



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**SİĞİRLARDA PATOJEN LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN  
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE  
SAPTANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali SERDAR**

**Samsun  
Mayıs-2018**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

**SİĞİRLARDA PATOJEN LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN  
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE  
SAPTANMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ali SERDAR**

**Danışman**

**Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ**


**Samsun  
Mayıs-2018**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ali SERDAR tarafından Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ Danışmanlığında hazırlanan “Sığırlarda patojen *Leptospira* türlerinin Gerçek Zamanlı PZR ile saptanması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 28/05/2018 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet AKAN   
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AD

Üye : Prof. Dr. Oktay GENÇ,   
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AD

Üye : Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ,   
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi AD

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... / .....

**Prof. Dr. Ahmet UZUN**  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her zaman bilgi ve desteğiyle yanımda olan, çalışmalarım konusunda beni yönlendirip, gerektiğinde motive eden ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bana çok değerli katkılarda bulunan sayın danışman hocam Doç. Dr. Özlem BÜYÜKTANIR YAŞ'a, materyal teminimde önemli katkısı olan, engin bilgi ve tecrübelerini her fırsatta paylaşan Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. Oktay GENÇ'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşım veteriner hekim Evrim GENÇ'e teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımın ilk gününden itibaren tüm çalışmalarım ve hayatımda büyük özveri ile yanımda olan sevgili eşim Gülnur SERDAR'a ve biricik oğlum Mehmet Kağan SERDAR'a minnettarlığımı bildiririm.

**ÖZET**  
**SIĞIRLARDA PATOJEN LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN**  
**GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE**  
**SAPTANMASI**

**Amaç:** Sığırlarda Leptospira hastalığına neden olan patojen Leptospira türlerinin sığır kan serumlarından *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı kantitatif gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) tekniğiyle saptanması amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışmada, Kars ili ve çevresinde abort yapmış 64 inek kan serum örneği ve Samsun ili Tekkeköy ilçesinde bulunan mezbahane kesilen sağlıklı sığırlardan alınan 25 adet kan örneği olmak üzere toplam 89 örnek kullanıldı. Serum ve kan örneklerine ait genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak, *lipL32* ve *lfb1* genleri qRT-PZR ve konvansiyonel PZR yöntemleri ile çoğaltıldı. Referans *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* serovarlarına ait DNA'lar pozitif kontrol, *L. biflexa* serovarına ait DNA negatif kontrol olarak kullanıldı. PZR koşulları optimize edildi ve qRT-PZR ürünlerinin saptanma limiti belirlendi. DNA örneklerinin qRT-PZR'de elde edilen Ct değerlerine göre sonuçlar değerlendirildi ve pozitif örnekler DNA elektroforezinde doğrulandı.

**Bulgular:** Kan serum örneklerine ait DNA'larda *lipL32* ve *lfb1* genlerini hedefleyen qRT-PZR analizi sonucunda, MAT pozitif bulunan toplam 27 kan serumunun 14'ü (%51,85) *lipL32* ve/veya *lfb1* genlerine dayalı gerçek zamanlı PZR ile pozitif, 13'ü (%48,15) negatif olarak belirlendi. MAT negatif bulunan 37 serumdan 1'i (%2,7) *lipL32* geni pozitif, 1'i (%2,7) hem *lipL32* hem de *lfb1* genleri pozitif, 35'i (%94,6) negatif bulundu. Mezbahane kan örneklerinde pozitiflik belirlenmedi. qRT-PZR testinin sensitivitesi %51,85, spesifitesi %94,6 olarak hesaplandı. Hedef DNA'ların saptanma limitleri analizleri testin analitik sensitivitesinin yüksek olduğunu gösterdi. Patojen ve apatojen Leptospira serovarları ve farklı bakteri türlerinin uygulanması sonucunda testin analitik spesifitesinin yüksek olduğu saptandı.

**Sonuç:** Abort yapmış sığır kan serumlarında patojen Leptospira türlerinin varlığı MAT ile karşılaştırmalı olarak spesifik *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR tekniğiyle belirlendi. Bu tekniğin Leptospirozis tanısında kullanılabilir olduğu benzer çalışmalarda olduğu gibi ortaya kondu.

**Anahtar Kelimeler:** Leptospirozis; *lipL32*; *lfb1*; qRT-PZR

**Ali SERDAR, Yüksek Lisans Tezi**  
**Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2018**

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA SPECIES USING REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

**Aim:** It was aimed to detect the pathogenic *Leptospira* species that cause Leptospirosis in cattle from cattle blood sera by quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) technique based on *lipL32* and *lfb1* genes.

**Material and Method:** In this study, a total of 89 samples constituted of 64 blood sera from aborted cows from Kars province and the surrounding regions and 25 blood samples taken from healthy cows in a slaughterhouse located in the district of Tekkeköy in Samsun province were used. Genomic DNAs extracted from blood and blood serum samples were used as the template and *lipL32* and *lfb1* genes were amplified by qRT-PCR and conventional PCR methods. DNA's from reference *L. hardjo* and *L. grippityphosa* serovars were used as positive control, *L. biflexa* DNA was used as negative control. PCR conditions were optimized and detection limit of qPCR products were defined. The results were evaluated according to Ct values of qRT-PCR and the positive samples were confirmed by DNA electrophoresis.

**Results:** As a result of the qRT-PCR analysis of DNA from the blood sera, 14 (51.85%) out of 27 MAT-positive blood sera were found positive based on *lipL32* and / or *lfb1* genes, 13 (48.15%) of them were negative. From MAT negative sera, 1 sample (2.7%) was *lipL32* gene positive, 1 (2.7%) was both *lipL32* and *lfb1* genes positive, 35(94.6%) of the samples were negative. Positivity was not determined from slaughterhouse blood samples. Sensitivity and specificity of qRT-PCR test were calculated as 51.85% and 94.6% respectively. Analytical sensitivity of the test was found high based on limit of detection of target DNAs. Analytical specificity of the test was high by evaluation of pathogen and apathogen *Leptospira* serovars and different bacteria species.

**Conclusion:** In conclusion, the presence of pathogen *Leptospira* species in blood serum samples from aborted cattle were determined by qRT-PCR targeting *lipL32* and *lfb1* genes. The potential use of this technique for Leptospirosis diagnosis was presented as shown in previous studies.

**Keywords:** Leptospirosis; *lipL32*; *lfb1*; qRT-PCR

Ali SERDAR (Master Thesis)  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2018

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AUC</b>	: Area Under Curve
<b>BOS</b>	: Beyin Omurilik Sıvısı
<b>ELISA</b>	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EMJH</b>	: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotid trifosfat
<b>FAM</b>	: Karboksifloresin
<b>IgG</b>	: Immunoglobulin G
<b>IgM</b>	: Immunoglobulin M
<b>IF</b>	: Immunfloresan
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarid
<b>MAT</b>	: Mikroskopik Aglütinasyon Testi
<b>MLST</b>	: Multi Locus Sequence Typing
<b>MLVA</b>	: Multi Locus VNTR Analysis
<b>PFGE</b>	: Pulsed-Field Jel Elektroforezi
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>qRT</b>	: Kantitatif Gerçek Zamanlı (quantitative Real Time)
<b>RAPID</b>	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RSAT</b>	: Rapid Slight Agglutination

<b>START</b>	: The Sequence Type Analysis and Recombinational Test
<b>TAMRA</b>	: Karboksitetrametil-rodamin
<b>TBE</b>	: Tris-Borat-EDTA
<b>T<sub>m</sub></b>	: Melting Temperature
<b>VNTR</b>	: Variable-Number Tandem-Repeat





## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Etiyoloji.....	3
2.3. Epidemiyoloji .....	5
2.4. Patogenez .....	8
2.5. Leptospiroz'un Teşhisi.....	9
2.5.1. Geleneksel Tanı Yöntemleri.....	12
2.5.2. Tanıya Yönelik Yeni Yaklaşımlar.....	17
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	25
3.1. Materyal .....	25
3.1.1. Örneklerin Toplanması.....	25
3.1.2. Kullanılan Malzemeler .....	25
3.2. Metod .....	28
3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	28
3.2.2. qRT-PZR Uygulaması .....	29
3.2.3. Hedef DNA'ların Saptanma Limitinin Belirlenmesi.....	29
3.2.4. Geleneksel PZR Uygulaması.....	30
3.2.5. PZR Ürünlerinin Analizi .....	31
3.2.6. qRT-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'de Analizi.....	31
<b>4. BULGULAR</b> .....	32
4.1. Referans Serovarlara ait Genomik DNA Konsantrasyon Bulguları .....	32
4.2. qRT-PZR Uygulaması Bulguları.....	32
4.3. Hedef DNA'ların Saptanma Limitinin Belirlenmesi.....	33
4.4. Standart Eğri Grafiği .....	34
4.4.1. <i>lfb1</i> genini hedefleyen qRT-PZR'ye ait Standart Eğri Grafiği .....	34
4.4.2. <i>lipL32</i> genini hedefleyen qRT-PZR'ye ait Standart Eğri Grafiği .....	35

4.5. Leptospira Referans Patojen ve Apatojen Serovarlarında Hedef Genlerin Varlığının Geleneksel PZR ile Belirlenmesi .....	35
4.5.1. Referans Suşlarda Patojen Leptospiralara ait <i>lfb1</i> geninin PZR ile Saptanması .....	35
4.5.2. Referans Suşlarda Patojen Leptospiralara ait <i>lipL32</i> geninin PZR ile Saptanması .....	36
4.6. Sığır Kan Serumu Örneklerine ait qRT-PZR bulguları.....	37
4.6.1. qRT-PZR Sonuçlarının DNA Elektrofrezinde Doğrulanması.....	37
4.7. Mezbahane Kan Örneklerinde Patojen Leptospira Varlığının <i>lipL32</i> ve <i>lfb1</i> genlerini Hedefleyen Geleneksel PZR ile Belirlenmesi .....	39
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	43
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	47
<b>KAYNAKLAR</b> .....	49
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	56

## 1. GİRİŞ

Leptospiroz, *Leptospira* cinsine ait spiral şekilli patojen bakterilerin sebep olduğu bulaşıcı bir zoonozdur (OIE, 2014). Bu hastalık farklı hayvan türlerinde septisemi, abortus, mastitis, interstisyel nefritis, hemolitik anemi, organlarda kanamalar, deri ve mukozalarda nekrozis ile seyreder (Dabak ve ark., 2001). *Leptospira* türleri insanlarda akut ateş, kas ağrısı ve ikterus gibi bozukluklara sebep olmakta, zoonotik bir enfeksiyon olması nedeniyle önemi daha da artmaktadır (Ertaş ve ark., 2002). Sığırlarda akut Leptospiroz'a ait klinik semptomlar ani süt kesilmesi, sarılık ve haemoglobinuri (özellikle genç hayvanlar) ve menenjit (OIE, 2014), enfeksiyonun kronik formuna ait klinik semptomlar ise abort, ölü doğum, zayıf yavru doğumu (prematüre) ve kısırılık olup ekonomik kayıplara sebep olur (OIE, 2014). *Leptospirahardjo*, *L. pomona* ve *L. grippotyphosa* sığırlarda en önemli patojen serovarlardır. Antibiyotik tedavisinin etkili olabilmesi için Leptospiroz tanısında erken teşhis önemli olmaktadır. Günümüzde hastalığın tanısına yönelik kullanılmakta olan konvansiyonel testlerin yanısıra etkin testlerin geliştirilmesine yönelik araştırma çalışmaları yürütülmektedir (Çetinkaya ve ark.,1999; Bolin ve Alt, 2001).

Leptospiroz'un tanısında; bakteri kültürü, etkene karşı oluşan antikorların belirlenmesine yönelik serolojik testlerden altın standart olarak da bilinen mikroskopik aglutinasyon testi (MAT) ve ELISA ile leptospira varlığını saptamayı amaçlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleri kullanılmaktadır. Bakteriyel kültürün zahmetli, pahalı ve zaman alıcı olması nedeniyle diğer testlere ağırlık verilmektedir (OIE, 2014). PZR ile manda (Marianelli ve ark., 2007), küçük ruminantlar (Lilenbaum ve ark., 2008) ve sığır (Hernandez-Rodriguez ve ark., 2011) gibi birçok farklı memeli hayvan türlerinde leptospiraların doğrudan tanımlanması hızlı ve kesin bir teşhis aracı olarak oldukça önemli hale gelmiştir (Otake ve ark., 2012). Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) daha duyarlı, hızlı ve kolay olması yanı sıra dış etkenlerden kaynaklanan kontaminasyonların en az düzeye indirilmesi nedeniyle konvansiyonel PZR'den daha etkin moleküler bir tanı yöntemidir. Kantitatif qRT-PZR'de elde edilen verilerin kantitatif yöntemlerle hesaplanması sonuçların istatistiksel bildirimini sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, patojen leptospira'ların sığır kan serum örneklerinden *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı kantitatif gerçek zamanlı PZR ile belirlenmesi amaçlandı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

Leptospirozun ilk belirlenen formu insanlarda Weil hastalığı olan ikterik formudur. Bu hastalıkta ateş ve sarılık en fazla gözlenen semptomlardır. Anikterik leptospiroz ise gözden kaçabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. *Leptospira* spiroketlerinin ilk izolasyonu Stimson tarafından 1907 yılında sarı humma epidemisi sırasında ölen bir hastanın böbreğinden yapılmıştır (Turhan ve Hatipoğlu, 2012).

Türkiye’de leptospiroz ilk olarak 1915 yılında Nüzhet ve Reşat Rıza bey tarafından yapılan çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada hasta serum örneklerinde *L.icterrohaemorrhagiae*, *L.grippotyphosa* ve *L. hardjo-bovis*’e karşı yüksek titrelerde antikor yanıtı saptanmıştır. (Unat, 1985). Sığırlarda ilk *Leptospira* izolasyonu ise 1954 yılında Özgen ve Tunus tarafından yapılmıştır (Özgen ve Tunus, 1954; Ertaş ve ark., 2002).

### 2.2. Etiyoloji

Leptospiralar, spiroket şekilli, yaklaşık 0,1-0,2 µm çapında 6-20 µm uzunluğunda (Şekil 1), Gram negatif, zorunlu aerop, optimum 28-30°C’de ve pH:7,2-7,6’da üreyebilen, iki adet periplazmik flagellaya sahip, çok hareketli mikroorganizmalardır. *Leptospira*’lar, Spirochetales takımının Leptospiroseae ailesine ait, *Leptospira* cinsinde yer alan patojenik ve saprofitik türlerden oluşmaktadır (Adler ve Moctezuma, 2010; Musso ve La Scola, 2013).

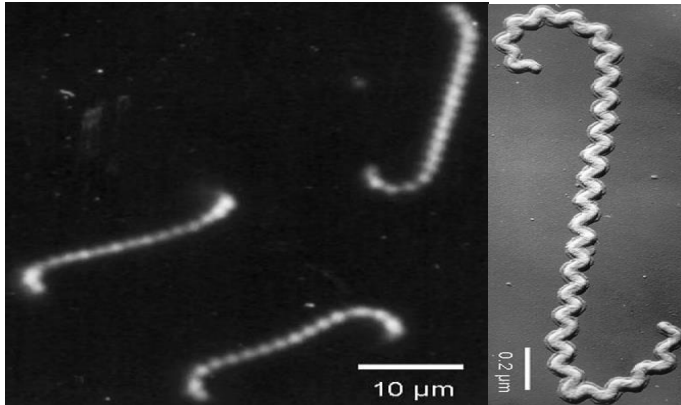
*Leptospira* cinsi 1989’dan önce iki türe ayrılmıştır: *L. interrogans* (patojen türler) ve *L. biflexa* (saprofitik türler). Daha sonra türler serogruplara bölünmüş ve serogruplar serovarlara ayrılmıştır (Musso ve La Scola, 2013). Bugüne kadar 300’den fazla serovar tanımlanmış ve bunlar 25 serogrup içerisinde gruplandırılmıştır. Günümüzde ise serolojik sınıflandırmanın yerini genotipik sınıflandırma almıştır. Genotipik sınıflandırmada leptospira cinsi bakteriler 20 türden oluşur ve bunlar dokuz patojen, beş intermediate (ara) ve altı apatojen olan saprofitik türleri kapsar (Tablo1). Patojenik serovarlara çoğunluğu, dünya çapında dağılım gösteren üç türe aittir ( *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* ve *L. kirschneri*). Diğer patojen türler ise, *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi*, *L. noguchi*, *L. santarosai* ve *L. weilii*.’dir ( OIE, 2014) (Tablo1).

**Tablo 1.** Leptospira türlerin patojenite yönünden sınıflandırması (OIE, 2014; Picardeau M, 2013)

Patojenik türler	Ara türler	Saprofitikler
<i>L. interrogans</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. weilii</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. santarosai</i>		<i>L. yanagawae</i>
<i>L. alexanderi</i>		
<i>L. alstonii</i>		
<i>L. kmetyi</i>		

Leptospiralar klasik besiyerlerinde ürememektedir. Üreme için kan, serum, B1 ve B12 vitaminleri ile demir ve uzun zincirli yağ asitlerine ihtiyaç duyarlar. Geçmişte tavşan serumu ile zenginleştirilmiş Fletcher, Korthoff, Noguchi ve Stuart gibi birçok sıvı ortam leptospira etkenlerini üretmek amacıyla kullanılmıştır. Günümüzde ise en çok kullanılan besi yeri, Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) dir (Adler ve Moctezuma, 2010; Turhan ve Hatipoğlu, 2012; Musso ve La Scola, 2013, OIE 2014).

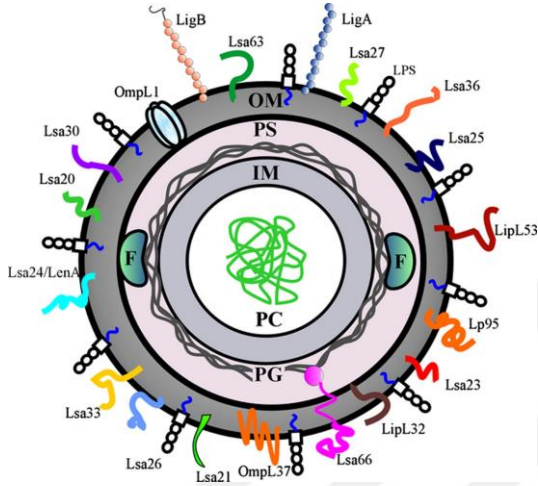
Leptospiralar çok ince mikroorganizmalardır (10-20µm) ve Gram veya Giemsa gibi geleneksel boyama yöntemleriyle boyanmazlar. Çoğunlukla bu bakteriler karanlık saha mikroskobu ile incelenebilirler (Şekil 1). Kanda leptospiralar ilk hafta içerisinde tespit edilebilir (Loureiro ve ark., 2013).



**Şekil 1.** *Leptospira spp.* nin karanlık saha ve elektron mikroskobunda görünümü (Adler ve Moctezuma, 2010)

Leptospiraların hücre duvarı sitoplazmik membran ve peptidoglikan tabakadan oluşan bir çift membran yapısına sahiptir (Cullen ve ark., 2004). Dış membranda

bulunan lipopolisakkarid (LPS) leptospiralar için antijenik özellik oluşturur. Leptospiraların sahip olduğu LPS, yapısal ve immünolojik olarak Gram negatif organizmalardaki LPS yapısına sahiptir. Ancak diğer bakterilerin LPS yapıları kadar toksijenik değildir. Ayrıca hücre duvarında, dış membran tabakada çok sayıda proteinler vardır ve bunlardan bir kısmının (LipL32, LigA, LigB vb) virülens özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Şekil 2) (Adler ve Moctezuma, 2010).

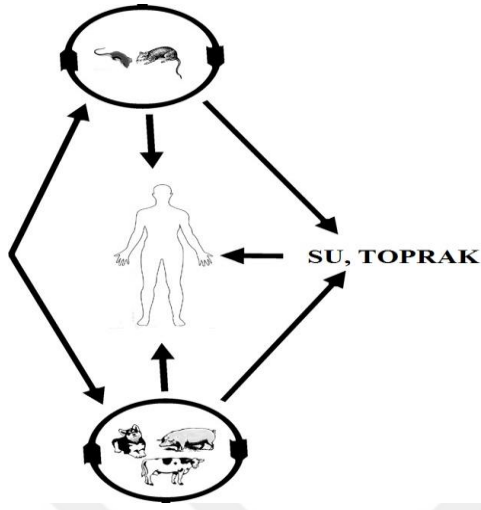


Şekil 2. Leptospira hücre duvarının şematik görünümü (Vieira ve ark., 2013)

### 2.3. Epidemiyoloji

Leptospiroz, sığırlarda akut, subakut veya kronik seyirli olabilmektedir. Abort, erken doğum ve infertilite işaretleri, kronik leptospirozun teşhisi için önemli bulgulardır. Abort birkaç hafta sonra ortaya çıkabilir, ama aynı zamanda hastalığın bu formdaki tek kanıtı olarak da görülebilir. Bazı sürülerde, 3 ay boyunca leptospiral mastit veya agalaksi görüldükten sonra abort meydana gelir. Abort tüm yıl boyunca gerçekleşebilir. Leptospiralar başta tropikal ve subtropikal ülkeler olmak üzere dünyada yaygın olarak bulunur. İklim koşulları, toprak yapısı ve rezervuar hayvan türlerine bağlı olarak leptospira serovarları farklı bölgeler ve ülkelerde değişiklik gösterir. Ancak deniz taşımacılığı ile taşınan kemirgenler sayesinde benzer suşlar gözlenebilmektedir. Bu bakteriler sıcak, rutubetli, yağışlı, bataklık yerler, su yalıkları, pirinç tarlaları, kanal sularında, mezbahane gibi yerlerde fazlaca bulunur. Hayvanların uygun olmayan barınak koşullarında yaşaması, yetersiz bakım, besleme ve stres faktörlerine bağlı olarak enfeksiyon oluşur. Enfekte hayvanların veya portörlerin sağlamlarla bir arada bulunması, hayvanların bulunduğu yerlerde ratların fazla olması ve dışarıdan kontrolsüz

enfekte ve portör hayvanların sürüye sokulmaları enfeksiyonun bulaşmasında ve yayılmasında önemli rol oynar (Şekil 3) (Adler ve Moctezuma, 2010; Sünbül 2006).



Şekil 3. İnsan ve hayvanlarda Leptospirozisin epidemiyolojisi (Adler ve Moctezuma, 2010)

Leptospiraların başlıca kaynağı; hasta ve gizli enfeksiyon geçiren hayvanların idrarları, sütleri, aborte olmuş fötuslar, yavru membranları, uterus akıntıları, spermalar ve mikropla bulaşık yem ve sulardır. İdrarla çok sayıda etken dışarı atıldığı için enfeksiyon yayılır. Hasta bir inek leptospiruri döneminde 24 saat içinde yaklaşık 6 trilyon leptospira'yı idrarla dışarı atar. Bu spiroket bakteriler vücuda çeşitli yollardan girerek enfeksiyon oluşturabilmektedir. İntrauterin bulaşmada gebelik döneminde alınan etkenler plasenta aracılığı ile yavruya geçer. Yavru ölür veya enfekte olarak doğar. Direkt bulaşma; çiftleşme yoluyla, inhalasyonla, idrar, süt, uterus akıntıları gibi mikroplu maddelerin deri, mukoza ve konjunktiva yoluyla alınmasıyla, indirekt bulaşma ise mikropla bulaşık yem ve suların sindirim sistemiyle alınması ve kan emen artropotlar yoluyla gerçekleşir. Doğadaki en önemli enfeksiyon kaynağı kemirgenlerdir. Leptospirozun epidemiyolojisinde rat, köpek, domuz, tilki, çakal, gelincik, tarla faresi, fındık ve lağım fareleri gibi şehir kemirgenleri, geyik, tavşan, kokarca, kirpi, yarasa, porsuk gibi rezervuar hayvanların önemi büyüktür. Ayrıca, tüm çiftlik hayvanları ve köpekler enfeksiyonun yayılmasında etkilidir. Taşıyıcı hayvanların böbrek tübüllerine yerleşen leptospiralar bu hayvanların idrarları ile çevreyi bulaştırırlar. Toprak, su ve gıdaların bulaşık olmaları durumunda insanlar da enfekte olur. Ayrıca, mezbahanelerde kesilen leptospirozlu hayvanların et, kan, organ ve idrarlarının kişilere teması enfeksiyonu bulaştırır (Arda ve ark., 1997; Sünbül, 2006; Turhan, 2007).



İnsanlarda “Bataklık ateşi”, “Weil hastalığı” şeklinde isimlendirilen leptospiroz dünyada en sık karşılaşılan antropozoonotik hastalıktır (Kriangsak ve ark., 2010; Lim, 2011).

Leptospiralar çevrede suda ve toprakta yaşayabilmektedir. Tropikal bölgelerde özellikle yağmurlu mevsimlerde çok sık görülmektedir (Turhan, 2007). Gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere, farklı bölgelerde düzenlenen su sporları yarışmalarında yüksek düzeyde leptospiroz vakaları ortaya çıkmıştır. 1987-1991 yılları arasında Hollanda’da 237 adet leptospiroz vakasının neredeyse tamamının seyahat eden kişilerde ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Leptospiroz; maden işçileri, su ve kanalizasyon işçileri, pirinç tarlası çalışanları, laboratuvar çalışanları ve askerler için risk oluşturmaktadır (Haake ve ark., 2002; Morgan, ve ark., 2002; Sejvar ve ark., 2003). Dünya çapında görüleceği tahmin edilen iklim değişiklikleri ve kentlerde gecekonduların artmasıyla birlikte bu önemli sağlık probleminin daha fazla önem kazanacağı öngörülmektedir (Lau ve ark., 2010). Bu hastalıkla beşeri ve veteriner hekimlik yönünden mücadelelerde etkin, güvenilir, duyarlılığı ve spesifikliğı yüksek testlerin kullanımına ihtiyaç bulunmaktadır.

Ülkemizde leptospiroz olgu bildirimleri düşük düzeydedir. Bunun muhtemel nedenleri, hiperendemik bir ülke olmayışımız, farkındalığın yeterli düzeyde olmaması ve tanı problemlerinden kaynaklanmaktadır. Türkiye’de yapılan çalışmalar genel olarak hayvanlarda leptospirozun seroepidemiolojik taranması ve insanlarda olgu sunumları tarzındadır. İnsanlarda vakalar pirinç ekiminin yapıldığı Çukurova (Saltoğlu ve ark., 1997), Karadeniz bölgesi (Leblebicioğlu ve ark., 1996) ile Bursa-Karacabey harası ve Marmara bölgesinde (Çaşkurlu, 1995; Çetin, 2004; Gürcüoğlu ve ark., 2009) gözlenmiştir. İç Anadolu (Erdinç ve ark., 2006) ve Doğu Anadolu Bölgeleri’nden (Buzğan ve ark., 2003) beşeri hastalık bildirimleri azdır. Bununla birlikte, sığırlar (Bulu ve ark., 1990; Ertaş ve ark., 2002; Şahin ve ark., 2002; Genç ve ark., 2005) ve sokak köpeklerinde (Aslantaş ve ark., 2005) leptospirozun seroepidemiolojisi üzerine yapılan çalışmalarda seropozitifliğin yüksek düzeylerde olduğu belirlenmiştir. Türkiye’de *L. icterohemorrhagiae*, *L. grippotyphosa*, *L. bovis*, *L. hebdomadis*, *L. autumnalis*, *L. sejroe*, *L. hardjo*, *L. pomona*, *L. butembo*, *L. wijnberg*, *L. Bratislavaizole* edilmiştir (Turhan ve Hatipoğlu, 2012). Sığırlarda en fazla gözlenen serovarlar, *L. hardjo*,

*grippotyphosa* ve *pomona*'dır (Çetinkaya ve ark., 1999; Şahin ve ark., 2002; Genç ve ark., 2005).

#### 2.4. Patogenez

Leptospiralar vücuda küçük sıyrıklardan veya konjunktiva ve nemli deri gibi mukoz membranlar aracılığıyla girmektedir. Bakteriler kan dolaşımına girdikten sonra bakteriyemi dönemi 7 güne kadar sürebilir. Leptospiralar kanda ve dokuda kritik seviyeye ulaştıktan sonra, lezyonlar oluşmaya ve semptomlar ortaya çıkmaya başlar. Primer lezyon, organlarda lokal iskemiyle sonuçlanan küçük kan damarlarının endotelinin zarar görmesi ve renal tübüler nekroz, hepatoselüler ve pulmoner hasar, menenjit, miyozit ve plasentittir. Hemorajiler, sarılık gibi ağır vakalarda ve sıklıkla trombosit eksikliğinde ortaya çıkar. Genellikle hafif bir granülositoz ve splenomegali vardır. Dolaşımdaki antikorlar ortaya çıktığında leptospiralar, dolaşımdan ve dokulardan opsonofagositoz ile yok edilirler. Doku hasarları ciddi olmasına rağmen geri dönüşümlü olabilir ve tam bir onarım (örn. böbrek, karaciğer) gerçekleşebilir, ancak uzun süren hasar (miyokardit) komplikasyona neden olabilir. Sığır, domuz ve köpeklerin böbreklerinde "beyaz lekeler" olarak görülen skarlara neden olabilir (Şekil 4) ( Adler ve ark., 2011; Azizi ve ark., 2014 ).



Şekil 4. Sığır böbrek yüzeyinde leptospiraya bağlı çok sayıda beyaz lekeler (Azizi ve ark., 2014)

Patojenik leptospiralar spesifik antikorlar mevcut değilken, makrofajlar ve nötrofiller tarafından oluşturulan fagositoza karşı direnç gösterirler. Yapılan çalışmalar patojen leptospiraların makrofajların içinde hayatta kalabildiklerini ve apoptozdan kaçabildiklerini göstermektedir. Leptospiraların bu yetenekleri virulensle ilişkilidir.

Saprofitik leptospiralar komplementin bakterisidal etkisine son derece duyarlıyken patojen leptospiralar direnç göstermektedirler. Leptospiraların en önemli virulens faktörlerinden bir diğeri de flagellasıdır. Kobaylarda yapılan çalışmalarda özellikle flagellar yapıyı oluşturan genlerin inaktivasyonu sonucunda bakterinin virulens özelliğinin azaldığı tespit edilmiştir (Adler, 2014).

Leptospiral LPS, diğer Gram negatif bakterilerin LPS yapısına benzerlik gösterir. Bununla birlikte, tavşan pirojenitesi, fare ölüm hızı, Schwartzman reaksiyonu ve B hücresi mitojenitesi gibi endotoksin aktivitesi için standart testlerde daha az aktiftir. Bu azaltılmış biyolojik aktivitenin leptospiral lipid A'nın özelliklerinden kaynaklı olup olmadığı bilinmemektedir (Adler ve ark., 2011).

Leptospira etkenleri proksimal renal tübüllerde, genital kanalda ve meme bezlerinde bulunur ve bu nedenle dolaşımda bulunan antikorlardan korunurlar. Bu durum leptospirozun persiste bir enfeksiyon oluşturmasına yol açar ve bakteriler bu alanlarda kolaylıkla üreyebilir (Wynwood ve ark., 2015).

## 2.5. Leptospiroz'un Teşhisi

Enfeksiyöz hastalıkların etkin kontrollerini sağlamak için tanı testlerinin yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olması ve kolay uygulanabilir olması gerekmektedir (Palaniappan ve ark., 2007). Leptospiroz'un doğal gelişim aşamaları kullanılacak tanı testinin seçimi ve hangi tip klinik örneklerin toplanacağı konularına yönlendirir (Picardeau, 2013). Tanı testi olarak sensitivite ve spesifitesi en uygun testlerin seçilmesi gereklidir.

**Sensitivite** (Gerçek pozitiflik oranı); bir serolojik testin aranan antikorların varlığını saptayabilme yeteneğinin ölçüsüdür. Sensitivitesi yüksek bir test, aranan antikorları büyük oranda saptayabiliyor demektir. Buna karşın, düşük sensitiviteli bir testte, aranan antikorları saptama, yani yanlış negatiflik elde etme olasılığı yüksektir.

**Spesifite** (Gerçek negatiflik oranı); bir serolojik testin aranan antikorları (veya gerçek pozitifliği) saptamada ne kadar spesifik olduğunun göstergesidir. Spesifitesi yüksek bir test, aranan antikorları, diğer antikorlardan ayırt edebiliyor veya diğer antikorlarla çapraz reaksiyon vermiyor demektir. Çapraz reaksiyona sebep olan antijen, immunize edici antijen ile ortak veya yapısal olarak benzer epitoplara sahiptir.

	Enfekte	Enfekte değil	
Test pozitif	A	B	A+B
Test negatif	C	D	C+D
	A+C	B+D	

Sensitivite	= A/[A+C]
Spesifite	= D/[B+D]
PPV	= A/[A+B]
NPV	= D/[C+D]

**Şekil 5.** Serolojik testlerin Spesifite, Sensitivite, Pozitif Tahmini Değer (PPV) ve Negatif Tahmini Değer (NPV)'lerinin hesaplanması

Leptospiranın teşhisinde kullanılan hayvanlara ait marazi maddeler;

a-) Akut klinik enfeksiyonlarda veya kronik enfekte sığırların yavrularında hayvanlardan birçok iç organ (karaciğer, akciğer, beyin ve böbrek gibi) ve vücut sıvıları [kan, süt, beyin omurilik sıvısı (BOS)].

b-) Kronik vakalarda ise (klinik belirtilerin görülmediği vakalarda) böbrek idrar ve genital sistem organları (OIE, 2014).

Klinik materyallerden leptospirozun teşhisi ve izolatların identifikasyonu zaman almasının yanında referans laboratuvarlarda uzmanlaşmış kişilere ihtiyaç duyar. Böbreklerden yapılan izolasyonlar oldukça önemlidir ve epidemiyolojik çalışmalarda (hayvan türlerinde veya coğrafik bölgelerde bulunan serovarların belirlenmesinde) oldukça yararlıdır (OIE, 2014).

Leptospirozun ilk aşaması (3-10 gün) olan leptospiremi ya da akut faz evresinde leptospiralar kanda bulunur ve semptomların başlamasından itibaren 15 gün içerisinde kandaki miktarları azalmaya başlar. Bu dönemde etken kan örnekleri, serebrospinal sıvı ve hayvanlara ait diğer salgılardan direkt tanı testleri ile belirlenir. Doğrulanmış leptospiroz vakalarında hastalığın akut fazı sırasında leptospiral antijenin veya DNA'nın saptanamaması, leptospiremi döneminin kısa olmasından, kan örneklerinin hastalığın geç döneminde alınmasından veya hayvanlara antibiyotik tedavisi uygulanmasından kaynaklanabilmektedir.

Leptospiroz, enfeksiyonun ilk haftasında kandan veya kronik dönemde idrardan karanlık saha mikroskopisi ile teşhis edilebilir (Al-Orry ve ark., 2016).

Hastalığın akut döneminde klinik örneklerden leptospiraların izolasyonu enfeksiyonun kesin teşhisi için en güçlü kanıttır. Bu amaçla leptospira etkenleri enfeksiyonun başlangıcından itibaren ilk 7-10 gün içinde alınan kan, beyin omurilik sıvısı ve idrar vb. örneklerden özel besi yerlerine ekilebilir. Kültürler 30°C'de inkübe edilmeli ve düzenli olarak 4-6 ay süreyle kontrol edilmelidir (Al-Orry ve ark., 2016). Ayrıca, bu dönemde klinik örneklerden etkenin belirlenmesine yönelik PZR uygulanmaktadır. Bununla birlikte, sığırlarda leptospirozun sürü bazında değerlendirilmesi gerekmekte olup, enfekte sürülerin belirlenmesi için hastalığın takibi amaçlı serolojik testlerin yürütülmesi gerekmektedir. Bu amaçla, 6-10. günlerden itibaren enzyme linked immuno assay (ELISA) yapılması, 11. günden itibaren BOS veya idrar numunelerinden PZR, MAT ve ELISA yapılması uygundur (Çetinkaya ve ark., 1999; Al-Orry ve ark., 2016).

Leptospirüri adı verilen ikinci aşama, semptomların başlamasından sonraki ikinci haftadan itibaren görülür. Bu aşama, leptospiraların idrarla aralıklı olarak atılması ve serumda antikorların ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu dönemde, leptospiralar kan dolaşımından temizlenir ve immunoglobulin M (IgM) sınıfı antikorların titreleri artar. Antikorlar genelde iki ila üç hafta içinde en yüksek seviyeye ulaşır ve kademeli olarak geri çekilir. Ancak hayvanlarda belirli periyotlarda veya düşük bir seviyede ömür boyu saptanabilir. IgG antikorları ise, IgM'den sonra görülür ve birkaç haftadan sonra pik seviyeye ulaşır ve yıllarca düşük bir seviyede kalabilir (OIE, 2014; Al-Orry ve ark., 2016).

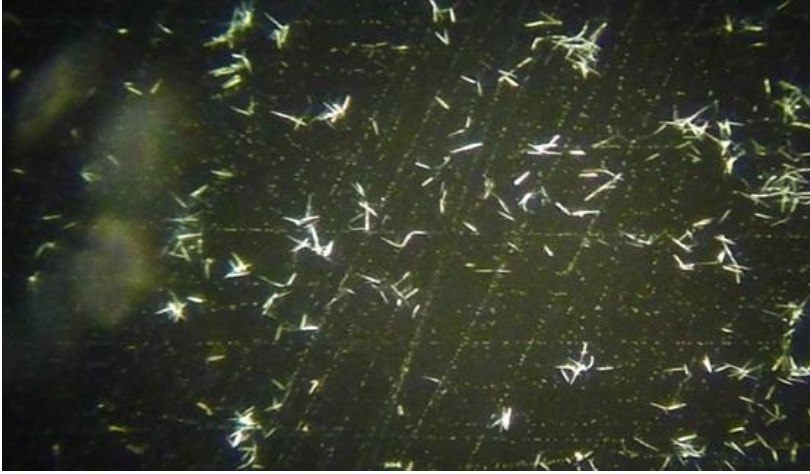
ELISA ve MAT en yaygın kullanılan serolojik testler olmasına rağmen, leptospirozla ilgili kesin tanıda MAT uygulanmaktadır. MAT hem IgM hem de IgG antikorlarını tespit eder, fakat akut ve kronik enfeksiyonu ayırt edemez. MAT'ın 1. haftada % 41, 2. haftadan 4. haftaya kadar % 82, hastalıktan sonraki 4 hafta boyunca % 96'lık bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemin iyi bir spesifitesi vardır ve bununla birlikte, duyarlılığı, akut evrede ELISA'ya kıyasla düşüktür (Al-Orry ve ark., 2016).

Leptospiranın laboratuvar tanısı, yukarıda belirtilen antikor belirlemeye yönelik indirekt testler ve etken belirlemeye yönelik direkt testler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Rutin tanıda kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemler ve yeni test yaklaşımları 2 temel başlık altında sunulmaktadır (Al-Orry ve ark., 2016).

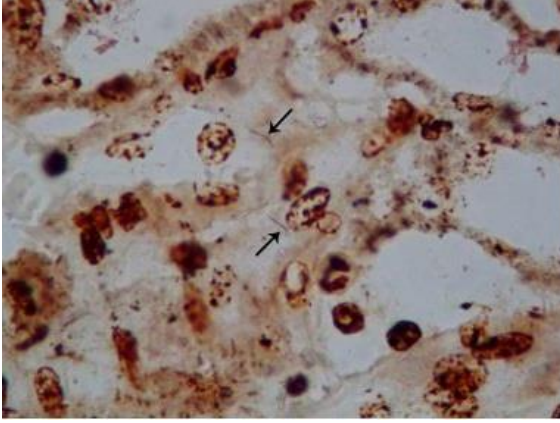
## 2.5.1. Geleneksel Tanı Yöntemleri

### Direkt Tanı Yöntemleri

**Mikroskopik;** leptospiralar çok ince bakteriler olduğu için geleneksel boyama yöntemleri olan Gram veya Giemsa boyama ile boyanamazlar. Karanlık saha mikroskopisinin prensibi, mikroskop tarafından büyütülen mikroorganizmanın yüzeyinden gelen yansımalara dayalıdır. Böylelikle, lens leptospiralar üzerine odaklandığında, karanlık zemin ile zıtlık oluşturacak şekilde bakteriler parlak bir obje olarak görünürler (Faine ve ark., 2000). Sahada bir bakterinin belirlenebilmesi için yaklaşık  $10^4$  bakteri/ml bulunması gerekmektedir. Hastalığın akut döneminde karanlık saha mikroskopisi ile spiroketlerin gözlenmesi (Şekil 6), uygulanacak diğer tanı testlerine destek niteliği taşımaktadır. Tek başına bu test ile tanı konulamaz. Örneklerden doğrudan mikroskopik muayene hassasiyetini arttırmak için, Warhin-Starry gümüş boyama (Şekil 7) ve direkt immünofloresan boyama veya immunohistokimyasal yöntemler kullanılabilir. Bakterilerin kandaki konsantrasyonları direkt mikroskopik muayene için çok düşüktür ve idrarla atılım aralıklıdır (Al-Orry ve ark., 2016).



**Şekil 6.** Sığır idrarından karanlık saha mikroskopunda *Leptospira spp.*'nin görünümü (Ajaj ve Al-Farwachi, 2013)



Şekil 7. Leptospiranın Gümüş boyama ile sıgır böbrek epitel hücre yüzeyinde görüntülenmesi (Azizi ve ark., 2014)

**Bakteriyel kültür;** leptospira etkeninin varlığını ortaya koyan en önemli (altın standart) tanı metodudur. Ancak, ilk izolasyonda bakterinin yavaş üremesi bu testin tercih edilmesinde önemli bir sınırlamadır. Leptospiralar, kan, beyin omurilik sıvısı, idrar ve ölüm sonrası doku örnekleri gibi klinik materyallerden izole edilebilir (Laureiro ve ark., 2014). Bu amaçla yapılacak olan çalışmalarda doku örnekleri toplandıktan sonra hızlı bir şekilde kültüre edilmeli, örneklerde antibiyotik kalıntısı olmamasına dikkat edilmeli, doku otolizi olmamalı ve idrardan alınan örneklerde idrarın pH'sı uygun olmalıdır. Eğer doku ve vücut sıvıları laboratuvara uygun şartlarda ulaştırılmazsa diğer bakterilerin ürememesi ve otolizin ilerlememesi amacıyla örnekler 2-5°C'de saklanmalıdır. Marazi maddelerden ekim EMJH besiyeri, modifiye Korthof veya yarıkatı Fletcher besiyerlerinden birine yapılmaktadır. Kültürlerde kontaminasyon oluşmasını engellemek amacıyla, membran filtrasyon yapılabilir veya selektif antimikrobiyal maddeler veya kemoterapötikler besiyerlerine ilave edilebilir. Kültürler  $29 \pm 1$  °C de en az 16 hafta boyunca inkubasyona bırakılmalıdır. *L.pomona* ve *L.grippityphosa* serovarları inokulasyonun 7-10. günlerinde üreme gösterirken diğer serovarlar daha uzun inkubasyon süresine sahiptir. Kültürler her 1-2 haftada karanlık saha mikroskopunda incelenmelidir (OIE, 2014). Bu nedenle, kültür, rutin bir tanı testi olarak etkili sayılmamaktadır. Yüksek spesifisiteye sahip olmasına rağmen, düşük sensitivitelidir ve negatif bir sonuç için bile üç ay beklenmesi gerekebilir (Laureiro ve ark., 2014).

## **İndirekt Tanı Yöntemleri**

Serolojik testler klinik teşhisi doğrulamak, sürü prevalansını saptamak ve epidemiyolojik çalışmaları yürütmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Leptospiral antikorlar hastalığın başlangıcından birkaç gün sonra ortaya çıkar ve haftalarca aylarca ve bazı durumlarda yıllarca kalıcı olabilirler. Hayvanlar kronik enfekte kaldıklarında antikor titreleri tespit edilemeyecek seviyelere düşebilir. Bu problemi önlemek için kronik durumlarda genital organlarından ve idrardan etkeni tespit etmek amacıyla duyarlı metotlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Leptospirozun teşhisinde iki önemli serolojik test (Mikroskopik Aglutinasyon Test ve ELISA) rol oynamaktadır (OIE, 2014).

**Mikroskopik Aglutinasyon Testi (MAT);** hem insanlarda hem de hayvanlarda leptospirozun tanısı için kullanılır. Testin amacı, serumdaki anti-leptospira antikorlar ile canlı leptospiraların dış membran antijenleri arasında oluşan aglutinasyon reaksiyonlarının saptanmasıdır. Bu amaçla serum-antijen karışımı inkübe edildikten sonra karanlık saha mikroskobu ile incelenir ve aglutinasyon yüzdesi ve serolojik titre belirlenir.

1) Seçilen suşlar  $29 \pm 1$  °C'de sıvı leptospiral kültür ortamında (örn. EMJH) en az 4 gün, en fazla 8 gün olmak koşuluyla bekletilir. Yaklaşık olarak ml başına  $2 \times 10^8$  leptospira yoğunluğuna sahip canlı kültürler antijen olarak kullanılır. Kültür yoğunluğu, karanlık saha mikroskobu kullanılarak sayım kamarasında hücrelerin sayımı ile belirlenir.

2) Kullanılacak antijen sayısı belirlenir.

3) Uygun serum dilüsyonu hazırlanır.

4) Her bir antijenin hacmi dilüe edilmiş serum hacmine eşittir ve her bir serum son dilüsyonu 1/100 olacak şekilde kuyucuklara eklenir.

4) Mikro titrasyon pleytleri 1,5 - 4 saat boyunca  $30 \pm 1$  °C'de inkübe edilir.

5) Örnekler karanlık saha mikroskobunda incelenir.

Sonuç olarak,  $\frac{1}{2}$  oranında fosfat tamponu ile dilüe edilmiş kontrol serumlarının %50'sinin aglutinasyonları %50'sinin ise serbest hücreleri gösterdiği tespit edilir (OIE, 2014).

MAT canlı antijenlerin kullanıldığı serolojik bir testtir ve optimum duyarlılığı için antijenler predominant serogrüplardan oluşmalıdır. MAT testinde diğer bakterilere



karşı oluşan antikorlar leptospira ile kros reaksiyon vermemektedir. Fakat leptospiranın serovar ve serogrupları arasında oldukça belirgin kros reaksiyon mevcuttur. Bu yüzden bireysel enfeksiyonlar ile leptospiral salgınlara neden olan serovarlara belirgin olarak tanımlanmamaktadır. Bu durum etkenin izolasyonunu gerektirir. MAT'ın leptospiroz teşhisinde sensitivitesi ve spesifitesi iyi olmakla beraber kronik enfeksiyonlarda sensitivitesinin %50'den düşük olduğu bildirilmiştir (OIE, 2014).

Son zamanlarda özellikle bazı ELISA varyantlarının Leptospiroz'a başarıyla uyarlanması MAT'ın referans test olarak uygunluğunun sorgulanmasına yol açmıştır. Canlı antijen kullanılması ve kronik enfeksiyonlarda testin sensitivitesinin düşük olması MAT'ın dezavantajlarıdır (Çetinkaya ve ark., 1999; OIE, 2014). Leptospira serovarlardan oluşan panellerin EMJH sıvı besiyerinde canlılığı sağlanmalı, haftalık incelemelerin yapılması ve çok sayıda subkültürünün yapılması gereklidir. Suşlar, laboratuvar personeli için tehlike oluşturabilmektedir. Paneller, tüm serovarlara içermeli ve eksik bir panelin yanlış negatif sonuçlara sebebiyet verebileceği göz ardı edilmemelidir (Musso ve La Scola, 2013).

MAT, leptospiroz teşhisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, zahmetli bir testtir. Bu testin canlı kültürlerle çalışılma zorunluluğu subjektif yorumlanmasına neden olur ve antikör sınıfları arasındaki farklılıkları belirleyememektedir (Wynwood ve ark., 2016). Bu farklılıkların en aza indirgenmesi için testin uygulanmasında iyi eğitim almış ve deneyimli gözlemciler gereklidir. Canlı leptospiral antijen olarak kullanıldığından standardize edilememektedir (Musso ve La Scola, 2013).

**Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays (ELISA);** MAT ile karşılaştırıldığında bazı avantajlara sahiptir. Sığır örnekleriyle yapılan ELISA testinde canlı antijen kullanılmaması, inaktif antijenler ile çalışılması, analizlerin objektif olarak değerlendirilmesi, spesifik IgM veya IgG'yi tespit edebilmesi, akut ve kronik enfeksiyonları ayırt edebilmesi bu avantajlar arasında sayılabilmektedir. Ayrıca, MAT ile karşılaştırıldığında spesifitesi, sensitivitesi ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Ancak ELISA ile leptospira'nın serovarlara tespit edilememektedir (Çetinkaya ve ark. 1999; Loureiro ve ark., 2013, Wynwood ve ark., 2016).

Hayvanlarda ELISA protokolleri özellikle pek çok leptospira yüzey proteinlerine dayalı olarak anti-leptospiral antikörlerin tespiti amacıyla geliştirilmiştir. Bu dış membran proteinleri, LipL32, LipL36, LipL41, Loa22 ve Lig proteinleri vb.'dir

(Hartleben ve ark., 2013). Ayrıca lipopolisakkarit (LPS)'e dayalı ELISA'lar serogrup spesifiktir ve epidemiyolojik çalışmalar açısından değerlidir. IgM ELISA'lar akut enfeksiyonun teşhisinde oldukça yararlıdır. Total Ig ELISA'lar bütün duyarlı hayvanlarda enfeksiyonun teşhisinde kullanışlıdır (OIE, 2014).

**Rekombinant Proteinlere Dayalı ELISA;** leptospira yüzey proteinleri rekombinant protein olarak üretilmekte ve bu proteinlere dayalı serolojik testler geliştirilmektedir. En fazla kullanılan serolojik testlerden olan rekombinant proteinlere dayalı ELISA yüksek sensitivite ve spesifiteye sahiptir. Bunun nedeni, immunoreaktif antijenlerin yüksek konsantrasyonda olması, bakteriyel tüm hücrede bulunan komponentleri içermeyecek şekilde saf proteinin teste kullanılmasıdır. Bu şekilde non-spesifik reaksiyonlar önlenmektedir. Burada önemli olan immunoreaktif antijenlerin kullanılmasıdır. lipL32 proteini ELISA protokollerinde en fazla kullanılan proteinlerdendir. Bu protein leptospira total protein profilinde en fazla bulunan antijendir (Hartleben ve ark., 2013). Rekombinant lipL32 proteinine dayalı ELISA'nın sığırlarda sensitivitesi ve spesifitesi %100 bulunmuştur (Bomfim ve ark., 2005). Rekombinant ligB (Sankar ve ark., 2010) ve lipL21 (Joseph ve ark., 2012) proteinlerine dayalı sığırlarda leptospira tanısına yönelik ELISA'nın, her iki çalışmada sensitivitesinin %100, spesifitesinin ise % 97,1 olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda MAT ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

**İmmunfloresan Yöntemi (IF);** şüpheli hayvanların kan, idrar ve diğer dokularından mikroskopik muayene hassasiyetini arttırmak için uygulanan yöntemlerdendir. IF tekniğinin en önemli avantajlarından biri, klinik örneklerde bakterilerin doğrudan görünürlüğünü sağlamasıdır. İmmunfloresans tekniği ile aynı zamanda bakterinin dış membran antijenleri de saptanabilmektedir (Laurience ve ark., 2014). Bu test, genellikle kültürün uygun olmadığı patolojik materyallerin teşhisinde ve hızlı teşhis gerektiren durumlarda yararlıdır (OIE, 2014).

**Hızlı Testler;** kullanımını kolaydır ve özel eğitim almayan kişiler tarafından da yapılabilir. Bazıları tam kanda uygulanabilir. Belli sıcaklıklarda uzun süre saklanabilir ve standart laboratuvar ekipmanları gerektirmezler. Bu testler IgM ve IgG antikorlarını tespit edebilmektedir (Musso ve La Scola, 2013; Picardeau ve ark., 2013 ).

Hızlı testlerin, sensitivite ve spesifitesi yüksek, kullanımını kolay, nispeten ucuz, yorumlanması kolay ve 1-2 saat içinde sonuç vermesi hedeflidir. Ancak performansının

düşük olması, akut leptospiroz tanısı amacıyla bu testlerin uygulanabilirliğini azaltmıştır ( Musso ve La Scola, 2013).

İnsanlarda akut enfeksiyonun teşhisi için çeşitli hızlı serolojik testler tarif edilmiş ancak hepsinin sınırlı duyarlılık ve düşük özgünlüğü sadece tarama metotları olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunlar dört immünolojik prensibe dayanır; partikül aglütinasyon, immünodot veya dip stick, immünfiltrasyon, immünokromatografi veya lateral flow ( Musso ve La Scola, 2013).

Veteriner alanda, köpek ve atlarda hastalığın akut döneminde anti-leptospira antikorlarının erken tespiti için bir tarama testi olarak hızlı bir slayt testi olan rapid slight agglutination testi (RSAT) geliştirilmiştir. Bu test, formaldehid içerisinde muhafaza edilmiş bakterinin antijen antikor aglütinasyonuna dayanmaktadır. Antijen süspansiyonları, bölgede en sık görülen serovarları içermelidir. RSAT, hastalık serovarını tanımlayamamaktadır. Çapraz reaksiyon olasılığı nedeniyle sonuçların yorumlanması klinik semptomlarla ilişkilendirilmelidir (Loureiro ve ark., 2014).

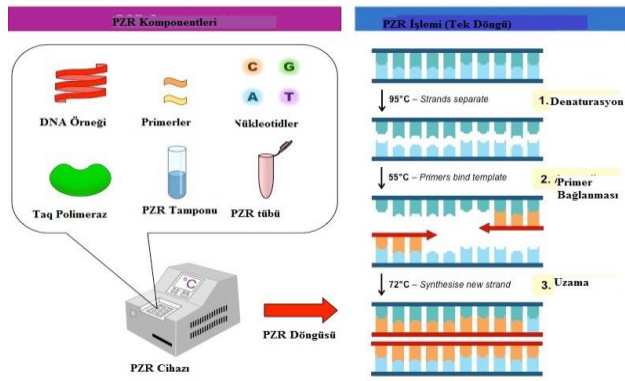
## **2.5.2. Tanıya Yönelik Yeni Yaklaşımlar**

### **Moleküler Direkt Tanı Yöntemleri**

Leptospira'yı cins veya tür düzeyinde belirleyebilen spesifik genlerin çoğaltılmasına dayalı konvansiyonel PZR ve qRT-PZR metodları bulunmaktadır. Bu testler son dönemlerde patojen ve apatojen leptospira serovarlarını ayırmada başarılıdır. Serogrup sınıflandırması moleküler sınıflandırma ile çok fazla ilişkili olmamasına rağmen, serovarların moleküler tiplendirilmesinde, restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi- RFLP (restriction fragment length polymorphism), rastgele çoğaltılmış polimorfik Deoksiribonükleik Asit (DNA)-RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) ve pulsed-field jel elektroforezi –(PFGE) gibi farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu moleküler yöntemlerin dezavantajları fazla miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zahmetli olmaları ve her zaman yeterince ayırdedici veya tekrarlanabilir olamamalarıdır (Salaun ve ark., 2006; Romero ve ark., 2009; Loureiro ve ark., 2013). Ayrıca, değişken-sayıda ardarda-tekrarlar içeren lokuslar- VNTRLoci, leptospira cinsine ait bazı türlerde tanımlanmıştır ve Çoklu Lokus VNTR analizi- MLVA (Multi Locus VNTR Analysis) ile *L. interrogans* ve *L. kirschneri*'ye ait serovarların birçoğunun ayırt edilmesi mümkün olabilmıştır (Salaun ve ark., 2006; Bourhy ve ark., 2013; Loureiro ve ark., 2013).

## Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR son yıllarda hayvanlarda leptospiroz tanısı için sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 8). Bu tekniğin önemi sürüdeki taşıyıcı hayvanların tespit edilmesi yada çok şiddetli leptospira enfeksiyonuna yakalanmış hayvanların erken teşhis edilebilmesidir. Bu tekniğin sensitivite ve spesifitesi yüksektir. Çeşitli biyolojik türlerden hızlı bir yöntemle düşük miktardaki mikroorganizma DNA'sının çoğaltılmasına izin verir. Bazı moleküler sistemler mililitrede 10 ile 100 Leptospira'ya ait genomik DNA'ya kadar tespit edebilme yeteneğine hassastır (Loureiro ve ark., 2013).



Şekil 8. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) (<http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>)

Leptospira tanısında kullanılan PZR yöntemiyle leptospiraların belirlenmesine dayalı moleküler testler iki gruba ayrılmaktadır.

1-) Bakteride mevcut yaygın genlerin (*gyrB*, *16srRNA*, *rrs* ve *secY*) tespitine dayalı PZR

2-) Patojenik leptospiraların ayırımında ön plana çıkan ve yalnızca patojen türlerde bulunan genlerin (*lipL32*, *ligA* ve *ligB*) tespitine dayalı PZR (Loureiro ve ark., 2013).

PZR'ye dayalı testler, yüksek duyarlılıkları ve erken teşhis kapasiteleri sebebi ile leptospiranın teşhisinde son zamanlarda artarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemle enfeksiyona neden olan serovarlar tespit edilememektedir. Bu nedenle rutin teşhis metodları olarak değerlendirilmemektedir. PZR ile gen bölgelerinin insanlar için çoğaltılmasında spesifik primerlerin tasarlanması önem taşımaktadır. Birçok primer grubu tasarlanmış ve değerlendirilmiştir. Bu testlerin birçoğunun *lipL32* genine dayalı olduğu rapor edilmesine rağmen hayvanlarda bu primerlerin kullanımı

yetersizdir. Hayvan örneklerinin dışkı ile kontamine olması veya otolizine bağlı olarak klinik örneklerde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (OIE, 2014).

Leptospiranın teşhisinde kullanılan PZR testlerinin kalite kontrolü örneklerin kontaminasyonunu önlemek amacıyla ciddi bir laboratuvar düzeni ve özen gerektirmektedir. Bu amaçla etkenlerin kontaminasyonu önlenmeli ve uygun örnekler kullanılmalıdır. PZR için örnek toplama oldukça hassastır, doku ve sıvılar uygun olmalı ve türler test edilmelidir (OIE, 2014).

### **Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR)**

Gerçek zamanlı RT-PZR kalitatif ve kantitatif (qRT-PZR) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. RT-PZR, DNA'nın PZR tekniğiyle çoğaltımını görünür hale getiren ve ekranda gerçek zamanlı takibini sağlayan, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresan oluşumunun DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (BioRad CFX 96 Guide,2006). Kullanılan iki farklı floresan boya tekniği aşağıda sunulmaktadır.

**SYBR Green I yöntemi;** Bu yöntemde kullanılan floresan SYBR Green boyası yalnızca çift zincirli DNA'nın küçük oluşuna bağlanır ve hedef DNA'nın çoğalmasına bağlı olarak qRT-PZR cihazında okunan floresanın miktarı artar.

Çoğaltımın başında ışımaya çok az olup, zayıf bir sinyal elde edilir.PZR ürün miktarındaki artış ile paralel floresan miktarı artar ve “qRT-PZR” cihazında ekranda eğriler tarzında görüntülenir. Bu yöntem, işaretli prob kullanılmaması dolayısıyla ucuzdur. Ancak, non-spesifik PZR ürünlerinin çoğalma ihtimali olabilmekte ve buna bağlı olarak yanlış pozitif sonuç elde edilebilmektedir.

SYBR Green yönteminde hedef DNA'ya spesifik olmayan çoğaltılmış DNA'ların uzaklaştırılması ve yanlış pozitifliklerin ortadan kaldırılması amacıyla, DNA'ların erime eğrisi analizleri (melting curve) yapılır. Bu işlem, PZR ürünleri elde edildikten sonra cihaz ısının yavaşça artacağı şekilde programlanarak yapılır. DNA çift zinciri birbirinden ayrılır ve belirli bir erime ısısında (melting temperature/Tm) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. DNA'ların Tm dereceleri farklılık gösterir ve Tm ısısı her ürün için özeldir (Levett ve ark., 2005; Günel, 2007; Bourhy ve ark., 2011).

**“TaqMan® probe” Yöntemi;** Bu yöntemde, hedef DNA ile hibridize olma özelliğinde ve floresan ile işaretlenmiş bir prob kullanılır. Bu probun 5' ucunda floresan

boya FAM (6-karboksifloresin) ve 3' ucunda da FAM boyasının sinyal oluşturmasını engelleyen baskılayıcı TAMRA boyası (6-karboksitetrametil-rodamin) bulunur. Hedef DNA çoğaltılması sırasında Taq DNA polimeraz enziminin "TaqMan" probun bağlı olduğu bölgeye ulaşmasıyla 5'→3' nükleaz aktivitesi ile FAM probdan ayrılır ve floresan yayılımı cihaz tarafından sinyal olarak algılanır. Bu şekilde, yeni döngülerde DNA sentezi ve ürün miktarında artışa bağlı olarak floresan da artış gösterir (Günel, 2007).

Kantitatif qRT-PZR tekniği ile leptospirozun ilk 5-10. günlerinde dahi kanda bulunan patojenik leptospira DNA'ları belirlenebilmekte olup, erken laboratuvar tanısı için umut vaat etmektedir. PZR tabanlı teşhis çok çeşitli mikroorganizmalar için etkili bir şekilde geliştirilebilmektedir. PZR'nin yüksek sensitivite, spesifite ve amplifikasyon hızından dolayı, mevcut kültür tekniklerinin başarısız yada yetersiz olduğu örneklerde organizmaların belirlenmesi için son derece kullanışlı olduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda qRT-PZR'ler (qPZR; SYBR Green ya da Taqman teknolojisi) geleneksel PZR'nin yerini almaktadır. Çünkü bunlar, normal PZR'den daha hızlı, kontaminasyonlara karşı duyarlılığı daha azdır. Ama yine de insan analizlerinde; klinik örneklerde saptanan bakteriyel yük ve hastanın prognozu arasında halen bir ilişki bulunamamıştır (Loureiro ve ark., 2013; OIE, 2014).

Leptospiranın teşhisi için yürütölen qRT-PZR'de *lipL32*, *lfb1*, *ligA*, *ligB*, *rrs*, *flab*, *ampL1*, *secY*, *gyrB* gibi çeşitli hedef genler çoğaltılmıştır. Patojenik leptospira türlerini patojen olmayanlardan ayırmaya yönelik sensitivitesi ve spesifitesi yüksek RT-PZR teknikleri geliştirilmesi hedeflenmiştir. qRT-PZR, leptospiraları belirlemek için hızlı ve hassas bir araç olarak ortaya çıkmış olup, örneklerin taşınması sırasında oluşabilecek kontaminasyon riskini ve yanlış pozitif sonuç elde etme riskini azaltmaktadır. Bu sebeplerle diagnostik kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir (Levett ve ark.,2005; Palaniappan ve ark.,2005; Merien ve ark., 2005; Ahmed, 2009; Stoddard ve ark., 2009; Bourhy ve ark. 2011;Loureiro ve ark., 2013,OIE, 2014).

### **Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR) Uygulamalarının Değerlendirilmesi**

qRT-PZR'deDNA'nın kopya sayısı sayısal değerler olarak belirlenmektedir (BioRad CFX 96 Guide,2006; Günel, 2007). qRT-PZR cihazına örneklerin uygulandığı PZR plakası yerleştirildikten ve reaksiyon başlatıldıktan sonra, hedef genin çoğaltılması

sirasında ürün oluşumu monitorda izlenebilmektedir. qRT-PZR’de çoğaltılan gene ait grafikte PZR siklus sayısı X-ekseninde, okunan floresan değeri de Y-ekseninde gösterilirki Y eksenindeki bu değer tüpte çoğaltılan ürünün miktarı ile orantılıdır. Amplifikasyon grafiğinde 2 faz vardır, üssel artış fazını üssel olmayan plato fazı takip eder. Üssel fazda PZR ürünü her siklusta yaklaşık 2 katına çıkar. Reaksiyon ilerledikçe, reaksiyonda yer alan komponentlerin tükenmesi nedeniyle reaksiyon yavaşlar ve plato fazına girer (28-40. sikluslar arası). Başlangıçta floresan zemin düzeyindedir. Yeterli ürün oluştuğunda ve ortamda biriktiğinde saptanabilir floresan sinyali oluşur. Bunun oluştuğu siklus sayısı Ct (Threshold cycle) olarak isimlendirilir. Bir reaksiyonun Ct’si kalıp DNA’nın hedef genin çoğaltılma reaksiyonunun başlangıcındaki miktarına bağlıdır. Reaksiyon sırasında eğer DNA miktarı fazlaysa, taban değer üzerinde bir floresan sinyali verecek düzeyde ürün eldesi daha düşük amplifikasyon siklusunda gerçekleşir. Dolayısıyla, reaksiyon düşük Ct’ye sahiptir.

qRT-PZR’nin kantitasyonu iki farklı şekilde yapılmaktadır. Absolut kantitasyonda; referans kalıp DNA’nın 10 katlı dilasyonları qRT-PZR’ye uygulanır ve standart bir eğri elde edilir. Kalıp DNA’nın başlangıç miktarının log (logaritmik) değeri her bir dilasyonun amplifikasyonu sırasında elde edilen Ct değerlerine karşı grafikte işaretlenir. Bilinmeyen örnekler bu egride karşılaştırmalı olarak kantite edilir. qRT-PZR testinin optimize edildiğini belirlemek için, lineer regresyon denklemi ve saptama değeri ( $R^2$ -coefficient of determination) kullanılır ve sahip olması gereken özellikler şöyledir.

-Lineer standart eğri ( $R^2 > 0,980$ )

-Yüksek amplifikasyon etkinliği (%90-105) olmalıdır (BioRad CFX 96 Real Time PCR Applications Guide, 2006)

Relatif kantitasyonda; deneysel uygulama yapılmış bir örnekteki hedef genin ekspresyonu, deneysel uygulama yapılmamış başka bir örnekteki aynı hedef genin ekspresyonu ile karşılaştırılır. Bu tip kantitasyonda deneysel değişkenliği kontrol edebilmek için bir housekeeping gen (GAPDH vb.) ile test normalize edilir. Livak ve Schmittgen (2001) tarafından önerildiği şekilde  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  yöntemine dayalı olarak hesaplama yapılır.

## Moleküler Tiplendirme Metodları

### Multi locus sequence typing (MLST)

MLST moleküler tiplendirme metodu olup, leptospira türlerini ayırtmak, türler arası ve tür altı ilişkileri araştırmak için geliştirilmiştir (Ahmed ve ark., 2006). MLST, PZR'ye dayalı basit bir teknik olup, otomatik DNA dizi analizörleri kullanılarak farklı hedef genlerde bulunan alleller ile karakterize edilir (Romero ve ark., 2009). Oluşturulmuş veri tabanları (leptospira.mlst.net) kullanılarak standardize edilebilmektedir. *L. interrogans* ve *L. kirschneri* dahil Leptospira'nın 7 önemli patojen türünü kapsayan MLST veri tabanı tarafından desteklenen Leptospira MLST şeması oluşturulmuştur (Boonsilp ve ark, 2013). MLST'nin leptospira için diğer tiplendirme yöntemlerine göre temel avantajları, tekrarlanabilirliği, tutarlılığı ve taşınabilirliğidir (Ahmed ve ark., 2006).

MLST'de seçilen lokuslar genellikle canlıların evrimi sürecinde çok az değişikliğe uğramış housekeeping genlerdir. Bu nedenle, çok eski dönem ve modern atalar için yüksek düzeyde belirteçlerdir.

MLST'de bakteri suşlarının kültürü yapılır. Genomik DNA'ları ekstrakte edilir. MLST için hedef genler seçilir. Örneğin; *adk* (adenilat kinaz), *icdA* (izositrat dehidrojenaz), *lipL32*, *rrs* (*16SrRNA*), *secY* (translokaz *secY* proteinin öncü proteini), *lipL41* (dış membran lipoprotein *lipL41*) genleri seçilmiştir.

PZR primerleri hedef genlerin değişken internal fragmanlarına komşu olan korunmuş bölgelerine ait Gen Bankasında yer alan diziler temel alınarak tasarlanır. Farklı hedef genler PZR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA fragmanları agaroz jelde etidium bromid ilavesi ile incelenir. Amplikonların dizi analizi çift taraflı yapılır.

MLST Veri Analizi: İki taraflı dizi analizi sonuçları incelenir. *L. interrogans*'ın tüm genom dizi analizi Gen Bankası'nda yer almaktadır. *L. interrogans* *Fiocruz* suşu dizi analizi sonuçları ile karşılaştırması yapılır. Diziler Clustal X programı ile sıralanır. The Sequence Type Analysis and Recombinational Test (START) program kullanılarak Guanin-Sitozin içeriği, polimorfik bölgelerin sayısı, eş anlamlı olmayan nükleotidlerin eş anlamlıların yerine geçme oranı belirlenir.

Filogenetik analizi sırasıyla her bir izolat için, *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs2* ve *secY* genleri olacak şekilde ardarda birbirine bağlanmış diziler (2980 bp) kullanılarak MEGA 3.1 programı ile yapılır. Filogenetik ağaç çizilir.



## **Türkiye’de Sığırlarda Leptospiroz Tanısına Yönelik Yürütülen Araştırmalar**

Ülkemizde Leptospiroz seroprevalansını belirlemeye yönelik yürütülen ilk çalışmalar MAT ve/veya ELISA testlerine dayalıdır. Farklı bölgelerden toplanan kan serumları ile yapılan bir araştırmada, MAT ile *L.butembo*, *L.icterroheamorrhagiae* ve *L.grippotyphosa*’ya karşı % 3 seropozitiflik belirlenmiştir (Unat, 1985). Elazığ ilinden toplanan sığır serum örneklerinde MAT ile *L.hardjo* ve *L. grippotyphosa* antijenlerine aglütinasyon gözlenmiştir (Çetinkaya ve ark., 1999). Kars ve Ardahan illerinde yetiştirilen ve leptospiroza karşı aşılammış sığır kan serumlarında MAT ile *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa*’ya karşı %33,63 pozitiflik, ELISA yöntemiyle ise %36,26 seropozitiflik belirlenmiştir (Şahin ve ark., 2002). Yine Kars ve Ardahan’ın farklı yerleşimlerinden leptospiroz’a karşı aşılammış 163 adet abort yapmış inek kan serumlarında MAT testiyle 66 serum pozitif bulunmuştur. Bunların 27’si *L. hardjo* pozitif, 20’si *L. grippotyphosa* pozitif, 19’u da her iki serovar yönünden pozitif bulunmuştur (Genç ve ark.,2005). Aslantaş ve Özdemir (2005), tarafından yürütülen çalışmada, Hatay ilinde sığırlardan alınan kan serumu örneklerinin MAT ve ELISA ile incelenmesi sonucunda en fazla sırasıyla *L. grippotyphosa*, *L. hardjo* ve *L. icterohaemorrhagie* serovarlarına karşı pozitiflik saptanmıştır. Özdemir ve Kenar (2013), Afyonkarahisar ve Aksaray illerinden toplanan manda kan örneklerinden leptospira türlerine karşı MAT ile %32,26 oranında pozitiflik elde ettiğini bildirmiştir.

Serolojik testlerle birlikte veya yalnızca spesifik hedef genleri hedefleyen farklı PZR teknikleriyle yürütülen araştırmalar şöyledir; Elazığ, Malatya ve Diyarbakır mezbahanelerinde kesilen sığırlara ait idrar örneklerinde leptospira varlığı *rrs* genine (16SrRNA) dayalı PZR ile %4.02 oranında saptanmıştır(Çetinkaya ve ark.,2000).Bir başka çalışmada, Kayseri’de mezbahanede kesilen hayvanlardan alınan kan ve klinik olarak şüpheli hayvanlardan alınan kan ve idrar örneklerinde MAT ile %25,42 ve ELISA ile %18,07 oranlarında pozitiflik belirlenmiştir. *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* baskın serovarlar olarak belirlenmiştir.Çetinkaya ve ark. (2000)’nın yöntemini uyguladıkları PZR ile leptospiralar sığır idrarında belirlenmiş, fakat şüpheli hayvanların kanlarında saptanamamıştır (Gümüşsoy ve ark.,2009). Diyarbakır bölgesinde mezbahanede sığırlardan toplanan idrar ve kan örneklerinde patojen leptospiraların

varlığı, *hap-1* genini hedefleyen qRT-PZR ile idrarda %9,4 oranında, kan örneklerinde ise negatif bulunmuştur (Yeşilmen ve ark.,2012).

Parın (2008), tarafından yürütülen tez çalışmasında, Aydın ilinden toplanan sığır kan serum örneklerinde multiplex PZR yöntemi kullanılarak *Brucella* ve *Leptospira* türleri varlığı incelenmiştir. Örneklerde yüksek düzeyde pozitiflik belirlenmiştir.



### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Örneklerin Toplanması

Leptospiroz olduğu serolojik olarak belirlenmiş abort yapmış ineklerin serum örnekleri (Genç ve ark. 2005) ile mezbahanedeki sığırlardan alınan kan örnekleri çalışmanın materyalini oluşturdu. 2017 yılı Haziran ve Temmuz aylarında, Samsun ili Tekkeköy ilçesi Belediye mezbahanesinden, klinik yönden sağlıklı 25 sığırdan kesim esnasında EDTA'lı tüplere (Vacutainer BD) kan alındı. Toplanan kanların, laboratuvarda aynı gün içinde ekstraksiyonları yapıldı. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen DNA'lar daha sonra PZR ve qRT-PZR testinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Malzemeler

###### DNA Ekstraksiyon Kiti

Örnek serumlardan DNA'nın saf olarak elde edilmesi için ticari QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) kullanıldı.

###### Primerler

Sığır serum ekstraktlarından elde edilen genomik DNA'dan PZR ile *lipL32* geni, *lfb1* geni ve *GAPDH* [Boss taurus (cattle)] genlerinin çoğaltılmasında kullanılan oligonükleotid primer dizileri belirlenerek ticari firmaya (BM Laboratuvarları) sentezlettiler. Testin normalizasyonu amacıyla kullanılan sığır *GAPDH* house keeping genine ait DNA dizisi NCBI, GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)'ta belirlendi ve aynı web adresinde primer 3 programı kullanılarak primerler tasarlandı. *lipL32*, *lfb1* geni ve *GAPDH*'yi hedefleyen tüm primerlerin aynı web adresinde NCBI-blast programında homoloji tayinleri yapıldı. Reaksiyonda kullanılan primerler Tablo 2'de sunulmaktadır.

**Tablo 2.** *lipL32*, *lfb1* ve *GAPDH* genlerinin çoğaltılmasında kullanılan forward (F) ve reverz (R) primerler

Primerler	Fragment Uzunluğu (bp)	Baz Dizisi (5'-3')	Referans
<i>lipL32</i> -F	270	AAG CAT TAC CGC TTG TGG TG	(Stoddart ve ark., 2009)
<i>lipL32</i> -R	270	GAA CTC CCA TTT CAG CGA T	(Bourhy ve ark., 2011)
<i>lfb1</i> -F	331	CATTCATGTTTCGAATCATTTCAAA	(Merien ve ark., 2005)
<i>lfb1</i> -R	331	GGCCCAAGTTCCTTCTAAAAG	(Merien ve ark., 2005)
<i>GAPDH</i> -F		CCGCATCCCTGAGACAAGAT	tasarlandı
<i>GAPDH</i> -R		TGCCGTGGGTGGAATCATAAC	tasarlandı

Liyofilize primerler steril bidistile su ile 100 pmol konsantrasyonunda hazırlanarak; 100 µl hacminde tüplere paylaştırıldı. Stok hazırlanan primerler buradan kullanılmak üzere 20 pmol/µl konsantrasyonunda dilüe edildi.

#### Referans Suş'lar

Araştırmada kullanılan *L.bratislava*, *L. canicola*, *L.grippotyphosa*, *L.icterohaemorrhagiae*, *L.pomona*, *L.hardjo*, *L.patocsuşları* Veteriner Hekim Dr. Erdinç ATABEK ( Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara) tarafından sağlanmıştır. Testin spesifitesinin araştırılması amacıyla referans *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* ve *Enterococcus faecalis* türleri Prof. Dr. Oktay GENÇ'den temin edildi.

#### qRT-PCR cihazı(Bio-Rad CFX)

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Merkezi (KİTAM)'nde bulunan cihaz kullanıldı.

#### qRT-PZR Reaktifleri ve malzemeler

SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad) (200 x 20 µl reaksiyon, 2x miks dNTPs, Sso7d fusion polimeraz, MgCl<sub>2</sub>, stabilizatör) qRT-PZR karışımı, SYBER Green floresan boyası içeren polimerizasyonun gerçekleşmesini sağlayan enzim ve reaktif karışımı.

### **qRT-PZR plakaları**

Hard-Shell 480, 96-kuyucuklu PZR pleytleri, (BioRad), 96 kuyucuklu RT-PZR plakaları kullanıldı.

### **Microseal 'C' Film (BioRad)**

RT-PZR plakalarını hava almayacak şekilde kapatan sızdırmazlık filmi kullanıldı.

### **Santrifüj Cihazı**

RT-PZR plakalarının yerleştirilerek santrifüj edildiği özel aparatın bulunduğu swing out rotorlu masa üstü santrifüj cihazı kullanıldı.

### **Geleneksel PZR Karışımının İçeriği**

PZR karışımında, Taq DNA polymerase, MgCl<sub>2</sub>, 10X Taq (Mg-free) reaksiyon tamponu, dNTP (deoksinükleotid trifosfat) karışımı yer almaktadır (Tablo 4).

### **Jel Yükleme Tamponu, 1X TBE Buffer**

10X TBE Buffer (Tris-borat-EDTA) solüsyonundan agaroz jel hazırlanmasında ve jel elektroforezinde kullanılmak üzere 1X tampon hazırlandı.

### **Agaroz Jel**

PZR ürünlerinin belirlenmesi amacıyla agaroz jel hazırlandı. Erlenmayer içerisinde 75 ml 1X TBE solüsyonundan % 1,5 oranında agaroz hazırlandı. Bu amaçla, 75 ml 1X TBE solüsyonuna 1,125 g agaroz ilave edildi ve mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar eritildi. Homojen hale gelen agaroz soğumaya bırakıldı, ılık hale geldikten sonra etidium bromide (0,5 µg/ml) ilave edildi. Elektroforez tankına yerleştirilen aparata döküldü ve jel polimerize oluncaya kadar beklendi.

### **Örnek Yükleme Boyası (DNA gel Loading Dye ) (6X) (Thermo Fisher)**

Agaroz jele uygulanacak PZR ürünleri 5 µl örneğe 1 µl boya içerecek şekilde hazırlandı.

### **Belirteçler (DNA Ladder)**

DNA'ları belirlemeye yönelik, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (#SM0241) kullanıldı.

### **PZR tüpleri**

RNAz ve DNAz içermeyen, ince duvarlı 0,2 ml'lik PZR tüpleri (Axygen)

qRT-PZR ve geleneksel PZR'de DNA kontaminasyonunun önlenmesi amacıyla tüm materyal ve ekipmanlar dahil yüzeyler %0,5 sodyum hipoklorit ile dezenfekte edildi. PZR karışımları yalnızca PZR uygulamaları için kullanılan steril çalışma kabininde hazırlandı ve yalnızca bu amaç için ayrılan mikropipetler kullanıldı.

## **3.2. Metod**

### **3.2.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu**

Genç ve ark. (2005), tarafından yürütülen çalışmada kullanılan 64 adet sığırcan serumlarından ve 2017 yılı Haziran ve Temmuz aylarında Samsun ili Tekkeköy İlçesi Belediye Mezbahanesinde kesilen klinik yönden sağlıklı 25 adet sığırdan alınan kan örneklerinden ve referans patojen ve apatojen leptospira serovarlarından ve *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* ve *Enterococcus faecalis* türlerine ait referans suşlardan DNA ekstraksiyonları yapıldı.

Kan serumları oda ısısında çözdürüldü ve 6000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldı. Genomik DNA ekstraksiyonları "Qiagen QIAamp DNA Mini Kit" kullanılarak üretici firmanın prosedürüne uyularak yapıldı. Buna göre, 1,5 ml steril ependorf tüpüne 20 µl proteinaz K koyuldu ve sonra üzerine 200 µl serum ve/veya kan örnekleri ilave edildi. Daha sonra AL tamponundan 200 µl ilave edilerek 15 saniye vortekslendi, kuru blok ısıtıcıda 10 dakika 56 °C 'de bekletildi. Tüpler yüksek devirde kısa süre santrifüjlendi ve 2 ml toplama tüpü içindeki QIAamp Mini spin kolonlarına aktarıldı. 8.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolondan geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı. Spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl AW1 tamponu ilave edildi, 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı ve spin kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl AW2 tamonu ilave edilerek 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve kolondan geçen sıvı toplama tüpü ile birlikte atıldı. Yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı, boş olarak 14.000 rpm'de santrifüjlendi ve toplama tüpü atıldı. DNA'nın elde edilmesi aşamasında Spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılarak 200 µl AE tamponu ilave edildi. 5 dakika kapak kapalı bekletildi, 8.000rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen elüsyon sıvısı geleneksel PZR ve qRT-PZR'da kalıp DNA olarak kullanılıncaya kadar -20 °C de saklandı. İkinci elüsyon için spin kolon yeni bir 1,5 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. 100

$\mu$ l AE tamponu ilave edildi ve 2 dakika kapak kapalı bekletildi, 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpüne geçen elüsyon sıvısı geleneksel PZR ve qRT-PZR'da kalıp DNA olarak kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

### 3.2.2. qRT-PZR Uygulaması

SsoFast™ EvaGreen® Supermix (BioRad) qRT-PZR karışımı, forward ve reverz primerler, referans ve örnek DNA'lar, distile H<sub>2</sub>O biyogüvenlik seviyesi 2 steril çalışma kabininde ve buz aküsü veya buz üzerinde soğuk ortamda çalışıldı. Herbir örnek için *lipL32*, *lfb1* ve housekeeping *GAPDH* genlerine yönelik spesifik primerleri içerecek şekilde ayrı ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı.

SsoFast™ EvaGreen® Supermix	= 10 $\mu$ l x örnek sayısı
Forward primer	= 0,4 $\mu$ l x örnek sayısı
Reverse primer	= 0,4 $\mu$ l x örnek sayısı
dH <sub>2</sub> O	= 4,2 $\mu$ l x örnek sayısı

Karışım hazırlandıktan sonra 96-kuyucuklu qRT-PZR plakalarının her bir kuyucuğuna 15  $\mu$ l karışım dağıtıldı. Her örnek için reaksiyon hacmi 20  $\mu$ l olacak şekilde 5  $\mu$ l her bir örnekten kuyucuklara eklendi. DNA uygulanmayan kuyucuğa örnek yerine 5 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eklendi. Enzim uygulanmayan kuyucuğa 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O eklendi. Pleytin üzeri yapışkanlı sızdırmazlık filmi ile kapatıldı ve qRT-PZR cihazına (BioRad CFX96) yerleştirildi. Tablo 3'de gösterilen program uygulanarak reaksiyon gerçekleştirildi. Programın son aşamasında, erime eğrisi analizi yapıldı. Reaksiyon bittikten sonra program sonlandırıldı ve sonuçlar kaydedildi.

**Tablo 3.** qRT-PZR reaksiyon aşamaları ( Bourhy ve ark., 2011)

Program Basamağı	Sıcaklık	Zaman	Döngü
İlk denatürasyon ve enzim aktivitesi	98 °C	2 dakika	1
Denatürasyon	98 °C	5 saniye	40
Primer bağlanma ve Uzama	57 °C	30 saniye	
Erime Eğrisi	65 °C – 95 °C (0,5 °C artırarak)	5 saniye	1

### 3.2.3. Hedef DNA'ların Saptanma Limitinin Belirlenmesi

qRT-PZR ile hedef DNA'ların çoğaltılmasında kullanılabilecek minimum genomik DNA konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla referans *L. hardjo* suşunun nanodrop spektrofotometrede konsantrasyonları ölçüldü. On katlı dilusyonları

hazırlanan genomik DNA'lar kalıp DNA olarak kullanılarak qRT-PZR ile hedef *lipL32* ve *lfb1* genleri çoğaltıldı. qRT-PZR'de elde edilen son dilusyondaki Threshold Cycle (Ct) değeri minimum DNA konsantrasyonu olarak tespit edildi. Bu değer PZR ürünlerinin hangi siklusta gözlemlendiğini göstermektedir.

#### 3.2.4. Geleneksel PZR Uygulaması

PZR karışımında 10X Taq buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs, Forward ve Revers primerler, Taq DNA Polimeraz, Kalıp DNA (Tablo 4) ilave edildi. Hedef genler olan *lipL32* ve *lfb1* genleri için ayrı reaksiyon karışımları hazırlandı. Her örnek için 25µl PZR karışımı Tablo 4'deki gibi hazırlandı ve PZR cihazına (Biometra-Tpersonal) yerleştirildi. Hedef DNA'ların çoğaltılması amacıyla aşağıda belirtilen koşullar PZR cihazında uygulandı.

İlk denaturasyon	: 95 °C'de 5 dakika
Denaturasyon	: 94 °C'de 30 saniye
Primerlerin bağlanması	: 55 °C'de 30 saniye
Polimerizasyon uzaması	: 72 °C'de 1,5 dakika (Toplam 35 döngü)
Son uzama	: 72 °C'de 10 dakika

Amplifiye edilen PZR ürünleri elektroforezde kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

**Tablo 4.** Geleneksel PZR içerikleri ve konsantrasyonları (Masuzawa ve ark., 2001)

PZR Karışımı	25 µl reaksiyon	Final konsantrasyon
10X Standart Taq (Mg-free) reaksiyon buffer	2,5 µl	Mix 1X 1,5-2 mM 200 µM 10 µM 10 µM 1 unite
25 µM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	
10 mM dNTPs	0,5 µl	
20 µM Forward (F) Primer	0,5 µl	
20 µM Reverz (R) Primer	0,5 µl	
Taq DNA Polimeraz 5u/µl	0,2 µl	
Distile su	25µl'ye tamamlandı	
Kalıp DNA	1 µl	< 1µg



### 3.2.5. PZR Ürünlerinin Analizi

Amplifiye edilen DNA'lar agaroz jel elektroforeze uygulanarak incelendi. Her bir örneğe ait 7,5 µl PZR ürünü 1,5µl boya (6X Loading Dye; Thermo Scientific) ile boyandı. Ethidium bromide'le boyanmış %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Yatay elektroforez tankına kuyucukların oluşması için baş kısmında tarak olacak şekilde hazırlanan agaroz jel döküldü. Agaroz jel soğuduktan sonra tarak çıkarılarak jel tamamen kaplanana kadar 1X TBE solüsyonu döküldü. Şekil 11'de gösterilen kuyucuklara belirtilen örnekler elektroforezde 80 voltta 30 dakika, sonra 130 voltta 30 dakika süreyle yürütüldü. Bu işlem sonunda referans patojen leptospiralara ait spesifik *lipL32* ve *lfb1* genlerini gösteren bantlar UV-transilluminatör yardımıyla görüntülenerek fotoğraflandı.

### 3.2.6. qRT-PZR Ürünlerinin Agaroz Jel'de Analizi

qRT-PZR cihazında amplifiye edilen DNA'lar agaroz jel elektroforez'e uygulanarak incelendi. Her bir örneğe ait 15 µl PZR ürünü 3 µl boya (6X Loading Dye; Thermo Scientific) ile boyandı. Ethidium bromide'le boyanmış % 1,5'luk agaroz jel hazırlandı. Yatay elektroforez tankına kuyucukların oluşması için baş kısmında tarak olacak şekilde hazırlanan agaroz jel döküldü. Agaroz jel soğuduktan sonra tarak çıkarılarak jel tamamen kaplanana kadar 1X TBE solüsyonu döküldü. Şekil 13'de gösterilen kuyucuklara belirtilen örnekler yüklenerek 80 voltta 30 dakika, sonra 120 voltta 30 dakika süreyle elektroforezde yürütüldü. Bu işlem sonunda patojen leptospiralara ait spesifik *lipL32* ve *lfb1* genlerinin varlığını gösteren bantlar UV-transilluminatör cihazında görüntülenerek fotoğraflar kaydedildi.

## 4. BULGULAR

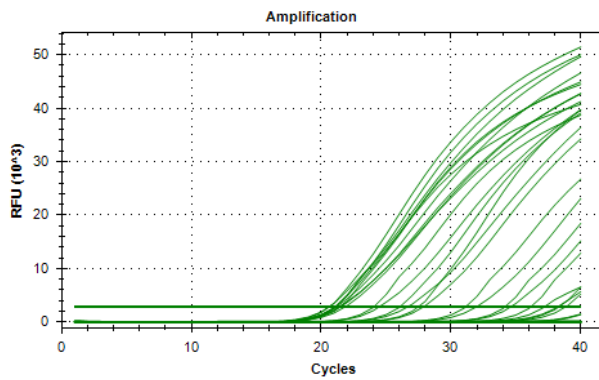
### 4.1 Referans Serovarlara ait Genomik DNA Konsantrasyon Bulguları

Referans *Leptospira* serovarlarına ait DNA konsantrasyon tayini nanodrop spektrofotometre cihazında *L.bratislava*: 4,6 ng/μl, *L. canicola*: 8,6 ng/μl, *L. grippotyphosa*: 12,3 ng/μl, *L. icterohaemorrhagiae*: 11,4 ng/μl, *L. pomona*: 12,5 ng/μl, *L. hardjo*: 11,5 ng/μl, *L. patoc*: 11,1 ng/μl olarak ölçüldü.

### 4.2 qRT-PZR Uygulaması Bulguları

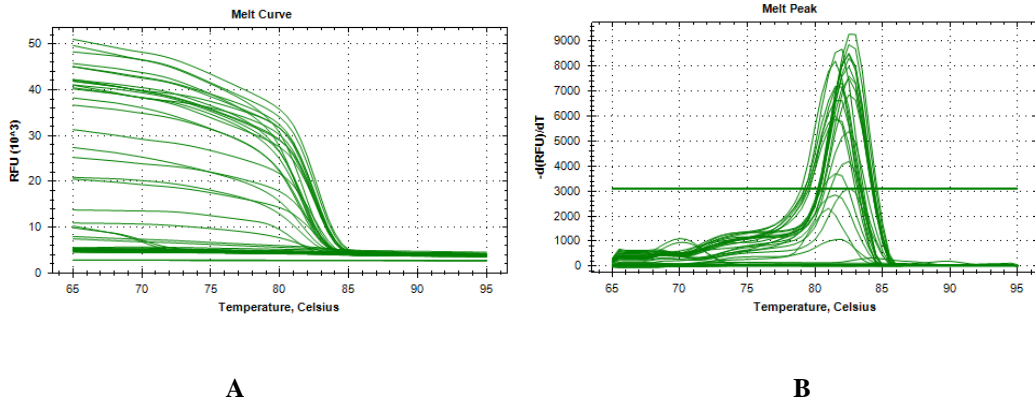
Sığır kan serumu ve kan örneklerine ait genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak qRT-PZR cihazı (Bio-Rad CFX)'nda uygun koşullarda spesifik *lipL32* ve *lfb1* gen bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon cihaz ekranından takip edildi ve gen amplifikasyonunun kaçınıcı siklusta oluştuğu gözlemlendi (Şekil 9). Elde edilen siklus değerlerine göre CT değerleri belirlendi. 65 °C – 95 °C arasında 0,5 °C artırarak erime eğrisi (melt curve) analizi yapıldı ve erime noktası (melt peak) belirlendi (Şekil 10).

Testin standardizasyonu için öncelikle referans suşlara ait DNA'lar direkt uygulandı. Ayrıca *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* DNA'larının 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve qRT-PZR'de DNA'ların saptanma limitleri belirlendi (Şekil 9). Sonuçlar qRT-PZR cihazının ekranında gerçek zamanlı olarak gözlemlendi ve PZR ürünlerinin reaksiyonun hangi siklusunda oluştuğu Ct değeri olarak belirlendi.



Şekil 9. qRT-PZR amplifikasyon Ct değerleri eğrisi

Primerlerin spesifikliğini belirlemek amacıyla erime eğrisi (melting curve) analizi yapıldı ve sonuçlar kaydedildi (Şekil 10).



Şekil 10. qRT-PZR’de erime eğrisi (A) ve erime ısıları (T<sub>m</sub>) (B)

Erime eğrisi değerleri *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR’de leptospira serovarları Bratislava’da 81,5; Canicola’da 82; Grippytyphosa’da 82; Icterohaemorrhagiae’de 81,5; Pomona’da 82; Hardjo’da 81,5 olarak belirlendi. *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR’de erime ısıları Pomona’da 83, diğer tüm referans serovarlarda 82,5 olarak belirlendi.

#### 4.3. Hedef DNA’ların Saptanma Limitlerinin Belirlenmesi

qRT-PZR ile hedef DNA’ların çoğaltılmasında kullanılabilecek minimum genomik DNA konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla referans *L. hardjo* suşu DNA’larının 10 katlı dilüsyonları hazırlandı. Referans *L. hardjo* suşunun DNA konsantrasyonu 11,5 ng/μl olarak ölçüldü. qRT-PZR’da kalıp *L.hardjo* DNA’sının her bir konsantrasyonundan 5 μl uygulandı. SYBR Green CT değerleri tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. *L. hardjo*’nun 10’luk dilüsyonlarına göre DNA konsantrasyonları ve *lipL32* ve *lfb1* genlerine göre SYBR Green CT değerleri

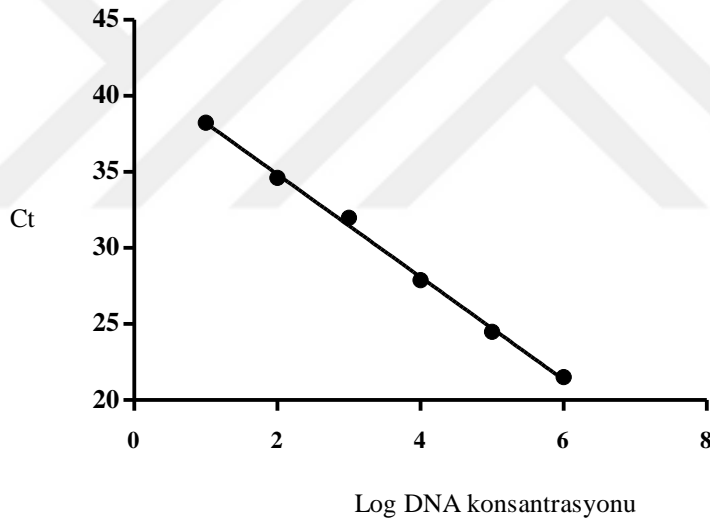
Dilüsyonlar	DNA Konsantrasyonu (ng/μl)	SYBR Green CT	
		<i>lipL32</i>	<i>lfb1</i>
<i>L. hardjo</i>	11,5	21,45	21,50
10 <sup>-1</sup>	1,15	24,08	24,48
10 <sup>-2</sup>	0,115	27,49	27,89
10 <sup>-3</sup>	0,0115	31,14	31,99
10 <sup>-4</sup>	0,00115	34,17	34,61
10 <sup>-5</sup>	0,000115	36,16	38,24
10 <sup>-6</sup>	0,0000115	(-)	(-)

qRT-PZR'de saptama limitleri *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı olarak 0,000115 ng/ $\mu$ l (0,115 pg/ $\mu$ l) olarak belirlendi (Tablo 5). Örneklerde elde edilen Ct değerlerine ilave olarak erime eğrisi analizleri yapıldı ve örneklerin pozitif oldukları erime eğrisi analizi ile doğrulandı.

#### 4.4. Standart Eğri Grafiği

Testin analitik sensitivitesini belirlemek amacıyla referans *L.hardjo*'nın 10 katlı seri dilusyonları qRT-PZR'ye uygulandı. *lfb1* ve *lipL32* genlerini hedefleyen qRT-PZR'de testin etkinliğini belirlemek için lineer standart eğri grafiği Prism (GraphPad versiyon 5) programında oluşturuldu. Bu grafikte standart eğri genin hangi siklusta çoğaldığını gösteren Ct değerlerine dayalı olarak hesaplandı.

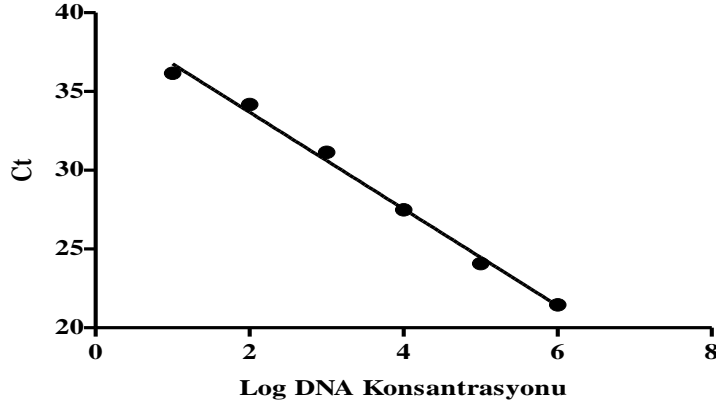
##### 4.4.1. *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR'ye ait Standart Eğri Grafiği



Şekil 11. *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR Standart Eğri Analizi

Standart eğri analizinde Slope -3,377; y intercept 41,6;  $r^2$  0,998 olarak hesaplandı (Prism programı/GraphPad 5). Testin etkinliği (efficiency) %97,75 olarak bulundu.

#### 4.4.2. *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR'ye ait Standart Eğri Grafiği



Şekil 12. *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR Standart Eğri Analizi

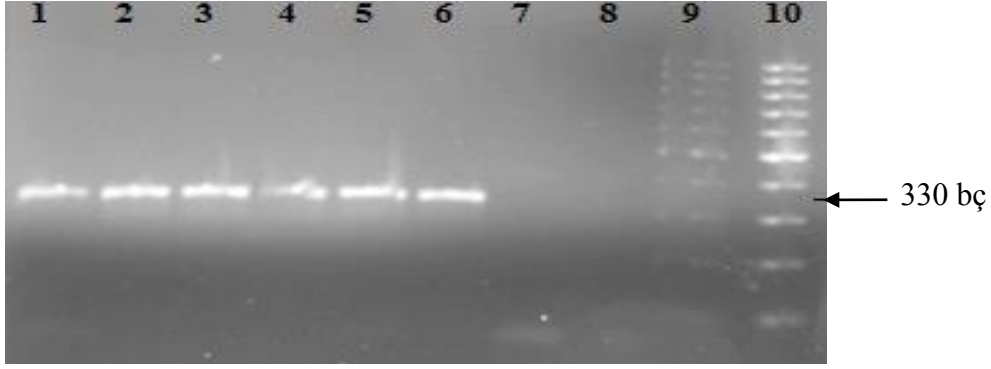
Standart eğri analizinde Slope -3,19; y intercept 38,52;  $r^2$  0,994 olarak hesaplandı (Prism programı/GraphPad 5). Testin etkinliği (efficiency) %96,57 olarak bulundu.

Testin sensitivitesini belirlemek için bölgede en yaygın serovarlardan biri olan *L. Hardjo*'ya ait genomik DNA'nın kopya sayısı Bourhy ve ark. (2011), tarafından önerildiği şekilde hesaplandı ve 23 kopya/ $\mu$ l olarak belirlendi. On katlı dilüsyon yapıldığı için 10 kopya/ $\mu$ l'de pozitif olma durumu belirlenemedi. Kontrol kalıp DNA dilüsyonlarından oluşturulan standart eğriye dayalı olarak bilinmeyen DNA'ların orijinal konsantrasyonları hesaplandı.

#### 4.5. Leptospira Referans Patojen ve Apatojen Serovarlarında Hedef Genlerin Varlığının Geleneksel PZR ile Belirlenmesi

##### 4.5.1. Referans Suşlarda Patojen Leptospiralara ait *lfb1* geninin PZR ile Saptanması

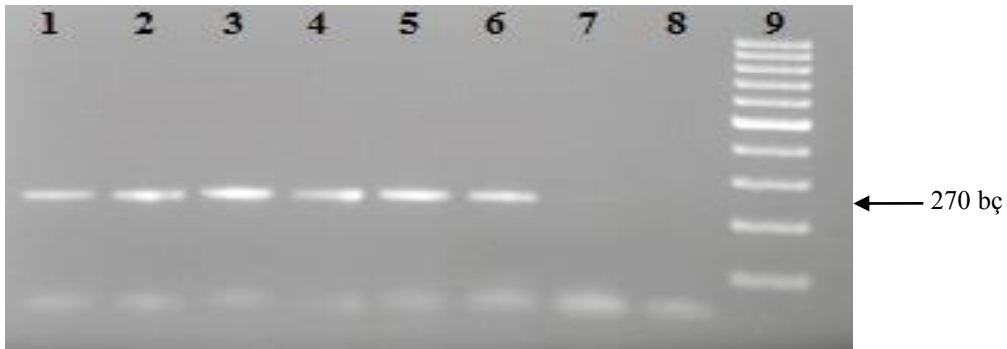
Referans suşlarda patojen leptospiralara ait *lfb1* geninin tespit edilmesi amacıyla, patojen olarak; *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. hardjo*, apatojen olarak; *L. patoc* suşlarına ait DNA'lar kullanıldı. Referans patojen DNA'larda yatay elektroforezde yaklaşık 330 bp boyutunda band gözlemlendi (Şekil 13).



**Şekil 13.** *lfb1* genini hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 80 – 1031 bç. Patojen leptospiralar; *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. hardjo* (sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu kuyucuklar), Apatojen leptospira; *L. patoc* (7 no'lu kuyucuk), No DNA (8 no'lu kuyucuk), DNA Ladder (10 no'lu kuyucuk)

#### 4.5.2. Referans Suşlarda Patojen Leptospiralara ait *lipL32* geninin PZR ile Saptanması

Referans suşlarda patojen leptospiralara ait *lipL32* geninin tespit edilmesi amacıyla, patojen olarak; *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. hardjo*, apatojen olarak; *L. patoc* suşlarına ait DNA'lar kullanıldı. Referans patojen DNA'larda yatay elektroforezde yaklaşık 270 bç boyutunda band gözlemlendi (Şekil 14).



**Şekil 14.** *lipL32* genini hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 80 – 1031 bç. Patojen Leptospiralar; *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. pomona*, *L. hardjo* (sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu kuyucuklar), Apatojen Leptospira; *L. patoc* (7 no'lu kuyucuk), No DNA (8 no'lu kuyucuk), marker (9 no'lu kuyucuk)

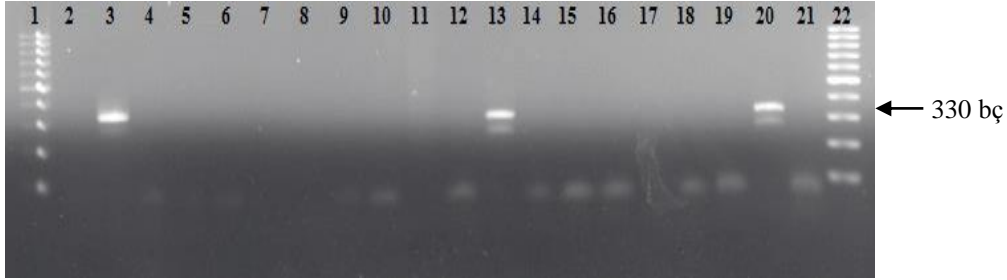
#### 4.6.Sığır Kan Serumu Örneklerine ait qRT-PZRbulguları

MAT testi yapılmış kan serumları ve mezbananede kesim sonrası alınan kan örneklerinde patojen leptospiraserovarlarının varlığı *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı olarak qRT-PZR yöntemi ile belirlendi. DNA içermeyen ve enzim içermeyen kuyucuklarda hiç bir çoğalma gözlenmedi. Ct değeri elde edilen ve pozitif olduğu varsayılan örneklerin doğruluğunu belirlemek için, qRT-PZR'ın spesifikliğı çoğaltılan örneklere ait erime eğrisi analizi yapılarak belirlendi. Tür spesifik olan erime ısısından farklı değerler elde edilmesi durumunda bu örnekler non-spesifik olarak negatif kabul edildi. qRT-PZR'de çalışılan örneklerin MAT ile karşılaştırmalı sonuçları tablo 6'da sunulmaktadır.

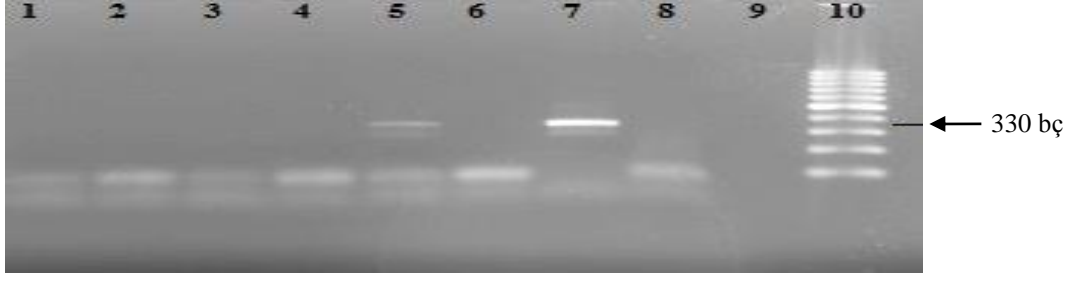
qRT-PZR'de elde edilen bulgular agaroz jel elektroforezine uygulandı ve karşılaştırma amaçlı değerlendirildi (Şekil 15-19 ve tablo 6).

##### 4.6.1 qRT-PZR Sonuçlarının DNA Elektroforezi'nde Doğrulması

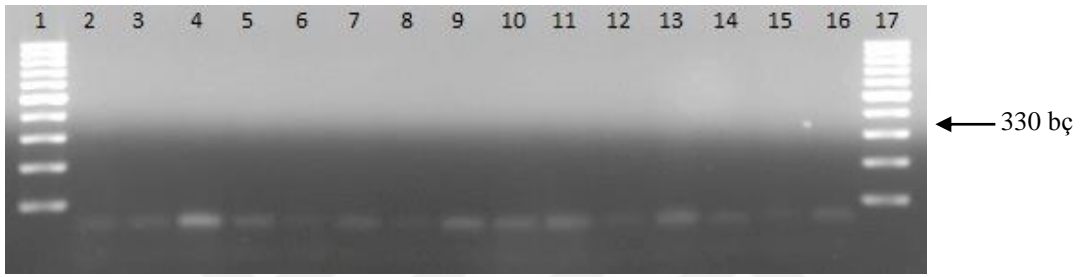
Sığır kan serumlarından *lfb1* ve *lipL32* genlerine dayalı yapılan qRT-PZR ürünlerini doğrulamak amacıyla agaroz jel elektroforezde doğrulama yapıldı. qRT-PZR de pozitif bulunan 14 serumdan 10 tanesi agaroz jelde doğrulandı (Şekil 15-19 ve tablo 6).



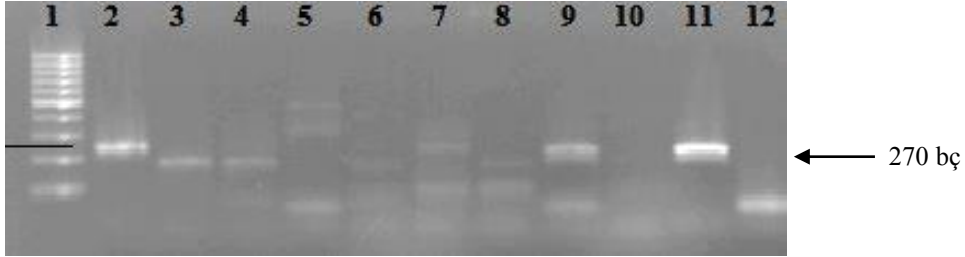
**Şekil 15.** *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR ürünlerinin agaroz jel'de görünümü M: marker 80-1031 bç. Marker (1 ve 22 no'lu kuyucuk) 14, 20, 23, 36, 39, 42, 44, 66, 76, 86, 90, 101, 104, 107, 108, 111, 113, 118 (sırasıyla 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ve 21 no'lu kuyucuklar) *lfb1* negatif kontrol; *L. pomona* ( 2 no'lu kuyucuk), *lfb1* pozitif kontrol; *L. hardjo* (3 no'lu kuyucuk)



**Şekil 16.** *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR ürünlerinin agaroz jel'de görünümü. M: marker 80-1031 bç. Marker (10 no'lu kuyucuk ) 123, 124, 132, 136, 142, 166, 26, 193, (sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 no'lu kuyucuklar), 9 no'lu kuyucuk boş kuyucuk



**Şekil 17.** *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 80 – 1031 bç. 13, 141, 143, 144, 145, 146, 151, 155, 159, 160, 187, 192, 195, 197 (sırasıyla 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16 no'lukuyucuklar), No DNA (16 no'lu kuyucuk), marker (1 ve 17 no'lu kuyucuk)



**Şekil 18.** *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR ürünlerinin agaroz jel'de görünümü. M: marker 80-1031 bç. Marker (1 no'lu kuyucuk), 113, 118, 119, 123, 124, 132, 136, 142, 166, 26, 193 (sırasıyla 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 no'lu kuyucuklar)

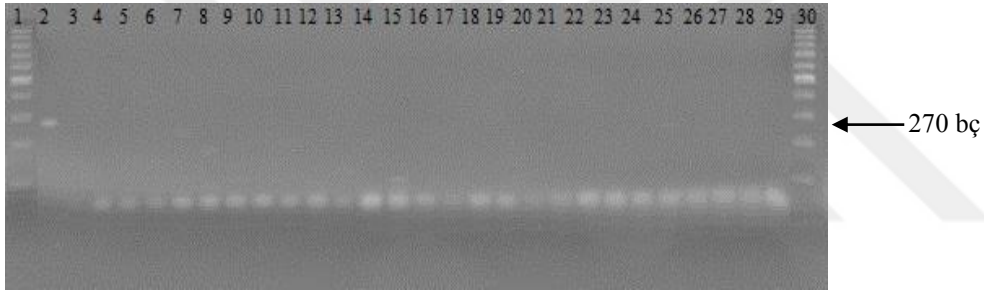




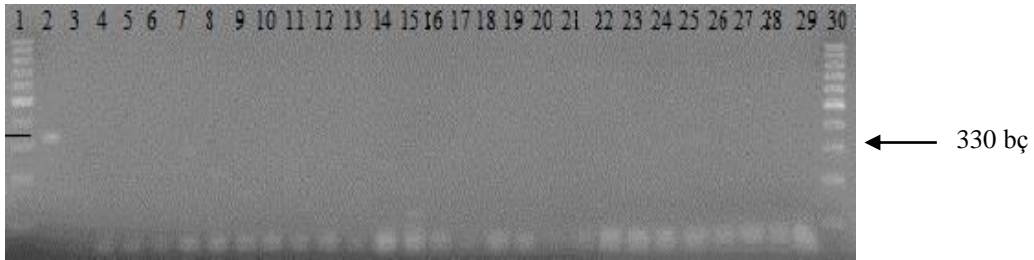
**Şekil 19.** *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. M: marker 80 – 1031 bç. 13, 141, 143, 144, 145, 146, 151, 155, 159, 160, 187, 192, 195, 197 (sırasıyla 2, 3, 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ve 16 no'lukuyucuklar), No DNA (16 no'lu kuyucuk), marker (1 ve 18 no'lu kuyucuk)

#### 4.7. Mezbahane Kan Örneklerinde Patojen *Leptospira* Varlığının *lipL32* ve *lfb1* genlerini Hedefleyen Geleneksel PZR ile Belirlenmesi

Mezbahaneden alınan kanlardan elde edilen DNA'larda *lipL32* ve *lfb1* genlerini hedefleyen PZR'de herhangi bir pozitiflik belirlenmedi.



**Şekil 20.** *lipL32* genini hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. m1-m25 nolu örnekler (sırasıyla 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 no'lu kuyucuklar), No DNA (29 no'lu kuyucuk), Pozitif Kontrol (2 no'lu kuyucuk), Negatif Kontrol (3 no'lu kuyucuk). M: marker 80 – 1031 bç. (1 ve 30 no'lu kuyucuklar)



**Şekil 21.** *lfb1* genini hedefleyen PZR ürünlerinin agaroz jelde görünümü. m1-m25 no'lu örnekler, (sırasıyla 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ve 28 no'lukuyucuklar), No DNA (29 no'lu kuyucuk), Pozitif Kontrol (2 no'lu kuyucuk), Negatif Kontrol (3 no'lu kuyucuk).M: marker 80 – 1031 bç. (1 ve 30 no'lu kuyucuklar)

**Tablo 6.** Sığır kan serum ve kan örneklerinde *Leptospira* varlığının *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR yöntemi ile değerlendirilmesi

Sıra No	Serum No	MAT		qRT-PZR		DNA Elektroforezi ile qRT-PZR sonuçlarının doğrulanması	
		<i>L. hardjo</i>	<i>L. grippotyphosa</i>	<i>lipL32</i>	<i>lfb1</i>	<i>lipL32</i>	<i>lfb1</i>
1	1	-	-	-	-		
2	8	-	+	-	-		
3	9	+	-	-	-		
4	13	-	-	-	-	-	-
5	14	+	-	+	+	-	-
6	20	+	-	+	-	+	-
7	21	-	-	-	-		
8	23	-	-	-	-	-	-
9	26	+	+	+	+	+	+
10	27	+	+	-	-		
11	29	-	-	-	-		
12	30	-	-	-	-		
13	36	-	-	+	-	-	-
14	39	-	+	-	-	-	-
15	41	-	-	-	-		
16	42	-	-	-	-	-	-
17	44	-	-	-	-	-	-
18	61	-	-	-	-		
19	65	+	-	-	-		
20	66	-	+	+	+	-	-
21	74	-	-	-	-		
22	76	-	-	-	-	-	-
23	81	+	+	-	-		
24	86	+	+	+	+	+	+
25	89	+	-	-	-		
26	90	-	-	+	+	+	-
27	96	+	-	-	-		
28	97	+	-	-	-		
29	101	+	-	+	+	-	+
30	104	-	-	-	-	-	-
31	105	-	-	-	-		
32	107	+	-	-	-	-	-
33	108	+	-	+	+	+	-
34	111	+	+	-	-	-	-
35	113	-	+	+	+	+	+
36	114	+	+	-	-		
37	115	-	-	-	-		
38	118	+	+	+	-	-	-
39	119	-	-	-	-	-	-
40	123	+	-	-	-	-	-
41	124	+	-	+	-	-	-
42	125	-	-	-	-		
43	127	-	-	-	-		
44	132	-	+	+	-	+	-
45	136	+	+	-	+	-	-
46	141	-	-	-	-	-	-
47	142	-	+	+	+	+	+
48	143	-	-	-	-	-	-

**Tablo 6.** Sığır kan serum ve kan örneklerinde *Leptospira* varlığının *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR yöntemi ile değerlendirilmesi (devamı)

49	144	-	-	-	-	-	-
50	145	-	-	-	-	-	-
51	146	-	-	-	-	-	-
52	151	-	-	-	-	-	-
53	155	-	-	-	-	-	-
54	159	-	-	-	-	-	-
55	160	-	-	-	-	-	-
56	166	+	-	-	+	-	-
57	172	-	-	-	-	-	-
58	184	-	-	-	-	-	-
59	187	-	-	-	-	-	-
60	188	-	-	-	-	-	-
61	192	-	-	-	-	-	-
62	193	-	-	-	-	-	-
63	195	-	-	-	-	-	-
64	197	-	-	-	-	-	-
65	M1	-	-	-	-	-	-
66	M2	-	-	-	-	-	-
67	M3	-	-	-	-	-	-
68	M4	-	-	-	-	-	-
69	M5	-	-	-	-	-	-
70	M6	-	-	-	-	-	-
71	M7	-	-	-	-	-	-
72	M8	-	-	-	-	-	-
73	M9	-	-	-	-	-	-
74	M10	-	-	-	-	-	-
75	M11	-	-	-	-	-	-
76	M12	-	-	-	-	-	-
77	M13	-	-	-	-	-	-
78	M14	-	-	-	-	-	-
79	M15	-	-	-	-	-	-
80	M16	-	-	-	-	-	-
81	M17	-	-	-	-	-	-
82	M18	-	-	-	-	-	-
83	M19	-	-	-	-	-	-
84	M20	-	-	-	-	-	-
85	M21	-	-	-	-	-	-
86	M22	-	-	-	-	-	-
87	M23	-	-	-	-	-	-
88	M24	-	-	-	-	-	-
89	M25	-	-	-	-	-	-

**Tablo. 7** Sığır kan serumlarına ait qRT-PZR sonuçlarının MAT ile karşılaştırılması

Örnek sayısı	<i>lipL32</i> (+)	<i>lfb1</i> (+)	<i>lipL32</i> ve <i>lfb1</i> (+)	Negatif (-)
MAT pozitif (27)	4	2	8	13
MAT negatif (37)	1	0	1	35
Mezbahane Sağlıklı Sığır Kanları (25)	0	0	0	25

Kan serumu örneklerinin MAT analizi sonuçları ile *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR sonuçları karşılaştırıldı. MAT'ta *L. hardjo*, *L. grippotyphosa* veya her iki serovar yönünden pozitif bulunan 27 serum örneğinin 4'ü (%14,8) yalnızca *lipL32* pozitif, 2'si yalnızca *lfb1* pozitif (%7,4), 8'i (%29,63) hem *lipL32* hemde *lfb1* pozitif olarak belirlendi. Sonuç olarak, MAT pozitif bulunan toplam 27 kan serumunun 14'ü (%51,85) *lipL32* ve/veya *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR ile pozitif bulundu. Onüç'ü (%48,15) negatif olarak belirlendi.

MAT negatif 37 serumun 1'i (%2,7) yalnızca *lipL32* geni pozitif, 1'i (%2,7) hem *lipL32* hemde *lfb1* genleri pozitif olarak belirlendi. Otuzbeş'i (%94,6) negatif olarak belirlendi.

Mezbahannede kesilen ve sağlıklı olduğu belirlenen sığırlardan kesim sonrası alınan kan örneklerinde *lipL32* ve *lfb1* genleri negatif bulundu.

MAT ile pozitif ve negatif bulunan serum örneklerine dayalı olarak qRT-PZR testinin sensitivitesi %51,85, spesifitesi %94,6; pozitif tahmini değeri (PPV) %87,50, negatif tahmini değeri (NPV) %72,91 ve AUC değeri MedCalc programı kullanılarak 0,732 olarak hesaplandı.

## 5. TARTIŞMA

Patojen leptospira türlerinin moleküler yöntemlerle saptanması leptospirozun tanısında önemlidir. Yalnızca patojen leptospiralarda bulunduğu belirlenen *lipL32* ve *lfb1* genlerini hedefleyen qRT-PZR'lerin sensitivite ve spesifitelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Levett ve ark., 2005; Merien ve ark., 2005; Stoddard ve ark., 2009; Bourhy ve ark., 2011). Bu genlerden *lfb1* geni fonksiyonu henüz bilinmeyen *lfb1* proteinini kodlar (Merien ve ark., 2005), *lipL32* geni önemli bir virulens faktörü olduğu tespit edilmiş olan major dış membran lipoprotein LipL32 proteinini kodlar (Haake ve ark., 2000; Yang ve ark., 2002).

Bu çalışmada, Genç ve ark. (2005), tarafından Kars ili ve çevresinde yapılan çalışmada kullanılan abort yapmış sığırlara ait ve hastalık yönünden MAT ile bakılmış sığır kan serum örnekleri kullanıldı. Bu bölgede *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* etkenlerinin yaygın serovarlar olduğu bildirilmiştir. Toplam 64 adet serum örneği çalışmaya dahil edilmiş olup, bunların 27'si MAT ile *L. hardjo* ve *L. grippotyphosa* serovarları ile pozitif, 37'si MAT negatif bulunmuştur. Benzer olarak, 2002 yılında Kars ve Ardahan illerinde sığırlarda leptospirozun serolojik yöntemlerle araştırıldığı bir çalışmada enfeksiyona neden olan serotiplerin aynı olduğu belirlenmiştir (Şahin ve ark., 2002). Bu nedenle çalışmada identifikasyon için gen seçiminde bu 2 serovarin varlığı göz önünde tutulmuştur.

Tez çalışmasında, hedeflenen *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı qRT-PZR ile referans patojen leptospira türlerinden spesifik gen ürünleri elde edildi. Testin tespit limitlerinin belirlenmesi amacıyla leptospira'ya ait yaygın bir serovar olan *L. hardjo* genomik DNA'sının 10 katlı dilusyonları hazırlandı ve testin optimizasyonu ile elde edilen Ct değerlerine bağlı standart eğri analizi yapıldı. Çalışmada MAT pozitif olan kan serumlarında %51,85 oranında *lipL32* ve *lfb1* genlerine dayalı pozitiflik saptandı. Her iki gene dayalı tespitinin sensitiviteyi artırdığı belirlendi. MAT negatif sığır kan serum örneklerinde %94,6 oranında spesifite belirlenmesi, patojen olmayan *Leptospira biflexa* türüne ait Patoc serovarında ve araştırılan *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* ve *Enterococcus faecalis* türlerinde negatif sonuçlar elde edilmesi, testlerin analitik spesifikliğinin yüksek olduğunu gösterdi. Testin spesifikliğinin belirlenmesinde, qRT-PZR'de referans ve örneklere ait elde edilen Ct değerleri melt curve analizleri ile incelenerek değerlendirildi. Spesifik melting curve'lerin elde

edilmesi reaksiyonda primer-dimerleri veya non-spesifik ürünlere ait sinyallerin olmadığını gösterdi. Bu analizler sonucunda, testin spesifikliğin yüksek olduğu tespit edildi. Elde edilen pozitif örneklerin bir kısmı agaroz jel elektroforezinde doğrulandı.

Hedef DNA'ların saptanma limitleri 115 pg/ml olarak belirlendi. Analitik sensitivitesinin yüksek olduğu belirlenen bu testte çok düşük DNA konsantrasyonunda dahi bakterilerin saptanabildiği tespit edildi. Dilüsyon son nokta standart eğri analizinde, Ct siklus sayısına karşı Log10 genom karşılığı belirlendi. Bu yöntem ile testin analitik sensitivitesi belirlenmiş oldu. Farklı çalışmalarda qRT-PZR testlerinin analitik sensitiviteyi 3-10 genom arasında değişmektedir (Levett ve ark., 2005; Merien ve ark., 2005; Bourhy ve ark., 2011). Bu çalışmada, 2 farklı geni hedefleyen qRT-PZR testlerinin analitik sensitiviteyi 23 genom/μl olarak belirlendi.

qRT-PZR testinin performansının kan, plazma ve kan serumu örneklerinde karşılaştırıldığı çalışmalarda, en düşük sensitivitenin kan serum örneklerinde saptandığı belirtilmiştir (Stoddard ve ark., 2009; Bourhy ve ark., 2011). Bununla birlikte, Merien ve ark. (2005), tarafından *lfb1* genini hedefleyen SYBR Green qRT-PZR'de klinik örneklere ait kan serumlarında %49 oranında pozitiflik belirlenmiştir. Bir başka çalışmada ise, kuzeydoğu Tayland'da kan serumlarında leptospirozun tanısı için *lipL32*'yi hedef alan qRT-PZR testinin % 43 sensitiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Thaipadunpanit ve ark., 2011). Bu çalışmada qRT-PZR testinin sensitivitesi Merien ve ark. (2005) ve Thaipadunpanit ve ark. (2011) tarafından tespit edilen sensitivite düzeylerine benzer bulundu. Genel olarak PZR ile enfeksiyonun akut döneminde kanda leptospira'ların yoğun bir şekilde bulunması nedeniyle pozitifliklerin yakalanma olasılığı çok daha yüksektir. Çalışmamızda diğer çalışmalardan nispeten yüksek bulunan ancak yine de düşük düzeyde olduğu görülen yaklaşık %52 düzeyindeki test sensitivitesi elde edilme nedeni kan serum örneklerinin hastalığın ilerlemiş geç döneminde olan abort yapmış hayvanlardan alınmasına bağlanabilir. Bu dönemde bakteriler kandan ziyade organlarda yayıldığı için bakterilerin kandaki seviyesi düşmektedir. Kan serumlarına ait yalnızca MAT analizi sonuçları bulunduğu için, qRT-PZR sonuçları MAT sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

*lipL32* ve *lfb1* genlerini hedefleyen qRT-PZR testinin negatif kan serumlarına dayalı olarak belirlenen spesifitesinin %94,6 düzeyinde tespit edilmesi, testin gerçek

negatifleri iyi düzeyde gösterdiğini ve yalancı pozitifliğin çok düşük düzeyde kaldığını göstermiştir.

Bu test özellikle enfeksiyonun erken döneminde MAT testinde negatif bulunan kan serum örneklerinin test edilmesinde kullanılabilecek ilave bir test niteliğindedir. MAT'ın leptospirozun erken döneminde sensitivitesinin düşük olması bazı örneklerde yanlış negatif sonuçların elde edilmesi sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Tamamlayıcı ve doğrulayıcı test olarak qRT-PZR'nin kullanılması önerilebilir. Leptospiremi döneminden sonra etken böbreklere yerleştiğinden bu organlardan da numune alınarak qRT-PZR çalışılması uygun olacaktır. Ancak bu çalışma için enfeksiyonun akut dönemini yansıtan örnek olmadığından net bir şey söylemek mümkün olamamakta ancak testin düşük konsantrasyonlarda tespit limitleri, etkenin varlığında bunun mümkün olacağını göstermektedir.

SYBR Green I floresan boyamaya dayalı qRT-PZR tekniği, spesifik prob kullanılan Taq Man teknolojisine nazaran kolay ve ucuzdur. SYBR Green teknolojisinde qRT-PZR'nin spesifitesi primerlerin spesifiteleri erime eğrisi (melting curve) analizi yoluyla belirlenmektedir. Bu çalışmada, cihazın programlanması aşamasında amplifikasyon siklusları elde edildikten sonra primerlerin ayrışma analizi olarak tanımlanan melt curve'ün elde edilmesi için programlama yapıldı. Aynı reaksiyon tüpünde reaksiyonun devamında elde edilen piklerin uygun erime ısısına sahip olması primerlerin spesifik olduğunu gösterdi. Leptospira türlerine bağlı olarak erime ısılarının (T<sub>m</sub>) 82,2°C-86°C arasında değiştiği bildirilmiştir (Levett ve ark., 2005; Merien ve ark.,2005; Bourhy ve ark., 2011). Bu çalışmada, *lfb1* genini hedefleyen qRT-PZR'de erime ısılarına ilişkin önemli olmayan bir değişiklik tespit edildi. Şöyle ki; testte erime ısıları serovarlar Bratislava'da 81,5; Canicola'da 82; Grippotyphosa'da 82; Icterohaemorrhagiae'de 81,5; Pomona'da 82; Hardjo'da 81,5 olarak belirlendi. *lipL32* genini hedefleyen qRT-PZR'de erime ısıları biri dışında çalışılan tüm referans patojen leptospira serovarlarında 82,5; Pomona serovarında 83 olarak belirlendi.

Biyolojik sıvılardan patojen leptospira'ların saptanmasında qRT-PZR, diğer geleneksel yöntemlere göre üstünlüklere sahiptir. Bu teknoloji hızlı ve kolaydır. PZR ürünlerinin agaroz jelde tespit edilmesi aşaması bulunmamaktadır. Kapalı sistemde örneklerin kısa süre içerisinde tek aşamada analiz edilmeleri dolayısıyla kontaminasyon riski azalmaktadır. Ayrıca qRT-PZR'de log fazına göre kantitasyon yapılmaktadır. Log

faz kantitasyon PZR siklusunun threshold (eşik değer) ile çakıştığı noktada yapılır. Henüz rn eldesinin başında olması nedeniyle kontaminasyonlar ve inhibitörlerden en az düzeyde etkilenme söz konusudur.

Erken dönem qRT-PZR araştırmalarında genellikle farklı gen bölgeleri hedeflenmiştir. Smythe ve ark. (2002), tarafından 16S rRNA'nın 87 bç'lik bir kısmını hedefleyen Taq man Prob kullanılan qRT-PZR yöntemi geliştirilmiştir. Patojen leptospira'ların varlığının belirlenmesi için *lig1* ve *lig2* genlerini (Palaniappan ve ark., 2004). *gyrB* genini Slack ve ark.(2006), *secY* genini Ahmed ve ark. (2009), hedefleyen geleneksel ve Taq man Prob kullanılan qRT-PZR yöntemleri geliştirilmiştir. Ferreira ve ark. (2014), yılında yaptıkları çalışmada, leptospira'nın önemli patojenik türlerini (*L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* ve *L. noguchii*'yi) tespit edebilen ve ayırt edebilen *ompL1* ve *secY* genlerini hedefleyen TaqMan prob yöntemine dayalı çoklu-gen hedefli qRT-PZR testi kullanmışlardır. Villumsen ve ark. (2012), insanlardaki patojen leptospiraları belirlemek amacıyla idrar ve kan örneklerinden TagMan probu kullanarak *lipL32* geni ve *16SrRNA* genini hedef alan bir yöntem geliştirmişlerdir.

Türkiye'de önceki yıllarda etkenin farklı gen bölgelerinin çoğaltılmasına dayalı geleneksel PZR ve yakın dönemde ise birkaç qRT-PZR tekniğiyle yrtlen çalışmalarda leptospiraların düşük düzeyde tespit edildiği görülmektedir. Çetinkaya ve ark. (2000), Elazığ, Malatya ve Diyarbakır illerindeki mezbahanelerden kesilen sığır idrarlarında *L. interrogans*'ın *rrs* genine (16s rRNA) dayalı PZR ile %4.02 oranında pozitif sonuç elde etmişlerdir. Parın (2008), Aydın ili ve çevresinde bulunan sığırlardan toplanan kan serumlarından brucella ve leptospira türlerini tespit etmeye yönelik multiplex PZR yöntemini kullanmıştır. Örneklerin % 31,2'inde hem *Brucella spp.*'ye hem de *Leptospira spp.*'ye ait bantlar görülmüş, % 37,7'si ise sadece *Leptospira spp.* için pozitif bulunmuştur. Diyarbakır bölgesindeki sığırlarda patojenik *Leptospira spp.* varlığı hap-1 genine dayalı qRT-PZR yöntemi ile %9,4 oranında tespit edilmiştir (Yeşilmen ve ark., 2012).

Bu araştırma ülkemizde ilk defa *lfb1* ve *lipL32* genlerine dayalı olarak qRT-PZR ile patojen leptospira'ların varlığının belirlenmesi üzerine yapılmış, elde edilen sonuçlar bu genlere dayalı testin epidemiyolojik çalışmalarda MAT ile birlikte tamamlayıcı test olarak kullanılabileceğini göstermiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, MAT testi uygulanmış sığır kan serumlarında patojen leptospira'ların varlığı spesifik *lipL32* ve *lfb1* genlerini hedefleyen SYBR Green teknolojisine dayalı qRT- PZR yöntemiyle belirlendi.

qRT-PZR testinin tespit limitinin belirlenmesinde, DNA konsantrasyonu 115 pg/ml olarak belirlenerek, testin analitik sensitivitesi yüksek bulundu. Dolayısıyla, konvansiyonel PZR'den çok daha duyarlı olduğu gösterilmiş olan bu testin Leptospiroz hastalığının tanısında kullanılması uygun olacağı anlaşılmaktadır. Araştırmada yalnızca patojen leptospira serovarlarını tespit edebilen *lfb1* ve *lipL32* genlerine dayalı qRT-PZR testinin sensitivitesi %51,85 olarak belirlendi. Yalnız bu değer MAT sonuçları temelinde düşünüldüğünde gerçek sensitiviteyi ifade etmeyeceğinden test sensitivitesi olarak değil de MAT'a göre yorumlanmalıdır. Yine de alternatif bir tanı testi olarak bu sensitivitenin ortalama bir değer olduğu görülmektedir. Bu oranın orta düzeyde olması, sığır kan serum örneklerinin abort yapmış hayvanlardan alınmış olmasına, bakterilerin iç organlara yerleşmesine ve enfeksiyonun ilerlemiş dönemine ait kan örnekleri içermesi ile ilgili olacağını göstermektedir. Enfeksiyonun akut döneminde etkenin kanda yoğun olarak bulunması potansiyeli nedeniyle bu testin sensitivitesinin daha yüksek bulunabileceği açıktır. Özellikle erken tanı açısından faydalı olacağı anlaşılmaktadır. Tez çalışmasında testin spesifitesininin yüksek olduğu (%95), yalnızca patojen serovarların belirlendiği, apatojen serovarların tespit edilmediği, diğer bakteri türleri ile de çapraz reaksiyonun gözlenmediği belirlendi.

Bu çalışmanın devamı olarak, klinik durumu belirlenmiş hayvan ve insanlarda leptospiroz tespitinin, enfeksiyonun farklı safhalarında kan, plazma ve serum örneklerinde MAT ve qRT-PZR ile incelenmesi planlandı. Yürütülmesi planlanan araştırmada, alternatif test olarak kullanımı kolay olan qRT-PZR testinin etkinliğinin MAT ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesi amaçlandı. MAT'ta canlı bakteri suşlarının kullanılıyor olması nedeniyle sürekli kültürlerin pasajlanması gereklidir. Bu nedenle hayvanlara leptospiroz teşhisi yapılan ülkelerde tanı amacıyla *lfb1* ve *lipL32* genlerini hedefleyen qRT-PZR testinin kullanılması önerilmektedir.

Testin yüksek spesifiteye ve analitik sensitiviteye sahip olması, sensitivitesinin ortalama düzeyde olması ülkemizde bu hastalığın tanısında doğrulama testi olarak

kullanılabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca bu testin patojen leptospiraların tespitine yönelik araştırmalarda kullanılması ile kısa sürede sonuçlar elde edilebilecektir.



## KAYNAKLAR

- Adler B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. *Veteriner Microbiology* 2014;172:353-358. Adler B, Lo M, Seemann T, Murray GL. Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics. *Vet Microbiol* 2011;153:73-81.
- Adler B, Moctezuma AP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;140:287-296.
- Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and validation of a real-time pcr for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE* 2009;4:e7093.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde ML, Vijayachari P, Machang'u RS, ; Ellis WA, Hartskeerl RA. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic leptospira species. *AnnClinMicrobiolAntimicrob* 2006;5:1-10.
- Ajaj EA, Al-Farwachi MI. Detection of bovine leptospirosis using different conventional laboratory tests in nineveh province, Iraq. *JAnimHealth Prod* 2013;1:32-35.
- All-Orry W, Arahou M, Hassikou R, Mennane Z. A review of laboratory diagnosis and treatment of leptospirosis. *Int J Pharm Sci* 2016; 8:7-13.
- Arda M, Mimbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS. Özel mikrobiyoloji. 4.Baskı, Ankara, Medisan Yayın. 1997;259-268.
- Aslantaş Ö, Özdemir V, Kılıç S, Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniasis among dogs in ankara. *Turk Vet Parasitol* 2005;129:187-191.
- Azizi S, Kheirandish R, Rahimi E. Comparison of polymerase chain reaction and warthin-starry techniques to detect leptospira spp. in kidneys of slaughtered cattle. *Onderstepoort J Vet Res*, 2014; 81.
- Bolin CA, Alt DP. Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to leptospira borgpetersenii serovar hardjo. *Am J Vet Res* 2001; 62: 995-1000.
- Bomfim MRQ, Ko A, Koury MC. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Vet Microbiol* 2005;109: 89-94.

- Boonslip S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MT, Zhang C, Jiang X, Koizumi N, Taylor K, Galloway R, Hoffmaster AR, Craig S, Smythe LD, Hartskeerl RA, Day NP, Chantratita N, Feil EJ, Aanensen DM, Spratt BG, Peacock SJ. A single multilocus sequence typing (mlst) scheme for seven pathogenic leptospira species. *PLOS Negl Trop Dis* 2013;7:1954.
- Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic leptospira spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol* 2011;2154–2160.
- Bourhy P, Storck CH, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Zinini F, Bremont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. Serovar diversity of pathogenic leptospira circulating in the french west indies. *PLOS Negl Trop Dis* 2013;7:2114.
- Bulu AA, Dörterler R, Özkan Ö, Hastürk F. Doğu anadolu'nun bazı illerinde (kars, artvin, gümüşhane, erzurum) sığır ve koyunlarda leptospiroz vakalarının yayılışı ve serotipleri üzerine bir araştırma. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg* 1990;6:49-60.
- Buzğan T, Irmak H, Karahocagil MK, Evirgen Ö, Akdeniz H, Demiröz A. Weil hastalığı olgu sunumu. *Flora* 2003;8:78-82.
- Cullen PA, Haake DA, Adler B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *Fems Microbiol Rev* 2004;28:291-318.
- Çaşkurlu H, Öztürk R, Polat E, Bağdatlı YA. Leptospirosis case. *Turk J Infect* 1995;9:223-224.
- Cerqueira GM ve Picardeau M. A century of leptospira strain typing. *Infect Genet Evol* 2009;9:760-768.
- Çetin BD, Harmankaya O, Hasman H, Gunduz A, Oktar M, Seber E. Acute renal failure: a common manifestation of leptospirosis. *Ren Fail* 2004;26:655-661.
- Çetinkaya B, Ertaş HB, Muz A, Öngör H, Kalender H, Özdemir V. Elazığ ilinde sığırlarda leptospirosis'in seroprevalansının saptanması. *Turk J Vet Anim Sci* 1999;23:633-639.
- Çetinkaya B, Ertas H.B, Ongor H, Muz A. Detection of leptospira species by polymerase chain reaction (PCR) in urine of cattle. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24: 123–130.
- Dabak M, Gül Y, Kızıl Ö, Özdemir V. Leptospirosis saptanan bir keçi sürüsünde klinik ve laboratuvar çalışmaları. *Turk J Vet Anim Sci* 2001;25:391-395.
- Erdinc FS, Kuru ST, Hatipoğlu CA, Kinikli S, Demiroz AP. Three cases of anicteric leptospirosis from turkey: mild to severe complications. *J Infect* 2006;52:45-48.

- Ertaş HB, Çetinkaya B, Muz A, Öngör H, Özdemir V, Yazıcıoğlu N. Sığırlarda leptospira seroprevalansının mikroskopik aglutinasyon testi (mat) ve elisa ile saptanması. Turk J Vet Anim Sci 2002;26:1415-1420.
- Esen S, Sunbul M, Leblebicioğlu H, Eroğlu C, Turan D. Impact of clinical and laboratory findings on prognosis in leptospirosis. Swiss Med Wkly 2004;134:347-352.
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. 2.nd ed. medscience, melbourne 2000; 272.
- Ferreira AS, Costa P, Rocha T, Amaro A, Vieira ML, Ahmed A, Thompson G, Hartskeerl RA, Inacio J. Direct detection and differentiation of pathogenic leptospira species using a multi-gene targeted realtime pcr approach.PLoS ONE 2014;9:e112312.
- Genç O, Otlu S, Şahin M. seroprevalence of brucellosis and leptospirosis in aborted dairy cows. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 359-366.
- Gümüşsoy KS, Özdemir V, Aydın F, Aslan Ö, Atabek E. Seroprevalence of bovine leptospirosis in kayseri, turkey and detection of leptospire by polymerase chain reaction. J AnimVet Adv 2009;8:1222-1229.
- Günel T. Quantitative analysis of gene expression "real-time pcr": scientific letter". Türk Klin Tıp Bil Derg 2007;27:763-767.
- Gürcüoğlu E, Öztürk Ç, Bayat N, Akalın H. Leptospiroz: güney marmara'dan üç olgu. Klimik Derg 2009;22:62-65.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. J Bact 1967;94:27-31.
- Joseph S, Thomas N, Thangapandian E, Singh VP, Verma R, Srivastava SK. Evaluation and comparison of native and recombinant lipL21 protein-based elisas for diagnosis of bovine leptospirosis. J Vet Sci 2012;13:99-101.
- Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. (2000). The leptospiral major outer membrane protein lipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun 2000;68:2276-2285.
- Haake DA, Dundoo M, Cader R, Kubak B. M, Hartskeerl RA, Sejvar J. J, Ashford, D. A. Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis. Clin Infect Dis 2002;34:40-43.

- Hartleben CP, Leal FM, Monte LG, Hartwig DD, Seixas FK, Vasconcellos SA, Brihuega B, Dellagostin OA. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen *lipL32* for the diagnosis of swine leptospirosis. *Curr Microbiol* 2013;66:106-109.
- Hernandez-Rodriguez P, Diaz CA, Dalmau EA, Quintero GM. A comparison between polymerase chain reaction (pcr) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *JMicrobiol Meth* 2011;84: 1-7.
- Kenar B, Özdemir V. The seroprevalence of leptospirosis in anatolian buffaloes in turkey. *Rev Vet Med* 2013;64: 331-335.
- Kositanont U, Rugsasuk S, Leelaporn A, Phulsuksombati D, Tantitanawat S, Naigowit P. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:117-122.
- Kriangsak P, Siriwan H, Chuanpit S, Sompong C, Kitti L, Sunee C, Wirongrong C, Duangjai S, Saowaluk S, Watcharee S, Sharon J. P, Lau C, Smythe L, Weinstein P. Leptospirosis: an emerging disease in travellers. *Travel Med Infect Dis* 2010;8:33-39.
- Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010;104:631–638.
- Leblebicioğlu H, Sencan İ, Sünbül M, Altıntop L, Günaydın M.. Weil's disease: report of 12 cases. *Scand J Infect Dis* 1996;28:637- 639.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:296–326.
- Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *JMed Microbiol* 2005;54:45-49.
- Lilenbaum W, Varges R, Brandao FZ, Cortez A, Souza de SO, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Vasconcellos SA. Detection of leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction. *Theriogenology* 2008;69:837-842.
- Lim VK. Leptospirosis: a re-emerging infection. *Malays J Pathol* 2011;33:1-5.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methdos* 2001;25:402-408.
- Loureiro A. P, Martins G, Thome S, Lilenbaum W. Laboratorial diagnosis of animal leptospirosis. *R Bras Ci Vet* 2013;20:119-126.

- Marianelli C, Tarantino M, Astarita S, Martucciello A, Capuano F, Galiero G. Molecular detection of leptospira species in aborted fetuses of water buffalo. *Vet Rec* 2007;161-310.
- Masuzawa T, Takada N, Kudaken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease –related borrelia species izolated in china. *Int Syst Evol Microbiol* 2001;51:1817-1824.
- Morgan J, Bornstein S. L, Karpati A. M, Bruce M, Bolin C. A, Austin C.C. , Woods C. W, Lingappa J, Langkop C, Davis B, Graham D. R, Proctor M, Ashford D. A, Bajani M, Bragg S. L, Shutt K, Perkins B. A, Tappero J. W. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in springfield, illinois, 1998. *ClinInfect Dis* 2002;34:1593-1599.
- Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge. *JMicrobiolImmun Infect* 2013;46:245-252.
- Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. a rapid and quantitative method for the detection of leptospira species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005;249:139-147
- OIE Leptospirosis.[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.01.12\\_LEPTO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_LEPTO.pdf) 2014.
- OIE Development and Optimisation of Nucleic Acid Detection Assays.[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/aahm/current/GUIDELINE\\_3.6.3\\_NAD\\_ASSAYS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/GUIDELINE_3.6.3_NAD_ASSAYS.pdf) 2014.
- Otaka DY, Martins G, Hamond C, Penna B, Medeiros MA, Lilenbaum W. Serology and pcr for bovine leptospirosis: herd and individual approaches. *Vet Rec* 2012;170:338.
- Özgen H, Tunus M. Türkiyede ilk olarak leptospira bovis suşunun kültürel geliştirilmesi. *Türk Vet Hek Der Derg* 1954;1865:98-99.
- Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. *J Med Microbiol* 2004;53:975-984.
- Palaniappan RUM, Chang YF, Chang CF, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, McDonough SP, Dubovi E, Divers T, Qu J, Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *MolCell Probe* 2005;19:111-117
- Palanippan RUM, Ramanujam S, Chang YF. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20:284-292.

- Parın U. Sığırlarda brucella ve leptospira türlerinin multiplex polimeraz zincir reaksiyonu (MPCR) ile tanımlanması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aydın. Yük Lis Tez 2008;50-55.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Maladies Infect* 2013;43:1-9.
- Picardeau M, Bertherat E, Jancloes M, Scouloudis AN, Durski K, Hartskeerl RA. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78:1-8.
- Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. Application of pulsed-field gel electrophoresis for the discrimination of leptospiral isolates in Brazil. *Letters in App Microbiol* 2009;48:623-627.
- Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandemrepeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *JClinMicrobiol* 2006;44:3954-3962.
- Saltoğlu N, Aksu HZ, Taşova Y, Arslan A. Leptospirosis: twelve turkish patients with the weil syndrome. *Acta Med Okayama* 1997;51:339-342.
- Sankar S, Harshan HM, Somarajan SR, Srivastava SK. Evaluation of a recombinant ligb protein of leptospira interrogans serovar canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *ResVetSci* 2010;88:375-378.
- Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S. S, Shutt K, Kaiser R, Marano N, Popovic T, Tappero J, Ashford D, Mascola L, Vugia D, Perkins B, Rosenstein N. Leptospirosis in "eco-challenge" athletes, malaysian borneo. *Emerg Infect Dis* 2003;6:702-707.
- Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Symthe LD. Identification of pathogenic leptospira species by conventional or real-time pcr and sequencing of the dna gyrase subunit b encoding gene. *BMC Microbiol* 2006;6:95.
- Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic leptospira spp. Through taqman polymerase chain reaction targeting the lipL32 gene. *Diag Microbiol Infect Dis* 2009;64:247-255.
- Sünbül M. Leptospiroz. *Ankem Derg* 2006;20:219-21.
- Şahin M, Aydın F, Özdemir V, Genç O, Gülere MA. Kars ve Ardahan illerinde sığır leptospirozisinin serolojik yöntemlerle araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci* 2002;26:17-25.



- Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V, Limmathurotsakul D, Amornchai P, Boonslip S, Smythe LD, Limpaboon R, Hoffmaster AR, Day NPJ, Peacock SJ. Diagnostic accuracy of real-time pcr assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in thailand: a case-control study. PLoS ONE 2011;6:e16236.
- Turhan V. "Türkiyede sık karşılaşılan hastalıklar" Leptospiroz. Fehmi Tabak, Ed. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sempozyum Kitabı. İstanbul. Sempozyum Dizisi 2007;55:227-240.
- Turhan V, Hatipoğlu M. Leptospirosis: "newly discerning but an ancient infectious disease". J ExpClin Med 2012;29:163-168.
- Unat EK. Temel mikrobiyoloji. 1. Baskı, İstanbul, Beta Basım Yayın 1985.
- Vieira ML, Fernandes LG, Domingos RF, Oliveira R, Siqueira GH, Souza NM, Teixeira arf, Atzingen MV, Nascimento ALTO. Leptospiral extracellular matrix adhesins as mediators of pathogen–host interactions.FEMS Microbiol Lett 2014;352:129-39.
- Villumsen S, Pedersen R, Borre MB, Ahrens P, Jensen JS, Krogfelt KA. Novel taqman® pcr for detection of leptospira species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. JMicrobiol Meth 2012;91:184-190.
- Wynwood SJ, Burns MA, Graham GC, Weier SL, McKay DB, Craig SB. Serological diagnosis of leptospirosis in bovine serum samples using a microsphere immunoassay. Vet Rec Open 2016; 3:e000148.
- Yang CW, Wu MS, Pan MJ, Hsieh WJ, Vandewalle A, Huang CC. The leptospira outer membrane protein lipL32 inducestubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximaltubule cells. J Am Soc Nephrol 2002;13:2037-2045.
- Yesilmen S, Arserım NB, Isık N, İcen H. Determination of prevalence of pathogenic leptospira spp. By real-time pcr in cattle in diyarbakır. YYU Vet Fak Derg 2012;23:137-139.
- [http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification\\_and/pcr.html](http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification_and/pcr.html). Erişim tarihi 01.02.2018

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ali SERDAR

Doğum Yeri: Akçaabat/Trabzon

Doğum Tarihi: 22.02.1986

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner

Fakültesi/2010

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Samsun SAMES A.Ş Mezbahanesi 2010-2011

59'uncu Topçu Eğitim Tugay Komutanlığı 2011-2012

Ladik İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü

2012-2014

Tekkeköy İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü

2014-2018

Samsun İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü

2018-

E-posta: aliiserdar@gmail.com