T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EDİRNE VE ÇEVRESİNDE *LEPTOSPİRA* CİNSİ BAKTERİLERİN ARAŞTIRILMASI

SÜLEYMAN DOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ECE ŞEN

EDİRNE-2019

Süleyman DOĞRU' nun hazırladığı "Edirne ve Çevresinde *Leptospira* Cinsi Bakterilerin Araştırılması" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyeleri :	İmza
Prof.Dr.Ece Şen	
Pamuk GÜLEN	
Mitat ÇAMDEVİREN	
.....	.....
.....	.....

Tez Savunma Tarihi: 25/02/2019

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof.Dr. Ece ŞEN
Tez Danışmanı

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

25/12/2019
Süleyman DOĞRU
İmza

Yüksek Lisans Tezi
Edirne ve Çevresinde Leptospira Cinsi Bakterilerin Araştırılması
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Edirne'deki çevresel sulardan alınan su numunelerinde ve çevresel sularda yaşayan kurbağalarda *Leptospira sp.* cinsi bakterilerin varlığı araştırılmıştır. Çevresel sulardan alınan 44 su numunesinde ve 100 kurbağa böbreğinde alınan doku örneklerinde moleküler ve bakteriyolojik yöntemler kullanılarak patojen bakteriler araştırılmıştır. Ayrıca karanlık alan mikroskopisi ile *Leptospira sp.* cinsi bakteriler saptanmıştır. 5-FU içeren EMJH besiyerinde kültürü yapılan bakteriler giemsa yöntemi ile boyanmıştır. Su numunelerinin membran filtrasyon yöntemi ile çalışılarak hazırlanan kültürlerin karanlık alan mikroskopisi ile değerlendirilmesinde 44 su numunesinin sadece 1' inde (%2,27) *Leptospira spp.* tespit edilmiştir. Kurbağa böbreğinden alınan doku örneklerinden yapılan kültürlerin karanlık alan mikroskobunda değerlendirilmesi sonucu 100 adet kurbağa böbreğine ait kültürden 7'sinde (%7) *Leptospira spp*. tespit edilmiştir. *Leptospira spp*. tespit edilen toplam 8 kültürden hazırlanan preperatlar Giemsa yöntemi ile boyanarak spiroketler ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. *Leptospira* tespit edilen 8 adet kültürden izole edilen DNA'lar sec Y (preprotein translocase for Leptospira) proteinini kodlayan gen bölgesine ait primerler (GCGATTCAGTTTAATCCTGC ve GAGTTAGAGCTCAAATCTA) kullanılarak Real-Time PCR ile çoğaltılmıştır. Bu çalışma ile ilk kez Edirne ve çevresindeki sularda ve bu sularda yaşayan kurbağalarda non-patojen, saprofit *Leptospira* cinsi spiroketlerin varlığı gösterilmiştir.

Yıl : 2019
Sayfa Sayısı : 110
Anahtar Kelimeler : Leptospira, Leptospiroz, Edirne, RT-PZR, Karanlık alan mikroskopisi

Institute of Natural Sciences
Master's Thesis
Investigation of the Genus *Leptospira* in Edirne and Surroundings
Trakya University Institute of Natural Sciences
Department of Biology

ABSTRACT

In this study, presence of bacteria of the genus *Leptospira* were investigated in surface water and frog tissue samples collected from Edirne and surroundings. By using the dark field microscopy, Giemsa staining and by inoculating EHJH medium with 5-FU, presence of *Leptospira* were investigated. Cultivated bacteria were genotyping by using the RT-PCR technique and species-specific probes to determine the pathogenic *Leptospira interrogans* complex. As a result, when water samples were prepared by the membrane filtration method and evaluated by dark field microscopy, only 1 'of water samples (2,27%) were contained *Leptospira spp*. Also cultured frog kidney samples were evaluated in the dark field microscope. Seven (7%) of the frog kidney sampels belonging to the frog kidney were found to be positive for Leptospira. Bacterie were stained from positive cultures by using Giemsa method. DNA sampeles isolated from 8 leptospira cultures were amplified by Real-Time PCR using the gene locus primers (GCGATTCAGTTTAATCCTGC and GAGTTAGAGCTCAAATCTA) encoding the sec-Y (preprotein translocase for Leptospira) protein. Pathogen *Leptospira interrogans* was not found in the study. First time, in this study, non- patogenic, saprophitic Leptospira genus spirochetes were demonstrated in surface waters and frog tissue samples in Edirne and surrounding.

Year : 2018
Number of Pages :
Keywords : *Leptospira*, Leptospirosis, Edirne, RT-PCR, Dark field microscopy

TEŞEKKÜR

Bu konuyu bana veren ve çalışmalarım boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel çalışmalarımda yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, sonuçlarını kontrol ederek, tezin şekillenmesine katkı sağlayan, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ece ŞEN' e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca bana yardımcı olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET……...	iii
ABSTRACT……	iv
TEŞEKKÜR……	v
İÇİNDEKİLER…….....	vi
SİMGELER DİZİNİ……..	x
ŞEKİLLER DİZİNİ…….....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ…….....	xiv
BÖLÜM 1……	1
GİRİŞ VE AMAÇ…….....	1
BÖLÜM 2……	3
2.1. GENEL BİLGİLER…….	3
2.1. Tarihçe…..…….....	3
2.2.Mikrobiyolojik Özellikler……...……	4
2.3. Epidemiyoloji ve Patogenez…….…….	5
2.4. Leptospira Cinsi Bakterilerin Tanısında Kullanılan Yöntemler……	10
2.4.1.KonvansiyonelYöntemler…….	10
2.4.1.1.Membran Filtrasyon Tekniği ……...…….	10

2.4.2. Moleküler Yöntemler…….…… 11

2.4.2.1 PCR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)……..……... 12

2.5.Leptospira Cinsi Bakterilerin Tiplendirmesinde Kullanılan Yöntemler…… 16

2.5.1. Serotiplendirme Yöntemi……. 16

2.5.2. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri……. 16

2.5.2.1.Ribotiplendirme…… 17

2.5.2.2.İnsersiyon Sekanslar……. 17

2.5.2.3.Restriksiyon Endonukleaz Analizi(REA) ve Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE)……... 18

2.6.2.4.RAPD (Randomly Amflied Polimorfic DNA) ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)…… 19

2.6.2.5.Çoğaltılmış Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP)…….. 19

2.6.2.6. Genomik Moleküler Tiplendirme……... 19

BÖLÜM 3…… 21

3.1. MATERYAL VE METOT…… 21

3.1.1. Su Numunelerinin Alındığı Çalışma Alanı……..... 21

3.1.2. Su Numunelerinin Alınması……. 25

3.1.3. Su Numunelerinin Membran Filtrasyon Metoduyla Çalışılması…….…… 25

3.1.3.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar…….……...……. 25

3.1.3.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler……... 26

3.1.3.3. Su Örneklerinin Çalışılması…… 26

3.1.4. Kurbağa Örnekleri İçin Araştırma Alanı…… 27

3.1.4.1. Kurbağa Böbreklerinin Geleneksel Kültür Yöntemiyle Çalışılması…….. 27

3.1.4.1.1. Kullanılan Ekipman…….. 27

3.1.4.1.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler…… 27

3.1.4.2. Kurbağa Örneklerinin Çalışılması……... 28

3.1.4.2.1. Kurbağaların Diseksiyonu…… 28

3.1.4.2.2. Kurbağa Böbreklerinin Besiyerine Ekilmesi…… 28

3.1.4.2.3. Kurbağa Böbreklerinin Froti (yayma) Preparatlarının Hazırlanması…... 29

3.1.4.2.4. Moleküler Çalışma için Böbreklerin Saklanması……. 29

3.1.5. Üremiş Kültürlerin Real-Time PCR Metoduyla Çalışılması……..…... 29

3.1.5.1. Kullanılan Ekipman……. 29

3.1.5.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Bileşenler……. 30

3.1.5.3. Numunelerin Çalışılması……. 30

3.1.5.3.1. Bakterilerden DNA İzolasyonu……... 30

3.1.5.3.2. Real-Time (Gerçek Zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu……... 31

BÖLÜM 4…… 34

4.1.ARAŞTIRMA BULGULARI…… 34

4.1.1. Su Numunelerinin Alındığı Noktalarla İlgili Bulguları……... 34

4.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi ÇalışmalarınınBulguları…… 35

4.1.2.1. *Leptospira* Cinsi Bakterilerin EMJH Besiyerindeki Üreme Durumlar... 36

4.1.3. Kurbağa Böbreklerinden Yapılan Kültürlerdeki Üreme Durumları……. 38

4.1.3.1 Kurbağa Böbreklerine Ait Kültürlerin Üreme Durumları……. 38

4.1.4. Real-Time PCR İle Yapılan Çalışmaların Bulguları……..……. 44

4.1.4.1 *Leptospira interrogans* Tespiti…… 44

4.1.5. Kurbağa Böbreklerinin Froti (Yayma) Bulguları……. 49

BÖLÜM 5…… 50

5.1. SONUÇLAR VE TARTIŞMA…… 50

KAYNAKLAR……..... 53

ÖZGEÇMİŞ…….. 63

SİMGELER DİZİNİ

Kısaltmalar

ATPaz **:** Adenozin Trifosfataz
BOS **:** Beyin Omurilik Sıvısı
ºC **:** Santigrat Derece
C_T **:** Eşik Döngüsü Sayısı
cm **:** Santimetre
DNA **:** Deoksiribonükleik asit
dNTP **:** Deoksinükleozid trifosfat
ELİSA **:** Enzim Linked immonosorbent assay
EMJH **:** Elling-Hausen, McCollough, Johnson, Harris Besiyeri
FRET **:** Floresan Rezonans Enerji Transferi
gr **:** Gram
HLA-DQ6 **:** Human Leukocyte Antijen Serotip Grubu
IL-10 **:** İnterlökin
IS **:** İnsersiyon Sekans
Lt **:** Litre
MAT **:** Mikroskobik Aglunitasyon Testi
$MgCl_2$ **:** Magnezyum Klorür
ML **:** Mililitre
MLST **:** Multi Lokus Sequens Typing
MLVA **:** Multi Lokus VNTR Analys
mm **:** Milimetre
mM **:** Mili Molar
mRNA **:** Massenger Ribonukleik Asit (ulak RNA)
PCR **:** Polimeraz Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE **:** Pulsed-Field Jel Elektroforezi (kesikli alan jel elektroforezi)
PP **:** Polipropilen

RFLP **:** Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon enzimi parça uzunluğu çeşitliliği

rDNA **:** Ribozomal Deoksiribonükleik asit

RNA **:** Ribonükleik asit

rRNA **:** Ribozomal Ribonükleik asit

RT-PCR **:** Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)

SPHS **:** Şiddetli Pulmoner Hemorajik Sendrom

TNFα **:** Tümör Nekrozis Faktör

T_m **:** Erime Sıcaklığı

VNTR **:** Değişken sayı tandem tekrarlaması

TCA **:** Trikloroasetik asit

TUİK **:**Türkiye İstatistik Kurumu

µm **:** Mikrometre

µM **:** Mikromolar

µl **:** Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Su örneklerinin toplandığı noktalara ait harita-1……. 22

Şekil 3.2. Su örneklerinin toplandığı noktalara ait harita-2……. 23

Şekil 3.3. Su örneklerinin toplandığı noktalara ait harita-3……. 23

Şekil 3.4. Su örneklerinin toplandığı noktalara ait harita-4……. 24

Şekil 4.1. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 31 nolu istasyona ait ekimden elde edilmiştir……... 34

Şekil 4.2. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 33 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 37

Şekil 4.3. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 38 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 37

Şekil 4.4. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 50 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 38

Şekil 4.5. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 64 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 38

Şekil 4.6. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 67 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 39

Şekil 4.7. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 90 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir…….. 39

Şekil 4.8. Çalışılan kültürlere ait PCR sonuçlar özeti…..…… 41

Şekil 4.9. Rn ve Döngü ‘ye göre 16 S RNA’ya ait amflikasyon eğrisi …….. 41

Şekil 4.10. Rn ve Döngü ‘ye göre *Leptospira interrogans* amflikasyon 42

eğrisi…….

Şekil 4.11. ΔRn ve Döngü ‘ye göre 16 S RNA amflikasyon eğrisi……..... 42

Şekil 4.12. ΔRn ve Döngü ‘ye göre *Leptospira interrogans* amflikasyon eğrisi……. 43

Şekil 4.13. 16S ve *Leptospira interrogans’ın* Kuyucuk ve Eşik Döngü Sayısına göre çoğalma durumu…… 44

Şekil 4.14. 16S ve *Leptospira interrogans’*a ait sonuçlar tablosu……... 45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Su numunelerinin alındığı noktalar…… 20

Çizelge 3.2. Hedef Gen ve Leptospira Primer Dizileri……... 28

Çizelge 3.3. Gerçek Zamanlı PCR Isı Döngüsü Programı……. 29

Çizelge 4.1. Su numunesi alınan noktalarda yerinde yapılan ölçümler…….. 30

Çizelge 4.2. Su numularine ait EMJH besiyerlerindeki aylık üreme durumları…….. 32

Çizelge 4.3. Kurbağa böbreklerine ait EMJH besiyerlerindeki aylık üreme durumları…….. 35

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Leptospiroz, Leptospira cinsindeki patojen spiroketlerin neden olduğu dünya çapında görülen hayvan kaynaklı bir hastalıktır. Temel olarak yabani veya evcil memeli hayvanların enfeksiyonu olup; kronik böbrek enfeksiyonu olan hayvanların idrarları ile çevreyi kirleterek leptospiraları devamlı bir şekilde doğaya yayarlar. Leptospiralar vücut sıvılarında, nemli toprakta ve infekte olmuş hayvanların idrarı veya dokuları ile kontamine olmuş sebzelerde sıklıkla bulunurlar. İnsanlarda bulaşma, hayvanların idrarları ya da dokuları ile doğrudan, çoğunlukla nemli toprak veya sulardaki leptospiralar ile dolaylı yönden mukozal ya da perkütan temas sonucu ortaya çıkar ve endemiler görülebilir. Asemptomatik ya da iyi seyirli-hafif bir klinik tablo ile seyredebileceği gibi; sarılık, kanama, vaskulit, böbrek yetmezliği ile karakterize Weil hastalığı ya da SPHS (Severe Pulmoner Hemorajik Sendrom) şeklinde de seyredebilir ki bu olgularda en uygun tedavi uygulansa bile ölüm fatalita oranı %10-50 gibi yüksek değerlere ulaşmaktadır. (Baharti vd., 2003; Mcbride vd., 2005)

Hayvanlardan insanlara doğrudan bulaşabildiği gibi sularla da bulaşabilen patojen leptospiralar suda veya toprakta haftalarca hatta aylarca yaşayabilir. Bu patojenlerin saptanması ve tür tayinleri günümüzde, geleneksel kültür yöntemlerinin yanında hızlı sonuç veren moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (Akhan, 2007). Dünyada hijyen kurallarına uygun su miktarı giderek azalmaktadır (Akın ve Akın, 2007). Bu yüzden *Leptospira* cinsi bakterilerin tespiti toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir.

İlk kez yapılan bu çalışma Edirne ili ve etrafındaki çevresel sularda ve kurbağa böbreklerinde leptospira cinsi bakterilerin moleküler, mikroskopik ve bakteriyolojik yöntemlerle araştırılmasını kapsamaktadır. Yüzeysel su numuneleri (nehir, gölet, su

birikintileri) ve bu sularda yaşayan kurbağa türleri örneklenerek su ve hayvan dokularında EMJH besiyerine ekim, karanlık alan mikroskopisi ve Giemsa boyama ile *Leptospira sp.* cinsi bakterilerin varlığının saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca soyutlanan bakteriler RT-PCR (gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu) ile incelenerek patojenik *L. interrogans* kompleksine dahil olup olmadığı belirlenmiştir.

Çevresel sulama, rekreasyon ve kullanım sularının sağlık açısından bilimsel ölçütlere uygun olması istenir (Akdur, 2007 s.24-27. ; Çalık, Menteş, Karadağ, Dayıoğlu, 2004; Dedeakayoğulları, Önal, 2009) . Patojen leptospiraların tespitinde kullanılan ve hızlı sonuç alınan moleküler yöntemler, patojenin varlığını gösterdiği gibi filogenetik analizle tür tayinine de olanak sağlamaktadır.

Daha önce Edirne'deki dere, nehir ve yüzeysel sulardan Leprospira cinsi bakteriler izole edilmemiş, tür tayini yapılmamıştır. Bu bakterilerle ilgili moleküler yöntemlerle yapılmış detaylı bir çalışma da bulunmamaktadır. Leptospira cinsi bakterilerin saptanması ve tür tayinleri halk sağlığı açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışma halk sağlığı ve çevresel suların hijyeninin araştırılması yönünde önemli bir katkı sağlayacaktır. Yapılan bu çalışma ile Leptospira cinsine ait patojen türlerin çevresel sularda ve kurbağa böbreğinde incelenmesi sayesinde, suyla temas halinde olan meslek grupları ve konak ile ilişkili kişiler için risk analizi yapılması mümkün olmaktadır. *Leptospira spp*'in çevresel sularda varlığının tespit edilmesi, bu konuda yapılacak diğer bilimsel çalışmalara kaynak oluşturması açısından önem arz etmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez 1886 yılnda Adolph Weil tarafından sarılık, nefrit, ateşle seyreden olgular "Weil hastalığı" olarak tanımlamıştır (Trejevo vd., 1998; Baharti vd., 2003; Dutta vd. ve Mcbride vd., 2005). 1907 yılında Stimson tarafından sarıhumma epidemisi esnasında ölmüş olan bir hastanın böbreğinden ilk kez leptospira spiroketleri izole edilmiştir (Levett, 2001). Etken spiral mikro organizmanın hasta kanında gösterilmesi ise 1914 yılında olmuştur. Daha sonra ise Inaba ve arkadaşları 1916 yılında Japon maden işçilerinden ve Uhlenhut ve Fromme 1946 yılında Fransa'daki Alman siper hastalığına yakalanmış askerlerden leptospiraları izole etmeyi başarmışlardır (Akhan, 2007). Ülkemizdeki ilk leptospiroz olgusu ise 1915 yılında Nüzhet ve Reşat Rıza Beyler tarafından bildirilmiştir (Reşat, 1915, Şerif, 1922).

Leptspiraların, yedigün ateşi olarak bilinen ve hafif seyreden vakalara da etken olduğu ve sarılıksız ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Daha sonraki yıllarda sarılıksız, ateşli olgular şeklinde epidemiler tanımlanmış ve evlerde yaşayan farelerin yarısının leptospira taşıyıcısı olduğu tespit edilmiş olup salgınlarda büyük etkileri olduğu ortaya çıkmıştır. Amerika'da 1940'lı yıllarda gözlenen sarılıksız, ateşli salgının leptospira kaynaklı olduğu yapılan geriye dönük çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu çalışmalarda serolojik yöntemler kullanılmıştır. Etkenin *Leptospira interrogans autumnalis* serovarı olduğu tespit edilmiştir. Yedigün ateşi, bataklık ateşi, fare ateşi, şeker kamışı ateşi gibi adlar taşıyan bazı endemiler, leptospirozun klinik ve salgın özelliklerini taşıdıkları için leptospiroz vakası şeklinde tanımlanmıştır. Nikaragua'da meydana gelen SPHS salgını

başlangıçta hafif seyreden bir enfeksiyon olarak bildirilmiş, ağır seyirli leptospiroz vaka bildirimlei artmaya başlayınca, hafif seyirli bir enfeksiyon hastalığı iken önceki yıllara göre önemi artan bir bulaşıcı hastalık haline gelmiştir (Trejevo vd, 1998; Baharti vd., 2003; Dutta vd ve Mcbride vd., 2005).

2.2. Mikrobiyolojik Özellikler

Leptospira cinsi bakteriler iki ana serogrup şeklinde tanımlanmıştır. Bu serogruplar *Leptospira interrogans* kompleks serogrubu ve *Leptospira biflexa* kompleks serogrubu şeklindedir. Leprospira cinsi bakteriler *Spirochaetales* ordosunda, *Leptospiraceae* ailesinde yer almaktadır. Bakterilerdeki lipopolisakkaridin O antijeni özelliğine göre serovarlar belirlenmektedir. Antijeni ortak olan serovarlar da serogruplar şeklinde adlandırılırlar. Memeli hayvanlarda ve insanlarda enfeksiyona neden olan leptospiralar, *Leptospira interrogans* kompleks serogrubunda yeralan serovarlardır. *L. interrogans* kompleks serogrubunda 200'den fazla serovar mevcut olup yaklaşık yarısı insanlardan izole edilmiştir. Nemli topraklarda ve çevresel sularda yaşayan saprofit leptospiral ise *L. biflexa* serogrubunda yer almaktadır. Bazı tanısal testlerde Patoc serovar I suşuna ait antijen enfeksiyonun tanısını koymak için kullanılmaktadır. Leptospiralar genetik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu leptospiralar 13 tür altında toplanmıştır. Henüz adlandırılmamış 4 tane tür bulunmaktadır. Bakteri virulansı ile leptospira serovarları arasında ilişki bulunmamaktadır (Brenner vd., 1999; Levett, 2001; Winn vd., 2006).

Leptospiralar iki ucu veya bir ucu kıvrık, spiral, hareketli, ince, 0,1-0,2 μm eninde 6-25 μm boyunda spiroketlerdir. Genellikle C, S harflerine benzyen ya da çengel, soru işareti şeklindeki bakterilerdir. Karanlık alan mikroskobunda incelendiğinde ise hareketli parlak taneciklerden oluşan spiraller şeklinde görülürler. Leptospiralar birçok bakteride kullanılan adi boyalarla boyanmazlar. Ancak Giemsa ve Gümüşleme gibi yöntemler kullanılarak boyanabilirler (Brenner vd., 1999; Levett, 2001; Winn vd., 2006).

Leptospiralar hareketli mikroorganizmalardır. Aksiyal filamentlerini kısaltarak kendi etraflarında dönme hareketi yaparlar. Ayrıca ileri geri giderek hareket ederler. Leptospiralar, saprofit ve patojen türleri arasında morfolojik açıdan bir farklılık

bulunmayan kapsülsüz ve sporsuz spiroketlerdir (Brenner vd., 1999; Levett, 2001; Winn vd., 2006).

Leptospira cinsi bakteriler, diğer bakterileri üretmek için kullanılan geleneksel besiyerlerinde üremezler. Üremeleri için organik maddelere (serum, kan vb.) demir, vitaminler ve uzun cincirli yağ asitlerine ihtiyaç duyarlar. Üremeleri için 18-30 °C sıcaklık ve 7,2-7,6 pH 'a ihtiyaç duyarlar. Enerjilerini uzun zincirli yağ asitlerinin oksitlenmesi ile ortaya çıkan enerji kaynaklarından sağlarlar. Bakterilerin nitrojen kaynaklarını genellikle amonyum tuzları oluşturur. Karbonhidrat ve amino asitleri enerji kaynağı olarak kullanamazlar (Kaufman ve Weyant, 1995).

Leptospira cinsi bakteriler, tavşan serumu içeren Korthoff, Fletcher. Noguchi (at-koyun serumu içeren) Tween 80 ve sığır albumin içeriğine sahip EMJH (Elling-hausen, McCollough, Johnson, Harris) gibi seçici-ayırtedici besiyerlerinde ürerler. Besiyerinde üreme olması için aerop ve karanlık bir ortam sağlanmalıdır. Leptospiralar yavaş ürediği için kültürler en az 5-6 hafta boyunca inküübasyona bırakılmalıdır. Leptospiralar, oksidaz ve katalaz testlerinde pozitif reaksiyon verirler (Brenner vd., 1999; Levett, 2001; Winn vd., 2006).

2.3. Epidemiyoloji Ve Patogenez

Leptospiroz özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerin tropik ve subtropik bölgelerinde yaygın bir şekilde görülen ve dünyanın diger bölgelerinde rastlanabilen hayvan kaynaklı bir enfeksiyon hastalığıdır. Yaz sonu ve ilkbabar mevsimlerinde, yağmurlu havalarda, tropikal bölgelerdeki hastalık insidansı artış göstermektedir. 10 binin üzerinde vaka görülen ve en çok leptospiroz olgusu gürülen ülkelerden biri Brezilya'dır. 1995-2000 yılları arasında Tayland'taki leptospiroz vaka sayıları çoğalmış ve hastalık insidansı otuz kat artmıştır. Leptospiroz daha çok gelişmekte olan ülkelerde görülse de bulaş yolu özelliğinden dolayı sanayinin yoğun olduğu diğer ülkelerde de sorun teşkil etmeye başlamıştır (Trevejo vd., 1998; Murhekar vd.,1998; Van Vd., 1998; Sejvar vd., 2005).

Çevresel sularda ve toprakta aylarca canlı kalabilen leptospiralar, deniz suyunda 24 saate kadar yaşabilmektedir. Bölgesel salgınların başlıca nedenleri gelişmiş ülkelerde spor ve eğlence amaçlı yapılan su kayağı, rafting gibi su sporlarıdır. 2000 yılında Malezya'da yapılan su sporları organizasyonunda yarışmaya katılan sporcuların %

44'ünde leptospiroz belirtileri gözlemlenmiştir. Bu organizasyondan sonra yarışmanın yapıldığı nehirde yüzme riski %38'e yükselmiştir. Hollanda'da 1987-1991 yılları arasında bildirilen 237 leptospiroz olgusunun hemen hemen tamamı seyahat öyküsü olan kişilerde tanımlanmıştır. Amerika'daki bir yarışmaya katılan atletlerde leptospira enfeksiyonu bildirilmiştir. Olası kaynak olarak yarışmadaki bir buçuk millik yürüyüş etabı gösterilmiştir. (Onul, 1980).

Leptospira cinsi bakterilerin en önemli konağı faraeler olup köpek, sığır, keçi, domuz, kuşlar, koyun gibi hayvanlar da leptospira enfeksiyonu oluştururlar. Bazı leptospira türlerinin tek bir konağı vardır. *Leptospira canicola* sadece köpeklerde enfeksiyon oluştururken *L. interrogans icterohaemorrhagiae* serovarı farelerde enfeksiyon oluşturur. Hayvanlar leptospiralar ile enfekte olduktan sonra belli aralıklarla spiroketleri idrarları ile doğal ortama bulaştırırlar. *Leptospira canicola* enfeksiyonu insanlarda nadir görülür. Bunun nedeni bakterilerin asidik özelliğe sahip köpek idrarında canlı kalamamasıdır. Komtamine havuz suları, göller, bataklıklar, sulama kanalları ve çeltik tarlasındaki sular ile temas en yaygın görülen bulaş yoludur. Bulaş genellikle ağız, burun, konjiktiva mukozalarından ya da deride oluşan açık yaralardan leptospiraların alınması şeklinde meydana gelmektedir. Kanalizasyon suları ve konak idrarları ile kontamine olmuş bataklıklar enfeksiyonun yayılmasında bir etkendir. Leptospiralar için en uygun ortamlardan biri taşkın sularıdır ve sel sonrası enfeksiyon artışı görülebilmektedir. Leptospirozun görüldüğü endemik bölgelerde yağış ile doğru orantılı olarak mevsimsel endemiler meydana gelir. Leptospiraların canlı kalıp üreyebilmesi için ortam koşullarının alkali olması sıcaklığın uygun olması gereklidir. 28-30 °C üreme için en uygun sıcaklık olduğundan leptospiroz olguları ılıman bölgelerdeki koşullarda daha yaygın görülür (Trevejo vd., 1998; Murhekar vd., 1998; Van Vd., 1998; Dutta, 2005).

Maden çalışanları, gemiciler, çiftçiler, pirinç tarlası işçileri, balıkçılar, askerler, kanalizasyon ve mezbaha çalışanları, veterinerler ve sulak yerlerde çalışan işçiler leptospiroz enfeksiyonu açısından risk altındadırlar ve olgular bu kişilerde daha sık görülür. Son zamanlarda çeşitli uğraşların artmasıyla evcil hayvan besleyenler, yüzücüler, avcılari su sporu yapanlar, bisikletçiler ve ılıman bölgelere tatile gidenler risk grubunda yer almaya başlamıştır. Daha çok kedilerde enfeksiyon yapan *Leptospira*

australis serovarı ile evde kedi beslenmesi arasında bir ilişki vardır. Laboratuvarda leptospira içeren numuneler ile çalışırken etkenin göze sıçraması ya da spiroketi taşıyan konağın ısırması sonucu leptospiralar çalışanı enfekte edebilir. Leptospirozun yaygın olarak görüldüğü az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere seyahat etmek enfeksiyonun gelişimi ve yayılması açısından bir risk oluşturmaktadır. Leptospira enfeksiyonunun insandan insana bulaşması çok nadir görülür. Anne sütü ve cinsel temas sonucu nadiren bulaştığı bildirilmiştir. Bulaş yollarının artması ve değişim göstermesi sonucu son yıllarda meydana gelen vakalarda cinsiyet, yaş faktörü ortadan kalmakla birlikte her yaş grubunda enfeksiyon görülebilmektedir. Nitekim bildirilen eski olgularda enfeksiyonun daha çok genç erkeklerde görüldüğü bildirilmiştir (Heath Vd., 1965; Bolin vd., 1988; Simon vd., 1999; Morgan vd., 2002; Baharati, 2003).

Leptospiroz, spesifik klinik bulguları olmayan ve asemptomatik olarak seyreden bir enfeksiyon hastalığıdır. Çoğunlukla subklinik ve kendini sınırlayan bir enfeksiyon şeklinde seyreder. Bu özelliklerinden olgulara tanı koymak zorlaşmakta veya tanı konulamamaktadır. Uluslar arası Leptospira Cemiyeti tarafından yürütülen bir sürveyans sistemi dünyada meydana gelen leptospiroz vakaları kayıt altına almak için kullanılmaktadır. Leptospiroz sağlık bakanlığı bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıklar C grubunda olmasına rağmen enfeksiyonun Türkiye'deki gerçek insidansı ve prevalansı hakkında sağlıklı bir veri bulunmamaktadır. Hijyen koşullarının iyi olmadığı ve ılıman bir iklime sahip bölgelerimizden bildirilen leptospiroz vakalarının gerçekçi olmadığı öngörülebilir bir durumdur. Nitekim hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda tespit edilen seropozitiflik oranı bu öngörüyü desteklemektedir. Hayvancılık ile uğraşan insanlarda yapılan bir çalışmada seropozitiflik oranı %4,4 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma sıcak ve ılman bir bölge olan Çukurova'da yapılmıştır. Mahkumlar, ortamda bulunan kemirgenlerden dolayı, çiftçiler (sulu tarımla uğraşanlar) ve balıkçılar da su ile temas halinde olduklarından leptospiroz enfeksiyonu açısından risk grubunda yer alırlar (Coşkurlu vd., 1995; Saltoğlu vd., 1997; Gönüllü vd., 1998; Cengiz vd., 2002; Çelikbaş vd., 2005; Erdinç vd., 2005).

Leptospiralar kuluçka dönemini izleyerek üredikleri giriş yerinden kan yoluyla yayılırlar. Giriş yerleri kesikler veya abrazyonlardan, mukozalar ve konjunktivalardan, mikroskobik damlacıkların aerosol inhalasyonları ile ya da çok nadir de olsa sindirim yolu ile olabilir. Sistemik bir vaskülit oluşur, spiroketlerin doku ve organlara ulaşması

kolaylaşır böylece oldukça geniş bir spektrumdaki leptospiroz kliniği ortaya çıkar (Turhan, Senol, Sonmez, Oncul, Cavuslu, Tanridag, 2006).

Kuluçka sürelerini tamamlayan leptospiralar, giriş yerlerinden kan yoluyla vücuda yayılırlar. Leptospiralar mukozalardan, kesiklerden, konjuktivalardan, aerosollerin solunması veya nadirende olsa sindirim yoluyla vücuda girebilirler. Sistemik vaskülitin oluşmasıyla leptospiralar doku ve organlara kalaylıkla ulaşabilirler. Böylece vücutta geniş etkili bir enfeksiyon meydana gelir (Turhan Vd., 2006).

Bakterilerin virulansı, bulaş miktarı, konağın bağışıklık sisteminin durumu ve genetik yatkınlık leptospiroz patogenezinde önemli bir rol oynar. Leptospirozun gelişimi ile bir genotip olan HLA-DQ6 arasında bir ilşki olduğu Springfeld salgınında gösterilmiştir. Ayrıca bu genotip göl suyunun içilmesi yoluyla vücuda alındığı için enfeksiyonun oluşumunda sinerjik bir etki meydana getirmiştir (Morgan Vd., 2002).

Leptospiraların böbreklere yerleşmeleri ve yayılmalarında bakterilerin hareketli olması etkili olmuştur. Spiroketlerin hareketli olması önemli bir virulans faktörüdür. Leptospiraların yayılmasında, adezyon ve invazyonu kontrol eden genlerin de etkili bir rolü bulunmaktadır. *L. interrogans icterohaemorrhagiae* serovarının suşlarında gösterilen fibronektinin, spiroketlerin deri ve mukozalardaki giriş yerlerinde etkli olan bir protein olduğu saptanmıştır. Ayrıca giriş yerlerinde sfingomyelinaz C, H ve hemolizin aktiviteleri tespit edilmiştir. “LipL32“ lipopoliproteini patojen leptospiraların yüzeyinde bulunur ve interstiyel nefritin patogenezinden sorumlu olduğu sanılmaktadır (Nally vd., 2004; Matsunaga vd., 2005).

Leptospiralar vücutta sistemik bir vaskulite sebep olurlar. Bunu kan dolaşımına, beyin omurilik sıvısına ve lenf sistemine karışarak gerçekleştirirler. Böylece spiroketler vücuda hızlı bir şekilde yayılarak diğer doku ve organlara ulaşırlar. Leptospiroz karaciğerde hepatoselüler fonksiyon bozukluğu böbreklerde ise tubüler hasara neden olur. Ayrıca bazı organlarda, deride, seröz yüzeylerde ve ağız-burun mukozalarında kanamalara sebep olabilir. Böbreklerdeki tubüler hasar ve dokularda oluşan oksijen yetmezliğinden dolayı böbrek yetmezliği gelişebilir. Böbrekler, leptospiraların bulunduğu konağın immun sisteminden korunduğu ve enfeksiyonunun vücuda yayılması için bir kaynak görevi yaparlar. Leptospira bulaştırılan hayvan deneklerinde, böbrek dokusunda oluşan interstiyel nefrit bulguları ile spiroket sayıları arasında bir ilişki saptanmıştır. Buna rağmen enfekte edilmiş hayvan deneklerinin böbreklerinde

patolojik bulgulara rastlanmaz. Sodyum-Potasyum ATPaz pompa aktivitesinin *Leptospira interrogans* glikoproteinindeki doymamış yağ asitleri tarafından doza bağlı olarak inhibisyona uğradığı gözlenmiştir. Bu sebepten dolayı intra venöz albumin uygulaması bu inhibisyonu tedavi eden bir yöntem olarak kullanılmıştır. Böbrek tübüllerinde oluşan lezyonlar akut böbrek yetmezliği sonucu oluşur ve Na^+ geri emilim aktivitesini bozar. Furosemid yanıtın düzgün çalışmamasına bağlı olarak enfeksiyon Henle kulbunu da etkiler. Böbreklerde oluşan hasardan leptospiraların toksik etkisi ve glomuronefrit sorumludur. Damarlar içinde oluşan endotelyal hasar sonucu ortaya çıkan hipertansiyon ve volüm kaybı böbrek yetmezliğinin ilerlemesine sebep olmaktadır (Lal vd., 1982; Seguro vd., 1990; Nally vd., 2004; Matsunga Vd., 2005).

Sarılık, ağır leptospiroz vakalarında sık görülen bir durumdur. Karaciğer parankimal ve Kuppfer hücrelerinde şekil bozukluğu meydana gelir. Karaciğerdeki bu hücre bozulmalarından dolayı transminazlarda yükselme söz konusudur. Bununla birlikte spiroketlerin karaciğerde görülmesi nadir rastlanan bir durumdur. SPHS vakalarında yapılan PCR çalışmalarında akciğerden alınan doku örneklerinde çok miktarda leptospira tespit edilmiştir. Akciğerde az miktarda spiroket tespit edilen hayvanlarda alveolar bazal membranda immunglobulin ve kompleman depozitler saptanmıştır. Bu durum immun mekanizmaların patogenezde rol aldığını göstermektedir (Nally vd., 2004).

Leptospiroz enfeksiyonunun birinci haftasında meningeal tutulum bulguları olmamakla birlikte spiroketler kan ve beyin omurilik sıvısında görülürler. Özgül antikorlar oluştuktan sonra spiroketler beyin omurilik sıvısında görülmezler. Ancak aseptik menenjit oluşması söz konusudur. (Romero vd., 1998).

Leptospiroz enfeksiyonunun ilk safhalarında şiddetli kas ağrıları rastlanan bir durumdur. Enfeksiyonun geç safhalarında ise perkütan nefrolitotomi ve kaslardaki miyofibrillerde vakuoller görülür (Baharti vd., 2003; Dutta ve Christopher, 2005).

Kanamalı miyokardit leptospiroz vakalarında nadir görülen bir durumdur. Bununla birlikte kardiyovasküler problemler oluşabilmektedir (Ramachandran vd., 1977; Mcbride vd., 2005).

Anne sütünde leptospira varlığı sadece septisemik evrede ortaya çıkabilir. Leptospiroz hamilelikte erken doğum, düşük gibi sorunlara sebep olabilir (Shaked, Shpilberg, Samra, 1993).

Leptospiroz enfeksiyonlarında genellikle humoral immunite söz konusudur. Vücutta dolaşan spesifik antikorlar, mikroorganizmaların bağışıklık komplementlerine bağlanmasına sebep olur. Seropozitiflik bu enfeksiyonu geçiren kişilerde uzun yıllar devam eder. Akut leptospiroz olgularında bakteri gözlenebilmesi, antipolisakkarit antikorlar haricindeki mekanizmaların da koruyucu immunitede rol aldığını ortaya koymaktadır. Tipik gram negatif bakteriler TLR-4 ile hücreleri uyarırken leptospiralar bu aktiviteyi TLR-2 aracılığı ile yaparlar. Leptospiraların hücre duvarlarında lipid A kısmında L-Metilfosfat grubunun bulunması bu farklılığın temel nedenini oluşturmaktadır. Kandaki mononükleer hücrelerinden IL-10 ve TNF-α salgılanması leptospiraların hücre duvarındaki glikoproteinler aracılığıyla sağlanmaktadır (Que-Gewirth vd., 2004; Nally vd., 2005).

2.4. Leptospira Cinsi Bakterilerin Tanısında Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Konvansiyonel Yöntemler

2.4.1.1. Membran Filtrasyon Tekniği

Su numuneleri analizinde kullanılan membran filtrasyon sistemi gıda analizlerinde de kullanılabilen bir yöntemdir. Bu yöntemin kullanım şekli aşağıdaki gibidir.

Sistem kullanılmadan önce sterlizasyon işlemleri uygulanır. Kullanılan ekipmanın özelliğine göre uygun bir sterilizasyon tekniği (alkol, otoklavlama, kimyasal vs.) kullanılır. Eğer sterilizasyon için kimyasal maddeler kullanılacaksa bu işlemin doğru bir şekilde uygulanması gerekir. Kullanılan kimyasal sistemden tamamen uzaklaştırılmalıdır. Kimyasal artıklar mikroorganizmalar üzerinde olumsuzluklara sebep olabilir. Sterilizasyonda otoklavlama yöntemi kullanılacaksa uygun sıcaklık ve süre seçilmelidir. Bu yöntem için 121 ºC sıcaklık ve 15 dakika süre yeterli olacaktır.

Sterilizasyonda alkol kullanılacaksa sistemdeki alkol yakılarak uzaklaştırılmalıdır. Sistemin tamamen steril hale gelmesi ve alkol kalıntısı kalmaması için godelere destile su koyularak sistemden geçirilmelidir. Steril hale getirilen membran filtrasyon sistemideki süzme godesi yerinden çıkarılarak uygun filtre yerleştirilir ve gode tekrar yerine takılır. Süzülmek istenen su miktarı godeye boşaltılır ve pompa motoru çalıştırılarak su örneği filtreden geçirilir. Godelerin çeperlerinde bakteri

kalabileceğinden bir miktar destile su sistemden filtre edilerek daha etkin bir sonuç elde edilebilir. Bu işlem özellikle inhibitör maddelerin varlığında önem teşkil etmektedir (Halkman, 2005)

Kısaca memran filtrasyon sistemine uygun bir filtre (0,2 µm veya 0,45 µm) yerleştirilerek uygun miktarda su örneği süzülür ve filtre kullanılacak besiyerine yerleştirilir. Daha sonra besiyeri uygun bir sıcaklıkta inkübasyona bırakılarak kültüre edilir (Halkman, 2005).

2.4.2. Moleküler Metodlar

Moleküler biyoloji alanında son 20 yılda meydana gelen gelişmeler sonucu birçok yeni yöntem bulundu. Ortaya çıkan bu yöntemler mikroorganizmaların tespitinde hızlı ve uygun metodlardır. İçme suyu hijyeninin sağlanması açısından gelecekte kullanılabilir yöntemlerdir. İsviçre'de yapılan uluslar arası bir toplantıda içme suyu kalitesinin arttırılmasında ve su yönetiminde moleküler tanı yöntemlerinin kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Epidemiyolojide ve salgın araştırmalarında bu metodların kullanılması, geleneksel tanı yöntemlerine göre daha etkili olacağı sonucuna varılmıştır (OECD, 1999).

Bir örnekteki spesifik nükleik asit dizisi ve bu dizi ile uyumlu bir nükleik asit probunun oluşturduğu çiftleşmiş melezin tespit edilmesi ilkesine dayanan ilk moleküler testler bu yöntemin temelini oluşturmaktadır. Kullanılan test probu RNA veya tek iplikli bir DNA da olabilir. Bu problar örnekte bulunan işaretlenmiş uyumlu bir DNA veya RNA ile melezlenerek tespit edilir. DNA veya RNA'lar radyoizotop, antijenik madde, floresan boyalarla işaretlenebilir. Özgüllüğü arttırmak için koşulların uygun olması ve doğru probun seçilmesi önemlidir (Yenen, 2010).

Ribozomal RNA'da bulunan 5S, 16S, 23S gibi alt ünitelerde spesifik gen bölgeleri bakterilerin tanısında kullanılabilmektedir. Moleküler tanıda bu intergenik bölgeler önemli bir yer teşkil etmektedir. Tanı amaçlı çalışmalarda RNA genleri arasında en çok kullanılan gen bölgesi 16S rRNA genidir. 16S gen bölgesinin en çok kullanılmasının sebebi bu gen bölgesinin birçok aynı türde korunmuş olmasıdır. Bu gen bölgesi farklı tür ve cinsler arasında farklılık göstermektedir. Bakterilerdeki 16S rDNA bölgesinin farklı olması, bu bakterilerin tanısında, sınıflandırılmasında, türler arası ilişkilerin belirlenmesinde ve tanımlanmamış yeni türlerin tespitinde kullanılabilmektedir. Bu

yüzden 16S gen bölgesi en çok tercih edilen bölge olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaklaşık 1550 baz çiftinden oluşan 16S rRNA geni birçok korunmuş ve değişken kısımdan oluşmaktadır. Bu özelliğinden dolayı primerler bu korunmuş bölgelere göre tamamlayıcı olarak yapılır. Tanımlanmamış türlerin tayininde tüm gen bölgesinin araştırılması gerekirken dizi analizi için il 500 baz çiftinin incelenmesi yeterli olmaktadır. Araştırılan bir türün yeni bir tür olarak tanımlanabilmesi için 16S rRNA'daki gen dizisinde % 0,5-% 1 oranında bir fark olması gerekmektedir (Ozkuyumcu, 2009).

Kültürde zor veya yavaş üreyen bakterilerin tanısında genellikle dizi analizi yapılmaktadır. Geleneksel kültür yöntemleriyle üretilemeyen ya da tanımlanamayan tüm bakteriler 16S rDNA dizi analizi yapılarak tanımlanabilmektedir (Ozkuyumcu, 2009).

2.4.2.1 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu), DNA dizi analizleri ve yapay DNA ile ilgili çalışmalar sonucu ortaya çıkmış ve DNA'nın laboratuvar ortamında amplifikasyonuna dayanan bir yöntemdir. Büyük miktardaki özel genler, moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere PZR ile oluşturulur. Polimeraz zincir reaksiyonu DNA molekülünün deney tüplerinde defalarca çoğaltılması esasına dayanan ve DNA molekülünü kopyalamak için DNA polimeraz enzimi kullanılan bir metodtur (Madigan ve Martinko, 2010)

Oligonukleotid iki primerin çift sarmallı bir DNA molekülüne bağlanarak uzaması temeline dayanan yöntem polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılır. DNA molekülleri yüksek sıcaklıklarda denatüre edildikten sonra ortama primerler koyularak tek iplikli DNA moleküllerine bağlanır ve bu bölgeler ile hibritler oluştururlar. DNA polimeraz enzimi, dNTP ve uygun tamponun bulunduğu eklenen primerler 3' ucundan uzayarak kalıp DNA molekülü için tamamlayıcı bir DNA molekülü haline dönüşür. Polimeraz zincir reaksiyonundaki döngü; denatürasyon, primer bağlanması ve uzama evrelerinden oluşur. Bu döngülerin sayısı arttıkça ortamdaki DNA miktarı da üssel olarak çoğalır (Temizkan ve Arda, 2008).

Her bir döngüde sentezlenen ürünler bir sonraki döngünün primerleri için kalıp DNA görevi yapacağından üssel bir artış söz konusudur. Polimeraz zincir

reaksiyonunun her bir döngüsünde DNA molekülündeki hedef gen bölgesi iki kat artması üssel artışın sunucudur. Ortamda oluşan ürünler hedef DNA gen bölgesinin ve 2 tane primerin uzunluğunun toplamı kadar olacaktır. Her bir döngü tam bir verimle gerçekleşirse, 30 döngünün sonunda 2^{30} kadar ürün oluşacaktır. (Temizkan ve Arda, 2008).

DNA polimeraz enzimi, reaksiyonun verimini etkileyen önemli bir faktördür. Reaksiyondaki sıcaklığın artmasıyla meydana gelen DNA denatürasyonu ve hedef gen bölgelerinin artması, 20-30 döngüden sonra DNA polimeraz enziminin kısıtlayıcı bir etki oluşturmasına sebep olmaktadır. Hedef DNA gen bölgelerinin primerler ile bağlanma rekabeti reaksiyon verimini olumsuz etkileyen bir diğer faktördür (Temizkan ve Arda, 2008).

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan bileşenler; kalıp DNA molekülü, primerler, tampon, dNTP ve $MgCl_2$ şeklindedir. Reaksiyonda kullanılacak kalıp DNA; plazmid, faj DNA, çeşitli gen bölgeleri, genomik DNA ya da herhangi bir DNA parçası olabilir. Tek veya çift iplikli DNA yerine RNA da polimeraz zincir reaksiyonunda kalıp olarak kullanılabilir (Temizkan ve Arda, 2008).

PCR'da kullanılan DNA polimeraz enzimi, kalıp olarak kullanılan DNA ipliğindeki baz bilgilerini kullanarak dNTP'den uzun bir polinukleotid zinciri sentezini kataliz eder ve tamamlayıcı DNA ipliğinin oluşmasını sağlar. DNA polimeraz enzimleri primerleri kullanarak 5' ucundan 3' ucuna doğru bir sentez başlatırlar. Yeni bir DNA polimerizasyonunun meydana gelmesi fosfodiester bağlarının katalizasyonuna ve dNTP'lerin primerlerin 3' ucundaki hidroksil grubuna nukleofilik etki yapmasıyla gerçekleşir (Temizkan ve Arda, 2008).

PCR'da kullanılan DNA polimeraz enzimi sıcaklığa dayanıklı bir enzimdir. Bu enzimin kullanılmaya başlanması klinik ve araştırma laboratuvaralrında yapılan analizler için büyük bir kolaylık sağlamıştır. İlk zamanlarda, polimeraz zincir reaksiyonunda sıcaklığa dayanıklı olmayan *E.coli*'nin DNA polimeraz enzimi kullanılmaktaydı. Fakat her bir döngüde denatürasyon evresinden sonra ortamda enzim tükenmekte ve ortama enzim eklenmesi gerekmekteydi. Bu sorunu ortadan kaldırmak için günümüzde sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz enzimleri kullanılmaktadır. Böylece polimeraz enziminin amplifikasyonun başında tüplere eklenmesi yeterli

olmaktadır. En yaygın kullanılan thermostabil plimeraz enzimi, *T.aquaticus* bakterilerinden elde edilen TaqDNA polimeraz enzimidir (Temizkan ve Arda, 2008).

Polimeraz zincir reaksiyonunun birçok uygulaması için primerlere ihtiyaç vardır. Bu primerler 20-30 nukleotid uzunluğunda ve kalıp DNA'daki hedef gen bölgesi ile tamamen uyumlu olmalıdır. Primerler ticari olarak ya da primer sentezleyen laboratuvarlardan temin edilebilirler (Temizkan ve Arda, 2008).

PCR'da kullanılan çeşitli tamponlar mevcuttur. Taq/amplitaq enzimlerine özgü olan tampon yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonunu engelleyen ya da verimi arttırabilen birçok madde bulunmaktadır (Temizkan ve Arda, 2008).

PCR çok duyarlı bir yöntemdir. Bu yüzden ortamda çok az miktarda DNA olsa bile PCR ile çoğaltılabilir. Polimeraz zincir reaksiyonunun hücrelerde bulunan DNA'yı analiz etme ve çoğaltma özelliğinden dolayı birçok hastalığın teşhis edilmesinde mikrobiyoloji laboratuarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Temizkan ve Arda, 2008).

Analizlerde kullanılan su örneği miktarı 100-100 ml olmasına rağmen PCR'da sadece birkaç µl numune kullanılmaktadır. Bu durum polimeraz zincir reaksiyonunun su analizlerinde kullanılmasında sorun oluşturmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için membran filtrasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Diğer bir problem ise su içerisinde nukleik asitlerle birlikte bulunan inhibitör maddelerdir. Bu yüzden çevresel örnekleri PCR yöntemiyle çalışırken negatif ve pozitif kontroller kullanılmalıdır. Böylece reaksiyondaki inhibisyon ve özgüllük kontrol altında tutulabilir. Ayrıca elde edilen sinyallerin canlı mikroorganizmalara ait olup olmadığını tespit edebilmek için Revers Transkriptaz PCR gibi ayırt edici yöntemler kullanılmalıdır. PCR'ın en büyük üstünlüğü hedef mikroorganizmayı direkt tespit edebilmesi ve bu organizmaların kültürlenmesine ihtiyaç duymamasıdır (Hasde, Oğur, Tekbaş, 2002).

Farklı amaçlar (genotiplendirme, serotiplendirme vs.) için kullanılan PCR çeşitleri bulunmaktadır. Nested PCR, Real-Time PCR, RT-PCR, Demirlenmiş PCR, Multiplex PCR ve In situ PCR gibi polimeraz zincir reaksiyonu çeşitleri bulunmaktadır. (Temizkan ve Arda, 2008, Ozkuyumcu, 2009).

1990'lı yıllarda kullanılmaya başlanan PCR yöntemi, özellikle kültürü zor yapılan ya da yavaş üreyen bakterilerin saptanmasında önemli bir metodtur. Günümüzde su ve

çevre mikrobiyolojisinde kullanılmaya başlanmış ve kültüre edilemeyen bakterilerin tanımlanması bu yöntemle yapılabilmektedir (Hasde vd., 2002).

İçme sularında su kalitesini etkileyecek birçok organizma mevcuttur. Bu mikroorganizmaların tespitini yapmak için farklı yöntem, cihaz ve ekipmana ihtiyaç vardır. Kullanılan yöntemler genelde mikroorganizmaların kültürünün yapılmasına dayanmaktadır. Bu yöntemelr uzun zamanda sonuç verdiğinden indikatör mikroorganizma kavramı ortaya çıkmıştır. Bu bakterilerin sularda tespit edilmesi suyun mikrobiyolojik kalitesi açısından önemli bir gelişme olsa da diğer organizmaların içme suyunda saptanması gerekliliği hızlı ve güvenilir yöntemlerin önemini ortaya koymaktadır (Hasde vd., 2002).

Real-Time PCR, elektroforeze ihtiyaç duymadan amplifikasyon sonrası oluşan ürünlerin bilgisyar programında gözlenebildiği bir moleküler yöntemdir. Real-Time PCR'da kullanılan SYBR-Green I boyası floresan özelliğine sahip olup sadece çift zincirli DNA molekülüne bağlanır. Böylece SYBR-Green ile boyanan ürünlerin sinyalleri reaksiyonun sonunda gözlemlenebilir. Melezleme probları gerçek zamanlı PCR'da yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle FRET yöntemiyle dirençli bakterilerin tespiti ve tanımlanması yapılabilmektedir. Birden fazla bölgede mutasyon tespiti yapabilen, çok sayıda probun kullanıldığı ve farklı dalga boylarında sinyal alabilen Real-Time PCR cihazları üretilmiştir. Bu yöntemin mutasyonları göstermesi büyük önem arz etmektedir. Real-Time PZR amflikasyondan sonra herhangi bir işleme ihtiyaç duymadığından, reaksiyon kontaminasyon oranı düşük bir yöntemdir. Bu durum gerçek zamanlı PCR'ın en önemli üstünlüğüdür. Fakat reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin boyutlarının gözlenememesi ve diğer moleküler yöntemlerin uygulanamaması Real-Time PCR'ın dezavantajlarıdır (Ozkuyumcu, 2009).

Farklı dalga boylarını ölçebilen, hızları, kapasiteleri ve reaksiyon sayıları değişkenlik gösteren birçok cihaz bulunmakatadır. Bu cihazlar birçok tanı laboratuarında kullanılmaktadır (Günel, 2007).

2.5. Leptospira Cinsi Bakterilerin Tiplendirmesinde Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Serotiplendirme Yöntemi

Serotiplendirme, kontaminant rezervuarındaki serogrupların veya serotiplerin belirlenmesinde yararlı bir epidemiyolojik araçtır. Leptospiraların tanısı, RFLP ve PFGE 'ye dayalı çeşitli moleküler yöntemler veya serolojik yöntemler olan CAAT ve Mikroskobik Aglutinasyon Testi (MAT) ile serovarların tespitini mümkün kılar(Thiermann vd., 1985; Herman vd., 1991 ve Herman, 1992; Perolat vd., 1993).

MAT ile erken tanı mümkün değildir. Çünkü MAT leptospiral antijenlere karşı antikorların saptanmasına dayanır. Bununla birlikte belirtiler başladıktan bir hafta sonra antikorların saptanması mümkün değildir (WHO, 2003).

Leptospirozun endemik olmadığı bölgelerde düşük titredeki antijenler hastanın leptospiroz olduğunu gösterirken, leptospirozun endemik olduğu bölgelerde yüksek titredeki antijenlerin bulunması durumunda hastalıktan şüphelenilir(WHO, 2003). Yüksek aglutinasyon oranına sahip serumdaki özel bir antijen bakterinin olası serogrubunu tanımlamak için kullanılır (Dikken ve Kmety, 1978). Serogruplar arasında meydana gelen çarpraz reaksiyonlardan dolayı sonuçların yorumlanması oldukça karmaşıktır (Levett, 2003).

Birçok laboratuar ve hastanede MAT'ı uygulamak için gerekli imkânlar olmadığından, genellikle daha basit ve teşhis hızı yüksek olan ELISA kullanılır. Son zamanlarda rekombinat tabanlı serolojik testlerin performansı değerlendirilmiştir. Ancak bu testlerin duyarlılığının kötü olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, bu testler sorumlu bakterinin olası serogrubunu tespit edemez. Bakteri hücresinin immunoblotingi MAT ile karşılaştırılıp değerlendirilerek leptospira serogrupları arasındaki ayırım yapılır (Levett, 2001; Mcbride vd., 2005).

2.5.2. Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

PFGE ve PCR tabanlı moleküler yöntemler ile tiplendirme yapılmadan önce, 1990'larda fenotipe dayalı tiplendirme çalışmaları yapılmaktaydı. Ancak tür düzeyinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar saprofit olmayan patojen leptospira türlerinin tanımlanmasında bilgilendirici olmamaktadır (Faine vd., 1999; Levett, 2001).

2.5.2.1. Ribotiplendirme

Ribotiplendirme, hem taksonomik amaçlarda hem de farklı türlere ait mikroorganizmaların altgrup karakterizasyonunda sık kullanılmaktadır(Grimont ve Grimont, 1986). Büyük bir kromozom üzerinde dağılmak yerine, Leptospira iki adet 16S, 23S rRNA ve birbirleriyle sıkı bağlantısı olmayan bir ya da iki 5S rRNA gen bölgesine sahiptir (Baril vd, 1992; Zuerner vd, 1993b). rRNA genlerinin az sayıda olduğu göz önüne alındığında bu tiplendirme metodu çok ayırt edici değildir (Perolat vd., 1993; Kositanont vd., 2007).

2.5.2.2. İnsersiyon Sekanslar

İlave sekans (IS) unsurlarına dayalı bakteriyolojik tipleme metodları epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir değere sahiptir. Başlangıçta iki tür unsur (IS1500 ve IS1502) patojen *L.interrogans* ve diğerlerinde tanımlandı (Boursaux, Saint Girons, Zeurner, 1995; Zeurner ve Huang, 2002). IS1533 ise *L. borgpeterseni* türünde tanımlandı(Zeurner, 1994). IS fragmentlerinin prob olarak kullanıldığı Southern Blotting yönteminde gösterildiği gibi, bu IS unsurlarının kopya sayısı, serovarlar ve belirtilen serovarların izolatları arasında önemli ölçüde değişiklik gösterir (Zeurner ve Bolin, 1990; Zeurner, 1994; Zeurner vd., 1995; Boursaux vd., 1995; Zeurner ve Bolin, 1997). IS1500 *L. interrogans* izolatları arasındaki ayırımı yapmak için kullanılırken, IS1533 farklı leptospira türlerine ait serovarları, hatta aynı tür içindeki farklı serovarları ayırt etmek için kullanılabilir (Zeurner vd., 1993a; Zeurner ve Bolin, 1995). Bazı serovarların genomik DNA'sı IS1500 ile test edilip PCR ürünlerinde veya hibridizasyon örneklerinde başarısız sonuç alınmasına rağmen, IS1533 bazlı tekniklerin ve analiz edilebilir serovar tekniklerin arttırılmasıyla IS1500'e dayalı deneyler gerçekleştirilmiştir (Zeurner ve Bolin, 1997). Diğer bir unsur olan IS1502, leptospira cinsindeki tespit edilemeyen bazı suşların analizinde tavsiye edilmektedir (Zeurner ve Huang, 2002).

2.5.2.3.Restriksiyon Endonukleaz Analizi(REA) ve Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Non-sekans bazlı metodlar, restriksiyon profillerin agaroz veya akrilamid jelde karşılaştırılmasını içerir. Total genomik DNA'nın restriksiyon endonukleaz analizi (REA) bazı leptospira suşlarının tiplendirilmesinde güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmiştir (Ellis vd., 1988; Ellis vd., 1991; Venkatesha ve Ramadas, 2001). Ancak bu yöntem emek, zaman ve bilgi gerektirmektedir. Buna ek olarak, çok sayıda bantın olması yorumların laboratuarlar arası karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. REA, PCR ürünleri ile de yapılabilir. Leptospira tanımlaması 16S ve 23S rRNA'nın tekrarlı dizilerinden (Ralph vd., 1993; Woo vd., 1997; Heineman vd., 2000) ve flaB geninden kesilip çoğaltılan PCR ürünlerinin analizine dayalıdır. Ancak bu yöntem düşük bir ayırtedici güce sahiptir (Woodward ve Redstone, 1993; Kawabata vd., 2001).

PFGE, nadir bir kesme endonukleazı olan genomik makrorestriksiyonu takip eden ve leptospira suşlarını sınıflandırmak için kullanılan güçlü bir tiplendirme yöntemidir. Makrorestriksiyon profillerindeki bantların boyutu ve sayısındaki farklılıklar DNA'daki dizilerin tekrar düzenlenmesine, eklenmesine, çıkarılmasına veya kesme bölgelerindeki baz değişikliklerine bağlıdır (Tenover vd, 1995). Bilgisayar destekli jel analizleri suşlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmek, dendogramlar yapmak ve farklı laboratuarlarda elde edilen verileri karşılaştırmak için kullanılabilir (Galloway ve Levett, 2008). Herman ve arkadaşları PFGE ve serotiplendirme sonuçları arasında iyi bir uyum olduğunu bildirmişlerdir (Hermann vd., 1992; Zeurner vd., 1993c). Belirli bir serovardan elde edilen PFGE örnekleri o serovara özgüdür. Örneğin Grippotyphosa serogrubundaki yeni bir serovar olan Dada I suşunun sınıflandırılması, o suşa özgü PFGE örnekleri ile güçlü bir şekilde desteklenmektedir(Hermann vd, 1994). Bununla birlikte PFGE ve serolojik testler arasında uyumsuzluklarda tespit edilmiştir. Örneğin, PFGE ile *L. interrogans*'a ait Icterohaemoirhagiae ve Copenhageni seravarlarını ayırt etmenin mümkün olmadığı bulunmuştur. Yine de bu iki serovara ait PFGE sonuçlarına bakılarak neredeyse 90% oranında tanımlanabilmektedir (Galloway ve Levett, 2008).

Tüm bu nedenlerden dolayı PFGE diğer teknikler ile karşılaştırıldığında leptospira serovarlarının moleküler tiplendirilmesinde altın standart olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte bu yöntem yoğun bir emek gerektirir ve hastalığın sık görüldüğü tropik ve subtropik ülkelerdeki birçok laboratuarda kullanılamaz.

2.5.2.4. RAPD (Randomly Amflied Polimorfic DNA) ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR)

RPAD parmak izi ve AP-PCR yönteminde suşa özel parmak izi üretmek için rastgele sıralı ve düşük sıklıktaki PCR primerleri kullanılır(Welsh ve McCelland, 1990; Williams vd, 1993). Ralph ve arkadaşları *L. interrogans, L. kirschneri, L. borgpetersenii* ve *L. santarosai* türlerini içeren 48 leptospira refeans suşlarını AP-PCR ile gruplandırılarak sınıflandırılmıştır. Bu yöntemin 16S rRNA gen dizisi ve DNA-DNA dizi benzerliği ile tutarlı sonuç verdiği gösterilmiştir (Ralph vd., 1993). Bu yöntemin türleri ayırt etme yeteneği sonradan birçok çalışma ile doğrulanmıştır(Brown ve Levett, 1997; Letocart vd., 1997; Collares-Pereira vd., 2000). RAPD parmak izinin leptospirozun yüksek endemik olduğu bölgelerde epidemiyolojik araştırmalar için yararlı olduğu kanıtlanmıştır (Roy vd, 2004 ve 2005; Natarajaseenivasan vd., 2005). Bu teknik leptospira türlerinin tanımlanması ve serovar karşılaştırılmasında (Corney vd., 1993; Gerritsen vd., 1995; Ciceroni vd., 2002) basit ve hızlı bir olanak sağlayarak, leptospirozun moleküler epidemiyolojik çalışmalarında yararlı olabilir (Ramadas vd., 2002). Bununla birlikte tekrarlanabilirliği düşük ve laboratuarlar arasındaki veri karşılaştırmaları zor olduğu için bu teknik geniş ölçekli çalışmalar için uygun değildir.

2.5.2.5. Çoğaltılmış Fragment Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP)

AFLP veya Fluorescent AFLP analizleri üç aşamalı bir prosedürdür. Genomik DNA kesilerek adaptör ile bağlanır. Daha sonra fragmentlerin çoğaltılmasıyla ayak izi oluşturulur. Bilgisayar destekli jel analizi kullanımı, bu metodu dizileme analizi için uygun kılar. Ancak bu metod diğer PCR tabanlı yöntemlere göre daha büyük miktarda saflaştırılmış DNA gerektirir (Vijayachari Vd, 2004; Slack vd, 2007).

2.5.2.6. Genomik Moleküler Tiplendirme

Leptospira türleri iki dairesel kromozom üzerinde bulunan 3,9-4,6 Mb'lık bir genoma sahiptir(Picardeau vd, 2008). Genom üzerindeki değişik sayısılı bitişik tekrarlar (VNTR), PCR ürünlerinin elektroforezi üzerinde yapılan polimorfizm analizleri için oldukça uygundurlar. MLVA (Multi Locus VNTR Analys), leptospira cinsindeki en sık

rapor edilen patojenik türlere ait serovarları ayırt edebilir ve patojen suşlar için spesifiktir (Majed vd., 2005; Slack vd., 2005 ve 2006b; Salaun vd., 2006; Pavan vd., 2008 Zeurner ve Alt, 2009). VNTR tiplendirme metodu özellikle gelişmekte olan ülkelerin araştırma ve halk sağlığı laboratuarlarında erişilebilir bir yöntem olabilir. MLVA, patojen kültürüne gerek kalmadan biyolojik ve çevresel örneklerden direk uygulanabilen ve geliştirilmesi gereken bir yöntemdir. MLST (multilocus sequens typing), leptospira türlerine uygulanan ve çeşitli housekeeping genlerin kısmi dizilimine dayanan bir tiplendirme metodur(Ahmed vd., 2006; Thaipadungpanit vd., 2007). MLST, salgınlarla yakından ilişkili izolatların dizilerini tanımlamak için de kullanılabilir. MLST büyük miktarda saflaştırılmış DNA gerektirmeyen basit bir moleküler tekniktir. Bu yöntem tekrarlanabilir, güvenilir ve sonuçların yorumlanması kolay olduğu için tüm dünyada rutin olarak kullanılabilir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1.1. Su Numunelerinin Alındığı Çalışma Alanı

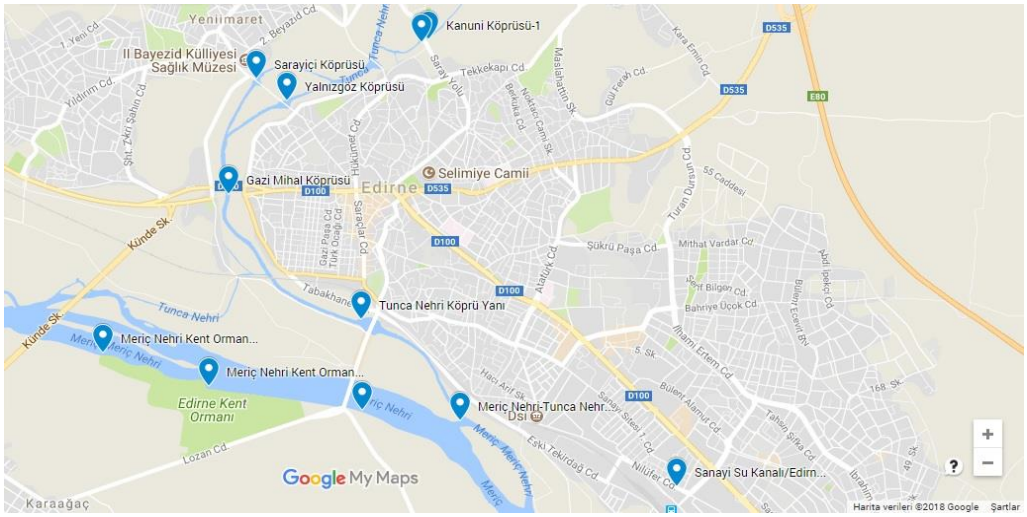
Bu çalışma için Temmuz 2015 tarihinde Edirne şehir merkezi ve çevre ilçelerde 44 numune noktasından su örneği toplanmıştır. Bu numune noktalarını belirlerken leptospira cinsi bakterilerin bulunma ihtimali olup insanların temasta olabileceği yüzeysel sular seçilmiştir. Bunun için Edirne şehir merkezinde bulunan Meriç ve Tunca nehrinin 10 noktasından, sanayi bölgesinde bulunan su kanalından 1 noktadan, ilçelerdeki gölet, nehir ve çeltik tarlalarından 31 adet ve Ergene nehrinden de 2 adet olmak üzere toplam 44 adet su örneği alınmıştır.

Çizelge 3. 1. Su numunelerin alındığı noktalar

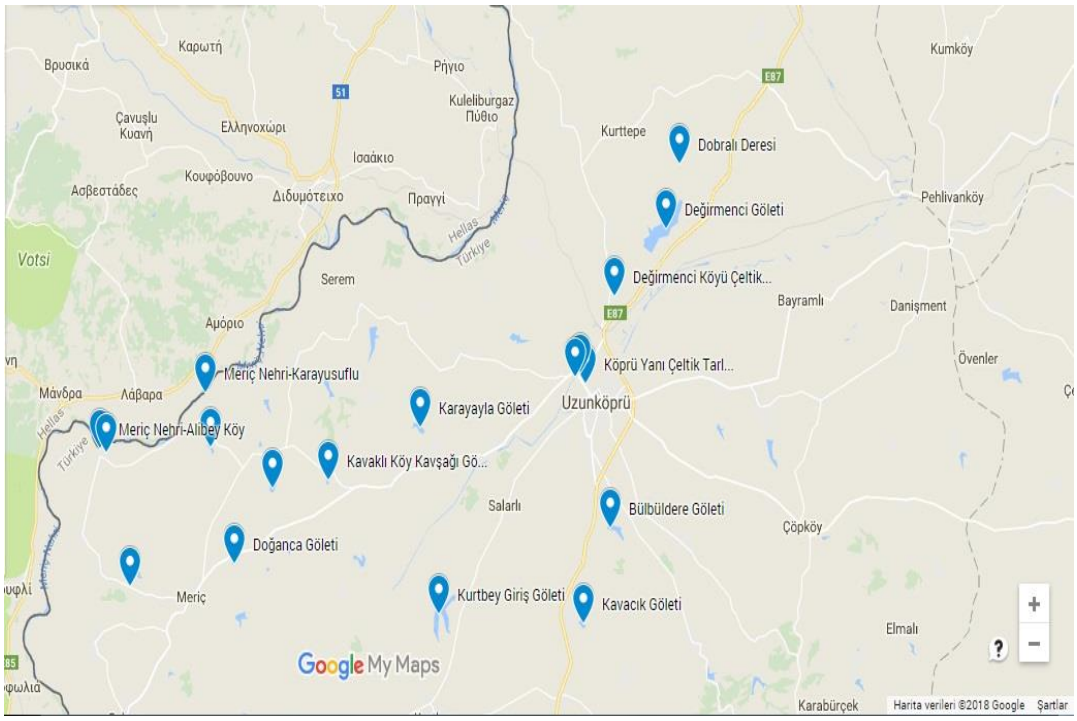
Numune noktası No:	Numune Noktasının Bulunduğu Yer/Nokta
1. Nokta	Değirmenci Göleti/Uzunköprü
2. Nokta	Dobralı Deresi/Uzunköprü
3. Nokta	Değirmenci Köyü Çeltik Tarlası/Uzunköprü
4. Nokta	Köprü Yanı Çeltik Tarlası/Uzunköprü
5. Nokta	Ergene Nehri-1/Köprü Solu
6. Nokta	Ergene Nehri-2/Köprü Sağı
7. Nokta	Karayayla Göleti
8. Nokta	Doğanca Göleti
9. Nokta	Küçük Doğanca Sulama Kanalı-1
10. Nokta	Meriç Nehri/Alibey Köy
11. Nokta	Alibey Köy Çeltik Tarlası
12. Nokta	Meriç Nehri/Karayusuflu
13. Nokta	Karayusuflu Gölet

14. Nokta	Kavaklı Köy Kavşağı Gölet
15. Nokta	Küpdere Gölet
16. Nokta	Kurtbey Giriş Gölet
17. Nokta	Kurtbey Balaban Yolu Gölet-1
18. Nokta	Kurtbey Balaban Yolu Gölet-2
19. Nokta	Kurtbey Çeltik Tarlası
20. Nokta	Balaban Köyü Sulama Kanalı
21. Nokta	Altınyazı Barajı
22. Nokta	Altınyazı Sulama Kanalı
23. Nokta	Sultanköy Barajı
24. Nokta	Sığırcı Gölü/Karpuzlu Barajı
25. Nokta	Yeni Karpuzlu Sulama Barajı
26. Nokta	Yeni Karpuzlu Çeltik Tarlası-1
27. Nokta	Yeni Karpuzlu Çeltik Tarlası-2
28. Nokta	Enez Çeltik Sulama Kanalı
29. Nokta	Gala Gölü/Enez
30. Nokta	Dalyan Gölü
31. Nokta	Musalı Göleti
32. Nokta	Kavacık Göleti
33. Nokta	Bülbüldere Göleti
34. Nokta	Sanayi Su Kanalı/Edirne Merkez
35. Nokta	Meriç Nehri-Tunca Nehri Birleşme Yeri
36. Nokta	Tunca Nehri Köprü Yanı
37. Nokta	Meriç Nehri Gezi Yolu
38. Nokta	Meriç Nehri Kent Ormanı-1
39. Nokta	Meriç Nehri Kent Ormanı-2
40. Nokta	Kanuni Köprüsü-1/Tunca Nehri
41. Nokta	Kanuni Köprüsü-2/Tunca Nehri
42. Nokta	Sarayiçi Köprüsü-1/Tunca Nehri
43. Nokta	Yalnızgöz Köprüsü-2/Tunca Nehri
44. Nokta	Gazi Mihal Köprüsü/Tunca Nehri

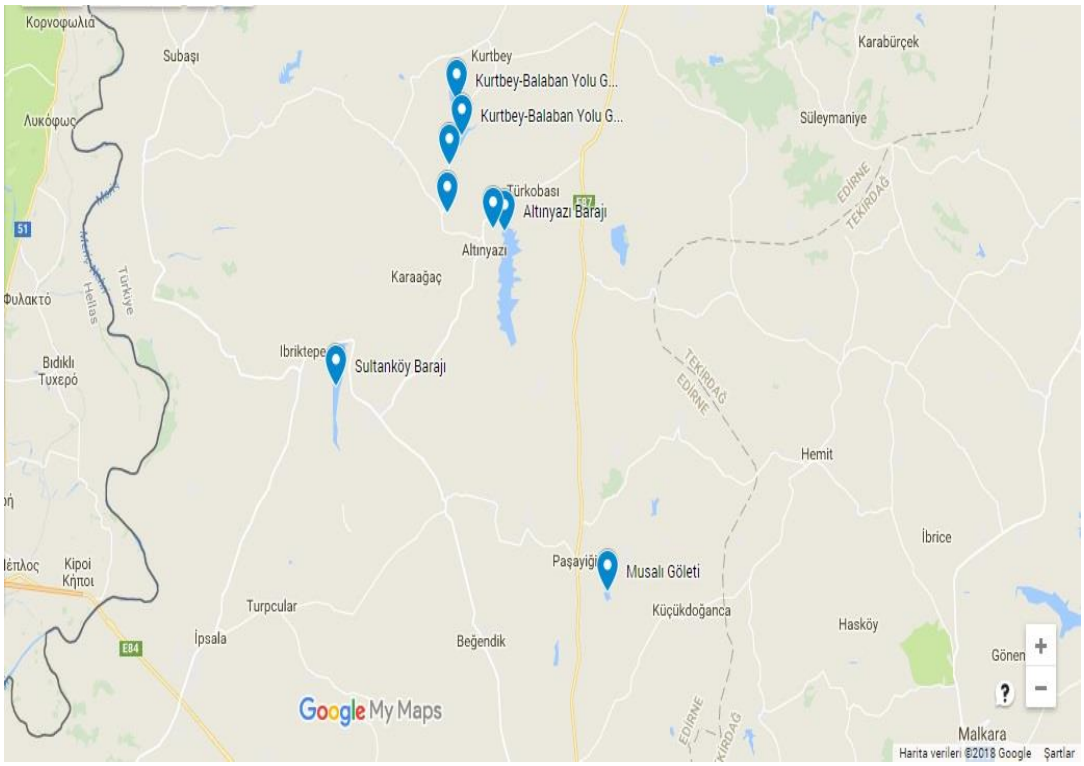
Göletlerden su numunesi alınırken özellikle kemirici hayvanların ayak izlerinin olduğu yerler tercih edildi. Çeltik tarlalarında da hayvan idrarlarının su ile temas edebileceği tarla kenarlarından su örnekleri toplandı. Su örneklerinin alındığı yerlere ait haritalar Şekil 3.1, Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir.



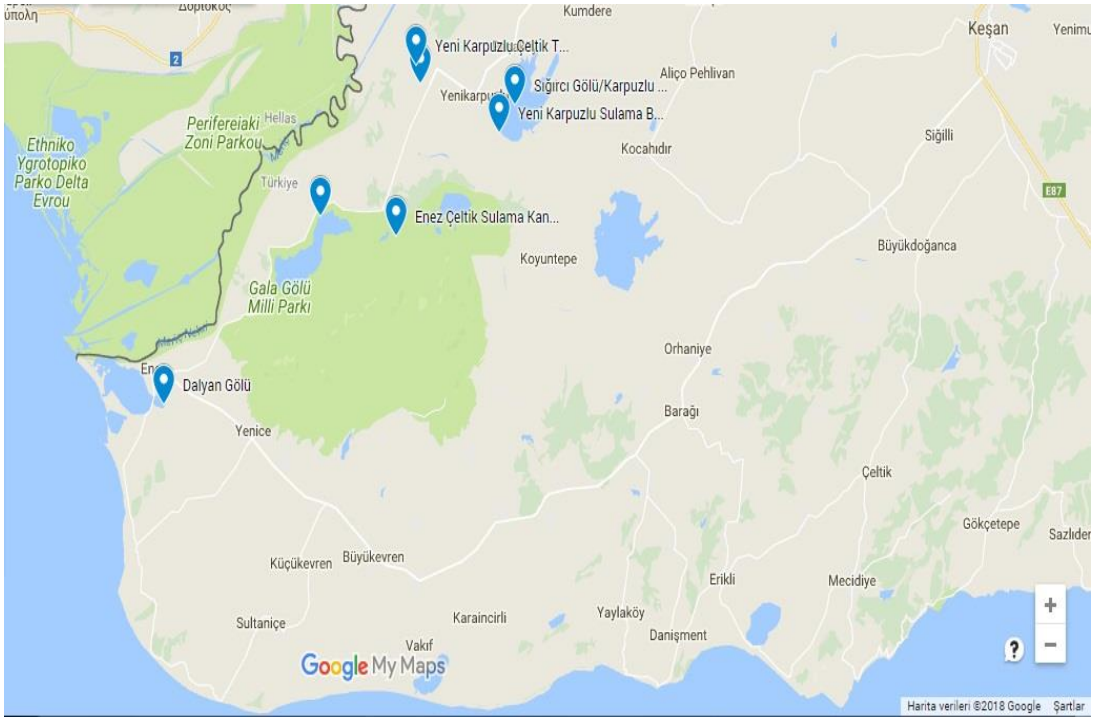
Şekil 3. 1. Su numunelerinin toplandığı noktalara ait harita-1



Şekil 3. 2. Su numunelerinin toplandığı noktalara ait harita-2



Şekil 3. 3. Su örneklerinin toplandığı noktalara ait harita-3



Şekil 3. 4. Su toplandığı toplandığı noktalara ait harita-4

3.1.2. Su Numunelerinin Alınması

Su numunelerini membran filtrasyon yöntemiyle analiz etmek için her bir noktadan 1 Litre'lik plastik (PP, PE) şişelere su numunesi alındı.

Su numunesi alınırken örnekleri kontamine etmemek için tek kullanımlık eldiven giyildi. Nehirlerden su numunesi alırken akıntılı olmayan bölgelerden 50 cm içeriden ve 20-30 cm derinlikten, numune şişeleri 45 derece açıyla batırılarak sular örneklendi ve şişelerin kapakları sıkı bir şekilde kapatıldı. Göletlerden su numunesi alırken akıntı olmayan, hayvan ayak izlerinin olduğu ve hayvan idrarlarının suya bulaşabileceği bölgelerden 50 cm içerinden yaklaşık 20 cm derinlikten su şişeleri 45 derece açıyla batırılarak su örneklendi ve şişelerin ağzı sıkı bir şekilde kapatıldı. Çeltik tarlalarından su numunesi alırken hayvanların ayak izlerinin olduğu, idrarlarının suya bulaşabileceği, tarla kenarındaki derin bölgelerden, su şişesi 45 derece açıyla batırarak su numunesi alındı ve şişelerin ağzı sıkıca kapatıldı. Su örneklerini alındıktan sonra güneş ışınlarından korumak ve 5±3 ºC 'de laboratuvara ulaştırmak için soğutucu saklama kutulara yerleştirildi. Ayrıca her noktadan numune alındıktan sonra hava durumu, numune alma noktasındaki su ve hava sıcaklığı ölçülerek kaydedildi. Alınan su numuneleri aynı gün içerisinde alındı ve 9 saatte laboratuara ulaştırıldı. Membran filtrasyon yöntemiyle ekimleri 24 saat içerinde yapıldı. Artan su numuneleri -18 º C'de derin dondurucuya konularak saklandı.

3.1.3. Su Numunelerinin Membran Filtrasyon Metoduyla Analizi

3.1.3.1. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Membran filtrasyon sistemi (Sartorius, Almanya), 28±2 ºC'ye ayarlanabilen inkübatör (Nüve, Türkiye), 45 ±1 ºC'ye ayarlabilen su banyosu (Nüve), otoklav (Nüve), sterlizatör (Nüve), saf su cihazı (Nüve), buzdolabı, -18 ºC'ye ayarlı derin dondurucu, analitik terazi (Gibertini İtalya), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Stuart), bunzen beki, kapaklı deney tüpleri, cam pipetler, otomatik pipet ve pipet uçları, mezür(250-500 ml), cam balon, spor, pH metre, lam-lamel, pens, karanlık alan mikroskobu, immersiyon yağı, Giemsa boya, preparat kutusu.

3.1.3.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler

Leptospira cinsi bakterilerin araştırılması ve kültüre edilmesi için Leptospira Medium Base EMJH (Difco) besiyeri olarak kullanıldı. Leptospira Medium Base EMJH (Difco) besiyerinin içeriği; 900 ml saf suya 2.3 gr Leptospira Medium Base toz besiyeri ve 100 ml steril EMJH sıvı suplament olacak şekilde ayarlandı.

Leptospira Medium Base (EMJH) şu şekilde hazırlandı: 900 ml saf suya 2.3 gram toz besiyeri tartılarak konuldu. Daha sonra manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile 45 ºC'de toz besiyerinin saf su içinde iyice çözünmesi sağlandı. Besiyeri çözeltisi hazırlandıktan sonra 121 ºC'de 15 dakika otoklavlandı. Steril hale getirilen besiyeri çözeltisi su banyosunda bekletilerek besiyeri sıcaklığı 45 ºC'ye ayarlandı. Besiyeri çözeltisinin sıcaklığı ayarlandıktan sonra 100 ml EMJH suplament ilave edildi. Hazırlanan besiyerinden steril deney tüplerine 10'ar ml aktarıldı. Hazırlanan 10 ml'lik besyeri tüpleri ekim yapılana kadar buzdolabında bekletildi. Ekimler yapılmadan önce kontaminasyonu azaltmak için her bir besiyeri tüpüne 40 µl 5-florourasil eklendi.

3.1.3.3. Su Örneklerinin Çalışılması

İlk olarak, kullanılacak besiyeri tüpleri oda sıcaklığında hazır hale getirildi. Ekilecek örneklerin numune numaraları tüplerin üzerine yazıldı. Membran filtrasyon yöntemiyle çalışmak üzere membran filtrasyon sistemi hazır hale getirildi. Su örneklerinde kaba kirlilik olmadığından herhangi bir ön filtre kullanılmadı.

Leptospira cinsi bakterilerin araştırılması ve kültür ekimlerinin yapılması için hem 0,2 µm por çapındaki hemde 0,45 µm por çapındaki filtreler kullanıldı. 1 litrelik plastik numune şişeleri iyice çalkalandıktan sonra 200 ml su örneği 0,45 µm por çapındaki membran filtreden süzüldü. Süzülen suyun filtratından pipet yardımıyla 10 ml alınarak içinde 10 ml sıvı besiyeri olan deney tüpüne ekim yapıldı.

Daha sonra aynı numuneden 300 ml su örneği 0,2 µm por çapındaki membran filtreden süzüldü. 0,2 µm por çapındaki filtre alınarak 10 ml sıvı besiyeri içeren deney tüpüne batırılarak ekim yapıldı. Aynı işlem tüm su örneklerine uygulandı. Ekim işlemlerinde hem 0,2 µm por çapında filtre hemde 0,45 µm por çapında membran filtreler kullanılarak bakterinin izolasyon olasılığı arttırıldı. Ekim yapılan tüm besiyeri tüpleri 28±2 ºC'ye ayarlanmış inkübatöre konularak 3 ay boyunca inkübe edildi.

İnkübasyondaki kültürler her ay karanlık alan mikroskobu ile kontrol edilerek üreme olup olmadığı değerlendirildi. Kontrol edilen kültürlere ait preparatlar Giemsa boyama ile boyanarak ışık mikroskobunda tekrar değerlendirildi ve kaydedildi. Bakterilerin fotoğrafları ve videoları fotoğraf makinesi (HP) ile çekildi

3.1.4. Kurbağa Örnekleri İçin Araştırma Alanı

Araştırma için Ağustos 2015 tarihinde Edirne'nin Meriç ilçesi sınırındaki Meriç nehrinden, bu ilçede bulunan çeltik tarlalarından ve Edirne'nin Süloğlu ilçesinde bulunan Süloğlu Barajından kurbağa örnekleri toplandı. Bu istasyonlar belirlenirken kurbağaların idrarlarını suya bulaştırabileceği ve birçok insanın risk altında olabileceği alanlar hedef alındı. Meriç ilçesindeki çeltik tarlalarından, Meriç nehrinde ve Süloğlu Barajından toplam 100 kurbağa incelenmek üzere aynı gün laboratuara götürüldü. Farklı bölgelerden kurbağalar toplanarak leptospira cinsi bakterilerin izolasyon olasılığı artırıldı.

3.1.4.1. Kurbağa Böbreklerinin Geleneksel Kültür Yöntemiyle Çalışılması

3.1.4.1.1. Kullanılan Ekipman

28±2 ºC'ye ayarlanabilen inkübatör (Nüve, Türkiye), 45 ±1 ºC'ye ayarlabilen su banyosu (nüve), otoklav (Nüve), sterlizatör (Nüve), saf su cihazı (Nüve), buzdolabı, -18 ºC'ye ayarlı derin dondurucu, bunzen beki, analitik terazi (Gibertini, İtalya), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Stuart), pH metre, kapaklı deney tüpleri, cam pipetler, otomatik pipet ve pipet uçları, mezür (250-500 ml), cam balon, spor, lam-lamel, pens, karanlık alan mikroskobu, immersiyon yağı, Giemsa boya, preparat kutusu, makas, steril cam petri (90 mm), cryo tüp (2ml), bistüri, cam kavanoz.

3.1.4.1.2. Kullanılan Besiyeri, Seyreltici ve Reaktifler

Leptospira cinsi bakterilerin araştırılması ve kültüre edilmesi için Leptospira Medium Base EMJH (Difco) besiyeri olarak kullanıldı. Leptospira Medium Base EMJH (Difco) besiyerinin içeriği; 900 ml saf suya 2.3 gr Leptospira Medium Base toz besiyeri ve 100 ml steril EMJH sıvı suplament olacak şekilde ayarlandı.

Leptospira Medium Base (EMJH) şu şekilde hazırlandı: 900 ml saf suya 2.3 gram toz besiyeri tartılarak konuldu. Daha sonra manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile 45 ºC'de toz besiyerinin saf su içinde iyice çözünmesi sağlandı. Besiyeri çözeltisi hazırlandıktan sonra 121 ºC'de 15 dakika otoklavlandı. Steril hale getirilen besiyeri çözeltisi su banyosunda bekletilerek besiyeri sıcaklığı 45 ºC'ye ayarlandı. Besiyeri çözeltisinin sıcaklığı ayarlandıktan sonra 100 ml EMJH suplament ilave edildi. Hazırlanan besiyerinden steril deney tüplerine 10'ar ml aktarıldı. Hazırlanan 10 ml'lik besyeri tüpleri ekim yapılana kadar buzdolabında bekletildi. Ekimler yapılmadan önce kontaminasyonu azaltmak için her bir besiyeri tüpüne 40 µl 5-florourasil eklendi.

3.1.4.2. Kurbağa Örneklerinin Çalışılması

3.1.4.2.1. Kurbağaların Diseksiyonu

Önce kurbağa diseksiyonunda kullanılacak ekipman (makas, pens, vb.) dezenfekte edilerek hazır hale getirildi. Diseksiyonu yapılacak olan kurbağa örneklerine ötenazi için cam bir kavanoza eterli gazlı bez yerleştirildi. Diseksiyonu yapılacak olan kurbağa cam kavanoza koyularak eter ile ötenazi yapıldı. Kurbağa ötenazi yapıldıktan sonra diseksiyon tablasında iğnelerle sabitlenerek uygun ekipman ile diseksiyon işlemi yapıldı. Kurbağa böbreklerinin sindirim sistemi organlarıyla kontaminasyonunu engellemek için bu organlar ayrı bir ekipmanla denekten uzaklaştırıldı. Sindirim sistemi organları uzaklaştırıldıktan sonra kurbağa böbrekleri uygun ekipmanla (pens, makas, vb.) denekten çıkartılarak temiz bir cam petriye alındı ve kurbağa böbreği 3 eşit parçaya bölündü.

3.1.4.2.2. Kurbağa Böbreklerinin Besiyerine Ekilmesi

İlk olarak, ekimde kullanılacak ve daha önceden oda ısısında bekletilen besiyeri tüpleri hazır hale getirildi. Diseksiyonu yapılan her bir kurbağa 1'den 100'e kadar numaralandırıldı. Aynı numaralar besiyeri tüplerinin üzerine yazıldı. Petri kabındaki 3 eşit parçaya bölünmüş olan kurbağa böbreğinin bir parçası ezilerek besiyeri tüpüne ekildi. Bu işlem diğer kurbağa böbreklerine aynı şekilde uygulandı. Ekim yapılan tüm besiyeri tüpleri 28±2 ºC'ye ayarlanmış inkübatöre (Nüve) konularak 3 ay boyunca

inkübe edildi. İnkübasyondaki kültürler her ay karanlık alan mikroskobu ile kontrol edilerek üreme olup olmadığı değerlendirildi. Kontrol edilen kültürlere ait preparatlar 2 dakika %96'lık metil alkol ile tespit edildikten sonra Gimsa boyama ile 45 dakika boyanarak ışık mikroskobunda (Olympus) tekrar değerlendirildi ve kaydedildi.

3.1.4.2.3. Kurbağa Böbreklerinin Froti (yayma) Preparatlarının Hazırlanması

Önce yaymada kullanılacak ekipman hazır hale getirildi. Froti yapılacak her bir örneğe ait numara lamların üzerine yazıldı. Petri kabında kalan iki böbrek parçasından biri lam üzerine üzerine alınarak başka bir lam ile ezildi. İki lam arasındaki böbrek parçası üstteki lam hızlı bir şekilde çekilerek yayma hazırlandı. Bu işlem diğer numunelere aynı şekilde uygulandı. Hazırlanan yaymalar 24 saat kurutularak Giemsa boyama için hazır hale getirildi. Yaymalar % 96'lık metil alkolde 2 dakika bekletilerek tespit işlemi yapıldı. Tespit işlemi yapılan yayma preparatlar Giemsa boya ile 45 dakika boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi ve kaydedildi.

3.1.4.2.4. Moleküler Çalışma için Böbreklerin Saklanması

Böbreklerin saklanması için kullanılacak 2 ml'lik cryo tüpler 1'den 100'e kadar numaralandırılarak hazır hale getirildi. Petri kabındaki son böbrek parçası bir miktar besiyeri içeren cryo tüplerin içine koyularak daha sonra yapılacak olan moleküler çalışmada kullanılmak üzere -20 ºC'ye ayarlanmış derin dondurucuda saklandı.

3.1.5. Üremiş Kültürlerin Real time PCR Metoduyla Çalışılması

3.1.5.1. Kullanılan Ekipman

Real-Time PCR cihazı (Thermo Fisher Scientific, USA), 15 ml'lik falcon tüpü, 1,5 ml'lik ependorf tüpü, 10000 G'ye ayarlanabilen mikrosantrifüj, uygun hacimde otomatik pipetler (5 µl-10 µl-100 µl-100 µl), Nanodrop DNA saflık ölçüm cihazı (Thermo Scientific, USA).

3.1.5.2. Kullanılan Sarf Malzemeleri ve Bileşenler

Örnek toplama tüpü, DNA kolonu (PureLink Spin Kolonlar-İnvitrogen), parçalama tamponu (Purelink Genomic lysis/Binding Buffer-invitrogen), Purelink Genomic Digestion Buffer (İnvitrogen), Proteinaz K, 96-100% ethanol, PureLink Genomic Elution Buffer, bağlama tamponu, yıkama tamponu, çözücü tampon, patojen Leptospira primerleri, nükleaz içermeyen steril 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri, nükleaz içermeyen steril pipet uçları (uygun hacimde) ve steril pipet ucu kutusu.

3.1.5.3. Numunelerin Çalışılması

3.1.5.3.1. Bakterilerden DNA İzolasyonu

Bakterilerden DNA izolasyon kiti (Purelink-İnvitrogen) kullanılmıştır. Bu kitin kullanım şekli şöyledir;

1- Bakteri örneklerini içeren kültür sıvıları 15mL lik Falkon tüplere alınarak 10.000x g'de 15dk santrifüj yapıldı.

2- Santrifüj sonrası süpernatant atılarak dipteki bakteri içeren tortu 1,5 mL'lik Ependorf tüplerine alındı.

3- Üzerine 180 µl Purelink Genomic Digestion Buffer konuldu. 20 µl Proteinaz K eklenerek vorteks ile karıştırıldı.

4- 55C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

5- Daha sonra lizata 20 µl RNaz A eklenerek vorteksle karıştırıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

6- 200 µl Purelink Genomic lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen bir karışım elde edene kadar vortekslendi.

7- Lizata 200 µl 96-100% ethanol eklendi ve homojen bir karışım elde etmek için 5 sn vortekslendi.

8- DNA bağlanması aşamasına geçildi.

9- Lizatlar PureLink Spin Kolonlarına (yaklaşık 650 µl) alındı.

10- Oda sıcaklığında 10.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Alttaki koleksiyon tüpü atılarak kolon yeni bir koleksiyon tüpüne alındı.

11- DNA yıkama aşamasına geçildi.

12- Kolon, önceden etanol ile hazırlanmış olan Wash Buffer 1'den 500 µl eklenerek oda sıcaklığında 10.000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Koleksiyon tüpü atılarak yerine yenisi koyuldu.
13- Bir önceki basamak bu sefer 500 µl Wash Buffer 2 ile tekrar edildi.
14- Oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj tüpü atıldı.
15- DNA saflaştırma aşamasına geçildi.
16- Kolonlar 1,5 ml'lik Ependorf tüplere alındı. Kolon üzerine 50 L PureLink Genomic Elution Buffer eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
17- Oda sıcaklığında 10.000xg hızda 1 dakika santrifüj edilerek DNA'lar ependorf tüplere toplandı.
18- Nanodrop cihazında (Thermo Scientific, USA) DNAların saflık kontrolü ve miktar ölçümü yapıldı.

3.1.5.3.2. Real- Time (Gerçek Zamanlı) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Real-Time PCR için kullanılan primer çiftleri ve primerlerin referansları Tablo 3.2.'de (Roche, Almanya) belirtilmiştir. Analiz, Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpüne 0,2 mM dNTP mix, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1U Fast Start Taq DNA Polimeraz, 1x Reaksiyon Tamponu, 1x SybrGreen-I, 5 ng/µl kalıp DNA ve her bir primerden 0,5 µM koyulmuştur.. Cihazda, Çizelge 3.3.'te verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır. Real-Time PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 60°C - 95°C arasında çoğalma analizi yapılmıştır. Real-Time PCR cihazı verileri Roche Light Cycler Nano Software 3.2.'de (Roche, Almanya) analiz edilmiştir. Erime sıcaklığı (Tm) Çizelge 3.2 'de verilen aralıkta olan ve Eşik döngü sayısı (CT) 40'ın altında numuneler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Deneylerde negatif kontrol olarak deiyonize su numunesin DNA ekstraksiyonu kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Hedef Gen ve *Leptospira* Primer Dizileri

Hedef bakteri	**Primer Adı**	**5'-3' Primer dizisi**	**Hedef Ürün Tm(°C)**	**Hedef Gen**	**Referans**
L. interrogans	LI_202F	GCGATTCAGTTTAATCCTGC	80-81	secY (*Leptospira* için translokaz preproteini)	Ahmed vd. 2009
	LI_202R	GAGTTAGAGCTCAAATCTA			

Çizelge 3.3. Real-Time PCR Isı Döngüsü Programı**.**

Tespit formatı	**Reaksiyon Hacmi**	
SYBR Green	20 µl	
Program İsmi	**Döngü Sayısı**	**Analiz Modu**
Ön-İnkübasyon	1	
Çoğalma	40	Sayım

Erime Eğrisi	1		Erime Eğrisi	
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	**Okuma Modu**	**Bekletme (hh: mm: ss)**	**Hız (°C/s)**	**Okuma (°C başına)**
Ön inkübasyon				
95	-	00:10:00	4,8	-
Çoğalma				
95		00:00:20	4,8	-
55		00:00:20	2,5	-
72	Tek	00:00:25	4,8	-
Erime Eğrisi				
95		00:00:05	-	-
55		00:01:00	-	-
72	Sürekli	-	1	10
Soğuma				
40	Tek	00:00:10	2,5	-

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.1. Su Numunelerinin Alındığı Noktalarla İlgili Bulgular

Su örneklerinin alındığı noktalarda fiziksel ve meteorolojik ölçümler gerçekleştirildi. Bu numune noktalarıyla ilgili yapılan ölçümler ve bulunan değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Su numunesi alınan noktalarda yapılan ölçüm sonuçları

Numune Noktası	Hava Durumu	Hava Sıcaklığı (ºC)	Su Sıcaklığı (ºC)
1	Açık	19,7	18,3
2	Açık	20,2	19,4
3	Açık	20,5	19,3
4	Açık	21,4	20,1
5	Açık	22	20
6	Açık	22,3	19,8
7	Açık	23.4	21,7
8	Açık	24,1	21,3
9	Açık	24.7	20,8
10	Açık	26,4	21,4
11	Açık	27,6	21,2
12	Açık	27,8	20,7
13	Açık	28,9	22,1
14	Açık	29,4	21,9
15	Açık	30	22,1
16	Açık	31,3	23,3
17	Açık	32,4	24,1

18	Açık	32,7	24,3
19	Açık	33,1	25,4
20	Açık	33	24,2
21	Açık	33,4	25,1
22	Açık	33,6	25,6
23	Açık	32.2	25,3
24	Açık	32.1	24,1
25	Açık	31,4	23,8
26	Açık	31,2	24,4
27	Açık	30,7	22,9
28	Açık	30,5	21,8
29	Açık	28,5	22
30	Açık	27,9	21,7
31	Açık	26,3	22,1
32	Açık	26,2	20,8
33	Açık	25,8	21.1
34	Açık	27,3	22,1
35	Açık	27,6	21,4
36	Açık	28,2	21,9
37	Açık	28,4	22,3
38	Açık	30,1	23,4
39	Açık	30,4	23,7
40	Açık	31.1	24,9
41	Açık	31,6	24,6
42	Açık	32,2	25,2
43	Açık	32,4	25,4
44	Açık	32,3	26,1

4.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi Çalışmalarının Bulguları

Membran filtrasyon yöntemiyle toplam 44 su numunesinde *Leptospira* cinsi bakterilerilerin varlığı araştırıldı. Bu yöntem ile su numuneleri 0,2 µm ve 0,45 µm por çapındaki filtrelerden geçirilerek daha sonra filtreler 5-Fluorourasil içeren EMJH besiyerine yerleştirilerek 28±2 ºC'de inkübe edildi.

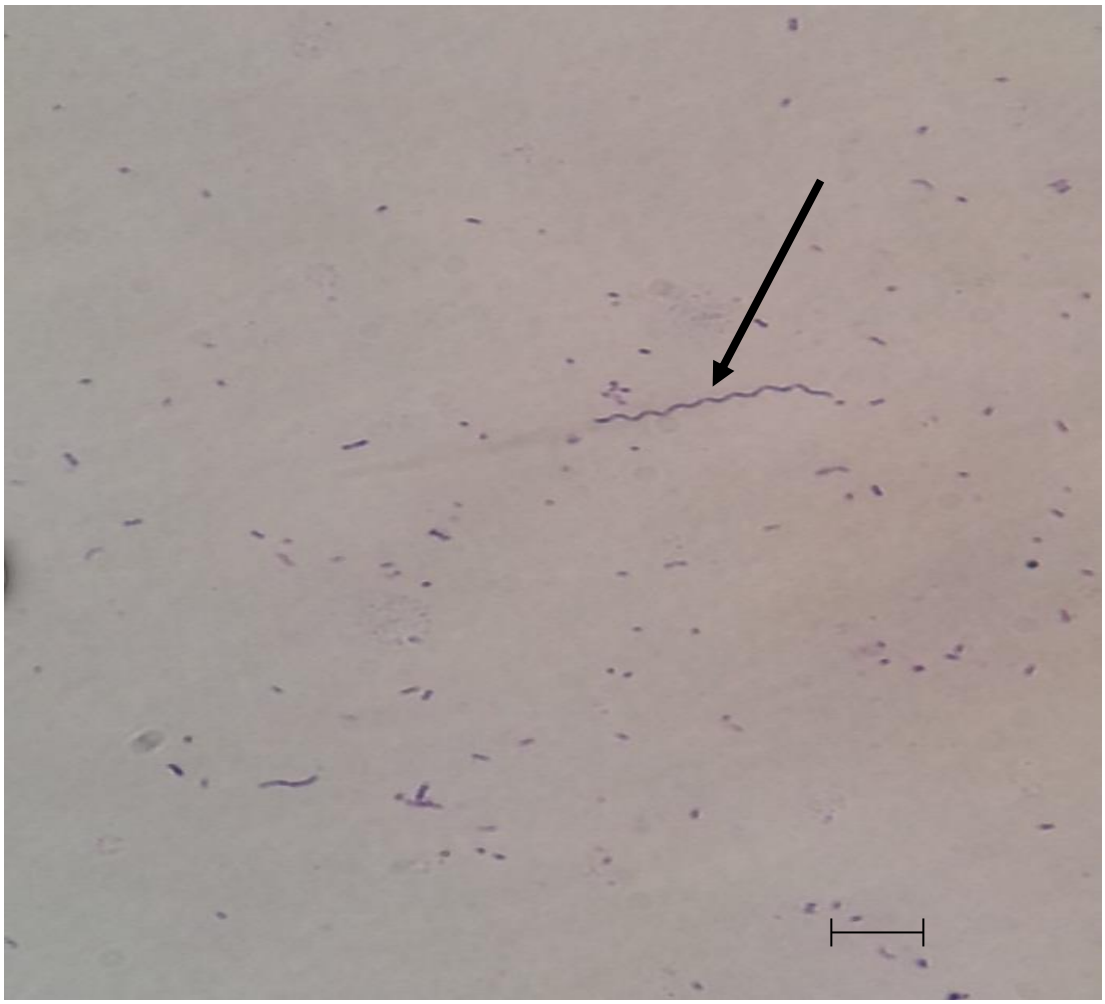
4.1.2.1. Leptospira Cinsi Bakterilerin EMJH Besiyerindeki Üreme Durumları

Her istasyondan *Leptospira* bakterilerileri için hem 0,2 µm hem de 0,45 µm por çapında filtreler kullanılarak besiyerine ekim yapıldı. Besiyerleri 28±2 ºC'de 3 ay boyunca inkübe edildi. Besiyerlerindeki üreme durumları 4 haftada bir karanlık alan mikroskobunda değerlendirilerek spiroket görülüp görülmediği kontrol edildi. Buna göre istasyonlardan alınan su numunelerine ait EMJH besiyerlerindeki üreme durumları Çizelge 4.2. deki gibi gerçekleşti.

Çizelge 4.2. İstasyonalara ait EMJH besiyerlerindeki aylık üreme durumları

İstasyon No	0,2 µm filtre içeren besiyeri			0,45 µm filtre içeren besiyeri		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-

18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	+	+	+
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-



Şekil 4. 1. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 31 nolu istasyona ait ekimden elde edilmiştir.[100x objektif **x** (4x)zoom)]

4.1.3. Kurbağa Böbreklerinden Yapılan Kültürlerdeki Üreme Durumları

Kültür yöntemi ile 100 adet kurbağa böbreği numunesi EMJH besiyerine ekildi. 28±2 ºC'de inkübe edilen kültürler 3 ay boyunca 4 haftalık periyotlarda üreme bakımından kontrol edildi.

4.1.3.1 Kurbağa Böbreklerine Ait Kültürlerin Üreme Durumları

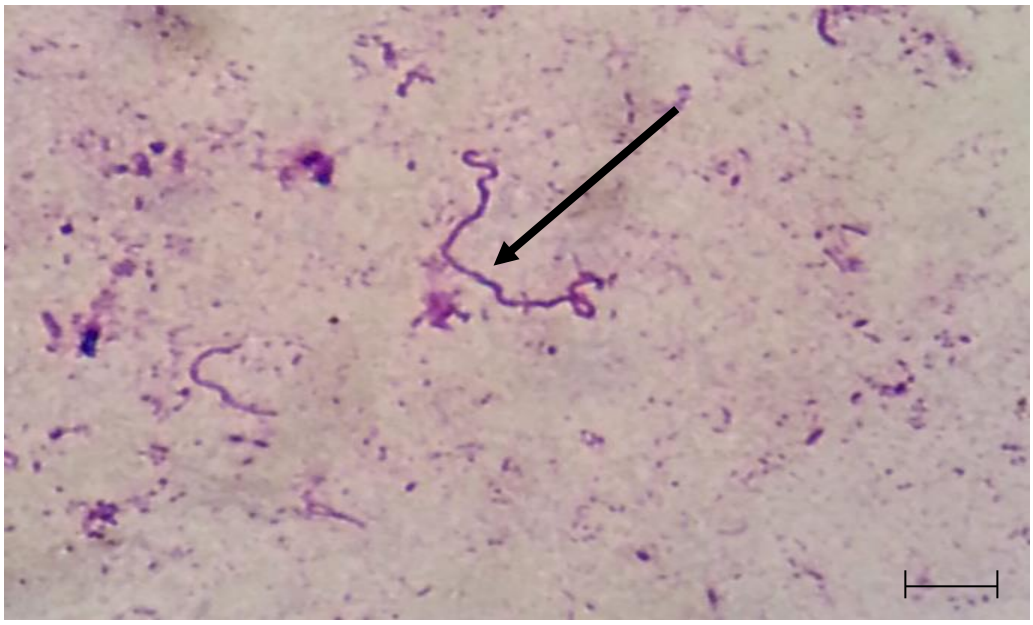
Her bir kültürden alınan bir miktar numune lam-lamel arası yapılarak karanlık alan mikroskobunda üreme bakımından değerlendirildi ve kaydedildi. Üreme olan

kültürlerden hazırlanan preperatlar Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobunda değerlendirildi. Ayrıca karanlık alan mikroskobunda hareketli spiroketlere ait video görüntüleri kaydedildi. Kurbağa böbreği numunelerine ait kültür sonuçları Çizelge 4.3'teki gibidir.

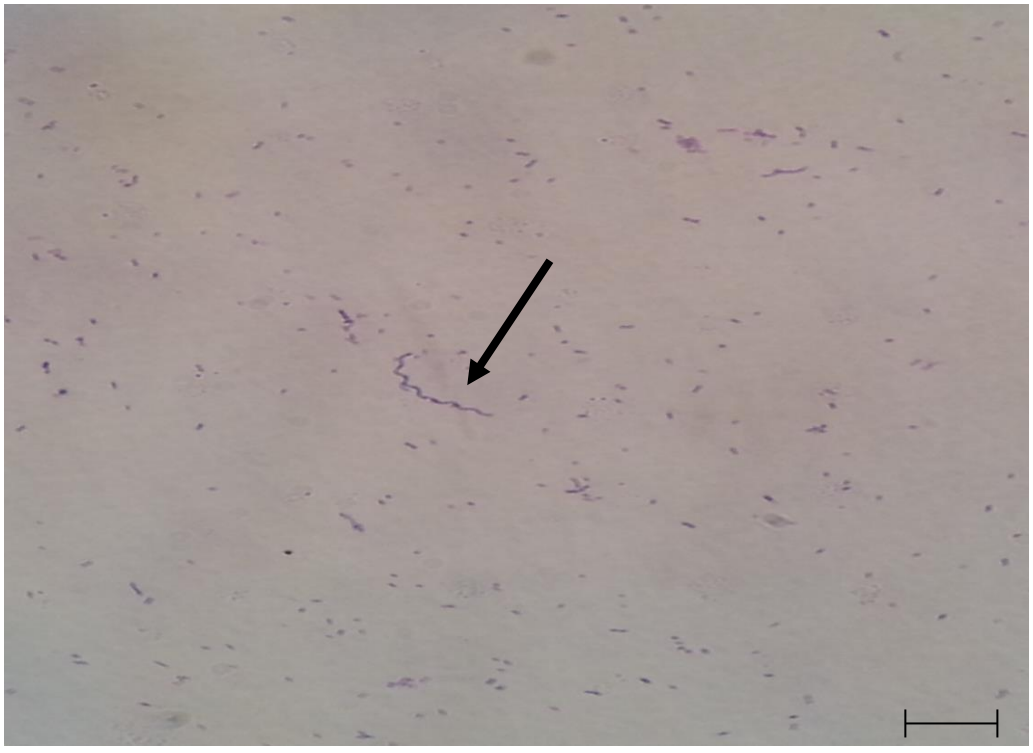
Çizelge 4.3. Kurbağa böbreklerine ait EMJH besiyerlerindeki aylık üreme durumları

Numune No	1.ay	2.ay	3.ay	Numune No	1.ay	2.ay	3.ay
1	-	-	-	51	-	-	-
2	-	-	-	52	-	-	-
3	-	-	-	53	-	-	-
4	-	-	-	54	-	-	-
5	-	-	-	55	-	-	-
6	-	-	-	56	-	-	-
7	-	-	-	57	-	-	-
8	-	-	-	58	-	-	-
9	-	-	-	59	-	-	-
10	-	-	-	60	-	-	-
11	-	-	-	61	-	-	-
12	-	-	-	62	-	-	-
13	-	-	-	63	-	-	-
14	-	-	-	64	+	+	+
15	-	-	-	65	-	-	-
16	-	-	-	66	-	-	-
17	-	-	-	67	+	+	+
18	-	-	-	68	-	-	-
19	-	-	-	69	-	-	-
20	-	-	-	70	-	-	-
21	-	-	-	71	-	-	-
22	-	-	-	72	-	-	-

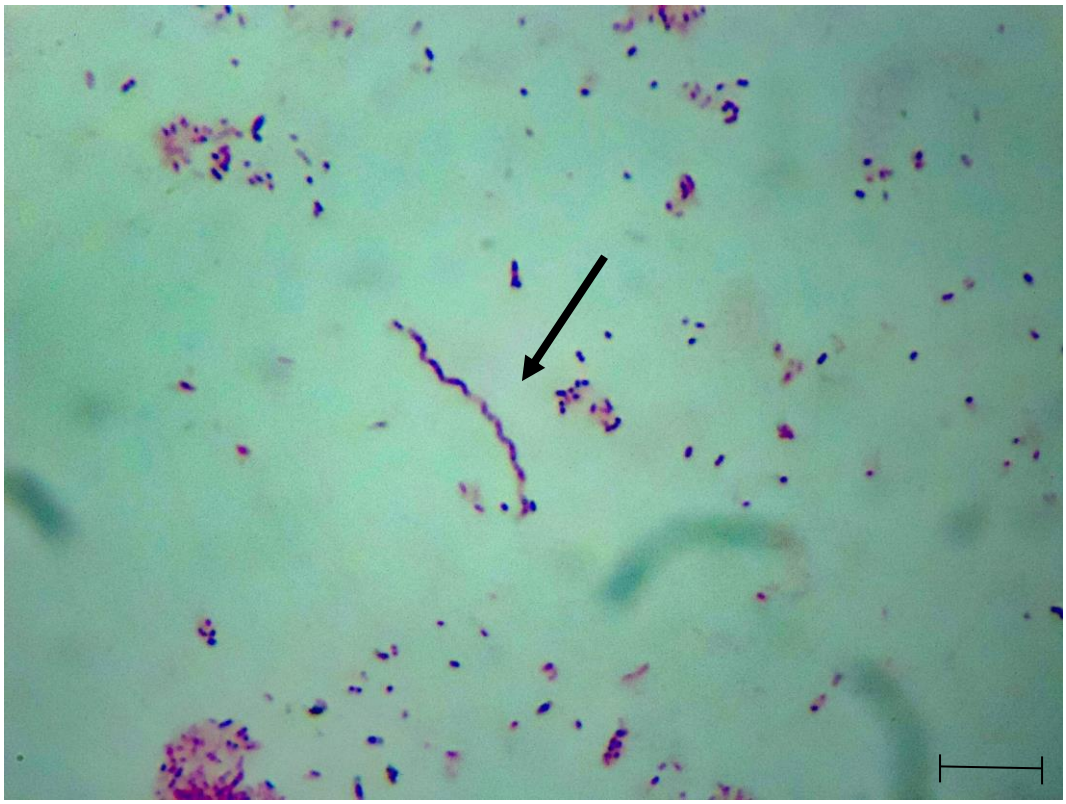
23	-	-	-	73	-	-	-
24	-	-	-	74	-	-	-
25	-	-	-	75	-	-	-
26	-	-	-	76	-	-	-
27	-	-	-	77	-	-	-
28	-	-	-	78	-	-	-
29	-	-	-	79	-	-	-
30	-	-	-	80	-	-	-
31	-	-	-	81	-	-	-
32	-	-	-	82	-	-	-
33	+	+	+	83	-	-	-
34	-	-	-	84	-	-	-
35	-	-	-	85	-	-	-
36	-	-	-	86	-	-	-
37	-	-	-	87	-	-	-
38	+	+	+	88	-	-	-
39	-	-	-	89	+	+	+
40	-	-	-	90	+	+	+
41	-	-	-	91	-	-	-
42	-	-	-	92	-	-	-
43	-	-	-	93	-	-	-
44	-	-	-	94	-	-	-
45	-	-	-	95	-	-	-
46	-	-	-	96	-	-	-
47	-	-	-	97	-	-	-
48	-	-	-	98	-	-	-
49	-	-	-	99	-	-	-
50	+	+	+	100	-	-	-



Şekil 4. 2. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 33 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]



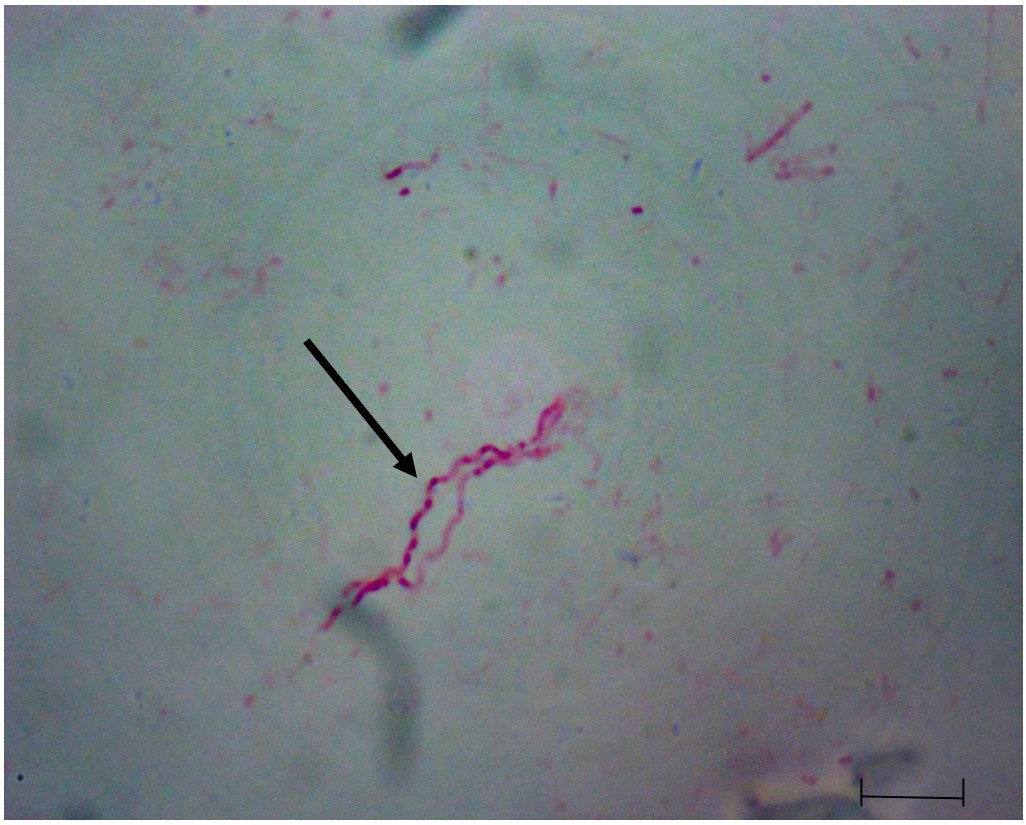
Şekil 4. 3. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 38 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]



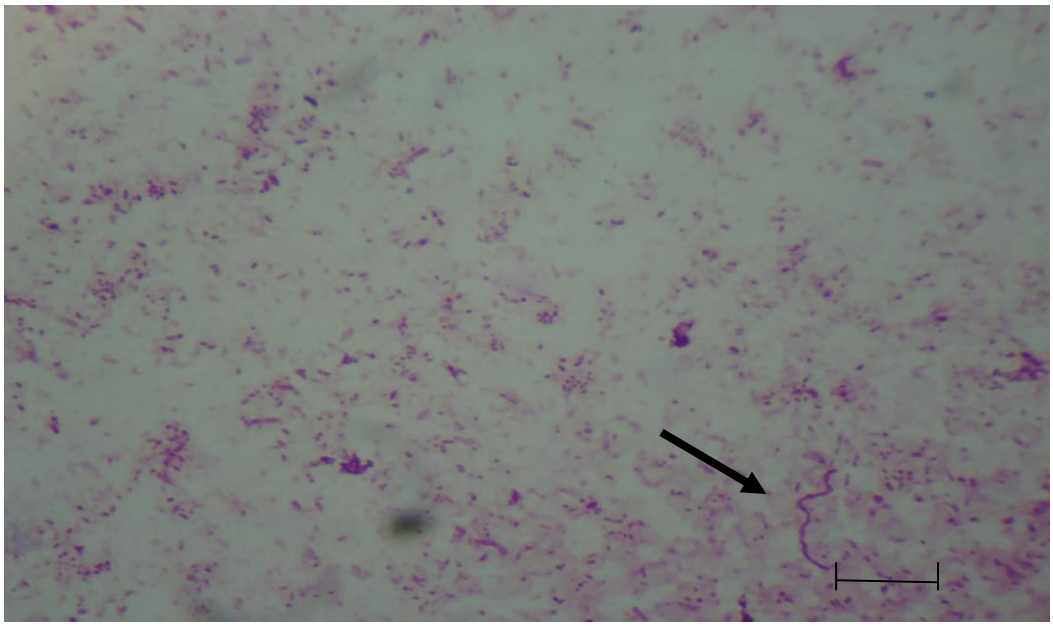
Şekil 4. 4. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 50 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]



Şekil 4. 5. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 64 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]



Şekil 4. 6. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 67 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]



Şekil 4. 7. Giemsa ile boyanmış spiroket içeren preparat örneği. Görüntü 90 nolu böbrek numunesine ait ekimden elde edilmiştir. [100x objektif **x** (4x)zoom]

4.1.4. Real-Time PCR İle Yapılan Çalışmaların Bulguları

Real-Time PCR yöntemi ile toplam 8 numunenin kültürü çalışıldı. Bu kültürler karanlık alan mikroskobunda Giemsa boyalı preperatların ışık mikroskobunda incelenmesi sonucu spiroket görülen yani pozitif olan numunelere ait kültürlerdir. Deneylerde steril saf su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 60°C - 95°C arasında çoğalma analizi yapılmıştır.

4.1.4.1 *Leptospira İnterrogans* Tespiti

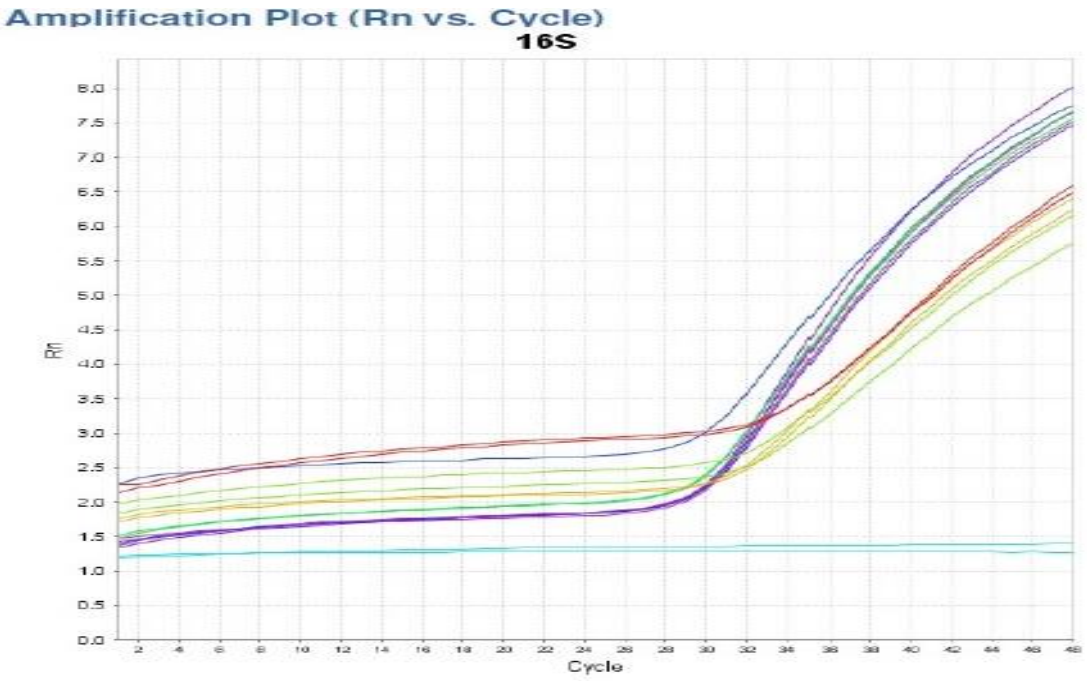
Leptospira interrogans tespiti için iki farklı primer (LI_202F ve LI_202R) kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar karanlık alan mikroskobisi ve Giemsa boyalı preperatların ışık mikroskobunda incelenmesi sonucu pozitif üreme tespit edilen EMJH besiyerindeki kültürden yapıldı. Yapılan çalışmada kütlüdeki bakterilerin ürde *Leptospira interrogans* olmadığı belirlendi. Çalışma ile ilgili PCR sonuçları şekillerdeki gibidir.

Results Summary

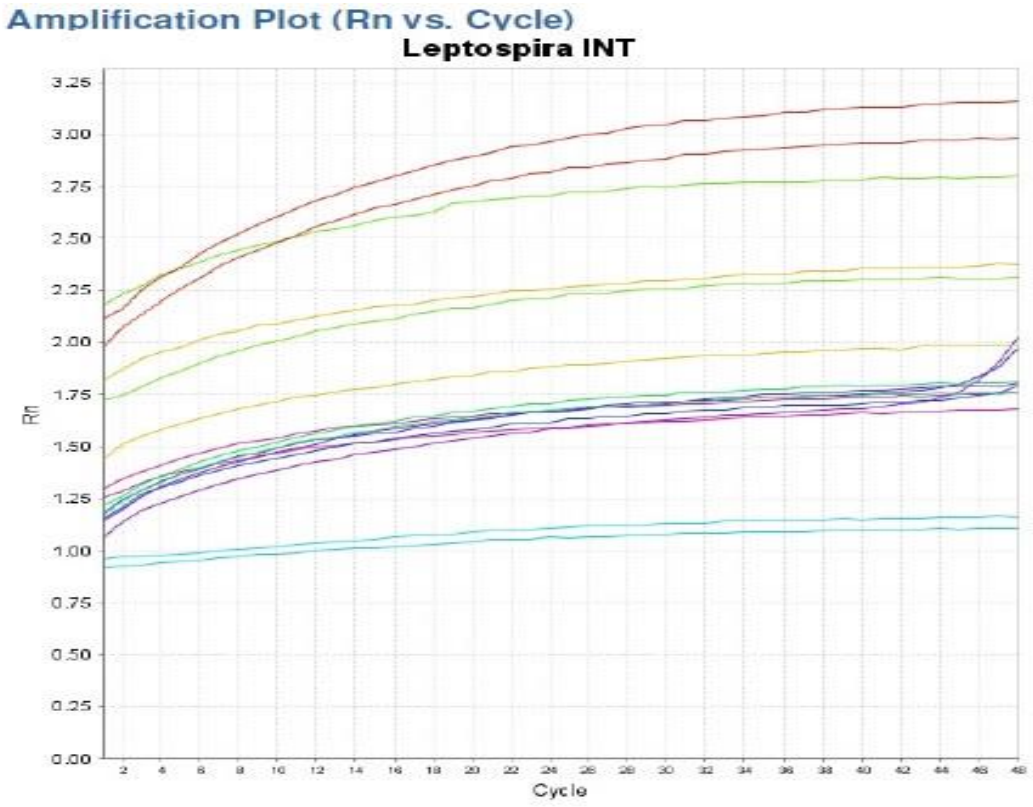
Sample	C_T (Mean)	C_T (Std Dev)	ΔC_T (Mean)	ΔC_T (Std Err)	$\Delta\Delta C_T$	RQ	RQ (Min)	RQ (Max)
Target: 16S †								
31 *								
33	33.7822	0.2481						
38	31.9486	0.1197						
50	29.012	0.2511						
64	28.9001	0.0259						
67	28.8343	0.1868						
89	30.7334	0.1894						
90	28.9777	0.1184						
Target: Leptospira INT								
31 *								
33								
38								
50								
64								
67								
89								
90								

Notes:
(*) denotes Calibrator
(†) denotes Endogenous Control

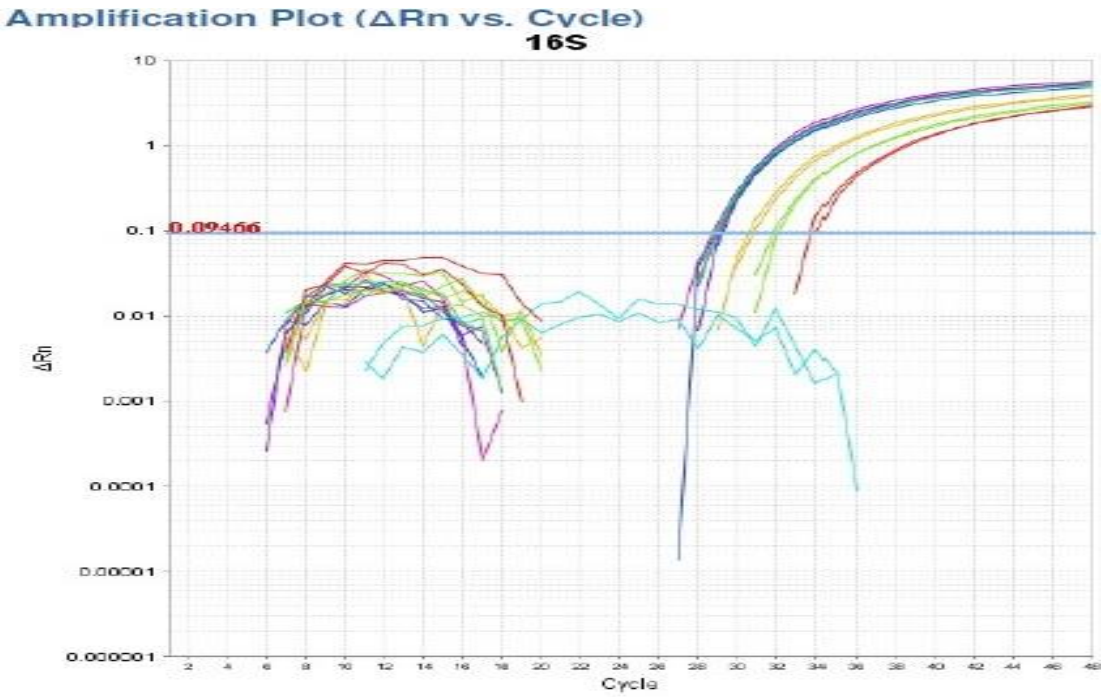
Şekil 4. 8. Çalışılan kültürlere ait PCR sonuçlar özeti



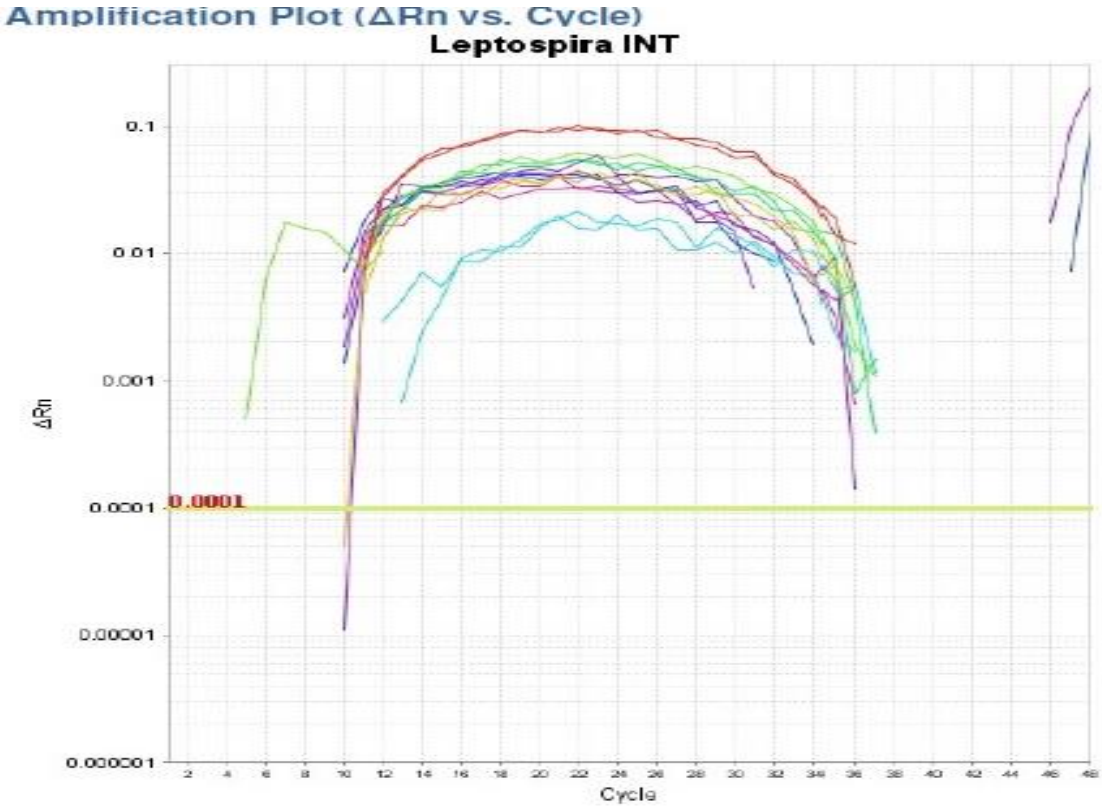
Şekil 4. 9. Rn ve Döngü ‘ye göre 16 S RNA’ya ait amflikasyon eğrisi



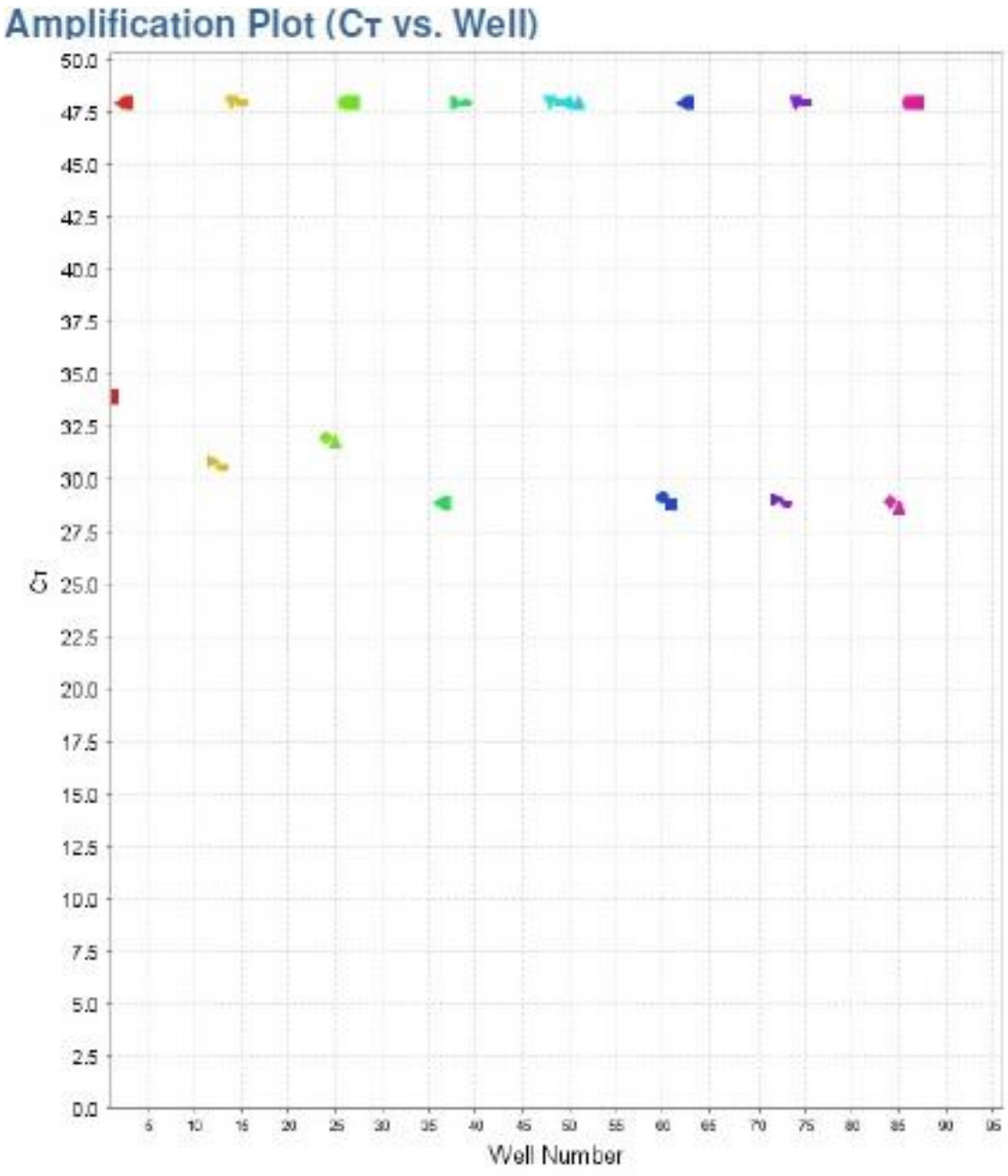
Şekil 4.10. Rn ve Döngü ‘ye göre *Leptospira interrogans* (Total DNA)amflikasyon eğrisi



Şekil 4.11. ΔRn ve Döngü ‘ye göre 16s rDNA amflikasyon eğrisi



Şekil 4.12. ΔRn ve Döngü ‘ye göre *Leptospira interrogans* (Total DNA) amflikasyon eğrisi



Şekil 4.13. 16S ve *Leptospira interrogans'ın* Kuyucuk ve Eşik Döngü Sayısına göre çoğalma durumu

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Ct	ΔCt
A1	33	16S	UNKNOWN	33.6068	
A2	33	16S	UNKNOWN	33.9577	
A3	33	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
A4	33	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
B1	89	16S	UNKNOWN	30.8673	
B2	89	16S	UNKNOWN	30.5995	
B3	89	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
B4	89	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
C1	38	16S	UNKNOWN	32.0332	
C2	38	16S	UNKNOWN	31.864	
C3	38	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
C4	38	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
D1	64	16S	UNKNOWN	28.9184	
D2	64	16S	UNKNOWN	28.8818	
D3	64	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
D4	64	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
E1	31	16S	UNKNOWN	Undetermined	
E2	31	16S	UNKNOWN	Undetermined	
E3	31	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
E4	31	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
F1	50	16S	UNKNOWN	29.1898	
F2	50	16S	UNKNOWN	28.8345	
F3	50	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
F4	50	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
G1	90	16S	UNKNOWN	29.0615	
G2	90	16S	UNKNOWN	28.894	
G3	90	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
G4	90	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
H1	67	16S	UNKNOWN	28.9864	
H2	67	16S	UNKNOWN	28.7023	
H3	β7	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	
H4	67	Leptospira INT	UNKNOWN	Undetermined	

Şekil 4. 14. 16S ve *Leptospira interrogans'*a ait sonuçlar tablosu

4.1.5. Kurbağa Böbreklerinin Froti (Yayma) Bulguları

Frotti yöntemi ile 100 adet kurbağa böbreğine ait 200 adet yayma preperat hazırlandı. Bu preperatlar Giemsa ile boyanarak ışık mikroskobunda spiroket varlığı bakımından incelendi. Yapılan mikroskobik incelemede hiçbir yayma preperatta spiroket tespit edilemedi.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Edirne merkezi ve ilçelerindeki çevresel sular membran filtrasyon ve Real-Time PCR yöntemi kullanılarak *Leptospira* cinsi bakterilerin varlığının araştırılması amacıyla çalışıldı. PCR yöntemi ile *Leptospira* cinsi bakterilerin tespiti ve göreceli olarak DNA miktarınının belirlenmesi hedeflendi. Membran filtrasyon yöntemi ile araştırılan *Leptospira* cinsi bakteriler soyutlanarak karanlık alan mikroskobu ile canlı olarak tespiti edildi. Karanlık alan mikroskobunda tespit edilen bakterilerin Giemsa boyaması yapılarak, ışık mikroskobunda incelendi.

Ayrıca Meriç, İpsala ve Süloğlu bölgelerinden toplanan kurbağaların diseksiyonu yapılarak kurbağa böbreklerinden 5-fluorouracil katkılı EMJH besiyerine kültür ekimleri gerçekleştirildi. Üreyen kültürler karanlık alan mikroskobuyla incelenerek spiroketlerin varlığı araştırıldı. Spiroket tespit edilen kültürlerden preperatlar hazırlanarak Giemsa boyama yapıldı. Boyanan preperatlar ışık mikroskobunda incelenerek görüntüler kaydedildi. PCR yöntemiyle araştırılan spiroketlerin tespiti ve göreceli olarak DNA miktarı saptandı, kültürlerden hazırlanan preperatlarda karanlık alan mikroskubu ve ışık mikroskobu kullanılarak spiroket tespiti yapıldı. Kurbağa böbreklerinden hazırlanan yaymalar (froti) Giemsa ile boyanarak spiroket varlığı gösterildi.

Su numunesi alınan tüm noktalar farklı çevresel ve yüzeysel su örneklerini (gölet, baraj, sulama kanalı, nehir vs.) temsil etmektedir. Bu istasyonlardan 15 tanesi nehir, 1 tanesi dere, 6 tanesi çeltik tarlası, 14 tanesi göl/gölet, 4 tanesi baraj ve 4 tanesi sulama kanalıdır. Bu istasyonlardan 31 nolu istasyona ait su numunesinde spiroket tespit edilirken diğer su numunelerinde spiroket varlığı tespit edilememiştir. Sadece 31 nolu istasyonda spiroket tespit edilmesi özellikle su numunesi alınan noktada kemirgen

hayvan ayak izlerinin görülmesinden dolayı bu kemirgen hayvanların idrarları ile suya spiroketleri bulaştırdığı düşünülmektedir. 26 ve 27 numaralı istasyona ait su numuneleri sığırların idararları ile bulaştırdığı noktalardan alınmasına rağmen spiroket tespit edilememiştir. Bu durum su numunesi alınan bölgedeki sığırların idrarlarında spiroket var olmadığını nispeten düşündürsede, sığırlarda kesin bir spiroket varlığının araştırılması ayrıntılı bir çalışma gerektirmektedir.

Çevresel sular kimyasal ve biyolojik kirleticilere maruz kalmaktadır. *Leptospira interrogans*, kemirgen (fare vs.) ve memeli hayvanların idrarlarını doğaya bulaştırmalarıyla çevresel sulara karışır. Durgun sularda ve bazik ortamlarda bile uzun süre canlı kalabilmektedirler. 31 nolu numune noktası dışındaki sularda tespit edilemeyecek kadar az sayıda bulunmalarından ya da su numunesi alınan bölgeler kemirgen hayvanların idararlarına maruz kalmadığından dolayı tespit edilemediği düşünülmektedir.

Gerçek zamanlı PCR yöntemiyle karanlık alan mikroskopisi ve Giemsa boyanmış preperatların ışık mikroskobuyla incelenmesi sonucu spiroket tespit edilmiş, 8 tane kültürde *Leptospira interrogans* için soyutlama çalışması yapılmıştır. Bu yöntemle hem kurbağa böbreklerine ait kültürlerden hem de membran filtrasyon yöntemiyle üretilmiş kültürden tespit çalışmaları yapılmıştır. Her iki örnek çeşidinden yapılan çalışmada *Leptospira interrogans* tespit edilememiştir. Üremiş kültürlerdeki spiroketlerin tanısı için sadece *Leptospira interrogans*'a özgü primerler kullanıldığından yapılan tespit çalışması bu spiroketlerin *Leptospira biflexa* serogrubuna ait olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim çevresel sularda *Leptospira biflexa* varlığı görülmektedir. Bu spiroketlerin *Leptospira biflexa* serogrubuna ait olup olmadığı hakkında kesin bir bilgi elde edebilmek için bu bakterilerin *Leptospira biflexa'ya* özgü primerlerle yapılacak PCR yöntemi ile bir tespit çalışmasına ihtiyaç vardır. Karanlık alan mikroskobisi ve Giemsa ile boyanmış preperatların ışık mikroskobunda incelenmesi sonucu elde edilen görüntüler, tespit edilen spiroketlerin *Leptospira biflexa* serogrubuna ait olabileceği kanısını güçlendirmektedir.

Froti (yayma) yöntemi ile hazırlanan 200 adet böbrek yaymasının giemsa boyanması ile yapılan preperatlarda spiroketlere rastlanmamıştır. Böbrek parçalarından hazırlanan yaymalarında spiroket tespit edilmemesi böbreklerdeki bakteri sayısının çok az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ülkemizdeki leptospiroz çalışmaları çoğunlukla insanlarda vaka sunumları ve hayvanlarda yapılan salgın temelli serolojik çalışmalar şeklindedir. Bu sebepten dolayı hastalık insidansını ve prevalansını ortaya koyabilecek devamlı çalışmalar bulunmamaktadır (Saltoğlu, 2003).

Leptospira kemirgen (fare vs.), evcil ve yabani memeli(sığır, keçi, koyun, geyik vs.) hayvanları enfekte eder. Bu spiroketler insanlarda leptospiroz enfeksiyonuna sebep olurlar. Spiroketler konak hayvanların böbreklerine yerleşir ve idrarların doğaya atılmasıyla çevreyi bu şekilde kirletirler. Doğada bulunan leptospiralar yiyecek ve içeceklere bulaşarak ve insanların kontamine besinleri tüketmesiyle spiroketler insanlara bulaşmış olur (Özkuyumcu, 2009).

Kurbağalar *Leptospira* bakterlerinin enfekte ettiği hayvanlar arasında sayılmamasına rağmen, bu çalışmada bu spiroketlerin kurbağa böbreklerindeki varlığı ilk kez tespit edilmiştir. Bu açıdan bakıldığında kurbağa böbreklerinde leptospira varlığı ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma Edirne şehir merkezi ve ilçelerde belirlenmiş numune noktalarındaki sularda *Leptospira* varlığı hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. Nehirlerde, derelerde, göletlerde ve sulama kanallarındaki Leptospira varlığı farklı noktalarda ve derinlikte Leptospira taşıyan hayvanların bu bölgelerde yaşayıp yaşamadığına göre değişkenlik gösterebilir. Her ne kadar tek bir su numunesinde spiroket varlığı tespit edilmiş olsada, istasyon sayılarının arttırılması ve çevresel sulardan numune alımının daha uzun zaman dilimlerine yayılması ile bu bakterilerin izole edilme ihtimali yükseltilebilir. Kurbağa böbreklerine ait küitürlerle yapılan moleküler çalışmalarda *L. interrogans* tespiti yapılamamış olsada farklı primerler ve diğer moleküler yöntemler kullanılarak kesin bir sonuç elde edilebilir.

KAYNAKLAR

Ahmed, N., Devi, S.M., Valverde Mde, L., Vijayachari, P., Machang'u, R.S., Ellis, W.A., Hartskeerl, R.A., (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. *Annanls of Clinical Microbiology. Antimicrobials, 5*, 28.

Akdur, R.(2007) Suların Temizliği ve Su Kesintilerinin Halk Sağlığına Etkileri. *TSS Türk Sağlık-Sen Dergisi, 15*, 24-27.

Akhan, M. (2007). *"Bir Kaynak Suyu Tesisindeki Mikrobiyal Kontaminasyon Kaynaklarının İncelenmesi",* (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Akın, M. Akın, G. (2007).Suyun önemi, Türkiye'de Su Potansiyeli, Su Havzaları ve Su Kirliliği. *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi, 47*(2), 105-118.

Baharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. (2003). Leptospirosis: a zootonic disease of global importance. *The Lancet. 3*, 757-771.

Baril, C., Herrmann, J.L., Richaud, C., Margarita, D., Girons, I.S., (1992). Scattering of the rRNA genes on the physical map of the circular chromosome of Leptospira interrogans serovar icterohaemorrhagiae. *Journal of Bacteriology. 174,* 7566–7571.

Bolin CA, Koellner P. (1988) Human to human transmission of leptospira interrogans by milk. *The Journal of Infectious Diseases. 158*, 246-248.

Boursaux-Eude, C., Saint Girons, I., Zuerner, R.L., (1998). Leptospira genomics. Electrophoresis *19*, 589–592.

Boursaux-Eude, C., Saint Girons, I., Zuerner, R.L., (1995). IS1500, an IS3-like element from Leptospira interrogans. *Journal of Cliical Microbiology, 141*, 2165–2173.

Brenner DJ, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in

the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. Nov. And four new Leptospira genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology. 49,* 839-85.

Brown, P.D., Levett, P.N., (1997). Differentiation of Leptospira species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *Journal of Medical. Microbiology*. *46,* 173–181.

Cengiz K, Sahan C, Sünbül M, Leblebicioğlu H. (2002). Acut renal failure in leptospirosis in the black sea repion in Turkey. *International Urol Nephrology*. *33,* 133-136.

Ciceroni, L., Ciarrocchi, S., Ciervo, A., Petrucca, A., Pinto, A., Calderaro, A., Viani, I Galati, L., Dettori, G., Chezzi, C., (2002). Differentiation of leptospires of the serogroup Pomona by monoclonal antibodies, pulsed-field gel electrophoresis and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Research in Microbiology, 153,* 37–44.

Collares-Pereira, M., Korver, H., Cao Thi, B.V., Santos-Reis, M., Bellenger, E., Baranton, G., Terpstra, W.J., (2000). Analysis of Leptospira isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiology Letters*. *185,* 181–187.

Corney, B.G., Colley, J., Djordjevic, S.P., Whittington, R., Graham, G.C., (1993). Rapid identification of some Leptospira isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. *31,* 2927–2932.

Coşkurlu H, Öztürk R, Polat E, Bağdatlı Y. (1995) Bir leptospiroz olgusu. *İnfeksiyon Dergisi*. *9,* 223-224.

ÇALIK, E. MENTEŞ, Y., KARADAĞ, F., DAYIOĞLU, H. (2004). İçme Suyunun Sağlık Açısından Değerlendirilmesi. *DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6,* 17-26.

Çelikbaş AK, Ulu A, Eren S, Ergönül O, Dokuzoğuz B. (2005). Two leptospirosis and review of the national literature. *Mikrobiyoloji Bülteni*, *39,* 357-361.

Dedeakayoğulları, H., ÖNAL, A.E. (2009). Çevre-İnsan Sağlığı Açısından Su ve Su Analizinin Önemi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi, 72,* 65-70.

Dikken, H., Kmety, E., (1978). Serological typingmethods of leptospires. Bergan, T., Norris, J.R. (Eds.), *Methods in Microbiology* (s.259–307). London: Academic Press

Dutta TK, Christopher M. (2005). Leptospirosis an overwiev. *The Journal of the Association of Physicians of India, 53,* 545-515.

Ellis, W.A., Montgomery, J.M., Thiermann, A.B., (1991). Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of Leptospira interrogans. *Journal of Clinical Microbiology, 29,* 957–961.

Ellis, W.A., Thiermann, A.B., Montgomery, J., Handsaker, A., Winter, P.J., Marshall, R.B., (1988). Restriction endonuclease analysis of Leptospira interrogans serovar hardjo isolates from cattle. *Research Veterynary Science, 44,* 375–379.

Erdinç FS, Koruk ST, Hatipoğlu CA, Kınıklı S, Demiröz AP. (2005) Three cases of anicteric leptospirosis from Turkey: mild to severe complications. *Journal of Infections, 52,* 45-48.

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., (1999). *Leptospira and Leptospirosis.* Melbourne, Australia: MedScience.

Galloway, R.L., Levett, P.N., (2008). Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of Leptospira serovars. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene, 78,* 628–632.

Gerritsen,M.A., Smits, M.A., Olyhoek, T., (1995). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting for rapid identification of leptospiras of serogroup Sejroe. *Journal of Medical Microbiology, 42,* 336–339.

Grimont, F., Grimont, P.A.D., (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Annales Institute Pasteur, 137B,* 165–175.

Gönüllü N, Bal Ç, Şalcıoğlu M, Güvener Z, Çevik H, Anığ Ö. (1998). Bir olgu nedeniyle leptospiroz. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 28,* 40-43.

Günel, T. (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR", Türkiye Klinikleri. *Journal of Medical Science, 27,* 763-767.

Halkman, A. K. (2005). *Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Ankara: Başak Matbaacılık.

Hasde, M. Oğur, R. ve Tekbaş, Ö. F. (2002). Ankara İl Merkezinde Bulunan Askeri Birliklerdeki Kuyu Sularının Polimeraz Zincir Reaksiyon Sistemi ile Mikrobiyolojik Analizlerinin Yapılması. *Gülhane Tıp Dergisi*, *44*(4), 373-377.

Heath CW, Alexander AD, Galton MM. (1965). Leptospirosis in the United States. Analysis of 483 cases in man, 1949-1961. *The New England Journal of Medicine*, *273*, 857-864.

Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Gregori, F., Higa, Z.M., Vasconcellos, S.A., Richtzenhain, L.J., (2000). Detection and differentiation of Leptospira spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veteranary of Microbiology*, *73*, 261–267.

Herrmann, J.L., Bakoss, P., Korver, H., Bulu, A.A., Bellenger, E., Terpstra, W.J., Saint Girons, I., Baranton, G., (1994). A new serovar in the Grippotyphosa serogroup comprising leptospiral isolates from different regions. *International Journal of Systematic of Bacteriology*, *44*, 362–364.

Herrmann, J.L., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., (1992). Pulsedfield gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, *30*, 1696–1702.

Herrmann, J.L., Baril, C., Bellenger, E., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., (1991) . Genome conservation in isolates of Leptospira interrogans. *The Journal of Bacteriology, 173*, 7582–7588.

Kaufmann, A.F. Weyant, R.S. (1995). Leptospiraceae. *In: Manual of clinical microbiology* (6th edition), (s.621). Washington, DC: ASM Press.

Kawabata, H., Dancel, L.A., Villanueva, S.Y., Yanagihara, Y., Koizumi, N., Watanabe, H., (2001). flaB-polymerase chain reaction (flaB-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection andidentification of Leptospira spp. *Microbiology and Immunology*, *45*, 491–496.

Kositanont, U., Chotinantakul, K., Phulsuksombati, D., Tribuddharat, C., (2007). Assessment of Southern blot ribotyping for differentiation of Leptospira strains isolated from field rats. *Journal of Microbiology Methods*, *69*, 288–297.

Lal KN, Aarons I, Woodroffe AJ, et al. (1982). Renal lesions in leptospirosis. *Australian and New Zealand Journal of Medicine, 12,* 276-281.

Letocart, M., Baranton, G., Perolat, P., (1997). Rapid identification of pathogenic Leptospira species (Leptospira interrogans, L. borgpetersenii, and L. kirschneri) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 35,* 248–253.

Levett, P.N. (2003). Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases, 36,* 447–452.

Levett, P.N., (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews, 14,* 296–326.

Letocart, M., Baranton, G., Perolat, P., (1997). Rapid identification of pathogenic Leptospira species (Leptospira interrogans, L. borgpetersenii, and L. kirschneri) with species-specific DNA probes produced by arbitrarily primed PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 35,* 248–253.

Madigan, M. T. Martinko, J. M. (2010). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi* (11.Baskı) . Cumhur Çökmüş(Ed.). Ankara: Palme Yayıcılık,

Majed, Z., Bellenger, E., Postic, D., Pourcel, C., Baranton, G., Picardeau, M., (2005). Identification of variable-number tandem-repeat loci in Leptospira interrogans sensu stricto. *Journal of Clinical Microbiology, 43,* 539–545.

Matsunaga J, Sanches Y, Xu X, Haake DA. (2005). Osmolarity, a key environ mental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infecttion and Immunity,73,* 70-75.

Mcbride AJ, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. (2005) Leptospirosis. *Current opinion in infectious diseases, 18,* 376-386

Morgan J, Bornstein SL and Karpati AM, et al. (2002) Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield. Illinois. *Clinical of İnfectious Diseases,34,* 1593-1599.

Murhekar MV, Sugunan AP, Vijayachari P, Sharma S, Sehgal SC. (1998). Risk factors in the transmission of leptospiral infection. *The Indian Journal of Medical Research, 107,* 218-222.

Nally JE, Chow E, Fishbein MC, et al. (2005). Changes in lipopolysaccharide o-antigen distinguish acute versus chronic Leptospira interrogans infections. *Infection and Immunity*, *73,* 3251-3257.

Nallly JE, Chantranuwat C, Wu XY, et al. (2004). Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. The *American Journal of Pathology*, *164,* 1115-1119.

Natarajaseenivasan, K., Vijayachari, P., Sharma, S., Roy, S., Sugunan, A.P., Biswas, D., Sehgal, S.C., (2005). Phylogenetic relatedness among leptospiral strains belonging to same serovar recovered from patients with different clinical syndromes. *Infection Genetics. Evolution*, *5,* 185–191.

Onul, B. (1980). Enfeksiyon Hastalıkları Kitabı (6. Baskı), *Weil Hastalığı* (s.39, 916-925) Ankara: Ankara Üniversitesi Yayınları.

Özkuyumcu, C. (2009). *Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı*, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri,

Pavan, M.E., Cairo´ , F., Brihuega, B., Samartino, L., (2008). Multiple-locus variablenumber tandem repeat analysis (MLVA) of Leptospira interrogans serovar Pomona from Argentina reveals four new genotypes. *Comparative Immunology, Microbiology Infectious Diseases, 31,* 37–45.

Perolat, P., Lecuyer, I., Postic, D., Baranton, G., (1993). Diversity of ribosomal DNA fingerprints of Leptospira serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Research Microbiology*, *144,* 5–15.

Picardeau, M., Bulach, D.M., Bouchier, C., Zuerner, R.L., Zidane, N.,Wilson, P.J., Creno, S., Kuczek, E.S., Bommezzadri, S., Davis, J.C., McGrath, A., Johnson, M.J., Boursaux- Eude, C., Seemann, T., Rouy, Z., Coppel, R.L., Rood, J.I., Lajus, A., Davies, J.K., Me´ digue, C., Adler, B., (2008). Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. *PLos One, 3*(2), 1-9

Ralph, D.,McClelland, M.,Welsh, J., Baranton, G., Perolat, P., (1993). Leptospira species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *Journal of Bacteriology, 175,* 973–981.

Ramachandran S, Perera M. (1977). Cardiac and pulmonary involvement in leptospirosis. *Transaction of Royal Society of Tropical Mededicine and Hygiene, 71,* 56-59

Ramadass, P., Latha, D., Senthilkumar, A., Srinivasan, P., Saranya, N., (2002). Arbitrarily primed PCR—a rapid and simple method for typing of leptospiral serovars. *Indian Journal of Medical Microbiology, 20,* 25–28.

Reşat, R. (1915) Weil hastalığı. *Ceride-i Tıbbıye-i Askeriye, 3,* 974-993.

Romero EC, Billerbeck AE, Lando VS, Camrgo ED, Souza CC, Yasuda PH. (1998). Detection of leptospira DNA in patients with aseptic meningitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology, 36,* 1453-1458.

Roy, S., Biswas, D., Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Sehgal, S.C., (2005). A clone of Leptospira interrogans sensu stricto is the major cause of leptospirosis in the archipelago of Andaman and Nicobar Islands, India. *Letters in Applied Microbiology, 41,* 179–185.

Roy, S., Biswas, D., Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Sehgal, S.C., (2004). A 22-mer primer enhances discriminatory power of AP-PCR fingerprinting technique in characterization of leptospires. *Tropical Medicine and International Health, 9,* 1203–1209.

Que-Gewirth NL, Ribeiro AA, Kalb SR, et al. (2004). A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. *The Journal of Biological Chemistry, 279,* 2542-2549.

Salaün, L., Me´ rien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau,M., (2006). Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *The Journal of Clinical Microbiology, 44,* 3954–3962.

Saltoğlu, N., (2003). Leptosira İnfeksiyonları: Türkiye ve Dünyada Durum, XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. *Klimik Dergisi, 16,* 108-110.

Saltoğlu N, Aksu HZ, Tasova Y, et al. (1997). Leptospirosis: twelve Turkish patients with weil syndrome. *Acta Med Okayam, 51,* 339-343.

Seguro AC, Lomar AV, Rocha AS. (1990) Acute renal failure of leptospirosis: non oliguric and hypokalemic forms. *Nephron. 55,* 146-149.

Sejvar J, Tangkanakul W, Ratanasang P, et al. (2005). An outbreak of leptospirosis, Thailand-the importance of the laboratory. *Southest Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 36(2),* 95-289.

Shaked Y, Shpilberg O, Samra Y. (1993). Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious Diseases, 17,* 271-247.

Simon MC, Ortega C, Alonso JL, Girones O, Muzquiz JL, Garcia J. (1999). Risk factors associated with the seroprevalence of leptospirosis among students at the veterinary school of Zaragoza University. *Veterinary Record, 144,* 287-291.

Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Corney, B.G., Smythe, L.D., (2007). Epidemiology of Leptospira weilii serovar Topaz infections in Australia. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report, 31*, 216–222.

Slack, A., Symonds, M., Dohnt, M., Smythe, L., (2006b). An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for Leptospira interrogans serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, *Australia. Journal of Medical Microbiology, 55*, 1549–1557.

Slack, A.T., Dohnt, M.F., Symonds, M.L., Smythe, L.D., (2005). Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for Leptospira interrogans and its application to Leptospira interrogans serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. *Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial, 4(1),* 10.

Şerif, H. (1922). Memleketimizde ilk görülen Weil hastalığı: *Ceridei Tıbbıye-i. Askeriye, 51(1).*

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *The Journal of Clinical Microbiology, 33,* 2233–2239.

Temizkan, T. Arda, N. (2008) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chierakul, W., Smythe, L.D., Petkanchanapong, W., Limpaiboon, R., Apiwatanaporn, A., Slack, A.T., Suputtamongkol, Y.,

White, N.J., Feil, E.J., Day, N.P., Peacock, S.J., (2007). A dominant clone of Leptospira interrogans associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases, 1*, e56.

Thiermann, A.B., Handsaker, A.L., Moseley, S.L., Kingscote, B., (1985). Newmethod For classification of leptospiral isolates belonging to serogroup pomona by restriction endonuclease analysis: serovar kennewicki. *The Journal of Clinical Microbiology, 21,* 585–587.

Trevejo RT, Rigau-Perez JG, Ashford DA, et al. (1998). Epidemic Leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *Journal İnfection and Diseases, 178,* 1457-1463.

Turhan, V. Senol, M.G. Sonmez, G. Oncul, O. Cavuslu, S. Tanridag, O. (2006). Cerebral venous thrombosis as a complication of leptospirosis. *J. Infect, 53*, 247-249.

Van CT, Thuy NT, San NH, Hien TT, Baronton G, Perolat P., (1998). Human leptospirosis in the Mekong delta, Vietnam. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 92,* 625-629.

Venkatesha, M.D., Ramadass, P., (2001). Identification of leptospiral isolates by bacterial restriction endonuclease analysis (Brenda). *Indian Journal of Medical Microbiology, 19,* 26–29.

Vijayachari, P., Ahmed, N., Sugunan, A.P., Ghousunnissa, S., Rao, K.R., Hasnain, S.E., Sehgal, S.C., (2004). Use of fluorescent amplified fragment length polymorphism for molecular epidemiology of leptospirosis in India. *The Journal of. Clinical Microbiology, 42*, 3575–3580.

Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC. (2006). *Color Atlas and Texbook of diagnostic Microbiology (*6th ed.). New York: Lippincott.

World Health Organization, (2003). *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.*

Woo, T.H., Patel, B.K., Smythe, L., Symonds, M.L., Norris, M.A., Dohnt, M.F., (1997). Comparison of two PCR methods for rapid identification of Leptospira genospecies interrogans. *FEMS Microbiology Letters, 155,* 169–177.

Welsh, J., McClelland, M., (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research, 18,* 7213–7218

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research, 18,* 6531–6535.

Woodward, M.J., Redstone, J.S., (1993). Differentiation of leptospira serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Record, 132,* 325–326.

Yenen, Y. Ş. (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri,

Zuerner, R.L., Alt, D.P., (2009). Variable nucleotide tandem repeat analysis reveals a unique group of Leptospira interrogans serovar pomona isolates associated with California Sea Lions. *The Journal of Clinical Microbiology, 47,* 1202–1205

Zuerner, R.L., Huang, W.M., (2002). Analysis of a Leptospira interrogans locus containing DNA replication genes and a new IS, IS1502. *FEMS Microbiology Letters, 215,* 175– 182.

Zuerner, R.L., Bolin, C.A., (1997). Differentiation of Leptospira interrogans isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *The Journal of Clinical Microbiology, 35,* 2612–2617.

Zuerner, R.L., Alt, D., Bolin, C.A., (1995). IS1533-based PCR assay for identification of Leptospira interrogans sensu lato serovars. *The Journal of Clinical Microbiology, 33,* 3284–3289

Zuerner, R.L., (1994). Nucleotide sequence analysis of IS1533 from Leptospira borgpetersenii: identification and expression of two IS-encoded proteins. *Plasmid, 31,* 1–11.

Zuerner, R.L., Ellis, W.A., Bolin, C.A., Montgomery, J.M., (1993a). Restriction fragment length polymorphisms distinguish Leptospira borgpetersenii serovar hardjo type hardjo-bovis isolates from different geographical locations. *The Journal of Clinical Microbiology, 31,* 578–583.

Zuerner, R.L., Herrmann, J.L., Saint Girons, I., (1993b). Comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. *Journal of Bacteriology, 175,* 5445–5451.

Zuerner, R., Herrmann, J.L., Saint Girons, I., (1993c). Construction and comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity in genomic organization. *Journal of Bacteriology, 175,* 5445–5451.

Zuerner, R.L., Bolin, C.A., (1990). Nucleic acid probe characterizes Leptospira interrogans serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Veterinary Microbiology, 24,* 355–366.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Hatay'ın Altınözü ilçesinde doğdu. İlkokulu Avuttepe köyünde ortaokulu Yayladağı ilçesinde tamamladı. 2002 yılında Antakya Lisesi'nden mezun oldu. 2003 yılında kazandığı T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldu. 2013 yılından itibaren Edirne Sağlık Müdürlüğü Halk Sağlığı Laboratuarında Biyolog olarak çalışmaktadır.