaklardan 2-3 saat sonra alınan örneklerin karanlık alan mikroskobunda incelenmesi ile tespit edildi. Şiddetli aglitünasyonun görülmesi pozitif olarak değerlendirildi. Pozitifl örneklerden 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 ve 1/1600 luk serum dilüsyonları hazırlanarak test tekrar edildi.



Şekil 6. MAT testi plağı



Şekil 7. Pozitif değerlendirilen aglütinasyon



Şekil 8. Negatif değerlendirilen aglütinasyon

3.3. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemi :

Leptospiraların hızlı, yüksek sensitivite ve spesifitede tanısına imkan sağlamak amacı ile bakterinin 16SrRNA, ompL1 ve LipL32 genleri üzerindeki iyi korunmuş gen fragmentlerinin Nested-PCR ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak, organizmanın varlığı araştırılmıştır. İşlem DNA'nın ekstraksiyonu, amplifikasyon, restriksiyon fragment analizi için enzimatik hidroliz ve ürünlerin agaroz jelde analizi basamakları ile tamamlanmıştır.

3.3.1. DNA Ekstraksiyonu:

Okzalatlı tüplerdeki tam kan örneklerinden elde edilen ve kullanılabilecek kadar -80 °C de saklanan plazma örnekleri leptospira DNA'sını ekstrakte etmek amacı ile QIAGEN kan ekstraksiyon kiti yardımı ile değerlendirilmiştir. Elde edilen DNA miktarlarının uygunluğu spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş her örnekte en az 50 mcg /ml DNA olacak şekilde örnekler sulandırıldıktan sonra DNA kalıbı olarak kullanılmak üzere saklanmıştır.

3.3.2. 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve RFLP:

Leptospiranın 16S rRNA Geninin 525 bp'lik bölgesini tanıyan primerler Forward 5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3' ve Reverse 5'-GTCCGCCTACGCACCCT TTACG-3', kullanılarak hedef bölge amplifiye edildi. Daha sonra aynı gen üzerindeki patojenik leptospiralar için spesifik olan 289 bp'lik bölgenin amplifikasyonu için inner primerler, Forward 5'-CAAGTCAAGCGGAGTAGCAA-3' ve Reverse 5'-CTTAACCTGCTGCCTCCCGTA-3', kullanılarak amplifikasyon sonlandırıldı. I. Amplifikasyon için; her bir primerden 0,5 µl (25 pmol/µl), 1 µl 200 µmol/l deoxyribonucleotide karışımı, 5 µl Mg²⁺-free 10× PCR reaction buffer, 5 µmol/l MgCl₂ 1 µl, 0.4 µl Taq Polymerase Mix, (Fermantas) 150 µl ependorfa alındı ve karışıma önceden hazırladığımız kalıp DNA'dan 10 µl DNA(100-50ng DNA) ilave edildi. Ependorflardaki karışım deiyonize PCR-grade distile su (37,6 µl) ile 50 µl olacak şekilde tamamlandı. PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

94 °C'de	5 dk,	
94 °C'de	1 dk,	
62 °C'de	2 dk	35 siklus
72 °C'de	1,5 dk	
72 °C'de	15 dk	

I. amplifikasyondan elde edilen ürünler DNA miktarının kantitasyonu için spektrofotometrede ölçülerek değerlendirilmiş ve 50ngr/10µl olacak şekilde sulandırılarak II amplifikasyonda kalıp DNA olarak kullanılmıştır. II amplifikasyonda da I. Amplifikasyonda kullanılan PZR karışımı kullanılmış, ancak DNA kalıbı olarak I. amplifikasyon ürününden 10 µl, I.amplifikasyondaki primelerin yerine inner primerlerin her birinden 0,5 µl (25 pmol/µl) ilave edilmiş, daha sonra karışımda son hacim 50 µl olacak şekilde ependorflar PZR-grade distile su ile tamamlanmıştır. Amplifikasyon sonunda elde edilen 289 bp uzunluğundaki ürünün tespiti için ampikonlar %2'lik agaroz jel'de 120 V'da yürütülerek UV transluminatörde (Kodak Imaging System) görüntülenmiştir.

Uygun ampikona sahip örneklerden alınan DNA kalıpları *ApoI* enzimi ile hidrolize uğratarak RFLP işlemi uygulanmıştır. Bu işlem için 150 µl'lik ependor tüpüne II. Amplifikasyon sonucu elde edilen 289 bp lik 10 µl kalıp DNA, 10X Buffer solusyonundan 2 µl ve *ApoI* enziminden 2 µl konduktan sonra total volum 30 µl olacak şekilde deiyonize PCR-grade distile su (16 µl) ilave edilmiştir. Karışım 37°C de 4 saat bekletildikten sonra oluşan ürünler % 2'lik agaroz jel'de 120 V'da yürütülerek UV transluminatörde (Kodak Imaging System) görüntülenmiştir. Non-patojenik leptospira suşları *ApoI* enzimi ile 200 ve 89 bp olmak üzere 2 parçalı halde görülürken patojenik leptospira suşları kesilmemiş ve 289 bp tek band olarak görüntülenmiştir.

3.3.3. OmpL1 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu :

L. interrogans grubuna ait farklı serotipleri tanıyan, A ve B olarak tanımlanan iki ayrı primer çiftinin kullanıldığı 2 tüpte PCR işlemi gerçekleştirildi. Kullanılan primerlerin pozitif sonuç vermesi beklenen serogrupları aşağıda (Tablo-8) belirtilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan primerlere göre pozitif sonuç vermesi beklenen serogruplar

Serovarlar	Kullanılan Primer Grubu	
	Intergroup A	Intergroup B
<i>L. interrogans</i> Icterohaemorrhagiae	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Djasiman	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Grippotyphosa	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Pomona	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Bratislava	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Autumnalis	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Copenhageni	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Akiyami A	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Jez	Pos	Neg
<i>L. interrogans</i> Hebdomadis	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Bataviae	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Canicola	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Australis	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Pyrogenes	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Hardjo	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Wolfii	Neg	Pos
<i>L. interrogans</i> Mankarso	Neg	Pos
<i>L. biflexa</i> Patoc	Neg	Neg

A grubu primerler *L.interrogans* grubuna ait, *Icterohaemorrhagiae*, *Djasiman*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Bratislava*, *Autumnalis*, *Copenhageni*, *Akiyami A*, *Jez* gibi suşların *OmpL1* geni üzerindeki 396 bp'lik bir fragmenti hedef alan F.5'-CTACTGGCGGCTTGATCAAC-3' ve R. 5'-CTGGATCTGTTCCGTCTGCGATC-3' dizilerinden oluşturuldu. B grubu primerler ise yine *L.interrogans* grubuna ait *Hebdomadis*, *Bataviae*, *Canicola*, *Australis*, *Pyrogenes*, *Hardjo*, *Wolfii*, *Mankarso* gibi suşların aynı geni üzerindeki 406 bp'lik fragmentini hedef alan F. 5'-CTTGATAGA-ACCACTGGTGGTGCC-3' ve R.5'-CTGGATCGGTTCCATCGCTCAG-3' dizilerin-

den oluşturuldu. Yapılan her iki amplifikasyon için birer tane olmak üzere; 150 µl'lik 2 ependorf tüpü kullanıldı. Tüplere her bir primerden 0,5 µl (25 pmol/µl), deoxyribonucleotide karışımından 1 µl 200 µmol/l, Mg_2^{+} -free 10× PCR reaction bufferdan 5 µl, 5 µmol/l $MgCl_2$ 'den 1 µl, Taq Polymerase Mix (Fermantas)'den 0.4 µl konuldu ve karışıma ilk hazırladığımız kalıp DNA'dan 10 µl DNA(100-50ng DNA) ilave edildi. Ependorflardaki karışım deiyonize PCR-grade distile su (37,6 µl) ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR reaksiyon karışımı içeren tüpler Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki programda çalıştırıldı;

94 °C'de	5 dk,	
94 °C'de	1 dk,	
62 °C'de	2 dk	35 siklus
72 °C'de	1,5 dk	
72 °C'de	15 dk	

Oluşan PCR ürünleri; amplifikasyonun başarısını kontrol etmek amacıyla % 2'lik agaroz jel'de 120 V'da yürütülerek UV transluminatörde (Kodak Imaging System) görüntülendi.

3.3.4. LipL32 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu:

LipL32 gen bölgesi sadece patojen leptospiralarda bulunduğundan kullanılan nested-primerlerle amplifikasyon ürünü oluşturan örneklerde patojen leptospira (*L.interrogans*) tanısı konuldu. Öncelikle *LipL32* gen bölgesindeki 859 bp'lik bölgeye spesifik F. 5'-CTAAGTTCATACCGTGATTT-3' ve R. 5'-TTCTGACGCGACTAAG-TAAT-3' primerleri kullanılarak I.amplifikasyon yapıldı. I.Amplifikasyon için; her bir primerden 0,5 µl (25 pmol/µl), 1 µl 200 µmol/l deoxyribonucleotide karışımı, 5 µl Mg^{2+} -free 10× PCR reaction buffer, 5 µmol/l $MgCl_2$ 1 µl, 0.4 µl Taq Polymerase Mix, (Fermantas) 150 µl ependorfa alındı ve karışıma önceden hazırladığımız kalıp DNA'dan 10 µl DNA(100-50ng DNA) ilave edildi. Ependorflardaki karışım deiyonize PCR-grade distile su (37,6 µl) ile 50 µl olacak şekilde tamamlandı. PCR reaksiyon karışımı içeren

tüpler Termal Cycler Cihazına (Applied Biosystem AB) yerleştirilerek aşağıdaki protokole göre amplifikasyon işlemi tamamlandı

94 °C’de	5 dk,	
94 °C’de	1 dk,	
62 °C’de	2 dk	35 siklus
72 °C’de	1,5 dk	
72 °C’de	15 dk	

Daha sonra I. amplifikasyondan elde edilen ürünler DNA miktarının kantitasyonu için spektrofotometrede ölçülerek değerlendirildi ve 50 ngr/10µl olacak şekilde sulandırılarak II amplifikasyonda kalıp DNA olarak kullanıldı. II: amplifikasyonda kalıp DNA ve iner primerler hariç I. amplifikasyondakine benzer PCR karışımı kullanıldı. Nested PCR primerleri aynı gen üzerindeki 497 bp’lik bölgeyi hedef alan; F. 5’-GACGGTTTAGTCGATGGAAAC-3’ ve R. 5’-GGGAAAACAGACCAAC AGA-3’ şeklinde dizayn edildi. Kalıp DNA ve primerlerde karışıma ilave edildikten sonra II amplifikasyon aşağıdaki protokole uygun şekilde tamamlandı.

Amplifikasyon sonunda elde edilen ürünler 497 bp uzunluğundaki hedef DNA fragmentinin tespiti için % 2’lik agaroz jel’de 120V’da yürütülerek UV transluminatör-de (Kodak Imaging System) incelendi.

4. BULGULAR

İnsan ve hayvan Leptospirosis vakalarının tanısında; Karanlık Alan Mikroskopisi ve MAT' ne göre daha sensitif, spesifik ve hızlı bir alternatif tanı testi oluşturmak üzere 16SrRNA Nested-PCR RFLP, OmpL1 PCR ve LipL32 Nested-PCR testlerinin kullanılabilirliğini belirlemek amacı ile yapılan bu çalışmada 47'si insan 86'sı hasta hayvanlara ait olmak üzere toplam 133 serum/plazma örneği değerlendirilmiştir.

Serum örneklerinden 5'i çocuk toplam 22 (%46.8)'si insan ve 6'sı tek tırnaklı hayvan toplam 34 (%39.5)'ü hayvan serumlarına ait olmak 56 (%42.1)'sında KAM'de leptospira ile uyumlu morfolojik görünüme uygun görüntü elde edilmiştir (Tablo-9).

Tablo 9. KAM' de elde edilen leptospira ile uyumlu morfolojik görünüm oranları.

KAM TESTİ	İnsan -47-				Hayvan-86-				Toplam 133	
	0-18		> 18 yaş		Tek tırnaklı		Ruminant			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Olgu sayısı	9	19.1	38	80.8	23	26.7	63	73.25	133	100
Pozitif sayı	5	55.5	17	44.7	6	26.1	28	44.4	56	42.1

Serum örnekleri ülkemizde sık görüldüğü bildirilen 7 farklı *L.interrogans* suşu ile *L. semeranga* ssv *patoc I* suşunun antijen olarak kullanıldığı MAT ile değerlendirilmesi sonucu insan serum örneklerinin 21'i (%44,68) ile hayvan serum örneklerinin 69'unda (%80,2) en az 1/50 titrasyonda bir antijene karşı seropozitiflik tespit edildi. En fazla sayıda seropozitiflik insanlarda 10 (%21.3) örnekte *L.patoc-I*'e karşı tespit edilirken, hayvan serum örneklerinde en fazla sayıda örnekte pozitiflik 29 (%33.7) örnek ile *L.Hardjo* ya karşı elde edildi (Tablo-10). İnsanlara ait serum

örneklerinde *L.grippothyphosa* ve *L.pomona* hayvanlarda ise *L.canicola*, *L.Hardjo* ve *L.ichterohemmragica*, serotiplerine karşı antikor elde edilemedi.

Tablo 10. Hayvan ve insan örneklerinin MAT ile değerlendirilmesi

	İnsan - 47-			Hayvan -86-			Genel Toplam 133
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek Tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
<i>L.patoc-I</i>	2 22.2	8 21.5	10 21,3	5 21.7	11 17.4	16 18.6	26 19.54
<i>L.Hardjo</i>		1 2.6	1 2.12	1 4.3	28 44.4	29 33.7	30 22.55
<i>L.grippothyphosa</i>				1 4.3	13 20.6	14 16.2	14 10.52
<i>L.canicola</i>		2 5.2	2 4.25				2 1.50
<i>L.bratislava</i>		2 5.2	2 4.25	2 8.6	2 3.1	4 4.6	6 4.51
<i>L.pomona</i>					6 12.3	6 6.9	6 4.51
<i>Lhebdomadis</i>		1 2.6	1 2.12				1 0.75
<i>L.ichterohemmragica</i>	1 11.1	4 10.4	5 10,63				5 3.76
Toplam	3 33.3	18 47.3	21 44.68	9 39.1	60 95.2	69 80.2	90 67.66

İnsan serumlarından elde edilen en yüksek seropozitiflik oranı olan 1/1600 dilusyonda pozitiflik 3 örnekle *L.patoc I* antijenine karşı elde edilirken, hayvanlarda 8 serum örneğinde *L.Hardjo*'ya ve 11 serum örneğinde de *L.grippothyphosa*'ya karşı 1/1600 titrelerde elde edildi. Ancak hayvan serum örneklerinden 2'sinde yine *L.Hardjo* 'ya karşı 1/3200 tirede de seropozitiflik tespit edildi (Tablo-11).

MAT ile seropozitiflik tespit edilen serum örneklerinin KAM sonuçları ile korelasyonunda en yüksek oranda uygunluk insanlarda *L.canicola* ile (%100) ile elde edilirken hayvan serum örneklerinde en yüksek koralasyon % 41.3 oranı ile *L.hardjo*

serotipine karşı elde edildi. İnsan serum örneklerinde KAM/MAT uyumu % 57.1 iken Bu oran hayvan serum örneklerinde % 33.3 olarak tespit edildi. Genel olarak MAT altın standart olarak kabul edilirse, KAM'ın sensitivitesinin % 50 (45/90), spesifitesinin de % 75.5 olduğu görüldü. Ancak KAM ile pozitiflik tespit edilen 56 serum örneğinden MAT testi ile 45'inin seropozitif olduğu, yani KAM testi altın standart olarak kabul edilecek olusa MAT'ın sensitivitesinin % 80.4 (45/56), spesifitesinin ise % 50 olduğu görülmüştür Bu sonuçlara göre KAM'ın kabul edilebilirlik değerinin % 63, MAT'ın ise % 65 olduğu kabul edilebilir.(Tablo-12).

Tablo 11. Örneklerin MAT testinde elde edilen seropozitiflik değerleri

1/dilasyon katsayısı Antijen	İnsan 21					Hayvan 63						Toplam 84
	50	00	00	00	600	50	00	00	00	600	3200	
	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	ay1	sayı	
<i>L.patoc-I</i>												26
<i>L.Hardjo</i>									0		1	30
<i>L.grippothyphosa</i>										1	2	14
<i>L.canicola</i>												2
<i>L.bratislava</i>												6
<i>L.pomona</i>									1	3	1	6
<i>L.hebdomadis</i>												1
<i>L.ichterohemmoragica</i>												5
Toplam			3				1	3	5	3	4	90

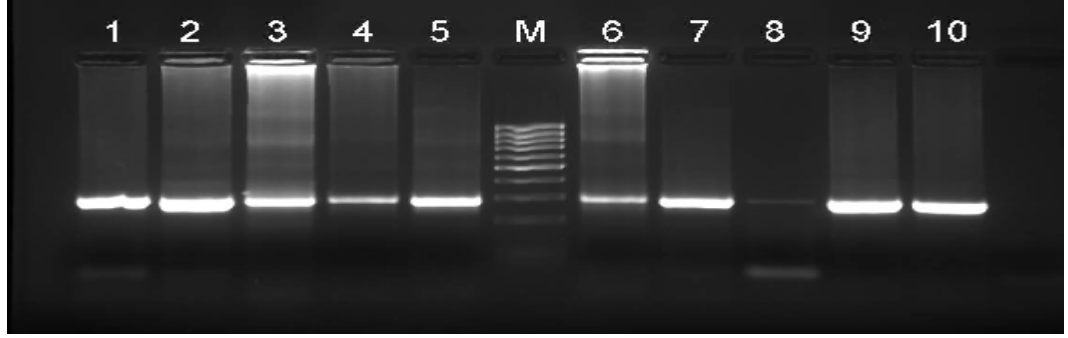
Tablo 12. Serum örneklerinde KAM/MAT uyumu

KAMPOZİTİF MAT Pozitif		İnsan - 22-			Hayvan -34-			Genel Toplam 56	
		0-18	> 18 yaş	Toplam	Tek Tırnaklı	Ruminant	Toplam		
		Sayı	Sayı	Sayı %	Sayı	Sayı	Sayı %		
<i>L.patoc-I</i>	26	2	6	8 30.8	4	2	6 18.1	14	47.6
<i>L.Hardjo</i>	30				1	11	12 41.3	12	40.0
<i>L.grippothyphosa</i>	14					3	3 21.4	3	21.4
<i>L.canicola</i>	2		2	2 100				2	100.0
<i>L.bratislava</i>	6				1		1 33.3	1	20.2
<i>L.pomona</i>	6					1	1 16.6	1	16.6
<i>Lhebdomadis</i>	1								
<i>L.ichterohemmoragica</i>	5	1	1	2 40				2	40.9
Toplam	90	3	9	12 57.1	6	17	23 33.3	45	50.0

Hastalardan alınan plazma örneklerinden elde edilen DNA kalıplarında Leptospira ve *L.interrogans* spesifik gen dizilerinin tespiti için dizayn ettiğimiz 16S rRNA Nested-PCR ve PCR-RFLP yöntemi ile insan plazma örneklerinden 35 (%74.4)'inde leptospiralar için hedeflenen 289 bp'lik hedef dizinin varlığı tespit edilirken, bu örneklerden elde edilen hedef DNA'nın ApoI enzimi ile hidrolizi sonunda elde edilen fraksiyon polimorfizmi, 16S rRNA PCR pozitif insan örneklerinin 27 (%77.1)'sinde *L.interrogans* ile ilişkili hidrolize edilmemiş 289bp'lik fragmentlerin, 8 (%22.9) örnekte ise *L.biflexa* ile ilişkili 200+89 bp'lik iki bandın varlığı gösterdi. Hayvan plazma örneklerinden elde edilen DNA kalıpları ile yapılan aynı çalışmada, bu oranlar sırası ile; 16SrRNA için 57 (%66.3), *L.interrogans* için 50 (%87.7) ve *L. biflexa* için 7 (%12.2) olarak belirlendi. Bütün örneklerin toplamında ise bu oranların sırası ile %69.1, % 83.6 ve % 16.3 olduğu ancak insan örneklerinden % 57.4 (27/47)'si ile hayvan örneklerinden % 37.6 (50/133)'sında yani toplamda % 57.9 (77/133)'unda *L.interrogans*ın spesifik DNA varlığı görüldü.

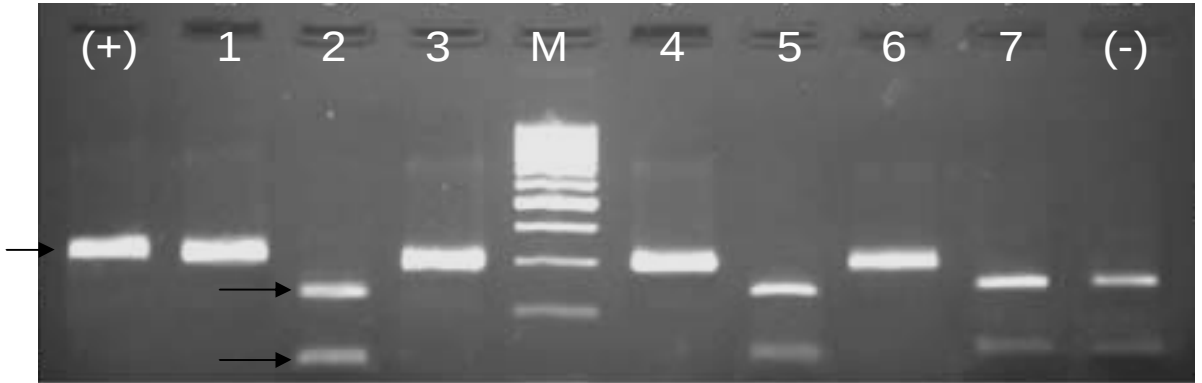
Tablo 13. 16S rRNA Nested-PCR ve PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen sonuçlar

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam 133
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
16 S rRNA	6 80.6	29 76.3	35 74.4	3 13.0	54 85.7	57 66.3	92 69.1
L. intterogans	4 66.6	23 79.3	27 77.1	3 100	47 87.3	50 87.7	77 83.6
L. biflexa	2 33.3	6 20.6	8 22.9	0 0	7 12.9	7 12.2	15 16.3

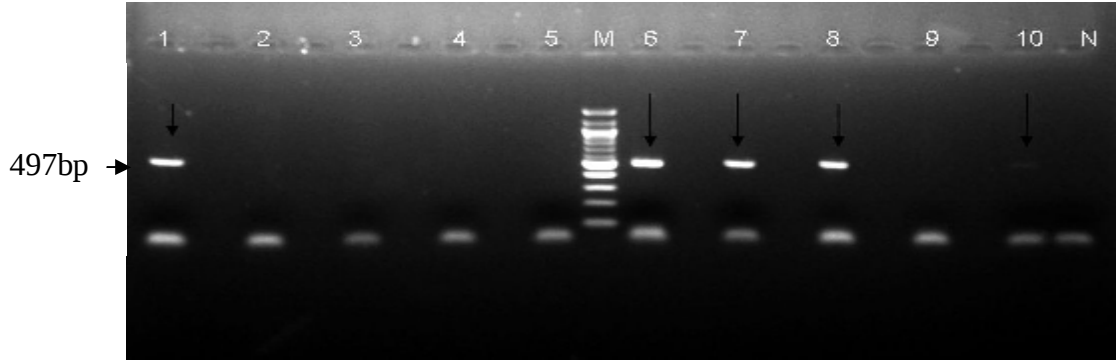


Şekil 9. 16S rRNA Nested-PCR sonunda alınan 289 bp'lik bantların görüntüsü. Pozitif kontrol olarak 10 numarada *L.pomona pomona pomona* suşu kullanıldı. 1,2,3,4,5,6,7,8,9 numaralar ilk PCR da 525 bp lik bant alınan pozitif örneklerdir.

Leptospirosis patofizyolojisinde son derece önemli olduğu bilinen dış membran lipoproteinlerinden LipL32'nin kodlandığı gen bölgesinde 497 bp'lik *L.interrogans* türleri için spesifik olan dizinin Nested-PCR ile tespiti amacı ile yapılan amplifikasyon sonunda 26 (%55.3)'sı insan, 51 (%59.3)'ü hayvan plazma örnekleri olmak üzere toplam 77 (%57.9) örnekte hedef dizilerin varlığı, yani *L.interrogans* türlerine ait DNA olduğu görüldü (Tablo-14).



Şekil 10. 16S rRNA Nested-PCR sonunda alınan 289 bp'lik hedef dizinin ApoI enzimi ile hidrolizi sonunda patojenik leptospira suşları 289 bp lik tek bant olarak izlenirken, nonpatojenik leptospira suşları ise 200 ve 89 bp lik iki bant verdi. (+) kontrol olarak *L.pomona pomona pomona*, ve (-) kontrol olarak *L.semaranga patoc patoc I* suşları kullanıldı.



Şekil 11. LipL32 Nested-PCR sonucunda pozitif örneklerde (1, 6, 7, 8, 10) 497 bp'lik bant görüntüsü. N; negatif kontrol.

Tablo 14. Serum örneklerinde LipL32 Nested-PCR yöntemi ile *L.interrogans* tespiti

LipL32 497bp	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam 133
	0-18	> 18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
L. interrogans	3 33.3	23 60.5	26 55.3	3 13.4	48 76.2	51 59.3	77 57.9

LipL32 gibi *L.interrogans* için spesifik olan 16S rRNA PCR-RFLP sonuçları ile kıyaslandığında; genel tanı değeri olarak her iki yöntem ile de örneklerin % 57.9'unda *L.interrogans* yönünden hedef dizilerin elde edildiği görüldü. Ancak LipL32 ile 18 yaş altı çocuklarda duyarlılığın 16S rRNA PCR-RFLP' ye göre daha düşük (%75) olmasına karşılık, ruminantlarda da yine 16S rRNA PCR-RFLP baz alındığında LipL32'nin spesifitesinin daha düşük (%98.03) olduğu, bu iki uyumsuz sonuç dışında her iki testin aynı plazma örneklerinde aynı sonuçları ürettikleri görüldü (Tablo-15).

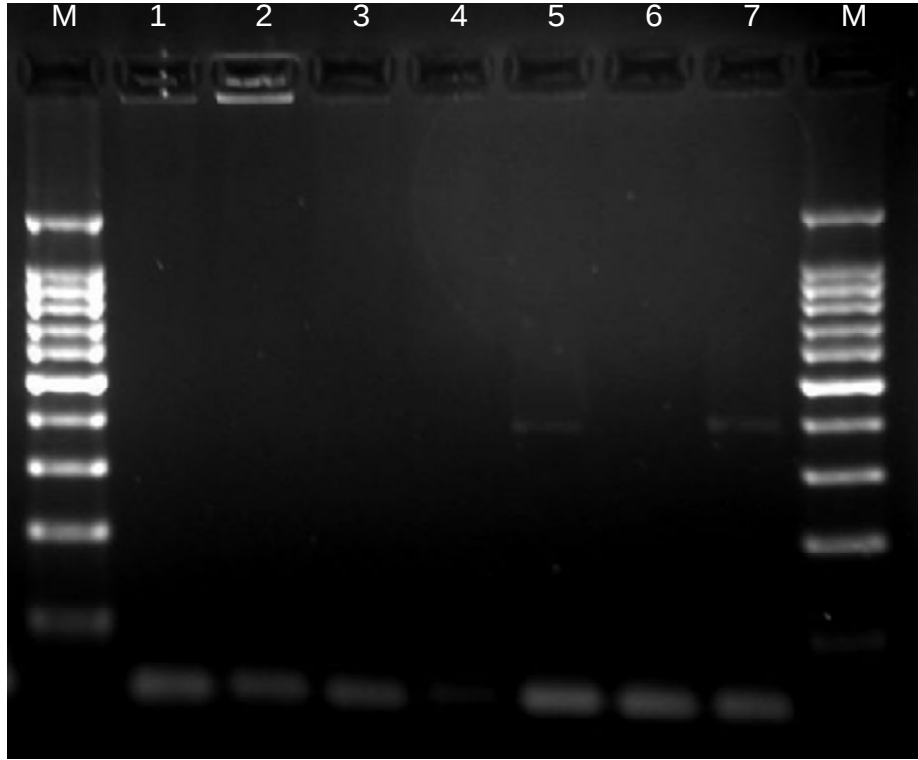
Tablo 15. 16S rRNA PCR-RFLP sonuçları ile LipL32 Nested-PCR sonuçlarının karşılaştırması

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam 133
	0-18	> 18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %
16 S rRNA	4 44.4	23 60.5	27 57.4	3 13.4	47 74.6	50 58.1	77 57.9
LipL32	3 33.3	23 60.5	26 55.3	3 13.4	48 76.2	51 59.3	77 57.9

Son olarak plazma örneklerinden elde edilen DNA kalıplarında *L.interrogans* serotiplerine ait OmpL1 spesifik gen dizilerinin A ve B grubu serotiplerin tespiti için yaptığımız amplifikasyon sonunda; A serogrubunda yer alan türlere ait hedef dizilerin 9 (% 19,1) 'u insan 31 (% 36,0) 'i de hayvan olmak üzere örneklerin toplam 40 (%30.1) 'nda varlıkları tespit edildi. İnsan örneklerinde en sık tanımlanan A grubu *L.interrogans* serotipinin 6 plazma örneğinde % 12,8 oranı ile *L.icterohaemorrhagiae*, hayvan plazma örneklerinde ise 20 örnekte % 23,3 oranı ile *L.grippotyphosa* serotipi olduğu görüldü (Tablo-16).

Tablo 16. OmpL1 spesifik A serogrubunda yer alan *L.interrogans* türlerine ait hedef dizilerin tespiti

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	133
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %
L.Icterohaemorrhagiae	1 11.1	5 13.2	6 12.8				6 4.5
L.Djasiman							
L. Grippotyphosa				1 4.3	19 30.15	20 23.3	20 15.0
L.Pomona					4 6.34	4 4.7	4 3.0
L.Bratislava	1 11.1	2 5.3	3 6.4		7 11.1	7 8.1	10 7.5
L.Autumnalis							
L.Copenhageni							
L.Akiyami A							
L.Jez							
TOPLAM	2 22.2	7 18.4	9 19.1	1 4.3	30 47.6	31 36.0	40 30.1



Şekil 12. OmpL1 A grubu primerlerle elde edilen 396 bp' lik bantların görüntüsü.

B grubunda yer alan *L.interrogans* türlerine ait hedef dizilerin tespiti amacı ile dizayn edilen priemerlerin kullanıldığı PCR ile örneklerden 1'i insana ait olmak üzere örneklerin 23 (% 17,3)'ünde *L.hardjo*' ya ait spesifik dizilerin varlığı tespit edildi (Tablo-17).

A ve B primerleri kullanılarak OmpL1 geni üzerindeki spesifik hedef dizilerin tespiti amacı ile yapılan amplifikasyon işlemi sonunda örneklerin; insanlar için: % 29'u ile hayvanlar için % 61,6'sında olmak üzere toplam % 50,4 örnekte hedeflenen DNA fragmentlerinin varlığı tespit edildi (Tablo-18).

Tablo 17. OmpL1 spesifik B serogrubunda yer alan *L.interrogans* türlerine ait hedef dizilerin tespiti

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	133
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %
L. Hebdomadis		1 2.6	1 2.1				1 0.8
L. Bataviae							
L. Canicola		3 7.9	3 6.4				3 2.3
L. Australis							
L. Pyrogenes							
L. Hardjo		1 2.6	1 2.1	1 4.3	21 33.3	22 25.6	23 17.3
L. Wolfii							
L. Mankarso							
TOPLAM		5 13.2	5 10.6	1 4.3	21 33.3	22 25.6	27 20.3

Tablo 18. OmpL1 spesifik gen dizilerinin A ve B grubu serotiplerin tespitinde amplifikasyon oranları

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	133
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %
L. Hebdomadis		1 2.6	1 2.1				1 0.8
L. Canicola		3 7.9	3 6.4				3 2.3
L. Hardjo		1 2.6	1 2.1	1 4.3	21 33.3	22 25.6	23 17.3
L.Icterohaemorrhagiae	1 11.1	5 13.2	6 12.8				6 4.5
L. Grippotyphosa				1 4.3	19 30.2	20 23.3	20 15.0
L.Pomona					4 6.3	4 4.7	4 3.0
L.Bratislava	1 11.1	2 5.3	3 6.4		7 11.1	7 8.1	10 7.5
TOPLAM	2 22.2	12 31.6	14 29.8	2 8.7	51 80.95	53 61.6	67 50.4

16S rRNA PCR-RFLP baz alındığında OmpL1 PCR yöntemi ile *L. Interrogans* türlerine ait hedef dizilerin belirlenmesi ile yapılacak tanının insan örneklerinde duyarlılığının % 51,9 hayvan örnekleri için duyarlılığının ise % 100 olduğu ancak genel örneklerdeki tanı duyarlılığının insanlarda elde edilen düşük oran sebebi ile % 0.87 olduğu görüldü. Diğer taraftan yine 16S rRNA PCR-RFLP baz olarak alınırsa Hayvan örneklerinde OmpL1 PCR yönteminin spesifitesinin % 94,3 olduğu görüldü (Tablo-19).

Tablo 19. Serum örneklerinde 16S rRNA PCR-RFLP, LipL32 Nested-PCR ve OmpL1 PCR sonuçlarının karşılaştırması

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam 133
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
16 S rRNA	4 44.4	23 60.5	27 57.4	3 13.4	47 74.6	50 58.1	77 57.9
LipL32	3 33.3	23 60.5	26 55.3	3 13.4	48 76.2	51 59.3	77 57.9
OmpL1	2 22.2	12 31.6	14 29.8	2 8.7	51 80.95	53 61.6	67 50.4

Bu çalışmada kullanılan konvensiyonel testlerden daha fazla sayıda hasta örneğinde pozitif sonuç elde edilen MAT ile, yine bu çalışmada kullanılan Letospirallardaki üç farklı gen bölgesini hedef alan primerlerin kullanıldığı dizileri hedef alan amplifikasyon bazlı yöntemlerden diğer ikisinden daha sensitif ve spesifik sonuçlar alınan *L.interrogans*-16S rRNA PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen *L.interrogans* pozitiflik sonuçları kıyaslandığında, 19 (% 40,4) örnekte her iki yöntemle de pozitif sonuç elde edildiği, örneklerin 2 (% 4,3)'i sadece MAT ile pozitif iken sadece *L.interrogans*-16S rRNA PCR-RFLP yöntemi ile pozitif olan örnek sayısının 8 (% 17) olduğu görüldü. Buna karşılık hayvan serum/plazma örneklerinden 69 (% 51,9)'unun her iki yöntem ile de *L.interrogans* türleri için pozitif olduğu, örneklerin hiç birisinde tek başına 16S rRNA yöntemi ile pozitiflik elde edilemezken 19 (% 22,1) örnek de sadece MAT testi ile seropozitiflik elde edildi (Tablo-20).

Bu çalışmada 16S rRNA-PCR-RFLP her iki yöntem ile tanı için altın standart olarak kabul edilecek olursa MAT'ın insan örneklerindeki sensitivitesinin % 70,3 (19/27) hayvan örnekleri için % 100 (50/50) genel örnekleri için ise % 89,6 (69/77)

olduğu görülmektedir. MAT testi altın standart olarak kabul edilecek olursa L.interrogans 16S-rRNA-PCR-RFLP testinin spesifitesi insan örnekleri için; % 90.4 (20/21), hayvan örnekleri için; % 86,0 (60/69), genel örnekler içinde % 76,6 (69/90) olduğu görüldü (Tablo-21).

Tablo 20. Serum örneklerinde 16S rRNA PCR-RFLP ve MAT testi sonuçlarının karşılaştırılması

	İnsan -47-			Hayvan-86-			Toplam 133
	0-18	>18 yaş	Toplam	Tek tırnaklı	Ruminant	Toplam	
	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	Sayı %	
16 S rRNA	1 11.1	7 18.4	8 17.0	0 0	0 0	0 0	8 6.0
MAT	0 0	2 5.3	2 4.3	6 26.8	13 20.6	19 22.1	21 15.8
16 S rRNA +MAT	3 33.3	16 42.1	19 40.4	3 13.0	47 74.6	50 58.1	69 51.9
Toplam	4 44.4	25 65.8	29 61.7	9 39.1	51 80.9	69 80.2	98 73.7

Diğer taraftan 16S rRNA-PCR-RFLP baz olarak alındığında MAT testinin spesifitesi ise insan örneklerinde % 89.5, hayvan örneklerinde % 62 genel örneklerde ise % 69,6 olduğu buna karşılık MAT testi referans alındığında ise L.interrogans 16S rRNA-PCR-RFLP testinin spesifitesinin; insanlar için: % 71.4, hayvanlar için: % 100 genel örnekleri için ise % 89,6 olduğu görüldü (Tablo-21).

Tablo 21. 16S rRNA-PCR-RFLP ve MAT test sonuçları için spesifite ve sensitivite değerlendirmesi

		İnsan -47-				Hayvan-86-			
		16 S rRNA		MAT %		16 S rRNA %		MAT %	
		Sensitif	Spesifik	Sensitif	Spesifik	Sensitif	Spesifik	Sensitif	Spesifik
16 S rRNA	Sensitif	100	100	90.4		100	100	6	
	Spesifik	100	100		71.4	100	100		100
MAT	Sensitif	70.3		100	100	100		100	100
	Spesifik		89.5	100	100		62.0	100	100

5. TARTIŞMA

Tüm dünyada insan ve hayvanlarda görülen leptospirosis vakalarının tanısında daha sensitif ve spesifik, hızlı sonuç üreten yöntemlerin geliştirilmesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarının hedefleri arasındadır. Klinik mikrobiyolojinin tüm alanlarında olduğu gibi enfekte materyalden mikroorganizmaların üretilerek tanımlandığı kültür yöntemleri leptospirosis içinde altın standarttır. Son yıllarda kan kültürü olarak önerilen ticari sistemlere rağmen bu mikroorganizmaların üretiminde kullanılan özel ve kompleks besiyerlerinin laboratuvarlarda bulundurulması ve saklanması yarattığı zorluk yöntemin tanı değerini sınırlandırmakta, direkt bakı veya serolojik bazlı daha düşük sensitivite ve spesifitedeki yöntemlerin kullanımını ve yeni arayışları zorunlu hale getirmektedir. Bu bağlamda kültüre alternatif olarak gösterilen ve altın standart olarak nitelendirilen MAT testinin akut ve konvelesan dönem serum örneklerindeki spesifitesinin sırası ile % 94 ve 92 kadar olduğu bildirilmiştir. Leptospirosis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerde tek serum örneği ile akut enfeksiyon tanısı konulabilmesi için en az 1/800 hatta 1/1600 titrelerde antikor cevabının gerekmesi veya akut ve konvelesan dönemde alınan serum örnekleri arasında en az 2 kat artışın istenmesi testin akut enfeksiyonların tanısındaki rolünü zayıflatmaktadır. Diğer taraftan MAT testinin hayvan çalışmalarında, post mortem otopsi örnekleri ile ispatlanmış olgularda duyarlılığının oldukça düşük olduğu, olguların % 46'sında 1/100 ve altındaki titrelerde, % 9,6 sında ise negatif olduğu gösterilmiştir¹⁰⁴. Buna karşılık KAM yöntemi ile de plazma örneğinde 10^3 spiroket/ml varlığında pozitiflik tespit edilebildiği bununda ispatlanmış leptospirozlu hastaların yaklaşık olarak % 32 'ne denk geldiği, yani sensitivitenin hayvan inokülasyonu ile karşılaştırmalı çalışmalarda % 30-35 seviyelerinde kaldığı gösterilmiş, yöntemin yüksek oranda yalancı negatif veya pozitiflik vermesi klinik örneklerden tanı amaçlı kullanımını sınırlandırmıştır^{105,106}. Son 10 yıldan beri konvansiyonel yöntemlerle tanısında zorluk yaşanan tüm enfeksiyonlarda olduğu gibi leptospirosis tanısında da moleküler yöntemlerin yeri yapılan çok sayıdaki çalışma ile sorgulanmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada KAM ve MAT gibi fenotipik karakterlere dayalı iki konvansiyonel test ile, leptospira genusuna ait 16S rRNA genindeki tür ve tip spesifik dizileri hedef

alan Nested-PCR-RFLP, bakterinin dış membranında yer alan gerek virulans için gerekse koruyucu immunité için önemli bir yapı elemanı olan lipoproteinler özellikle LipL32 ve OmpL1'i hedef alan PCR bazlı yöntemlerin tanı değerleri karşılaştırılarak PCR bazlı rutin kullanıma uygun bir protokolün geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Biz çalışmamızda insanlara ait 47 plazma/serum örneği ile hayvanlara ait 86 plazma/ serum örneğinden toplam 56 (% 42,1) sında KAM'inde leptospira ile uyumlu morfolojik özelliklere sahip spiroketlerin varlığını tespit ettik (Tablo.9). Buna karşılık aynı örneklerin MAT testi ile değerlendirilmesi sonucu 21 (% 47,3)'i insan 69 (%80,2)'si de hayvan örneklerine ait olmak üzere 90 (% 66,7) örnekte, en düşük 1/50 titrelerde olmak üzere, total antikor varlığını belirledik (Tablo 10). MAT pozitif örneklerden 10 'u insan 16 'sı da hayvan serumlarına ait olmak üzere toplam 26 (% 28,9) 'sı *L.patoc* suşuna 64 (% 71,1) 'i de *L.interrogans* serotiplerine karşı antikor cevabını oluşturuyordu. Yani *L.patoc* avirulan cevap için gösterge olarak kabul edilecek olursa elde edilen pozitifliklerin sadece 64'ü gerçek leptospirosis ile ilişkili antikor cevabı olarak yorumlanabilir. Diğer taraftan tek serum örneği ile çalışıldığı için akut enfeksiyonun göstergesi olarak 1/800 ve üzerindeki titreler kriter olarak kabul edilecek ve bu titrelerde elde edilen 11 *L.patoc* seropozitifliği değerlendirme dışına çıkarılacak olursa elde edilen seropozitifliklerden 41 (% 45,5)'i akut enfeksiyon için bir parametre olarak kabul edilebilir bulundu. Bir başka ifade ile MAT testi ile elde edilen seropozitiflik her ne kadar % 66,7 ise de gerçek anlamda akut leptospirosis kriterine uygun seropozitiflik tespit ettiğimiz örnek oranımız % 30,8 olup bu oran KAM'ile elde edilen % 42,1 'lik orandan daha düşüktür. Ancak KAM'da elde edilen sonuçların sensitivitesinin oldukça düşük oluşu, *L.patoc* veya *L.biflexa* suşları ile *L.interrogans* suşları arasındaki farkın bu yöntemle tespit edilememesi, bu çalışmada bu varsayımların gözardı edilerek hesaplamaların seropozitiflik ve görüntü pozitifliği oranları üzerinden yapılmasını zorunlu kılmıştır. Bu bakış açısı ile de MAT'ın kabul edilebilirlik değerinin % 65, KAM'ın ise % 63 olduğu görülmüş (Tablo-12) ve bu sonuçlara dayanarak çalışmamızda kullanılabilirlik yönünden PCR bazlı test sonuçları ile yapılacak kıyaslamada MAT testi baz alınmıştır.

Diğer taraftan plazma örneklerinden elde edilen DNA'dan spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR bazlı tanıda seçilen primerler daha önce yapılan çalışmalarla irdelenmiş ve tanı değerleri gösterilmiş gen bölgelerini hedef almıştır. Haake ve

arkadaşları (2000) çalışmalarında dış membran proteini olan LipL32 gen bölgesinin patojenik Leptospiralarda yüksek derecede korunmuş bir bölge olduğunu ve non-patojenik leptospiralarda bu bölgenin bulunmadığını gösterilmişlerdir⁹⁸.

Meriens ve arkadaşlarının (1992) yaptıkları bir çalışmada 16S rRNA gen bölgesinin tüm patojenik leptospiralarda bulunduğunu, sadece bu bölgenin hedeflenmesiyle patojen ve non-patojen leptospiralar arasında bir ayırım yapılamayacağını göstererek, 16S rRNA gen bölgesi için düzenlenen primerlerin leptospiralar için genel belirleyici olduğunu iddia etmişlerdir. Aynı grup LipL32 geninin ise patojenik Leptospiralar için spesifik bir hedef olduğunu vurgulamışlardır.

Yine aynı çalışmada hasta örneklerinden yapılan kültürlerden ancak 8. günde 10^6 yoğunlukta Leptospira ile KAM de sonuç verilebilirken PCR ve jel elektroforez yöntemi ile kültürün 5. gününde sonuç alınabildiği ve PCR yönteminin KAM ne göre daha sensitif olduğunu söylemişlerdir⁹⁹. Ancak Vitale ve arkadaşları (2005) İtalya da hayvanlar üzerinde yaptıkları çalışmada 16S rRNA gen bölgesine spesifik primerlerle yaptıkları amplifikasyon ile patojenik leptospiraların tespitinde yüksek spesifitede sonuçlar elde ettiklerini nonpatojenik leptospiralar ve diğer bakteriler ile negatif sonuç alındığını bildirmişlerdir¹⁰⁰.

Tansuphasiri ve arkadaşları'da (2006) 56 patojenik leptospira suşu, 15 saprofitik leptospira ve 21 farklı bakteri suşları ile yaptıkları çalışmada, 16S rRNA ve LipL32 gen bölgelerine spesifik 2 çift primer kullanmışlar ve primerlerin spesifite ve sensitivitesinin %100 olduğunu bildirmişlerdir¹⁰¹.

Guerreiro ve ark. 2001 yılında İnsan leptospiroz vakalarında humoral cevap oluşumunda tanınan leptospiral proteinleri incelemişler ve LipL32 yi akut ve iyileşme fazında yüksek sensitivite ve spesifite değerlerine sahip belirleyici bir bölge olarak göstermişlerdir¹⁰².

Biz çalışmamızda hem 16S rRNA spesifik nested-PCR-RFLP, hem LipL32 spesifik PCR hem de OmpL1 spesifik PCR yöntemlerini hem kendi içlerinde hemde konvensiyonel yöntemlerle duyarlılık ve kabul edilebilirlik yönünden kıyasladık. Literatürde de belirtildiği gibi patojen ve non-patojen suşların ayırımına imkan veren 16S rRNA spesifik nested-PCR-RFLP'ile 77 (% 57,9) 'si *L.interrogans* 15 (% 11,3) 'i de *L.biflexa* olmak üzere 92 (% 69,1) 'sinde hedef dizilerin varlığı tespit edildi. Sadece *L.interrogans* türlerinde bulunan LipL32 geni spesifik dizilerini hedef alan primerlerin

kullanıldığı PCR ile de 26 (% 55,3) 'sı insan 51 (% 59,3) 'i de hayvan örneklerine ait olmak üzere toplam 77 (% 57,9) 'sinde hedef dizilerin yani *L.interrogans* DNA'sının, varlığı tespit edildi. Bu bulgu 16S rRNA spesifik nested-PCR-RFLP yönteminin % 57,9 'luk pozitiflik oranı ile aynıdır. İlginç olanı pozitiflik sayı ve oranları her iki yöntem ile insan ve hayvan örneklerinde benzer çıkmış olmasıdır. Böylece *L.interrogans* tür tayininde her iki yöntemin sensitivite ve spesifite yönünden birbirlerine üstünlüklerinin olmadığı ancak 16S rRNA yönteminin *L.biflexa* ile ilgilide sonuç üretmesi açısından özellikle epidemiyolojik amaçlı çalışmalar için daha faydalı olacağı söylenebilir (Tablo-15). Bu bulgumuz Tansuphasiri ve arkadaşlarının bulguları ile % 100 uyum göstermektedir. Ancak Meriens ve arkadaşları ile Vitale ve arkadaşlarının 16S rRNA PCR ile ilgili iddialarını kısmen desteklemektedir. Bu grup sadece PCR ile patojen non-patojen ayrımının yapılamayacağını söylemişlerdir. Biz çalışmamızda 16S rRNA-PCR ile elde ettiğimiz amplikonları ApoI ile keserek patojen non-patojen ayrımını yaptık ve bu grubun yarım kalan çalışmaya dayalı iddiasını hem desteklemiş hem de geliştirmiş olduk.

Diğer taraftan serotip düzeyinde tespiti imkan veren OmpL1 PCR ile de örneklerin insanlar için: % 29 'u ile hayvanlar için % 61,6 'sında olmak üzere toplam % 50,4 örnekte hedeflenen DNA fragmentlerinin varlığı tespit edildi (Tablo-18). Kullanılan primerlerin doğası gereği tespit edilen pozitifliklerin tamamı *L.interrogans* serotiplerine ait olup bölgede en sık karşılaşılan serotipin % 2,1 'i insan % 25,6 'sı hayvan örneklerinden olmak üzere % 17 oranı ile *L.hardjo* olduğu, bu serotip dışında, sırası ile *L.grippotyphosa*, *L.Bratislava* ve *L.ichterohaemorrhagia* gibi serotiplerin görüldüğü tespit edilmiştir. OmpL1-PCR , % 57,9 'luk duyarlılık oranına sahip LipL32-PCR ve 16S rRNA PCR'a göre % 50,4 'lük oran ile daha düşük duyarlılık göstermiştir. Ancak insan örneklerinde diğer iki yöntemle göre anlamlı dercede düşük duyarlılık gösteren OmpL1-PCR'ın (sırası ile % 57,4, 55,3 ve 29,8) hayvan örneklerinde diğer iki yöntemden daha duyarlı olması (sırası ile % 58,1, 59,3 ve 61,6) dikkat çekici bulunmuştur. Bu sonuçlar her ne kadar serotip düzeyinde tanıya imkan sağlasa da OmpL1 PCR'ın hayvan örnekleri için daha uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bizim sonuçlarımız PCR bazlı tanı yöntemleri arasında klinik tanıya yardımcı olabilecek testin *L.biflexa*'yı da tanıyıp ayırt edebilen insan ve hayvan örneklerinde

diğer iki yöntemle kıyaslandığında benzer duyarlılıkta sonuç üreten 16S rRNA-PCR-RFLP'nin en kabul edilebilir sonuç üreten test olduğunu göstermektedir.

Bu açıdan bakıldığında 16S rRNA-PCR-RFLP'nin bu çalışmada kullanılan konvensiyonel yöntemler içerisinde en yüksek kabul edilebilirlik oranına sahip MAT testi ile korelasyonunda insan örneklerinin % 40,4'ü ile hayvan örneklerinin % 58,1'inde her iki test ile de pozitiflik tespit edildiği yani genelde her iki test ile pozitif sonuç oranının % 51,9 olduğu görülmüştür. İnsan kökenli örneklerde tek başına 16S rRNA-PCR-RFLP pozitiflik oranının (% 17,0), tek başına MAT pozitiflik oranından (% 4,3) daha yüksek olduğu görülmüştür. Oysa hayvan örneklerinde tek başına 16S rRNA-PCR-RFLP pozitifliği tespit edilememişken tek başına MAT pozitifliği % 22,1 dir. Bu sonuçlar her iki test korelasyonundaki % 51,9 'luk düşük oranın izahı açısından önemlidir. Muhtemelen MAT için pozitiflik kriteri olarak kabul ettiğimiz 1/50'nin altındaki seropozitif hastalarımız klinik yakınmalar sebebi ile ölçülebilir antikor seviyelerine ulaşamadan hekime başvurmakta ve tedavi süreci başlamaktadır. Bu sebeple klinik olarak leptospirosis düşünülen bu hastalarda DNA pozitif olmasına rağmen henüz tespit edilebilir düzeylerde antikor cevabı oluşmadığı için MAT testi negatif olarak değerlendirilmektedir. Oysa hayvanlarda klinik oturduktan sonra hastalık fark edilip veteriner hekime başvurulduğu için hasta hayvanda ölçülebilir düzeylerde antikor da gelişmekte böylece MAT ile 16S rRNA-PCR-RFLP'nin duyarlılıkları aynı olmaktadır. Kanaatimizce bu gruptaki % 22,1 lik tek başına MAT pozitifliği de geçirilmiş enfeksiyonlara veya aşılama ya bağlı olarak ortaya çıkan serokonversiyonu işaret etmektedir. Bizim insanlardaki yüksek PCR düşük serokonversiyon bulgumuz Eliete ve arkadaşlarının 103 insan BOS örneğinde PCR, MAT ve ELISA-IgM yöntemleri ile yaptığı çalışmada elde ettikleri % 39,8 PCR, % 3,88 'lik ELISA-IgM ve % 8,74 'lik MAT oranı ile uyumludur. Bu grupta 2 si MAT ile 1 'i ELISA-IgM yöntemi ile olmak üzere seropozitif bulunan 3 hastalarında PCR'ın negatif olduğunu söylemişlerdir¹⁰³.

6. SONUÇ

Leptospirosis tanısında KAM, MAT, 16S rRNA PCR-RFLP, LipL32-PCR ve OmpL1-PCR yöntemlerinin duyarlılık, özgüllük ve kabul edilebilirlik değerlerinin tespiti ve tanıda en uygun yöntemin belirlenmesi amacı ile planlanan çalışma sonunda;

1. Konvansiyonel testler içinde MAT'ın KAM'a göre daha duyarlı ve özgül olduğu, ancak insan serum örneklerinde, MAT ile yapılan değerlendirmelerde, 1/50 nin altındaki titrelerin de dikkate alınması gerektiği,
2. 16S rRNA ve LipL32 dizilerini hedef alan PCR çalışmalarının benzer duyarlılık ve özgüllük de oldukları, ancak 16S rRNA-PCR 'ın özellikle diagnostik amaçlı olarak *L.interrogans* ve *L.biflexa* türleri arasındaki ayırımı sağlaması sebebiyle tercih edilebileceği,
3. OmpL1 PCR yönteminin diğer iki PCR bazlı yöntemden, özellikle insan kökenli serum örneklerinde, daha düşük duyarlılık gösterdiği için tanı amaçlı olarak kullanımının uygun olmayacağı, ancak *L.interrogans* türü içinde serotip tayinine izin verdiği için epidemiyolojik amaçlı kullanılabilirliği,
4. MAT testinin 16S rRNA-PCR ile korelasyonunun özellikle hayvan örneklerinde yüksek olduğu, insan örneklerinde ise ölçülebilir düzeyde seropozitiflik gelişmeden kliniğe başvuruların olabilmesi nedeniyle, MAT 'ın duyarlılığının, hayvanlar için 1/200 olarak kabul edilen seropozitiflik değerinde düşük olduğu görülerek, tanıda 16S rRNA-PCR 'ın klinik olarak desteklenmiş vakalarda tedavi başlangıcı için yol gösterici olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- 1- **Murgia R, Riquelme N, Baraton G, Cinco M.** Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic *Leptospira* occurring in water. *FEMS Microbiol Lett* **1997**; 148: 27-34.
- 2- **Stimson AM.** Note on an organism found in yellow fever tissue. *Public Health Rep* **1907**; 22: 541-5.
- 3- **Uhlenhuth P, Formme W.** Quoted in Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immun **1916**; 8(2): 617
- 4- **Noguchi H.** The spirochaetes, In: Jodan EO, Falk IS, eds. The newer knowledge of bacteriology and immunology. Chicago: University of Chicago Press, **1928**; P.452-97.
- 5- **Kmety E, Dikken H.** Classification of the species *Leptospira interrogans* and the history of its serovars. Groningen: University Press Groningen, **1993**
- 6- **Yanagawa and Faine.** Morphological and serological analysis of *Leptospiral* structure. *Nature (London)* **1996**; 211: 823-6
- 7- **Plevnelioğlu KH.** Çamur humması (*Leptospirosis grippo-typhosa*). Askeri sıhhiye mecuması **1946**; 75: 1.
- 8- **Stoenner HG.** Treatment and control of leptospirosis. In: Johnson RC, ed. The biology of parasitic spirochetes. New York: Academic Press; **1975**. P. 375-88.
- 9- **Hookey JV.** Detection of *Leptospiraceae* by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol lett* **1992**; 90: 267-74.
- 10- **Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S.** Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 935-41.
- 11- **Haake DA, Martinich C, Summers TA et al.** Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36 down regulation associated with late log-phase growth and mammalian infection. *Infect Immun* **1998**; 66: 1579-87.
- 12- **Pacciarini ML, Savio ML, Donini G.** The search for improved methods for diagnosis leptospirosis: the approach of a laboratory in Brescia, Italy. *Rev Sci Tech* **1993**; 12: 647-63.
- 13- **Smith DJW, Doherty RL.** Observations on the survival of *Leptospirosis australis* A in soil and water. *J Hyg* **1955**; 53: 43-4.
- 14- **Zaitsev SV, Chernukha IuG, Evdokimova OA.** Survival rate of *Leptospira pomona* in the soil at a natural focus of leptospirosis. *Zh mikro Epi Immun* **1989**; 64-8.
- 15- **Ryu E, Liu CK.** The viability of leptospires in the summer paddy water. *Jpn J Microbiol* **1967**; 10: 51-7.
- 16- **Kossey-Vrain C.** Canine leptospirosis: a review. Thesis Med. Vét. ENVA, **2004**: 135:15.
- 17- **A. E. Ritchie ve Herman C. Ellinghausen.** Electron Microscopy of Leptospire I. Anatomical Features of *Leptospira pomona*. *J Bacteriol.* **1965** January; 89(1): 223–233.

- 18- **Morter RL, Valentine BL, Tapacio T.** Anaphylaxis in cattle receiving serum free leptospire. Proceeding of the U.S Livestock Sanitary Association. **1962**; 66: 140-5.
- 19- **R. Oliveira, Z. M. de Moraes, A. P. Gonçalves, E. C. Romero, S. A. Vasconcellos, and A. L. T. O. Nascimento,** "Characterization of novel OmpA-like protein of *Leptospira interrogans* that binds extracellular matrix molecules and plasminogen," **2011**: vol. 6, no. 7, Article ID e21962.
- 20- **T. R. Fraga, R. M. Chura-Chambi, A. P. Gonçalves et al.** "Refolding of the recombinant protein OmpA70 from *Leptospira interrogans* from inclusion bodies using high hydrostatic pressure and partial characterization of its immunological properties," *Journal of Biotechnology*, **2010**: vol. 148, no. 2-3, pp. 156–162.
- 21- **Zuerner RL, Alt D, Bolin CA.** IS1533-based PCR assay for the identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *J Clin Microbiol* **1995**; 33:3284-9.
- 22- **Cince M, Vecile E, Murgia R, Dobrina A.** *Leptospira interrogans* and *Leptospira* peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *FEMS Microbiol Lett* **1996**; 138: 211-4.
- 23- **Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P.** *Leptospira icterohaemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **1995**; 63:2995-9.
- 24- **Stalheim OHV.** Chemical aspects of leptospirosis. *CRC Critical Rev Microbiol* **1973**; 2: 423-56.
- 25- **Kondo E, Ueta N.** Composition of fatty acid and carbohydrates in *Leptospira*. *J Bacteriol* **1972**; 110: 459-67
- 26- **Yasuda BH, Steigerwatt AG, SulZer KR.** Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int J Syst Bacteriol* **1987**; 37: 407-15.
- 27- **Holt SC.** Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiol Rev* **1978**; 42: 114-60
- 28- **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P.** *Leptospira* and Leptospirosis 2nd Melbourne, Australia: Medi Sci; **1999**.
- 29- **Boursaux Ec, Saint Girons I, Zuerner RL.** *Leptospira* genomic Electrophoresis. **1998**; 19: 589-92.
- 30- **Zuerner RL, Herrmann JL, Saint Girons I.** Comparison of genetic maps for two *Leptospira interrogans* serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *J Bacteriol* **1993**; 175: 5445-51.
- 31- **Borrsaux Ec, Saint Girons, Zuerner RL.** IS 1500, an IS3-like element from *Leptospira interrogans*. *Microbiol* **1995**; 141: 2165-73.
- 32- **Zuerner RL. Bolin CA.** Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS 1500 hybridization and PCR assay. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 2612-7.
- 33- **Fukunaga M, Mifuchi I, Yanagihara Y.** Comparison of flanking regions of 5S ribosomal ribonucleic acid genes in *Leptospira biflexa* and *Leptospira interrogans*. *Chem Pharmacol Bull (Tokyo)* **1992**; 40: 544-6.
- 34- **Haake DA.** Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* **2000**; 146: 1491-504.
- 35- **Shang ES, Exner MM, Summers TA.** The rare outer membrane protein, OmpL1 of pathogenic *Leptospira* species is a heat-modifiable porin. *Infect Immun* **1995**; 63: 3174-81.

- 36- **Flannery B, Costa D, Carvalho FP**, et al. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-base enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3303-10.
- 37- **Stamm LV, Gherardimi FC, Parrish ERA**. Heat shock response o spirochetes. *Infect Immun* **1991**; 59: 1572-5.
- 38- **Wets C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH**, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cell through a TLR2 dependent mechanism. *Nat Immunol* **2001**; 2: 346-52.
- 39- **Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R**. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th 1 immunity comprising response by CD4 and gamma-delta T lymphocytes. *Infect Immun* **2001**; 69: 7550-58.
- 40- **Wesley Farr R**. Leptospirosis. *Clin Infect Dis* **1995**; 21: 1-8.
- 41- **Tuner LH**. Leptospirosis. *Br Med J* **1973**; 1: 537-40.
- 42- **Farrar WE, Bennett JR, Mandell GL, Dolin R**. Principle and practice of infectious diseases. 4. ed. New York Churchill Livingstone; **1995**. P. 2137-41.
- 43- **Miller NG, Froehling RC, White RJ**. Activity of leptospires and their product on L cell monolayers. *J Clin Gastroenterol* **1970**; 31: 371-7.
- 44- **Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P**. *Leptospira* and Leptospirosis 2nd Melbourne, Australia: Medi Sci; **1999**.
- 45- **Navy GY**. Comparative pathogenicity study of *Leptospira interrogans* serovar Pomona strain. *Acta Vet Hung* **1993**; 41: 315-24.
- 46- **Wolft JW**. The laboratory diagnosis of leptospires. Oxford: Blackwell, **1954**.
- 47- **Sambasiwa RR, Naveen G, Bhalla P**. Leptospires in India and the rest of the world. *BJID* **2003**; 7: 178-93
- 48- **Terpstra WJ, Schoone GJ, Light GS**. Detection of leptospiral DNA by nucleic hybridization with P-and biotin-labeled probes. *J Med Microbiol* **1986**; 22: 23-8.
- 49- **Miller BD, Chappel RJ, Adler B**. Detection of leptospires in biological fluids using DNA hybridization. *Vet Microbiol* **1987**; 15: 71-8.
- 50- **Bolin CA, Zuerner RL, Trueba G**. Comparison of the three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am J Vet Sci.* **1989**;190;50:1001-3.
- 51- **Ramadass P, Marshall RB, Jarvis BDW**. Species differentiation of *Leptospira interrogans* serovars hardjo strain Hardjobovies from strain Hardjoprajitno by DNA slot blot hybridization. *Res Vet Sci* **1990**; 49: 194-7.
- 52- **Shen D, Baoman R**. 1994. Cited by Venkatesha.**1997**.
- 53- **Venkatesha MD**. Molecular characterization of Leptospiral serovars. Ph.D Thesis submitted to Tamil Nadu Veterinary and Animal Science University, Chennai.**1997**.
- 54- **Merien F, Amouriax P, Perolat P**. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical sample. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 2219-24.

- 55- **Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, et al.** The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* **2000**; 68: 2276-85.
- 56- **Van Eys GJ, Gravekamp C, Gerritsen MJ. et al.** Detection of leptospires in urine by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **1989**; 27: 2258-62.
- 57- **Merian F, Perolat P, Moncel E. et al.** Detection of leptospira DNA by polymerase chain reaction in aqueous humor of a patient with unilateral uveitis. *J Infect Dis* **1993**; 168: 1335-6.
- 58- **Shuka J, Tuteja U, Batra HV.** 16S rRNA PCR for differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* isolates. *IJMM* **2003**; 21: 25-30.
- 59- **Savio ML, Rossi C, Fusi P.** Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 935-41.
- 60- **Cumberland P, Everard CO, Levett PN.** Assessment of the efficacy of an IgM- ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* **1999**; 25: 731-4.
- 61- **Faine S.** Leptospirosis Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9. ed. **1998**; 3: 849-69.
- 62- **Naigowit P, Luepaktra O, Yasang S.** Development of a screening method for serodiagnosis of leptospirosis. *Intern Med J Thai* **2001**; 17: 182-7.
- 63- **Watt G, Alguiza LM, Padre LP. et al.** The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific microscopic agglutination test at different stages of illness. *J Infect Dis* **1988**; 157: 840-42.
- 64- **Gussenhoven GC, Hoorn AWG, Goris MGA, Terpstra WJ, et al.** Lepto dipstick, a dipstick assay for detection of leptospira specific immunoglobulin M antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 92-7.
- 65- **Appassakij H, Silpapojakul K, Wansit R, Woodtayakorn J.** Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg* **1995**; 52: 340-43.
- 66- **Paccirini ML, Savio ML, Tagliabue S, Rossi C.** Repetitive sequence clone from *Leptospira interrogans* serovar hardjo genotype hardjoprajitno and their application to serovar identification. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 1243-9.
- 67- **Faine S.** Leptospirosis Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9. ed. **1998**; 3: 849-69.
- 68- **Bovet P, Yersin C, Merien F, Davis CE, Perolat P.** Factor associated with clinical leptospires: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean) . *Int Epidemiol* **1999**; 28: 583-90.
- 69- **Thierman AB.** Leptospirosis current development and trend. *J Am Vet Med Assc* **1984**; 184: 722-5.
- 70- **Michel V, Branger C, Andre-Fontaine G.** Epidemiology of leptospirosis. *Rev Cubana Med Trop* **2002**; 54: 7-10.
- 71- **Faine S.** Leptospirosis In: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. 9 ed. London, UK. Arnold; **1998**; P. 849-69.

- 72- **Kingscote BF.** Leptospirosis outbreak in piggery in southen Alberta. *CanVet J.* **1986**; 27: 188-90.
- 73- **Feigin RD, Anderson DC.** Leptospirosis. In: Feigin RD, Cherry JD, eds. *Pediatric infectious disease.* 4 ed. Philadelphia: Saunders; **1998**. P. 1529-42.
- 74- **Bolin CA, Koellner P.** Human-to-human transmission of *L. interrogans*: by milk. *J Infect Dis.* **1988**; 158: 246-7.
- 75- **Ulaş H, Alver H,** Batı Anadolu ve Trakya sığırlarında leptospirosis insidansı ve etken izolasyonu üzerine bir çalışma. *Pendik Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi* **1973**; 4 (1) 41-49.
- 76- **Çetinkaya B., Ertaş H. B., Öngör H., Muz A.** Dedection of *Leptospira* spp. by polimerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* **2000**; (24): 123-130.
- 77- **Unat EK, Gürtürk S.,** Türkiyede *Leptospira canicola* İnfeksiyonu. *Mikrobiyoloji Dergisi* **1954**; VII: 5-6.
- 78- **Unat EK, Gürtürk S,** İstanbul'da lagım suyundan tecrid edilen bir *Leptospira icterohaemorrhagiae* suşu. *Mikrobiyoloji Dergisi* **1954**; VII: 5-6.
- 79- **Unat EK, Gürtürk S.,** Leptospiroloji. İ. Ü. Tıp Fakültesi Mecmuası Monografi serisi **1955**; No:17.
- 80- **Fazlı, ŞA. C.** Gelengeus cinsi yabancı kemiricilerden izole edilen *L.djasmani* serotipi. *Mikrobiyolo. Bült.* **1970**; 6(2): 183-185.
- 81- **Fazlı, ŞA.** Orta ve Güney Doğu Anadolu yabancı kemiricileri favonasında leptospira araştırması. *Mikrobiyolo. Bült.* **1970**; 4(1): 111-136.
- 82- **Vardar T.** Türkiyede 1963-1974 yılları arasında evcil hayvanlarda leptospirosis. *Etlik Vet Enst Derg* **1976**; 4: 147-62.
- 83- **Yarkın F., Sadr R. E., Apan T., Yiğit S., Köksal F.,** Çukurova Bölgesinde Leptospiroz , Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği KLİMİK dergisi **1996**; cilt 9: sayı 3.
- 84- **Sunbul M, Esen S, Leblebicioğlu H, C.** *Rattus norvegicus* acting as reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea region of Turkey, as evidenced by PCR and presence of serum antibodies to leptospira strain. *Scand Infect Dis* **2001**; 33 (12):896-8.
- 85- **Şencan İ, Leblebicioğlu H, Sünbül M ve ark.** Samsun'da insan ve hayvanlarda leptospiroz sıklığı. *Flora* **1999**; 4 (1): 58-63.
- 86- **Takafui ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, et al.** An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *N Eng J Med* 1984; 310: 497-500.
- 87- **Saltoğlu N, Aksu HZ, Taşova Y, Arslan A, Canataroğlu A, Dünder IH, Köksal F.** Leptospirosis: Twelve Turkish patients with the Weil syndrome. *Acta Med Okayama.* **1997**; 51:339-42.
- 88- **Martinez SR, Perez SA, Baro SM, Alvarez AM, et al.** Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in group at risk. *Rev Panam Salud Publica* **2000**; 8: 385-92.
- 89- **Chen TZ.** Development and situation of and techniques for production of leptospirosis vaccine in China. *Jpn J Bacteriol* **1985**; 40: 755-62.
- 90- **Levett P. N.** *Clinical Microbiology Reviews* **2001**; DOI: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001: 296–326

- 91- **Çetinkaya B., Ertaş H. B., Öngör H., Muz A., Öngör H., Kalender H., Özdemir V.** Elazığ ilinde sığırlarda leptospirozisin seroprevalansının saptanması. *Türk J. Vet. Anim. Sci.* **1999**; (23):633-639.
- 92- **W.J.Terpstra.** International Leptospirosis Society Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, Surveillance and Control World Health Organisation, **2003**.
- 93- **Levett P N, Haake DA.** *Leptospira Species (Leptospirosis)* in In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7 th edition. USA Elsevier **2009**: 3059-3065
- 94- **Turhan V, Cavuslu S.** Leptospirosis is still a mortal infection in even today's world. *Scand J Infect Dis.* **2006**;38:746.
- 95- **Djadid N.D, Ganji Z.F, Gouya M.M.,** A simple and rapid nested polymerase chain-restriction fragment length polymorfizm technique for differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp., *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2009**; 63: 251-256.
- 96- **Bomfim M.R.Q. , Barbosa-Stancioli E.F., Koury M.C.,** Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR, *The Veterinary Journal* **2008**; 178:251–256.
- 97- **Raven E. Reistter,** Development of sepecies-spesific PCR primer sets for the detection of *Leptospira*. *FEMS Microbiol Lett.* **2006**; 264:31-39.
- 98- **Haake DA, Chao G, Zuerner RL ve ark.** The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect Immun* **2000**; 68: 2276-85
- 99- **Merien F, Amouriaux P, Perolat P.** Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* **1992**; 30: 2219-24
- 100- **Vitale M., Vitale F., Di Marco V. ve ark.** Polymerase chain reaction method for leptospirosis, analysis on samples from an autochthon swine population in Sicily, Italy *Rev Cubana Med Trop* **2005**;57(1):25-7.
- 101- **Tansuphasiri U, Chantadee R, Phulsuksombati D.** Development of a duplex-polymerase chain reaction for rapid detection of pathogenic leptospira. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **2006**; 37: 297-308
- 102- **Guerreiro H, Croda J, Ko AI, Haake DA.** Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect Immun* **2001**; 69: 4958-68.
- 103- **Eliete C. Romero, Ana E. C. Billerbeck, Valéria S. Lando.** Detection of *Leptospira* DNA in Patients with Aseptic Meningitis by PCR, *J Clin Microbiol.* **1998** May; 36(5): 1453–1455.
- 104- **Ellis, W.A., O'Brien, J.J. and Cassells, J.** Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in North Ireland. *The Veterinary Record.* **1981**;108: 555-557.
- 105- **Joseph M. Vinetz.** Current Opinion in Infectious Diseases, Leptospirosis. **2001**;14:527±538.
- 106- **Kramer K. J., Pang L. W., Minette H. P.** Evaluation of the quantitative buffy coat analysis (QBC) system for the detection of leptosira in human blood. *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health* **1994**; 25:788–789.

ÖZGEÇMİŞ

Kasım 1976'da Adana'da doğdu. İlkokulu Adana İsmet İnönü İlkokulunda 1987, orta öğrenimini Adana Gazi Ortaokulunda 1990 ve lise öğrenimini Adana Paksoy Kız Lisesinde 1993 yıllarında tamamladı. Üniversite eğitimini 1994-1999 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamladı. 2008-2009 Bahar yarıyılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. İngilizce bilmektedir.