

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DOĞU ANADOLU VE ORTA ANADOLU BÖLGESİNDEKİ BAZI
İLLERDE DOĞAL YAŞAM KEMİRİCİLERİNDE PATOJENİK
LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

DR. BERKEN GÜR

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2024

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DOĞU ANADOLU VE ORTA ANADOLU BÖLGESİNDEKİ BAZI
İLLERDE DOĞAL YAŞAM KEMİRİCİLERİNDE PATOJENİK
LEPTOSPIRA TÜRLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. BERKEN GÜR

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. İ. MEHMET ALİ ÖKTEM

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Leptospiraların Tarihçesi.....	7
2.2. Leptospiraların Mikrobiyolojik Özellikleri.....	9
2.2.1. Leptospiraların Genel Özellikleri.....	9
2.2.2. Leptospiraların Üreme Özellikleri.....	10
2.2.3. Leptospiraların Hücre Duvarı Yapısı.....	11
2.2.4. Leptospiraların Patojenik Özellikleri.....	11
2.2.5. Leptospiraların Tanımlama Yöntemleri.....	12
2.2.5.1. Serolojik Yöntemler.....	12
2.2.5.2. Moleküler Yöntemler.....	12
2.3. Leptospirozun Epidemiyolojisi ve Bulaş Yolları.....	13
2.3.1. Leptospirozun Coğrafi Yayılımı ve Prevalansı.....	13
2.3.2. Leptospirozun Doğal Kaynakları ve Bulaş Yolları.....	13
2.3.3. Leptospirozun Risk Faktörleri.....	14
2.4. Leptospirozun Klinik Özellikleri.....	15

2.4.1. Leptospirozun Belirti ve Bulguları.....	15
2.4.2. Leptospirozun Tanısı.....	16
2.4.3. Leptospirozun Tedavi ve Önlenmesi.....	18
2.5. Kemiriciler.....	19
2.5.1. Kemiricilerin Sınıflandırılması ve Genel Özellikleri.....	19
2.5.2. Kemirici Kaynaklı Hastalıklar.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Örneklerin Toplanması.....	21
3.2. Nükleik Asitlerin Ekstraksiyonu.....	24
3.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi Basamakları.....	26
3.3.1. Primerlerin Hazırlanması.....	26
3.3.2. Pozitif Kontrolün Temini.....	27
3.3.3. Reaksiyonların Hazırlanması.....	27
3.3.4. Polimeraz Zincir Tepkimesi.....	28
3.3.5. Jel Elektroforezi.....	29
3.4. DNA dizilimi analizi.....	31
3.5. Filogenetik analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. PCR ve Jel Elektroforezi Sonuçları.....	33
4.2. Sanger Sekansı Sonuçları.....	35
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKÇA.....	56

8. EKLER.....	66
8.1. Ek 1. Etik Kurul Onayı.....	66



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Leptospiraların sınıflandırılması.....	9
Tablo 2. Kemiricilerin numaraları ve fenotipik cins ve tür tayinleri.....	23
Tablo 3. Taramada pozitif saptanan örnekler ve konum bilgileri.....	34
Tablo 4. Örneklerin nükleotit dizileri.....	43



SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Leptospiraların fiziksel yapısı.....	10
Şekil 2. Küresel yıllık leptospira yükü.....	13
Şekil 3. Kemiricilerin toplandığı bölgeler.....	24
Şekil 4. Optimizasyon çalışmasının jel elektroforezi.....	31
Şekil 5. Taramada pozitiflik saptanan örneklerin jel elektroforezi.....	33
Şekil 6. Doğrulamada pozitiflik saptanan örneklerin jel elektroforezi.....	34
Şekil 7. 8153 ve 8155 numaralı örneklerin jel elektroforezi.....	35
Şekil 8. 8153 numaralı örneğin ileri yönlü dizi elektroferogramı.....	36
Şekil 9. 8153 numaralı örneğin geri yönlü dizi elektroferogramı.....	36
Şekil 10. 8155 numaralı örneğin ileri yönlü dizi elektroferogramı.....	37
Şekil 11. 8155 numaralı örneğin geri yönlü dizi elektroferogramı.....	37
Şekil 12. 8167 numaralı örneğin ileri yönlü dizi elektroferogramı.....	38
Şekil 13. 8167 numaralı örneğin geri yönlü dizi elektroferogramı.....	38
Şekil 14. 8175 numaralı örneğin ileri yönlü dizi elektroferogramı.....	39
Şekil 15. 8175 numaralı örneğin geri yönlü dizi elektroferogramı.....	39
Şekil 16. 8233 numaralı örneğin ileri yönlü dizi elektroferogramı.....	40
Şekil 17. 8233 numaralı örneğin geri yönlü dizi elektroferogramı.....	40
Şekil 18. Örneklerin filogenetik ağaçtaki yerleri.....	44
Şekil 19. Örneklerin dairesel görünümdeki filogenetik ağaçtaki yerleri.....	45
Şekil 20. Microtus spp. kemiricilerinin Türkiye’de yayılımı.....	49
Şekil 21. Mus spp. kemiricilerinin Türkiye’de yayılımı.....	49

KISALTMALAR

ARDS: Akut solunum sıkıntısı sendromu

BOS: Beyin-omurilik sıvısı

CAAT: Çapraz agglutinin absorpsiyon testi

DNA: Deoksiribonükleik asit

EMJH: Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris

MAT: Mikroskopik aglütinasyon testi

MIC: Minimum inhibitör konsantrasyon

LAMP: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon

LPS: Lipopolisakkarit

PCR: Polimeraz zincir tepkimesi

RNA: Ribonükleik asit

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim ve bu eğitim süreciyle birlikte başlayıp devam eden Covid 19 pandemisi süresince desteklerini esirgemeyen, danışman hocam Doç. Dr. Mahmut Cem ERGON ve tez danışmanım Prof. Dr. İbrahim Mehmet Ali ÖKTEM olmak üzere tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada kullanılan *Leptospira* pozitif kontrol örneği ve doğrulama primerlerinin temininde bizlere yardımcı olan Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları'ndan Doç. Dr. Bekir ÇELEBİ'ye ve kemiricilerin ve örneklerin harita üzerinde gösterilmesini sağlayan görsellerin tasarımı için Kürşat Kenan KALKAN'a özellikle teşekkür ederim.

ÖZET

Doğu Anadolu ve Orta Anadolu Bölgesindeki Bazı İllerde Doğal Yaşam Kemiricilerinde Patojenik *Leptospira* Türlerinin Varlığının Araştırılması

Leptospiroz günümüzde en sık görülen bakteriyel zoonozlardandır. Hastalığın etkeni patojenik *Leptospira* türü bakterilerdir. Antarktika kıtası dışında tüm kıtalarda bu bakterilerin varlığı gösterilmiştir. Patojenik *Leptospira* türleri birçok memelide enfeksiyon yapabilir de hastalığın doğadaki temel konağı kemiricilerdir. Bakteri konağın vüdocuna çeşitli yollarda girdikten sonra kan dolaşımı yoluyla böbreklere gelir ve proksimal tübül epiteline kolonize olur. Aseptomatik olarak enfekte olan konağın kolonizasyonu sonrası idrar yoluyla sürekli atılım gerçekleşir. İnsanlar en sık kontamine materyalin mukozalar veya bütünlüğü bozulmuş deri ile teması ile enfekte olur. İnsanlarda aseptomatik veya hafif hastalık tablosundan hayatı tehdit eden Weil Hastalığı veya pulmoner kanama gibi geniş bir yelpazede hastalık yapabilmektedir.

Patojenik *Leptospira* türü bakterilerin doğal yaşamdaki varlığının ve yayılımının gösterilmesi ileride oluşabilecek salgınlara karşı önlem alınması için önemlidir. Bu amaçla 2016 yılında Erzurum, Amasya, Kayseri, Malatya ve Elazığ illerinde doğal yaşam alanlarından toplanmış *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Mus* spp., *Chionomys* spp., *Cricetulus* spp., *Crocidura* spp., *Meriones* spp. ve *Mesocricetus* spp. türlerinden oluşan toplam 211 adet kemiriciye ait böbrek örnekleri polimeraz zincir tepkimesi yöntemi ile *Leptospira* spp. açısından tarandı. Yapılan testler sonucunda Amasya bölgesinden toplanan 80 örnekten beşi pozitif saptandı. Bu örneklerin üçü *Microtus* spp., ikisi *Mus macedonicus* kemiricilerinden olduğu görüldü. Sanger sekansı yöntemi ile çoğaltılan bölgelerin dizi analizi yapıldıktan sonra pozitif örneklerin yapılan filogenetik ağaçta *Leptospira interrogans* dizileri ile birlikte gruplandığı görüldü.

Birçok ülkede kemiricilerde ve çevresel materyalde çalışmalar yapılarak *Leptospira* ve diğer zoonoz etkenlerinin varlığı ve dağılımı araştırılmaktadır. Türkiye’de ise bu çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Beş farklı il ve yedi farklı bölgeden toplanan birçok kemirici türüne ait örneklerin bulunduğu bu çalışmayla birlikte Türkiye’nin Amasya ilinden toplanan 80 kemiricinin beşinde patojenik *Leptospira*

varlığı gösterildi. *Leptospira* spp. ve diğ er zoonoz etkenlerinin T rkiye’deki dağılımının ve varlığının tespiti i in daha  ok  alışma yapılması gerekir.

Anahtar kelimeler: Leptospira, Kemiriciler, PCR, Dizi analizi



SUMMARY

Investigation of The Presence of Pathogenic *Leptospira* Species in Wild Rodents from Some Provinces in East Anatolia and Central Anatolia Regions

Leptospirosis is one of the most common bacterial zoonosis. Causative agent of the disease are bacteria classified as pathogenic *Leptospira* species. Presence of the bacteria has been shown in all continents except Antarctica. Although they can infect most mammals, natural reservoirs of pathogenic *Leptospira* are rodents. After entering the host's body through many possible routes, bacteria reaches kidney via blood circulation and colonises at proximal tubule epithelium. Once colonised, bacteria is shedded continuously via urine. Humans usually get infected when contaminated material contacts with mucosa or damaged skin. Human infections can range from asymptomatic or mild illness to life threatening Weil's Disease or pulmonary hemorrhage.

Determining the prevalence and distribution of pathogenic *Leptospira* is crucial for preventing future outbreaks. In this study we analysed kidney samples of 211 wild rodents belonging to *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Mus* spp., *Chionomys* spp., *Cricetulus* spp., *Crocidura* spp., *Meriones* spp. and *Mesocricetus* spp., collected from Erzurum, Amasya, Kayseri, Malatya ve Elazığ provinces in 2016, with using polymerase chain reaction method. Five samples were found positive out of 80 samples collected from Amasya province. Three of the positives found in *Microtus* spp. and other two were found in *Mus macedonicus*. Nucleotide sequences of positive samples were established by Sanger sequencing method and found to be grouped with *Leptospira interrogans* in constructed phylogenetic tree.

Presence and distribution of *Leptospira* and many other zoonotic agents in rodents are being investigated in many countries. In Turkey, number of studies in this topic are limited. By testing samples from multiple rodent species obtained from five provinces and seven regions, we showed the presence of pathogenic *Leptospira* in five out of 80 samples from Amasya province. To determine presence and distribution of *Leptospira* spp. and other zoonotic agents in Turkey, more study are needed.

Keywords: Leptospira, Rodents, PCR, Sequence analysis



1. GİRİŞ VE AMAC

Patojenler insanlara çeşitli yollarla bulaşabilir. En önemli bulaş yollarından biri, insan dışı hayvanlardan insanlara bulaş yoludur. Bu şekilde bulaşma sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlar zoonoz olarak tanımlanır (1). Zoonozlar tarih boyunca birçok salgına sebep olmuş önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Özellikle son yüzyılda hızla artan toplam insan nüfusu ve buna bağlı olarak insanların yaşam alanlarının genişlemesi, yaban hayvanları ve insanlar arasındaki etkileşimin artmasına sebep olmuştur. Bu durum birçok zoonoz etkeninin yayılmasını kolaylaştırmaktadır (2).

Leptospiroz günümüzde Antarktika dışında tüm kıtalarda görülen en önemli bakteriyel zoonozlardan biridir. Hastalığın etkeni *Leptospiraceae* ailesi altında bulunan patojenik *Leptospira* türleridir. Klinik açıdan asemptomatik veya ateş, titreme, baş ağrısı gibi hafif semptomlarla ilerleyebilirken sarılık, karaciğer ve böbrek yetmezliği, gastrointestinal kanama, ağır pulmoner kanama sendromu gibi ölümcül izleyen durumlar da görülebilmektedir. Bakteri insanlara genellikle bütünlüğü bozulmuş deri, mukoza, konjunktiva gibi koruyucu bariyerlerin yetersiz olduğu vücut yüzeylerinin enfekte olmuş su, toprak, hayvan dokuları gibi materyallerin teması ile bulaşır (3–5).

Doğal hayatta birçok hayvanda varlığı gösterilmiş olmasına rağmen küçük memeliler ve otçul hayvanlar bu bakteriler için en önemli rezervuar konaklardır. Çeşitli yollarla hayvanın vücuduna giren bakteri kan dolaşımı yoluya böbrek glomerüller ve peritübüler kılcal damarlarına gelir. Konak canlının böbreklerinde, proksimal renal tübüler epitelin fırçamsı kenarlarında kolonize olur ve konakta hastalık yaratmaksızın idrar yoluyla sürekli atılım gerçekleşir. İdrar yoluya çevreye salınan bakteriler diğer konaklara bulaşarak döngüyü tamamlar (3).

Patojenik *Leptospira* türlerinin doğal yaşam hayvanlarındaki taşıyıcılığının gösterildiği dünya genelinde birçok çalışma mevcuttur (6–10). Ülkemizde ise bu konuda yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bu çalışmalar riskli alanların belirlenmesi ve sağlık otoritelerinin olası salgınları engellemesi açısından önem teşkil eder. Yapacağımız çalışmada Orta Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesindeki bazı illerden

toplanmış kemirici türlerinin, patojenik *Leptospira* türleri açısından taşıyıcılık durumu araştırılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leptospiraların Tarihçesi

Leptospira cinsi bakterilerinin ilk tanımı 1838 yılında Ehrenberg tarafından yapılmıştır. Su örneklerinden izole edilen uzun, hareketli ve esnek bu bakterilere "Spirochaete" ismini vermiştir (11).

İnsanda leptospiroz binlerce yıldır var olmasına rağmen yazılı tarihte ilk kez 1886 yılında Adolf Weil tarafından tanımlanmıştır. Adolf Weil, akut sarılık ile birlikte görülen hepatosplenomegali, böbrek fonksiyonlarında bozukluk, konjunktivit ve deri döküntüleri bulunan bu hastalığa Weil hastalığı ismini koymuştur. Hastalık etkeninin ilk kez gösterilmesi ise 1907 yılında Stimson tarafından, Sarıhumma hastalığından öldüğü düşünülen bir hastanın böbrek doku kesitinde gümüş boyama yöntemiyle gösterilmiştir. Stimson, soru işaretine benzeyen spiral yapılı bu bakteriye *Spirochetes interrogans* ismini vermiştir (11,12).

Bakterinin izolasyonu ise ilk kez 1915 yılında İnada ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (12). Weil hastalarından alınan kanların kobayların peritonlarına inokülasyonu sonucu hayvanlarda tipik hastalığın geliştiği görülmüştür. Bu hayvanların karaciğer ve böbreklerinden alınan örneklerle hazırlanan besiyerlerinde bakteri üretilmiştir. Üretilen bu bakteriye *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* ismi verilmiştir. 1918 yılında Noguchi tarafından, hayvanlarda ve insanlarda bulunan diğer spiroketlerle karışmasının önüne geçmek için *Leptospira* cinsi önerilmiş ve bakterinin adı *Leptospira icterohaemorrhagiae* olarak değiştirilmiştir (11,12).

İlerleyen yıllarda serolojik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte birçok antijenik farklı suş keşfedilmiştir. 1954 yılında Wolf ve Broom tarafından patojenik ve saprofitik leptospiralar Çapraz agglutinin absorpsiyon testi (CAAT) sonuçlarına göre farklı serotiplere ayrılmıştır. 1962 yılında Leptospiraların Taksonomisi Alt komitesince bu serotipler patojenik türleri temsil eden *Leptospira interrogans* ve saprofitik türleri temsil eden *Leptospira biflexa* olarak iki tür altında toplanmıştır. 1973 yılında ise serotip terimi kullanımdan kaldırılmış ve yerine serolojik varyant anlamına gelen serovar kullanılmaya başlanmıştır. 1983 yılında L. interrogans sensu lato complex içerisinde 23 serogrup ve 202 serovar varken L. biflexa sensu lato

complex içerisinde 38 serogrup ve 63 serovar tanımlanmıştır. Mikroskopik Agglutinasyon Testi (MAT) ve CAAT ile günümüze kadar 300 farklı serovar tanımlanmıştır (11,12).

Nükleik asit temelli moleküler testlerin gelişmesiyle birlikte diğer birçok mikroorganizmada olduğu gibi Leptospiraların sınıflandırılmasında da büyük değişiklikler meydana gelmiştir. DNA-DNA hibridizasyon yönteminin gelişmesi ile bakterilerin taksonomisinde fenotipik özelliklerin yerini DNA dizilimi almıştır (13). Genom dizileme yöntemleri ile *L. alexanderi*, *L. borgpetersenii*, *L. fainei*, *L. inadai*, *L. kirschneri*, *L. meyeri*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. weilii*, *L. wolbachii* gibi birçok yeni tür keşfedilmiştir. Bu türler genetik benzerliklerine göre 7 farklı genomgrupa ayrılmıştır (11).

1977 yılında bakteriyel ribozomun bir parçası olan küçük alt ünite ribozomal ribonükleik asit (RNA) üzerine yapılan çalışmalar ve 16S rRNA'yı kodlayan genin dizileme analizinin geliştirilmesi ile birlikte taksonomide önemli gelişmeler yaşanmıştır (14,15). 16S rRNA geni üzerine yapılan filogenetik çalışmalar *Leptospira* türlerini patojenik, saprofitik ve patojenitesi bilinmeyen türlerden oluşan orta sınıf olarak ayırmıştır (16). DNA ve RNA dizileme yöntemlerinin gelişmesi, özellikle yeni nesil dizileme yöntemlerinin yaygınlaşması ile birlikte mikroorganizmanın tüm genomunun elde edilebilip analiz edilebilmesi Leptospiraların sınıflandırmasında da altın standart olarak yerini almıştır. *Leptospira* cinsinde 60'dan fazla tür bulunur ve bu türler filogenetik olarak iki dal ve dört alt dala (P1, P2, S1, S2) ayrılmıştır. P1 alt dalı patojen türleri, P2 türleri patojenitesi düşük veya bilinmeyen türleri, S1 ve S2 ise saprofit türleri barındırır. P1 ve P2 alt dalındaki türler insanlarda enfeksiyon yapabilirken S1 ve S2 alt dalındaki türler insanda enfeksiyon yapmazlar (17,18). Güncel olarak *Leptospira* cinsi altında yer alan türler tablo 1'de belirtilmiştir.

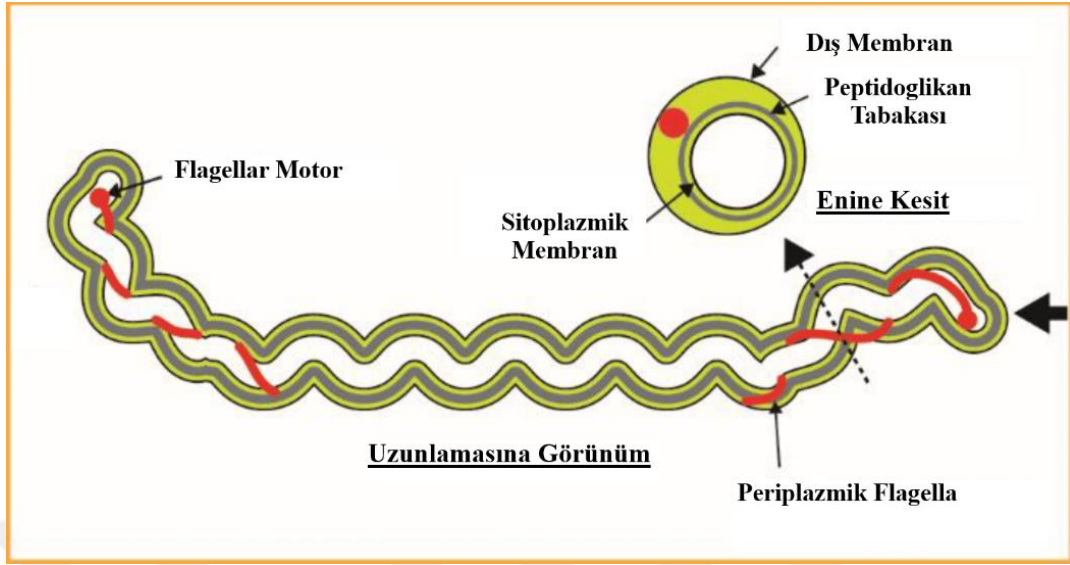
Türler	Altsınıf	Türler	Altsınıf	Türler	Altsınıf
<i>L. adleri</i>	P1	<i>L. fletcheri</i>	P2	<i>L. chreensis</i>	S1
<i>L. ainazelensis</i>	P1	<i>L. fluminis</i>	P2	<i>L. congkakensis</i>	S1
<i>L. ainlahdjerensis</i>	P1	<i>L. haakeii</i>	P2	<i>L. ellinghauseni</i>	S1
<i>L. alexanderi</i>	P1	<i>L. hartskeerlii</i>	P2	<i>L. harrisiae</i>	S1
<i>L. alstonii</i>	P1	<i>L. inadai</i>	P2	<i>L. jelokensis</i>	S1
<i>L. barantonii</i>	P1	<i>L. johnsonii</i>	P2	<i>L. kanakyensis</i>	S1
<i>L. borgpetersenii</i>	P1	<i>L. koniamboensis</i>	P2	<i>L. kemamanensis</i>	S1
<i>L. ellisii</i>	P1	<i>L. langatensis</i>	P2	<i>L. levettii</i>	S1
<i>L. gomenensis</i>	P1	<i>L. licerasiae</i>	P2	<i>L. meyeri</i>	S1
<i>L. interrogans.s.</i>	P1	<i>L. neocaledonica</i>	P2	<i>L. montravelensis</i>	S1
<i>L. kirschneri</i>	P1	<i>L. perolatii</i>	P2	<i>L. mtsangambouensis</i>	S1
<i>L. kmetyi</i>	P1	<i>L. saintgironisae</i>	P2	<i>L. noumeaensis</i>	S1
<i>L. mayottensis</i>	P1	<i>L. sarikeiensis</i>	P2	<i>L. perdikensis</i>	S1
<i>L. noguchii</i>	P1	<i>L. selangorensis</i>	P2	<i>L. terpstrae</i>	S1
<i>L. santarosai</i>	P1	<i>L. semungkikensis</i>	P2	<i>L. vanthielii</i>	S1
<i>L. stimsonii</i>	P1	<i>L. venezuelensis</i>	P2	<i>L. wolbachii</i>	S1
<i>L. tipperaryensis</i>	P1	<i>L. wolffii</i>	P2	<i>L. yanagawae</i>	S1
<i>L. weilii</i>	P1	<i>L. abararensis</i>	S1	<i>L. idonii</i>	S2
<i>L. yasudae</i>	P1	<i>L. bandrabouensis</i>	S1	<i>L. ilyithenensis</i>	S2
<i>L. andrefontaineae</i>	P2	<i>L. biflexas.s.</i>	S1	<i>L. kobayashii</i>	S2
<i>L. broomii</i>	P2	<i>L. bourretii</i>	S1	<i>L. ognonensis</i>	S2
<i>L. dzoumogneensis</i>	P2	<i>L. bouyouniensis</i>	S1	<i>L. ryugenii</i>	S2
<i>L. fainei</i>	P2	<i>L. brenneri</i>	S1		

Tablo 1. Leptospiraların sınıflandırılması

2.2. Leptospiraların Mikrobiyolojik Özellikleri

2.2.1 Leptospiraların Genel Özellikleri

Leptospira cinsi Spirochaetia sınıfının Leptospiraceae ailesinin altında bulunur. Yaklaşık 0,1 µm eninde, 6-20 µm boyunda, helikal konformasyona sahip, uçlarında sivri ve karakteristik kanca benzeri kıvrımları bulunan gram negatif benzeri hücre duvarına sahip bakterilerdir. Helikal yapıları saat yönünün tersi yönünde, dalga büyüklüğü 0,1-0,15 µm, dalga boyu yaklaşık 0,5 µm'dir. Bakteri boyunca uzanan 2 adet, periplazmik yerleşimli flagellaları vardır. Hızlıca ileri ve geri hareketlerden oluşan öteleme hareketi ve döngüsel hareket olarak iki tip hareketi vardır. Leptospiralar morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemezler (19).



Şekil 1. Leptospiraların fiziksel yapısı (20)

Leptospira genomu toplamda 3,9 - 4,6 megabaz uzunluğunda iki adet kromozomdan oluşur (21). Türler arasındaki baz uzunluğu ve gen sayısı farklılığı diğer birçok spiroketten fazladır. Patojenik *Leptospira* türlerinde saprofit türlerde bulunmayan ve iki sınıf arasında ayırımda kullanılan 500'den fazla gen bulunur (21,22).

2.2.2. Leptospiraların Üreme Özellikleri

Leptospiralar zorunlu aerob bakterilerdir. En uygun 28-30°C sıcaklığında, 7,2-7,6 pH aralığında ürerler. Katalaz ve oksidaz testlerinde pozitif sonuç verirler. B2 ve B12 vitaminleriyle, uzun zincirli yağ asitleriyle ve amonyum tuzlarıyla zenginleştirilmiş besiyerlerinde ürerler (19). Fletcher'in yarı katı besiyeri veya Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) besiyerleri ticari olarak sağlanabilen ve Leptospiraların üretilmesinde sık kullanılan besiyerleridir.

Örneklerden hazırlanan kültürlerde üretilmeleri 6-12 haftayı bulabilmektedir. Yarı katı besiyerinde, yüzeyin birkaç milimetre altında bant görünümü yapacak şekilde üreme gösterir. Bu bant görünümüne Dinger's ring ismi verilmiştir (19,23).

2.2.3. Leptospiraların Hücre Duvarı Yapısı

Leptospiraların hücre duvarı yapıları gram negatif hücre duvarı özelliğindedir. Hücre zarının dış kısmında ince bir peptidoglikan tabakası, bu tabakanın üzerinde de dış zar bulunur. Periplazmik aralıkta peptidoglikan tabakasına bağlı proteinler, transmembran proteinler ve periplazmik flagella bulunur. Dış membran ise genel olarak lipopolisakkaritlerden (LPS), fosfolipitlerden ve lipoproteinlerden oluşur. LPS diğer gram negatif bakterilerden farklı olarak disakkarit omurgasında daha fazla amino grubu bulunur ve lipit A tabakasındaki yağ asitlerinin boyları farklıdır (24). Dış membranda ayrıca LipL32, Loa22, LipL41, LipL71, LigA, LigB, LipL21 gibi fonksiyonları farklı çeşitli lipoproteinler de bulunur (25).

2.2.4. Leptospiraların Patojenik Özellikleri

Patojenik leptospiraların virülans faktörleri ve patojenik özellikleri üzerine birçok güncel çalışma yapılmasına rağmen leptospirozun patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. LPS'nin önemli bir virülans faktörü olduğu düşünülmese de rağmen çalışmalarda LPS yapısındaki farklılıklar nedeniyle diğer gram negatif bakterilere göre daha az endotoksik özellikte olduğu ve bağışıklık sistemini daha zayıf aktive ettiği görülmüştür. Buna rağmen, LPS genindeki mutasyonların virülansı zayıflatmaktadır (26). Ayrıca, patojenik *Leptospira* türlerinde saprofit türlere kıyasla daha kalın bir LPS tabakası olduğu da tespit edilmiş ve bunun patojenite ile ilgili olabileceği de düşünülmüştür (24).

Bunun dışında patojenik leptospiralarda olup saprofit türlerde bulunmayan birçok dış membran transmembran proteini bulunur. Yapılan deneylerde bu proteinlerden bazılarının varlığının (Lip21, LipL71, Loa22) patojenite için gerekli olduğu görülürken bazılarının ise (LipL32, LipL41, LigA, LigB) patojeniteyi etkilemediği görülmüştür (25).

Yapısal olmayan heme-oksijenaz, hemolizin, sfingomiyelinazlar gibi enzimlerin, salgısal proteinlerin ve flagella yapısının patojenitedeki önemi gösterilmiş olmasına rağmen tüm bu etkenlerin toplam virülansa katkıları henüz bilinmemektedir. Türler arasındaki genetik ve fenotipik farklılıklar da bu konuda genel sonuçlara varmayı zorlaştırmaktadır (27).

2.2.5. Leptospiraların Tanımlama Yöntemleri

Kültürde izole edilmiş leptospiraların tanımlanması serolojik veya moleküler yöntemler ile yapılır. CAAT yöntemi ile serovar tayini yapılabilir, fakat günümüzde bu yöntem sadece referans laboratuvarlarında bulunur. Nükleik asit temelli testler ise patojenik ve saprofitik *Leptospira* türlerinin ayrımında kullanılabilir. (19).

2.2.5.1. Serolojik Yöntemler

CAAT yöntemi *Leptospira* cinsi bakterilerin serogruplarının ve serovarlarının tanımlanması için kullanılan referans yöntemdir. Eskiden taksonomik sınıflandırmada kullanılan bu yöntem zamanla yerini nükleik asit temelli testler ve deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizine bırakmıştır. CAAT yönteminde serovarlara karşı oluşan antikorlar kullanılır ve tanımlanmak istenen bakteri izolatu bu antiserumlarla karşılaştırılarak oluşan aglutinasyona göre serovar tespiti yapılır. Yöntem prosedürü uygulanan laboratuvarlara göre farklılık gösterebilir. Tecrübeli ve sayı olarak yeterli teknik personel gerektirmesi, zaman alıcı olması, tüm serovarlar için ayrı antiserum gereksinimi ve uygulamada zorluklar nedeniyle referans laboratuvarları dışında kullanılmaz (28,29). Bu yöntem aynı zamanda yeni serovarların keşfinde de kullanılmaktadır (11,30).

2.2.5.2. Moleküler Yöntemler

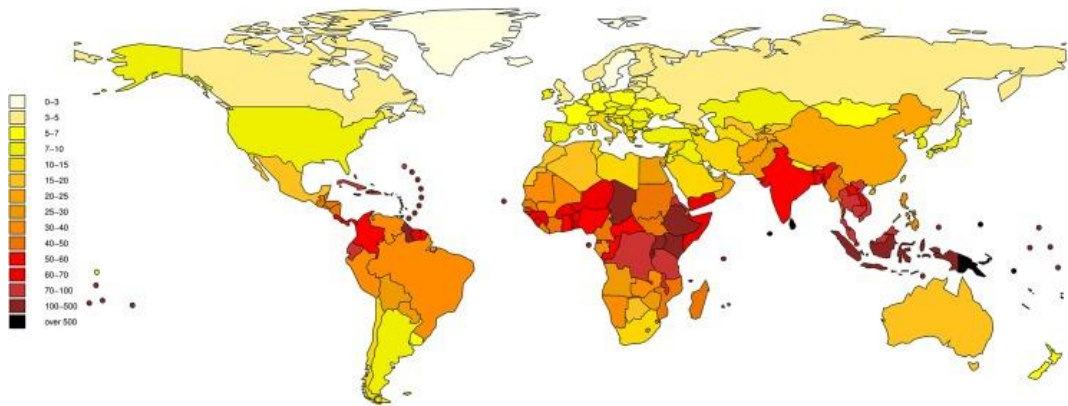
Üretilen bakterinin tür düzeyinde tanımlanması için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Patojenik türlerde bulunup saprofitik türlerde bulunmayan *LipL32* ve *flaB* gibi genlere özgü primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir tepkimesi

(PCR) yöntemi patojenik türleri diğer türlerden ayırt etmede kullanılabilir ancak bu yöntem tür düzeyinde tanımlama için yetersizdir. (31). 16S rRNA proteininin sentezlendiği *rrs* geninin tamamen veya kısmen dizileme analizi diğer birçok bakteride olduğu gibi Leptospiraların tür tayininde de kullanılabilir (16). Ayrıca *gyrB*, *rpoB*, *secY* gibi gen bölgelerinin dizi analizleri de bakterinin tür tayini ve filogenetik olarak sınıflandırma konusunda başarılıdır (32–34). Güncel çalışmalarda genetik materyalin tümünün veya büyük bir kısmının DNA dizi analizi ile tespitinin bakterinin doğru sınıflandırılması için gerekli olduğu düşünülmektedir (17,18).

2.3. Leptospirozun Epidemiyolojisi ve Bulaş Yolları

2.3.1. Leptospirozun Coğrafi Yayılmı ve Prevalansı

Leptospiroz dünyada en yaygın zoonozlardan biridir. En yaygın olarak tropikal bölgelerde ve ılıman iklim koşullarının yaşandığı yerlerde bulunur. En yüksek mortalite ve morbidite Güney ve Güneydoğu Asya, Okyanusya, Karayipler, Latin Amerika, Sahra Altı Afrika ülkelerinde görülür. Hastalığın prevalansı ve insidansı tam olarak bilinmemekle beraber yıllık küresel insidansın bir milyondan yüksek, mortalitenin yaklaşık 59 bin olduğu tahmin edilmektedir (35–37).



Şekil 2. Engelliliğe Ayarlanmış Yaşam Yılı(DALY)/100.000 biriminden küresel yıllık leptospiroz yükü.

2.3.2. Leptospirozun Doğal Konakları ve Bulaş Yolları

Patojenik leptospiralar için konak türleri rezervuar konak ve rastlantısal konak olmak üzere ikiye ayrılır. Rezervuar konak, bakterinin hastalık belirtisi göstermeden üzerinde yaşadığı ve doğal hayatta bakterinin devamlılığından sorumlu olan konak iken rastlantısal konak, rezervuar konakla indirekt temas sonrası enfekte olan ve hastalığın klinik enfeksiyon gösterebildiği konaktır (19). Yapılan çalışmalarda patojenik leptospiralar için domuz, sığır, at, koyun, köpek, rakun, yarası gibi birçok memeli hayvanın rezervuar konak olabileceği gösterilmiştir, ancak etken için en önemli rezervuar kaynaklar kemiricilerdir (19,38,39). Bakteri, rezervuar konağın vücuduna çeşitli yollarla girdikten sonra kan dolaşımı yoluyla böbreklerde glomerüller ve peritübüler kılcal damarlara ulaşır ve böbrek tübüllerinin lümenine ulaşır. Proksimal tübül epitelinin fırçamsı kenarında kolonize olur ve böylece idrar yoluna sürekli veya aralıklı olarak idrardan bakteri atılımı sağlanır. Bulaş, diğer hayvanların kontamine idrar ile enfekte olmuş su, toprak veya hayvan dokularına maruz kalmasıyla olur. Bakteri bu materyallerde aylarca hayatta kalabilir (3,38).

İnsanlar patojenik leptospiralar için rastlantısal konaktır. Bulaş genellikle mukoza, konjunktiva veya bütünlüğü bozulmuş derinin bakteriyle kontamine materyal ile maruz kalması sonucu gerçekleşir (3,40). Daha nadir olarak ise oral, hayvan ısırıkları yolları ile de bulaşabilmektedir (41). İnsandan insana bulaş çok nadir olarak anne sütü, cinsel temas veya plasental yolla olabilmektedir (41–43).

2.3.3. Leptospirozun Risk Faktörleri

Patojenik *Leptospira* türlerinin doğada bulunma ihtimali yüksek olan alan ve bölgelerde yapılan mesleki ve meslek dışı uğraşlar leptospirozun en önemli risk faktörleridir. Mesleki olarak; Tarım ve hayvancılıkla uğraşanlar, mezbaha işçileri, veterinerler, kereste işçileri, lağım işçileri, pirinç tarlalarında çalışanlar, evcil hayvan satıcıları ve askeri personeller yüksek risk grubundadır. Meslek dışı uğraşlar olarak

tatlı su sporcuları, doğa yürüyüşleri, dağcılık gibi uğraşlar patojenik leptospiraların endemik olduğu yerlerde yapıldığında enfeksiyon açısından önemli risk faktörleridir. (44–46). Çok nadir görülmekle birlikte laboratuvar kaynaklı enfeksiyonlar da olabilmektedir (47).

Leptospiroz insanlarda sporadik veya salgınlar şeklinde görülebilmektedir. Leptospiroz vakalarının dağılımına bakıldığında gelişmiş ülkelerde vakalar daha nadir görülürken gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde daha sık görülmektedir. Düşük sosyoekonomik durum ve buna bağlı olarak kötü hijyen ve arıtım koşulları, aşırı nüfus, zayıf altyapı, özellikle sıçanlar olmak üzere kemiriciler ve diğer yaban hayatıyla insanlar arasındaki etkileşimin artması bu ülkelerdeki önemli risk faktörleridir (48–50).

Salgınlar genelde bakteri ile enfekte toprak ve su gibi materyallerin sel, fırtına, toprak kayması, deprem gibi doğa olayları ve doğal afetler sonucu içme suyu ve genel kullanım sularına karışması sonucu gerçekleşir. Doğal afet sonrası birkaç ay içerisinde bölgede leptospiroz vakalarında artış görülür. Bu dönemde toplumun olası salgınlar hakkında bilgilendirilmesi, temiz suya erişimin sağlanması, kirli sularla temas eden kişilere profilaktik antibiyotik uygulamaları mortalite ve morbidite oranlarında azalma sağlar (51–56).

2.4. Leptospirozun Klinik Özellikleri

2.4.1 Leptospirozun Belirti ve Bulguları

İnsanda leptospiroz çok farklı klinik belirti ve bulgularla izleyebilmektedir. Enfekte kişilerin büyük çoğunluğunun hastalığı asemptomatik geçirdiği düşünülmektedir. Hastalığın en sık görülen klinik formu anikterik leptospiroz olarak tarif edilen hafif formudur. Anikterik leptospiroz leptospiremik faz ve immün faz olmak üzere iki faza ayrılır. Leptospiremik faz yaklaşık 2-30 günlük bir inkübasyon süresinin ardından ortaya çıkan ve 2-9 gün kadar süren, genellikle ateş, titreme, kas ağrısı, baş ağrısı gibi semptomlarla seyreder. Daha nadir olarak ise bulantı, kusma, ishal, öksürük gibi belirtiler görülebilir. Fizik muayenede bilateral konjunktival hipereminin görülmesi klinik tanı için önemlidir. Kaslarda hassasiyet,

hepatosplenomegali, lenfadenopati ve deri döküntüleri daha nadir görülür. Laboratuvar bulgularında akut faz reaktanlarında yükselme, eritrosit sedimentasyon oranında artış, nötrofili ve karaciğer enzimlerinde hafif artış görülür. Semptom ve bulgular genellikle hafiftir ve hastalarda sekel kalmadan iyileşme görülür. Hastaların bir kısmında ise leptospiremik fazın ardından immün faz ortaya çıkar. İmmün faz, akut faz semptomlarının iyileşmesinden sonra ortaya çıkabildiği gibi akut faz sırasında da başlayabilir. 7-30 gün sürebilen bu dönemde hastalarda ateş, baş ağrısı ve kas ağrısı gibi semptomların tekrar ortaya çıkar. Aseptik menenjit tablosu ve üveit sık görülür. Hastaların büyük çoğunluğunun iyileşmesine rağmen akut böbrek yetmezliği, uzamış ateş ve diğer organ yetmezlikleri görülebilir (3,19,57,58).

Tarihte ilk Weil hastalığı olarak tanımlanan form ise hastaların %5-10'unu oluşturan ikterik leptospirozdur. Ateş, sarılık ve böbrek yetmezliği tipiktir. Hızlı ilerler ve hastalığın mortalitesi %5-15'tir. Karaciğer tutulumuna bağlı olarak ikter, böbrek tutulumuna bağlı olarak oligürük veya non-oligürük böbrek yetmezliği, kardiyovasküler tutulumuna bağlı olarak miyokardit, kalp yetmezliği ve kardiyojenik şok görülebilir (57,58). Akciğer tutulumuna bağlı akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) gelişebilir. Ağır pulmoner hemoraji sendromu hastalığın en önemli mortalite sebebidir ve bu durum %50-70 ölümcül seyrederek (59,60). Daha nadir olarak rabdomiyoliz ve vaskülit de tabloya eşlik edebilir. Laboratuvar bulgularında direkt hiperbilirubinemi, normal veya hafif artmış aminotransferazlar, pulmoner hemorajiye bağlı trombositopeni, anemi ve dissemine intravasküler koagülasyon bulguları, kalp tutulumuna bağlı artmış kardiyak belirteç seviyeleri görülebilir (57,58).

Hamilelik sırasında leptospiroz geçiren kadınlarda belirti ve bulgular hamileliğin diğer hastalıkları olan akut yağlı karaciğer, hipertansiyon, HELLP (Hemoliz, artmış karaciğer enzimleri, trombositopeni) sendromu gibi durumlarla karışabilir (61,62). Transplasental geçiş yaparak gebeliğin erken dönemlerinde spontan düşüklere yol açabilirken ileri dönemlerde konjenital enfeksiyonlara yol açabilir (63,64).

2.4.2. Leptospiroz Tanısı

Leptospirozun ön tanısında klinik anamnez ve fizik muayene önemlidir, fakat hastalığın belirti, bulgu ve laboratuvar test sonuçları özgül değildir ve birçok hastalıkla karışabilmektedir. Hastalığın kesin tanısı hasta örneklerinde bakterinin varlığının veya bakteriye karşı oluşan antikorların gösterilmesi ile koyulur. Alınabilecek örnek türleri semptomların başlama zamanına göre değişir. Mikroskopi ve kültür testleri kan örnekleri belirtilerin başlamasından sonraki bir hafta içerisinde alınmalıdır. 7-10 gün sonra bakteriyemi sona erer ve bakteri böbreklerin proksimal tübül epiteline yerleştiği için idrarda salınım başlar. İmmün fazda mikroskopik inceleme ve kültür için taze idrar örneği alınmalı ve örnek pH'ı 7,2 olacak şekilde fosfat tamponlu salin eklenmelidir. Serolojik testler için ise kan veya serum, beyin-omurilik sıvısı (BOS), aköz humör örnekleri toplanabilir (65). Moleküler testler için plazma tercih edilse de tam kan veya serum kullanılabilir (66).

Karanlık saha mikroskopisi spiroketler için örnekte bakterinin gözlemlenmesi amacıyla kullanılan en eski yöntemlerden biridir. Hızlı ve basit bir yöntem olmasına rağmen mililitrede on bin bakteriden yüksek konsantrasyonda bakteri yükü olması gerekliliği nedeniyle duyarlılığı düşüktür. Ayrıca kirlilik ve ortamdaki yabancı maddelere bağlı yanlış pozitif sonuçlar verilebileceği unutulmamalıdır. Tecrübeli personel gereklidir (65–67). Boyama yöntemleri için histokimyasal, immün temelli boyalar, gümüş boyaları kullanılabilir fakat bu yöntemler de karanlık saha mikroskopisi ile aynı dezavantajlara sahiptir. Gram boyama leptospiraların gösterilmesi için uygun bir yöntem değildir (66,67).

Kültür temelli yaklaşım ve bakteri izolasyonu birçok enfeksiyonda olduğu gibi leptospiroz için de standart bir tanı yöntemidir. EMJH besiyeri veya Fletcher'in yarıkatı besiyeri kullanılabilir. Mikroskopik yöntemlere kıyasla daha duyarlıdır ancak bakterinin yavaş üremesi nedeniyle izolasyon üç ay kadar sürebilmektedir. Kültür ve mikroskopi için alınacak örneğin antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınması gereklidir (65–67).

Serolojik testler klinik laboratuvarlarda sık kullanılan yöntemlerdir. *Leptospira* antijenlerine karşı oluşan IgM ve IgG antikorları tespit etmek amacıyla geliştirilmiş enzim bağımlı, kemilüminesan, immünfloresan, immünokromatografik testler gibi birçok yöntem olmasına rağmen MAT günümüzde serolojik grupların tayininde

kullanılan en önemli serolojik testtir (65,67,68). 1/100 ve üstü konsantrasyonlarda pozitiflik saptanması veya 1-2 hafta arayla alınan iki serum örneğinde dört kattan fazla artışın görülmesi tanı koydurucudur. Etkenin serolojik varyantının saptanmasında yardımcı olsa da hastalığın akut fazında kullanımı kısıtlıdır. Zaman alıcı ve tecrübe isteyen bir test olması, prosedürde canlı bakteri kullanılması gerekliliği ve biyogüvenlik riskleri nedeniyle günümüzde kullanımı referans laboratuvarlar ile kısıtlıdır. Antijen testleri ise zayıf doğrulukları nedeniyle kullanılmamaktadır (65–68).

Nükleik asit temelli testlerin gelişmesi günümüzde birçok etken için olduğu gibi leptospiralarda da tanıda çığır açmıştır. PCR yöntemi ile kan, doku, BOS, idrar gibi birçok örnekte hızlı bir şekilde patojenik leptospiralara ait DNA tespiti yapılabilmektedir (65,68). Günümüze kadar moleküler yöntemlerde gerçek zamanlı PCR, döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi birçok yöntemin gelişmesi bu testlerin uygulamasını kolaylaştırmıştır. Diğer testler ile kıyaslandığında çalışılan örneğe ve örneğin alınma zamanına göre duyarlılık değişebilmekle birlikte özgüllük genellikle %90'ın üzerindedir (69).

2.4.3. Leptospirozun Tedavisi ve Önlenmesi

Leptospirozun temel tedavisi destek tedavisi ve antibiyotiklerdir. ARDS gelişen hastalarda ventilasyon kullanımı mortaliteyi azaltmaktadır (70). Böbrek yetmezliği gelişen hastalarda günlük hemodiyaliz uygulamasının mortaliteyi azalttığı düşünülmekle birlikte bu konuda daha fazla çalışma yapılması gereklidir (71). Pulmoner hemoraji gelişmesi durumunda plazmaferez ve ekstrakorporal membran oksijenizasyonu (ECMO) kullanımı konusunda yapılan çalışmaların sayısı kısıtlı olmakla beraber hastane imkanları doğrultusunda kullanılabilir (72).

Leptospiralar birçok antibiyotiğe duyarlı bakterilerdir ve yapılan in-vitro çalışmalarda beta laktam gruplarına, tetrasiklinlere, fluorokinolonlara, makrolidlere ve streptomisine duyarlı olduğu gösterilmiştir (73,74). Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri için minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) tespit edilebilir, fakat bakterinin üreme özellikleri nedeniyle duyarlılık testleri referans laboratuvarlar

dışında kullanılmazlar (75,76). Hafif hastalıkta doksisisiklin veya azitromisin kullanılabilirken ağır hastalıkta genellikle penisilin, doksisisiklin veya sefotaksim kullanılır (77,78). Leptospiraların in-vitro olarak duyarlı tespit edilmesine rağmen antibiyotik tedavisinin etkinliği tartışmalıdır. Antibiyotik tedavisinin hastalığın mortalitesini, diyaliz ihtiyacını veya hastanede kalım süresini azaltmadığını gösteren kanıtlar mevcuttur (79). Ayrıca sifiliz ve Lyme gibi diğer spiroket hastalıkların antibiyotik tedavisi sırasında ortaya çıkabilen; ateş, hipotansiyon, titreme, taşikardi, baş ağrısı gibi belirti ve bulgularla izleyen Jarisch–Herxheimer reaksiyonu bu hastaların bir kısmında görülebilmektedir (80,81). Antibiyotikler hastalığın sık görüldüğü yerlerde hastalığı engellemek amacıyla profilaktik olarak kullanılabilir. Haftada bir doz doksisisiklin kullanımı morbidite ve mortalitede azalma açısından önemlidir (82,83).

Leptospiroz aşıları için hayvanlarda birçok çalışma mevcut olmasına rağmen insanlar için veriler kısıtlıdır (84). Leptospiraların dış membran proteinleri ve LPS'ye karşı geliştirilen zayıflatılmış, inaktif ve rekombinant aşılar geliştirilmiştir ve birçok hayvan türünde günümüzde kullanılmaktadır (84–86). İnsanlarda aşı çalışmaları yetersizdir. Ticari olarak kullanılabilen aşılar sadece Çin, Japonya, Fransa ve Küba'da bulunmaktadır ve bu aşılar sadece belirli serolojik varyantlara karşı etkinliği vardır (87).

2.5. Kemiriciler

2.5.1. Kemiricilerin Sınıflandırılması ve Genel Özellikleri

Kemiriciler taksonomik olarak Animalia aleminin Chordata şubesinin Mammalia sınıfının altında bulunan Rodentia takımında bulunurlar. Rodentia takımı farklı sınıflandırma yöntemlerine göre birçok alt takım, süper aile ve ailelere ayrılır. Bu takım yaklaşık 481 cins ve 2277 türden oluşur (88–90). Kemiriciler Antarktika dışında tüm kıtalarda bulunurlar ve günümüzde küresel memeli biyoçeşitliliğinin yaklaşık %42'sini oluştururlar (89). Sıçangiller, sincapgiller, kunduzgiller, oklu kirpiggiller, hamsterler, kobaylar, gerbiller ve kör fareler kemiriciler için verilebilecek örneklerdir. Kemiriciler ortak olarak alt ve üst çenede birer çift olacak şekilde,

sürekli büyüme özelliği olan kesici dişlere sahiptirler. Boy, ağırlık, kuyruk ve uzuv boyları, kafatası ve diş yapıları, beslenme özellikleri, sosyal yapıları gibi birçok özellikleri bakımından farklı özellikleri vardır (91).

2.5.2. Kemirici Kaynaklı Hastalıklar

Kemiriciler zoonozların en önemli kaynaklarından biridir. Hantavirüsler, Arenavirüsler, Lassa virüs, *Yersinia pestis*, *Leptospira* türleri, *Bartonella* türleri, *Leishmania* türleri gibi birçok viral, bakteriyel ve parazit etkenlerinin ısırma gibi doğrudan veya vektör aracılı olarak ya da çevresel bulaş gibi dolaylı yollarla insanlara bulaşmasından sorumludur (92,93). Bu etkenler insanda Hantavirüs pulmoner sendromu, Weil hastalığı, viseral Layşmanyaz gibi hayatı tehdit eden birçok hastalığa sebep olabilir. Tarım alanlarının genişlemesi ile birlikte kemirici nüfusunda artış ve kemirici-insan etkileşiminde artış kemirici kaynaklı hastalıkların artmasına da sebep olmaktadır (88,92).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

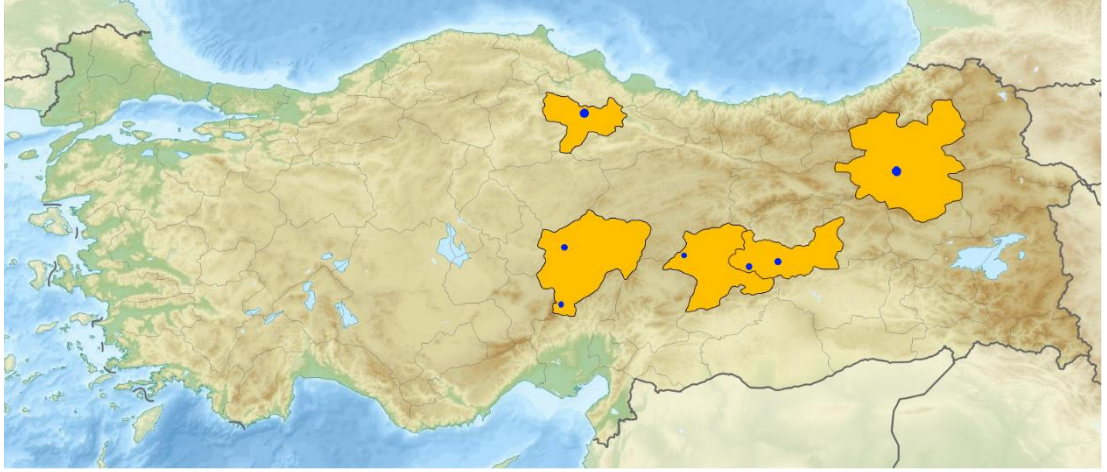
Patojenik *Leptospira* türlerinin yayılımını göstermek için Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış 72/2016 Protokol No'lu; "Türkiye'nin Doğusundaki Bölgesindeki bazı illerde (Ardahan, Bingöl, Bitlis, Elazığ, Erzincan, Erzurum, Iğdır, Kars, Malatya, Muş, Sivas, Tunceli, Van) yaşayan *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Mus* spp., *Chionomys* spp., *Cricetulus* spp., *Crocidura* spp. türlerinde Hantavirüs varlığının ve dağılımının araştırılması" isimli Mustafa Sözen, Ferhat Matur, Ceylan Polat, Sercan Irmak, Muhsin Çoğal, Ortaç Çetintaş'ın araştırıcı olduğu çalışmada toplanmış 28 adet *Apodemus* spp, 83 adet *Microtus* spp, 23 adet *Mus* spp, 31 adet *Chionomys* spp, 21 adet *Cricetulus* spp, 12 adet *Crocidura* spp, dokuz adet *Meriones* spp, dört adet *Mesocricetus* spp olarak toplam 211 adet kemiriciye ait arşivlenmiş böbrek örnekleri kullanıldı.

Örn. No.	Tür (Fenotipik)	Örn. No.	Tür (Fenotipik)
8014	<i>Chionomys</i> sp.	8125	<i>Chionomys nivalis</i>
8015	<i>Chionomys</i> sp.	8126	<i>Chionomys nivalis</i>
8016	<i>Chionomys</i> sp.	8127	<i>Chionomys nivalis</i>
8017	<i>Chionomys</i> sp.	8128	<i>Chionomys nivalis</i>
8018	<i>Apodemus</i> sp.	8129	<i>Chionomys nivalis</i>
8019	<i>Apodemus</i> sp.	8130	<i>Chionomys nivalis</i>
8020	<i>Chionomys</i> sp.	8131	<i>Chionomys nivalis</i>
8021	<i>Apodemus mystacinus</i>	8132	<i>Chionomys nivalis</i>
8022	<i>Apodemus mystacinus</i>	8133	<i>Chionomys nivalis</i>
8024	<i>Apodemus mystacinus</i>	8134	<i>Microtus</i> sp.
8025	<i>Apodemus</i> sp.	8135	<i>Cricetulus migratorius</i>
8026	<i>Apodemus mystacinus</i>	8136	<i>Cricetulus migratorius</i>
8027	<i>Apodemus mystacinus</i>	8137	<i>Cricetulus migratorius</i>
8028	<i>Apodemus mystacinus</i>	8138	<i>Cricetulus migratorius</i>
8029	<i>Apodemus mystacinus</i>	8139	<i>Cricetulus migratorius</i>
8030	<i>Apodemus</i> sp.	8140	<i>Cricetulus migratorius</i>
8031	<i>Meriones tristrami</i>	8141	<i>Cricetulus migratorius</i>
8032	<i>Meriones tristrami</i>	8142	<i>Cricetulus migratorius</i>
8033	<i>Meriones tristrami</i>	8143	<i>Cricetulus migratorius</i>
8034	<i>Meriones tristrami</i>	8144	<i>Apodemus</i> sp.
8035	<i>Apodemus</i> sp.	8145	<i>Apodemus</i> sp.
8036	<i>Meriones tristrami</i>	8146	<i>Microtus</i> sp.

8037	<i>Apodemus mystacinus</i>	8147	<i>Microtus sp.</i>
8039	<i>Microtus sp.</i>	8148	<i>Mus macedonicus</i>
8040	<i>Microtus sp.</i>	8149	<i>Microtus sp.</i>
8041	<i>Microtus sp.</i>	8150	<i>Microtus sp.</i>
8042	<i>Meriones tristrami</i>	8151	<i>Microtus sp.</i>
8043	<i>Apodemus mystacinus</i>	8153	<i>Microtus sp.</i>
8044	<i>Apodemus mystacinus</i>	8154	<i>Microtus sp.</i>
8045	<i>Apodemus mystacinus</i>	8155	<i>Microtus sp.</i>
8046	<i>Apodemus mystacinus</i>	8156	<i>Microtus sp.</i>
8047	<i>Apodemus mystacinus</i>	8160	<i>Microtus sp.</i>
8048	<i>Apodemus mystacinus</i>	8161	<i>Microtus sp.</i>
8049	<i>Apodemus mystacinus</i>	8162	<i>Microtus sp.</i>
8050	<i>Apodemus sp.</i>	8163	<i>Microtus sp.</i>
8051	<i>Apodemus sp.</i>	8164	<i>Microtus sp.</i>
8052	<i>Crocidura sp.</i>	8165	<i>Microtus sp.</i>
8053	<i>Microtus sp.</i>	8166	<i>Microtus sp.</i>
8054	<i>Microtus sp.</i>	8167	<i>Mus macedonicus</i>
8055	<i>Microtus sp.</i>	8168	<i>Mus macedonicus</i>
8056	<i>Microtus sp.</i>	8169	<i>Mus macedonicus</i>
8057	<i>Microtus sp.</i>	8170	<i>Mus macedonicus</i>
8058	<i>Microtus sp.</i>	8171	<i>Mus macedonicus</i>
8059	<i>Microtus sp.</i>	8172	<i>Mus macedonicus</i>
8060	<i>Microtus sp.</i>	8173	<i>Mus macedonicus</i>
8061	<i>Microtus sp.</i>	8174	<i>Mus macedonicus</i>
8062	<i>Microtus sp.</i>	8175	<i>Mus macedonicus</i>
8063	<i>Microtus sp.</i>	8176	<i>Mus macedonicus</i>
8064	<i>Microtus sp.</i>	8177	<i>Mus macedonicus</i>
8065	<i>Microtus sp.</i>	8178	<i>Mus macedonicus</i>
8066	<i>Microtus sp.</i>	8179	<i>Mus macedonicus</i>
8070	<i>Mus macedonicus</i>	8180	<i>Mus macedonicus</i>
8071	<i>Mus macedonicus</i>	8181	<i>Mus macedonicus</i>
8072	<i>Mus macedonicus</i>	8182	<i>Apodemus sp.</i>
8073	<i>Crocidura sp.</i>	8183	<i>Apodemus sp.</i>
8074	<i>Crocidura sp.</i>	8184	<i>Cricetulus migratorius</i>
8075	<i>Crocidura sp.</i>	8185	<i>Cricetulus migratorius</i>
8076	<i>Crocidura sp.</i>	8186	<i>Cricetulus migratorius</i>
8077	<i>Crocidura sp.</i>	8187	<i>Cricetulus migratorius</i>
8078	<i>Microtus sp.</i>	8188	<i>Cricetulus migratorius</i>
8079	<i>Microtus sp.</i>	8189	<i>Cricetulus migratorius</i>
8080	<i>Microtus sp.</i>	8190	<i>Cricetulus migratorius</i>
8081	<i>Microtus sp.</i>	8191	<i>Meriones tristrami</i>
8082	<i>Microtus sp.</i>	8192	<i>Meriones tristrami</i>
8083	<i>Microtus sp.</i>	8193	<i>Meriones tristrami</i>
8084	<i>Microtus sp.</i>	8194	<i>Crocidura sp.</i>
8085	<i>Microtus sp.</i>	8195	<i>Crocidura sp.</i>
8086	<i>Microtus sp.</i>	8196	<i>Crocidura sp.</i>
8087	<i>Microtus sp.</i>	8197	<i>Microtus sp.</i>

8088	<i>Microtus sp.</i>	8198	<i>Crocidura sp.</i>
8089	<i>Microtus sp.</i>	8199	<i>Crocidura sp.</i>
8090	<i>Microtus sp.</i>	8200	<i>Microtus sp.</i>
8091	<i>Microtus sp.</i>	8201	<i>Microtus sp.</i>
8092	<i>Microtus sp.</i>	8202	<i>Microtus sp.</i>
8093	<i>Microtus sp.</i>	8203	<i>Microtus sp.</i>
8094	<i>Microtus sp.</i>	8204	<i>Microtus sp.</i>
8095	<i>Chionomys nivalis</i>	8205	<i>Microtus sp.</i>
8096	<i>Chionomys nivalis</i>	8206	<i>Crocidura sp.</i>
8097	<i>Chionomys nivalis</i>	8207	<i>Microtus sp.</i>
8098	<i>Chionomys nivalis</i>	8208	<i>Microtus sp.</i>
8099	<i>Chionomys nivalis</i>	8209	<i>Microtus sp.</i>
8100	<i>Chionomys nivalis</i>	8210	<i>Microtus sp.</i>
8101	<i>Chionomys nivalis</i>	8211	<i>Mus sp.</i>
8102	<i>Chionomys nivalis</i>	8212	<i>Mus sp.</i>
8103	<i>Chionomys nivalis</i>	8213	<i>Mus sp.</i>
8104	<i>Chionomys nivalis</i>	8214	<i>Mus sp.</i>
8105	<i>Cricetulus migratorius</i>	8216	<i>Microtus sp.</i>
8106	<i>Cricetulus migratorius</i>	8217	<i>Microtus sp.</i>
8107	<i>Cricetulus migratorius</i>	8218	<i>Microtus sp.</i>
8108	<i>Mesocricetus brandti</i>	8219	<i>Microtus sp.</i>
8109	<i>Mesocricetus brandti</i>	8220	<i>Microtus sp.</i>
8110	<i>Mesocricetus brandti</i>	8221	<i>Microtus sp.</i>
8111	<i>Microtus sp.</i>	8222	<i>Microtus sp.</i>
8112	<i>Microtus sp.</i>	8223	<i>Microtus sp.</i>
8113	<i>Cricetulus migratorius</i>	8224	<i>Microtus sp.</i>
8114	<i>Apodemus sp.</i>	8225	<i>Microtus sp.</i>
8115	<i>Cricetulus migratorius</i>	8226	<i>Microtus sp.</i>
8116	<i>Apodemus sp.</i>	8227	<i>Microtus sp.</i>
8117	<i>Microtus sp.</i>	8228	<i>Microtus sp.</i>
8118	<i>Chionomys nivalis</i>	8230	<i>Microtus sp.</i>
8119	<i>Chionomys nivalis</i>	8232	<i>Microtus sp.</i>
8120	<i>Chionomys nivalis</i>	8233	<i>Microtus sp.</i>
8121	<i>Chionomys nivalis</i>	8234	<i>Microtus sp.</i>
8122	<i>Chionomys nivalis</i>	8235	<i>Microtus sp.</i>
8123	<i>Chionomys nivalis</i>	8236	<i>Mesocritus branthi</i>
8124	<i>Chionomys nivalis</i>		

Tablo 2. Saha çalışmasında toplanan kemiricilerin numaraları ve fenotipik olarak tayin edilmiş cins ve tür isimleri



Şekil 3. Kemiricilerin toplandığı iller. Mavi noktalar örnek toplama alanlarının Türkiye Haritası üzerindeki izdüşümünü göstermektedir.

3.2. Nükleik Asitlerin Ekstraksiyonu

Chomczynski ve arkadaşları tarafından tanımlanan guanidin-tiyosiyanat-fenol-kloroform RNA ekstraksiyonu esasına dayanan bir yöntem olan TRIzol™ ekstraksiyonu uygulandı (94). RNAlater (ThermoFisher, ABD) içerisinde -80 °C’de saklanmış böbrek örnekleri çalışılmak üzere oda ısısında 15 dakika çözünmesi beklendi. Böbrek örneklerinden stetil bistüri yardımıyla 50-100 miligram ağırlığında olacak şekilde kesitler alındı. Bu kesitler 0,5 mL TRIzol™ (ThermoFisher, ABD) içeren 2 mL’lik mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. Ardından bu tüplerin her birine bir adet steril çelik boncuk koyuldu. Tüplerin kapakları iyice kapatıldıktan sonra sızdırmazlığı sağlamak için kapakların etrafı Parafilm Bant (3M, ABD) ile sarıldı. Tüpler homojenizator yardımıyla 30 frekansta 35-45 saniye homojenize edildi. Tam olarak homojenize olmayan örnekler için 30 frekansta 5-10 saniye fazladan homojenizasyon yapıldı. Homojenizatlar pipet yardımıyla 1,5 mL yeni bir mikrosantrifüj tüplerine alınarak çelik boncuklardan ayrılmaları sağlandı. O gün içerisinde çalışılmayacak örnekler -80 °C’ye kaldırıldı.

0,1 M NaOH çözeltisi hazırlamak için mol ağırlığı 40 g/mol olan anhidroz sodyum hidroksit pelletlerinden 4 gram alınarak 500 mL distile su içerisinde çözünene kadar balon joje içerisinde karıştırıldı. Pelletler çözüldükten sonra oluşan

karışımın son hacmi 1000 mL olana kadar üzerinde distile su eklendi. Karışım oda ısısında saklandı.

0,1 M sodyum sitrat içeren 500 mL %10 etanol çözeltisi hazırlamak için formül ağırlığı 357,15 g/mol olan $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ pelletlerinden 17,85 gram alındı. %10'luk etanol çözeltisi için %96'lık etanol çözeltisinden 52 mL alınarak son hacmi 500 mL olacak şekilde üzerine distile su eklendi. Oluşan %10'luk etanol çözeltinin 250 mL'si balon bir jojeye alındı ve üzerine pelletler eklenerek karışımın tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Oluşan karışımın son hacmi 500 mL olana kadar üzerine %10'luk etanol çözeltisi eklendi.

%75'lik etanol çözeltisinden 500 mL hazırlamak için %96'lık etanol çözeltisinden 390 mL alınarak üzerine karışımın son hacmi 500 mL olana kadar distile su eklendi.

Faz separasyonu aşaması için homojenizatlara 0,1 mL kloroform eklendi. Tüpler dikkatlice kapatılarak yaklaşık 15 saniye boyunca ters-düz edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edilmeleri beklendi. Solüsyonlar 12.000 g kuvvetinde 15 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte renksiz sulu fazın, ortada beyaz renkli ara fazın, altta kırmızı organik fazın oluştuğu görüldü. Üstteki saydam faz ileride başka çalışmalarda RNA ekstraksiyonunda kullanılmak üzere pipet yardımıyla dikkatlice alınarak farklı bir 2 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Geriye kalan ara ve organik fazın üzerine 0,15 mL etanol eklendi. Tüpler kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra birkaç kez ters-düz edilerek karıştırıldı. Oda ısısında 2-3 dakika inkübe edildi. Örnekler 2000 g'de 5 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüplerin dibinde çökelti oluşumu gözlemlendi. Çökeltiyi dağıtmadan dikkatlice fenol, etanol ve protein içeren süpernatant uzaklaştırıldı. Çökelti içeren tüplere 0,1M sodyum sitrat içeren %10'luk etanol çözeltisinden 0,5 mL eklendi. Tüpler oda sıcaklığında ara sıra karıştırılarak 20-30 dakika boyunca inkübe edildi. Tüpler 2000 g'de 5 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çökeltilerin üzerine tekrar 0,1M sodyum sitrat içeren %10'luk etanol çözeltisinden 0,5 mL eklendi. Tüpler tekrar 2000 g'de 5 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çökeltilerin üzerine %75'lik etanol çözeltisinden 1 mL

eklendi. Örnekler ara sıra karıştırılarak yaklaşık 20 dakika inkübe edildi. Tüpler 2000 g'de 5 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Çökeltilerdeki fazla etanolün uzaklaştırılması için tüplerin kapakları açık kalacak şekilde oda ısısında 10 dakika kadar inkübe edildi. Bu süreçte sürekli gözlemlerle çökeltilerin tamamen kurumaları engellendi. Çökeltilerin üzerine 8mM sodyum hidroksit çözeltisinden 0,3 mL eklendi. Çökelti çözünene kadar yaklaşık 5 dakika hafifçe ters-düz edilerek karıştırıldı. Örnekler 12000 g'de 10 dakika boyunca 4 °C sıcaklığında santrifüj edildi. DNA içeren süpernatant 1,5 veya 2 mL'lik ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bu tüpler ileride yapılacak PCR için -80 °C'de saklandı.

3.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi Basamakları

3.3.1. Primerlerin Hazırlanması

SecY genini hedefleyen primerlerin *LipL32*, *flaB*, *rrs* gibi gen bölgelerini hedefleyen primerlerden kısmen daha başarılı olduğu görülmüştür (31). Bunun üzerine Leptospiraların örneklerden tespiti için S10-spc-alfa operonu üzerinde bulunan *SecY* genini hedefleyen G1 ve G2 primer seti kullanıldı (95). Bu primer setinin *L. kirschneri* dışındaki türlerin tespitinde yüksek başarı gösterdiği literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (31,96–98). G1 primeri 5' – CTGAATCGCTGTATAAAAGT – 3' dizisinden, G2 primeri ise 5' – GGAAAACAAATGGTCGGAAG – 3' dizisinden oluşmaktadır. Bu primer seti *SecY* geni üzerinde 285 baz çifti uzunluğundaki bir bölgeyi çoğaltmayı sağlar (31). Bu primer seti leptospiraların böbrek örneklerindeki varlığının taranması amacıyla kullanıldı. Yine *SecY* geni üzerindeki 549 baz çifti uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltmayı sağlayan, ileri yönlü Fr549 5' – ATGCCGATCATTTTTGCTTC – 3' ve geri yönlü Rv549 5' – CCTTCCTTTAATTTTAGACTTTTTC – 3' dizilimine sahip farklı bir primer seti ise G1 ve G2 primerleri ile pozitif saptanan örneklerin doğrulanması amacıyla kullanıldı.

PCR için G1 ve G2 primerleri Alfagen (Türkiye) tarafından sentezlenerek liyofilize şekilde tarafımıza teslim edildi. Primerler Alfagen tarafından sağlanan

primer sulandırma protokolüne uygun olacak şekilde 100 µM konsantrasyonunda, G1 için 735 µL, G2 için 714 µL hacminde stok solüsyonları enjeksiyonluk distile su ile hazırlandı. Ardından bu stok solüsyonlarından 100 µL ve enjeksiyonluk distile sudan 900 µL alınarak karıştırıldı ve 10 µM'lık 1 mL çalışma solüsyonları hazırlandı. Bu solüsyonlar 100 µL'lik alikotlara ayrıldı. Oluşturulan stok solüsyonu ve çalışma solüsyonu alikotları – 20 °C'de saklandı.

Fr549 ve Rv549 primerleri ise Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları tarafından sağlandı.

3.3.2. Pozitif Kontrolün Temini

Reaksiyonların başarılı gerçekleştiğini göstermek ve reaksiyon karışımı ve ısılarını optimize etmek amacıyla Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'ndan anonim bir pozitif insan serum örneği temin edildi.

3.3.3. Reaksiyonların Hazırlanması

Tarama reaksiyonu karışımı hazırlamak için enjeksiyonluk distile su, Amonyum sülfat içeren magnezyum klorür içermeyen 10X Taq tamponu (Thermo Scientific, ABD), 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, ABD), 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP içeren dNTP karışımı (Applied Biological Materials, Kanada) ve 5U/µL konsantrasyonda enzim içeren rekombinant Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

Reaksiyon optimizasyonu için ilk karışım, reaksiyon başına hacimleri aşağıdaki gibi olmak üzere 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı:

1. 13,3 µL enjeksiyonluk distile su
2. 2,5 µL Taq tamponu
3. 1,8 µL MgCl₂ karışımı
4. 1 µL dNTP karışımı

5. 2,5 µL G1 primer çalışma solüsyonu
6. 2,5 µL G2 primer çalışma solüsyonu
7. 0,4 µL Taq DNA polimeraz karışımı

Hazırlanan karışım 0,2 µL'lik PCR tüplerine dağıtıldı. Her PCR tüpüne 1 µL örnek koyulurken tüplerden birine 1 µL pozitif kontrol, diğerine ise olası kontaminasyonu değerlendirmek amacıyla negatif kontrol olarak 1 µL enjeksiyonluk distile su koyuldu. Tüpler sıkıca kapatıldı ve termal döngüleyiciye yerleştirildi.

Doğrulama reaksiyonu karışımı hazırlamak için tarama reaksiyonu karışımında kullanılan sarf malzemeler kullanıldı. Malzemeler, reaksiyon başına hacimleri aşağıdaki gibi olacak şekilde 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpünde hazırlandı:

1. 17,1 µL enjeksiyonluk distile su
2. 2,5 µL Taq tamponu
3. 2 µL MgCl₂ karışımı
4. 1 µL dNTP karışımı
5. 0,5 µL G1 primer çalışma solüsyonu
6. 0,5 µL G2 primer çalışma solüsyonu
7. 0,4 µL Taq DNA polimeraz karışımı

Hazırlanan karışım 0,2 µL'lik PCR tüplerine dağıtıldıktan sonra G1/G2 primer seti ile pozitiflik saptanan örneklerden 1 µL alınarak bu tüplere aktarıldı. Tüpler sıkıca kapatıldı ve termal döngüleyiciye yerleştirildi.

3.3.4. Polimeraz Zincir Tepkimesi

Tarama reaksiyonu için tüpler Techne TC-3000 Termal Döngüleyici cihazına yerleştirildi. Reaksiyonun sıcaklık dengeleri aşağıdaki gibi ayarlandı:

Ön ısıtma: 95 °C – 3 dakika

35 döngü için:

Denatürasyon: 95 °C – 30 saniye

Bağlanma: 55 °C – 30 saniye

Uzama: 72 °C – 1 dakika

Döngüler sonrası

Son uzama: 72 °C – 5 dakika

Bekleme: 4 °C – Sonsuz

Doğrulama reaksiyonu için aynı cihaz kullanıldı. Reaksiyon sıcaklık değerleri aşağıdaki gibi ayarlandı:

Ön ısıtma: 95 °C – 3 dakika

35 döngü için:

Denatürasyon: 95 °C – 30 saniye

Bağlanma: 52 °C – 30 saniye

Uzama: 72 °C – 1 dakika

Döngüler sonrası

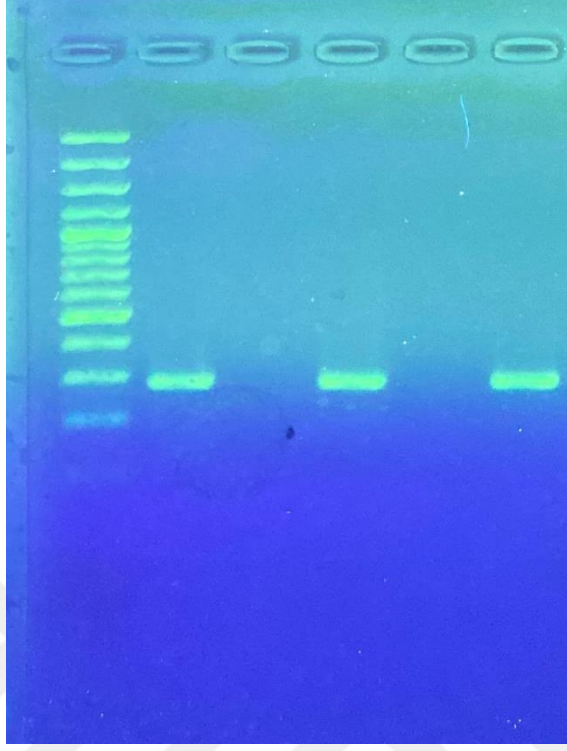
Son uzama: 72 °C – 5 dakika

Bekleme: 4 °C – Sonsuz

3.3.5. Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla jel elektroforezi hazırlandı. 10X TBE Elektroforez Tamponundan (Thermo Scientific, ABD) 100 mL alınarak üzerine 1 litreye tamamlanacak kadar distile su eklendi. Oluşan 1X TBE solüsyonu cam şişede saklandı. 50 mL 1X TBE solüsyonu agaroz jel hazırlamak üzere başka bir küçük cam şişeye aktarıldı. Hassas tartıda 0,75 gram agaroz tartıldı ve 50 mL'lik 1X

TBE solüsyonuna eklendi. Karışım mikrodalga fırın yardımıyla ısıtılarak agarozun solüsyon içinde tamamen çözünmesi sağlandı. Karışımın bir miktar soğuması beklendikten sonra 2,5 µL SafeView™ Classic (Applied Biological Materials, Kanada) nükleik asit boyası eklendi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Karışım el yakmayacak sıcaklığa gelinceye kadar beklendi ve ardından Owl™ EasyCast™ B1 (Thermo Scientific, ABD) jel elektroforez tablosuna döküldü ve kuyucuk tarakları takıldı. 30 dakika sonra jel dondu ve taraklar dikkatlice çıkarıldı. Jel, elektroforez için uygun pozisyona getirildikten sonra üzerine jelin yüzeyini kaplayacak ancak tepsi sınırını aşmayacak kadar 1X TBE solüsyonu eklendi. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ruler (Thermo Scientific, ABD) DNA merdiveni ve PCR ürünlerinden 5 µL alınarak 1 µL 6X Loading Dye (Fermentas, ABD) yükleme boyası ile karıştırıldı ve bu karışımın 5 µL'si kuyucuklara aktarıldı. Anot ve katot kabloları katot kuyucuklara yakın olacak şekilde bağlandıktan sonra güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı 120 Volt potansiyelinde, 80 mAmp akım şiddetinde, 40 dakika sürecek şekilde çalıştırıldı. Yürütme sonrası jeli görüntülemek için TFX-35.MC UV Transillüminatör (Vilber Lourmat, Fransa) kullanıldı. Jelin görüntüleri akıllı telefon kamerası veya kamera kullanılarak dijital ortama aktarılıp saklandı.



Şekil 4. Optimizasyon çalışması sonucunun jel elektroforez görüntüsü. Soldan sağa olacak şekilde ilk sırada DNA merdiveni; 2, 4 ve 6. sıralarda pozitif kontroller, 3 ve 5. sıralarda negatif kontroller yer almakta. Pozitif kontrol bandının merdivende yaklaşık 285 baz çiftlik bölgeye denk gelmesi reaksiyonun olumlu gerçekleştiğini gösterdi.

3.4. DNA dizilimi analizi

Sanger sekansı yöntemi Makrogen Biyomühendislik tarafından gerçekleştirildi. Tarama ve doğrulama primerleri ile çoğaltılan bölgelerin DNA dizi analizi için bu bölgelerin PCR ürünleri Sanger sekansı yöntemi ile analiz edilmek üzere her örneğe ait 10 µL PCR ürünü, 5 µL ileri yönde primer ve 5 µL geri yönde primer ile olacak şekilde iki farklı şekilde karıştırıldı. Bu karışımlar Makrogen Biyomühendislik’e firma önerileri doğrultusunda gönderildi. Analiz sonuçları e-posta yoluyla firma tarafından iletildi. Elektroferogram dosyaları Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) programının 11. sürümü ile görüntülenerek incelendi. Ters yönde

primerle elde edilen dizi ters çevirilip tamamlayıcı dizisi alınarak ileri yöndeki primerle elde edilen dizi ile eşleştirildi. Elektroferogramdaki uyumsuzluklar diziler iki yönlü incelenerek çözümlendi. GenBank genetik dizi veritabanından elde edilen CP092660, EU358025, CP0919662, MT233032, OY754503, CP0972630, CP030142, CP028370, EU357972 dizileri referans olarak kullanılmak üzere diziler ClustalW sistemi ile hizalandı (99).

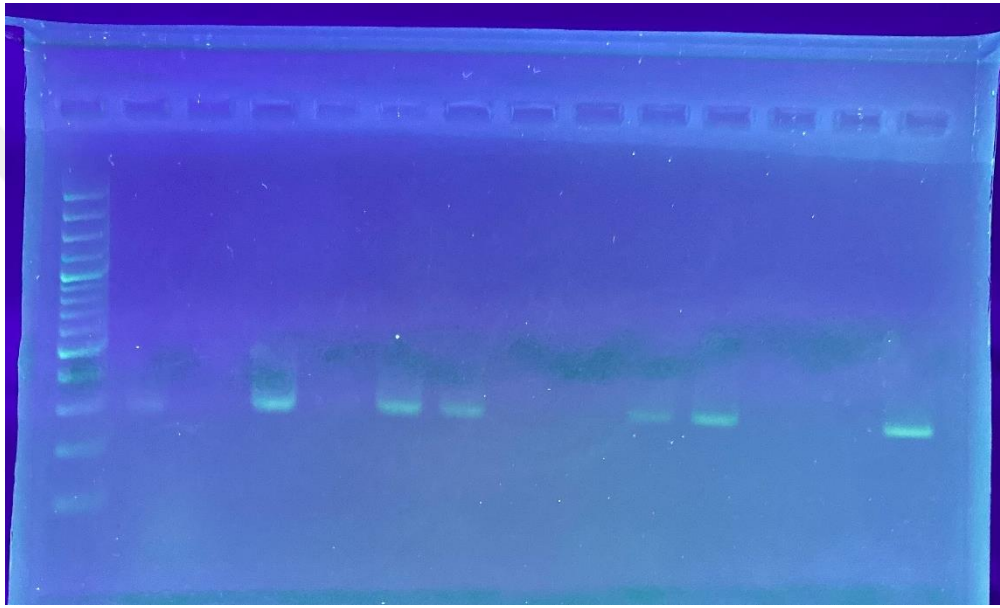
3.5. Filogenetik Analiz

Filogenetik ağaç oluşturmak için GenBank veritabanından bu çalışmada kullanılan bölgeye denk gelen 49 adet *Leptospira* spp. dizisi kullanıldı. MEGA 11 programı kullanılarak bu çalışmadaki beş dizi ile birlikte toplam 54 adet dizinin bulunduğu grup ClustalW sistemi ile hizalandı. Diziler Maximum Likelihood yöntemi ve Jukes-Cantor modeli kullanılarak orijinal filogenetik ağaç oluşturuldu. Bootstrap ortak ağacı ise 1000 tekrar sonucu oluşturuldu (99–101).

4. BULGULAR

4.1. PCR ve Jel Elektroforezi Sonuçları

Saha çalışmasında toplanmış olan kemiricilere ait 211 böbrek örneği SecY genini hedefleyen primerlerle taraması yapıldı ve 8153, 8155, 8167, 8175 ve 8233 numaraları örneklerde jel elektroforezinde yaklaşık 285 baz çiftlik bölgeye denk gelen bant tespit edildi.



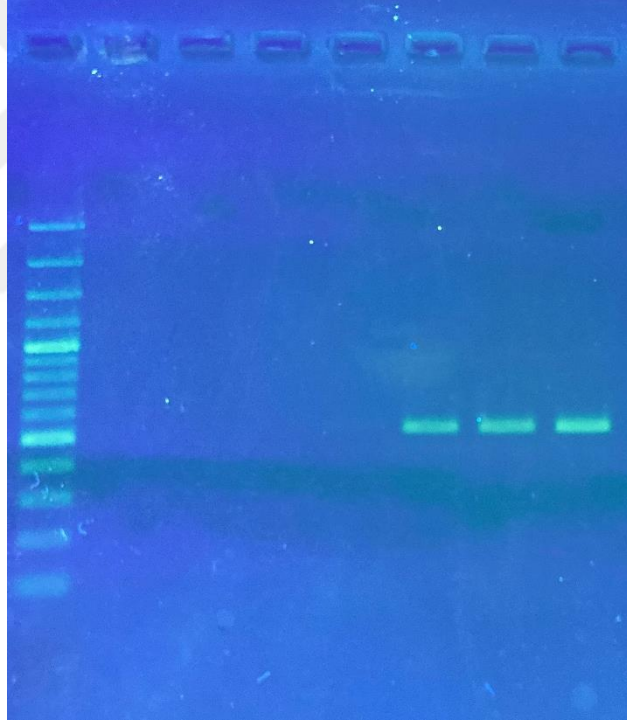
Şekil 5. Tarama primerleri ile pozitiflik saptanan örneklerin jel görüntüsü. Soldan sağa olmak üzere kuyucuklara sırasıyla 100 baz çiftlik DNA merdiveni, pozitif kontrol, negatif kontrol, 8233, 8222, 8167, 8175, 8144, 8146, 8153, 8155, 8126, 8117 ve pozitif kontrol (tekrar) koyuldu.

Örnek	Kemirici	Bölge	Boylam	Enlem
8153	<i>Microtus sp.</i>	Boyalı Köyü, Suluova, Amasya	40.784958°	35.795565°
8155	<i>Microtus sp.</i>	Boyalı Köyü, Suluova, Amasya	40.785487°	35.796761°
8167	<i>Mus macedonicus</i>	Boyalı Köyü, Suluova, Amasya	40.784040°	35.798178°

8175	<i>Mus macedonicus</i>	Boyalı Köyü, Suluova, Amasya	40.784040°	35.798178°
8233	<i>Microtus sp.</i>	Boyalı Köyü, Suluova, Amasya	40.78586°	35.81122°

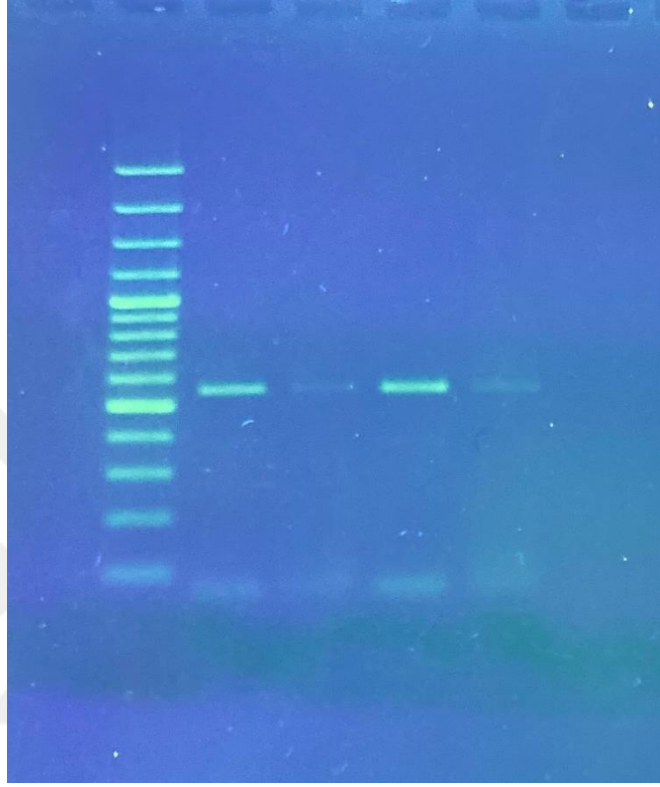
Tablo 3. Taramada pozitiflik saptanan örneklerin konak hayvanları ve konum bilgileri

Tarama primerleri ile pozitiflik saptanan 5 örnek ile doğrulama primerleri kullanılarak PCR yapıldı. Bu örneklerin hepsinde DNA merdiveninde 549 bazlık bölgeye denk gelen elektroforez bantları tespit edildi.



Şekil 6. Doğrulama primerleri kullanılarak çoğaltılmış PCR ürünlerinin jel elektroforez görüntüsü. Soldan sağa olmak üzere kuyucuklara 100 baz çiftlik DNA merdiveni, 2 adet boş kuyucuk, 8153, 8155, 8167, 8175 ve 8233 numaralı örnekler koyuldu. 8167, 8175 ve 8233 numaralı örneklerde DNA merdiveninde yaklaşık 549 bazlık bölgeye denk gelen elektroforez bandı tespit edildi. 8153 numaralı örnekte

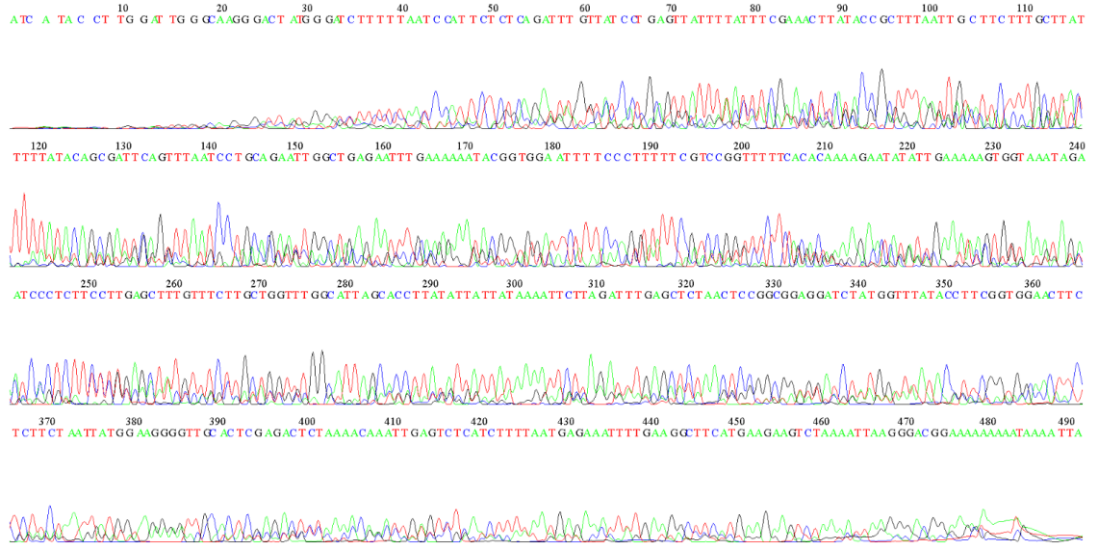
bant görülmemesi ve 8155 numaralı örnekte zayıf bant görülmesi üzerine bu örneklerin PCR ürünleri aynı primerlerle tekrar çoğaltıldı.



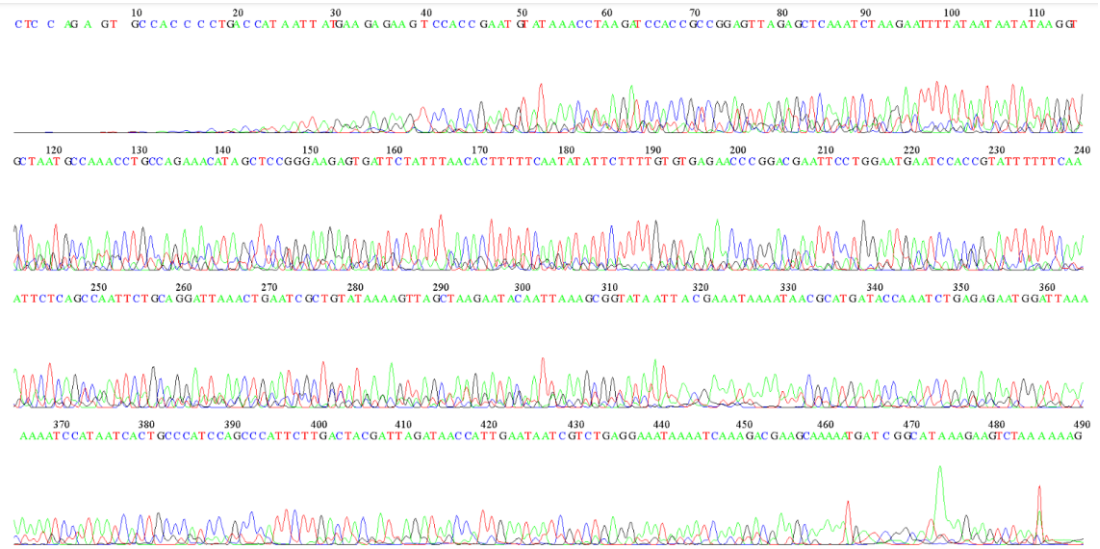
Şekil 7. 8153 ve 8155 numaralı örneklerin tekrar PCR işlemi sonrası jel elektroforez görüntüleri. Soldan sağa olmak üzere kuyucuklara 100 baz çiftlik DNA merdiveni, 2 adet 8153 numaralı örneğin tekrar çoğaltılmış ürünü, 2 adet 8155 numaralı örneğin tekrar çoğaltılmış ürünü koyuldu. Bu iki örnekte de DNA merdiveninde yaklaşık 549 baz çiftlik bölgeye denk gelen elektroforez bantları tespit edildi.

4.2. Sanger Sekansı Sonuçları

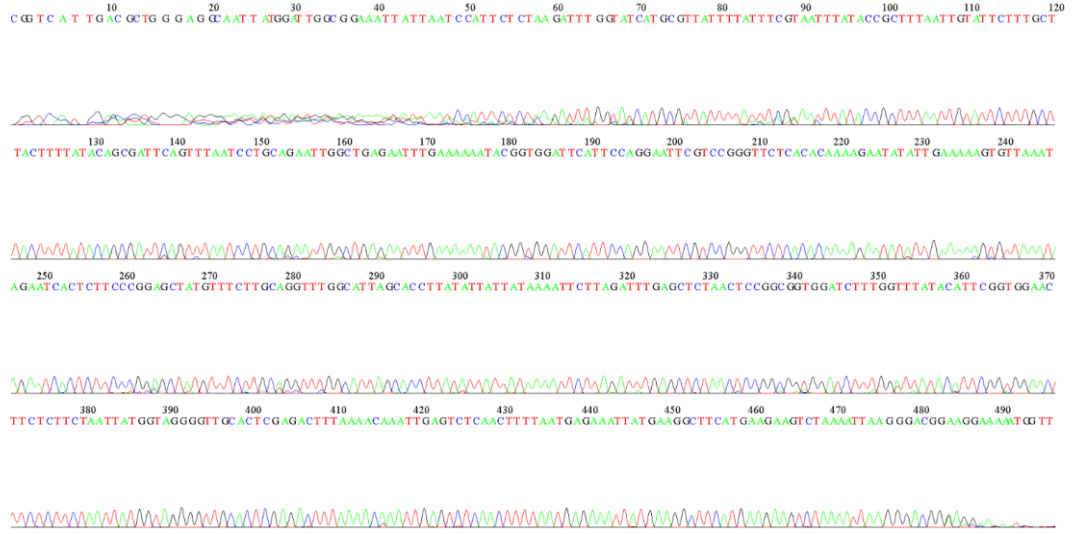
Makrogen Biyomühendislik tarafından analizleri yapılan örneklerin MEGA programı ile yapılan incelemesinde ClustalW yöntemi ile hizalanarak 536-549 baz uzunluğunda diziler elde edildi.



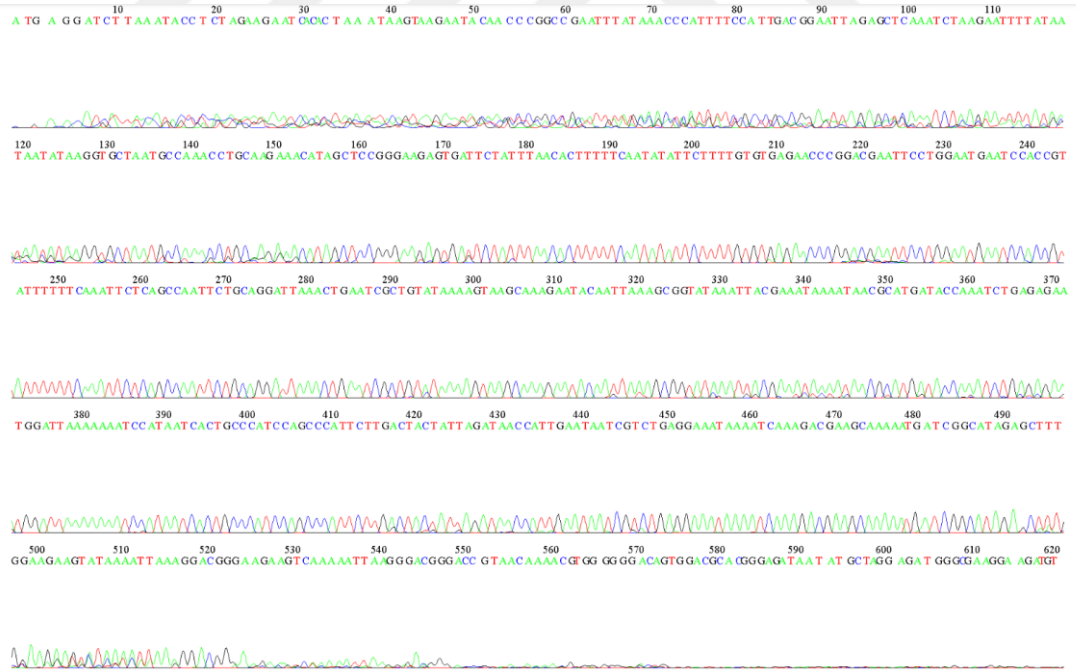
Şekil 8. 8153 numaralı örneğe ait ileri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



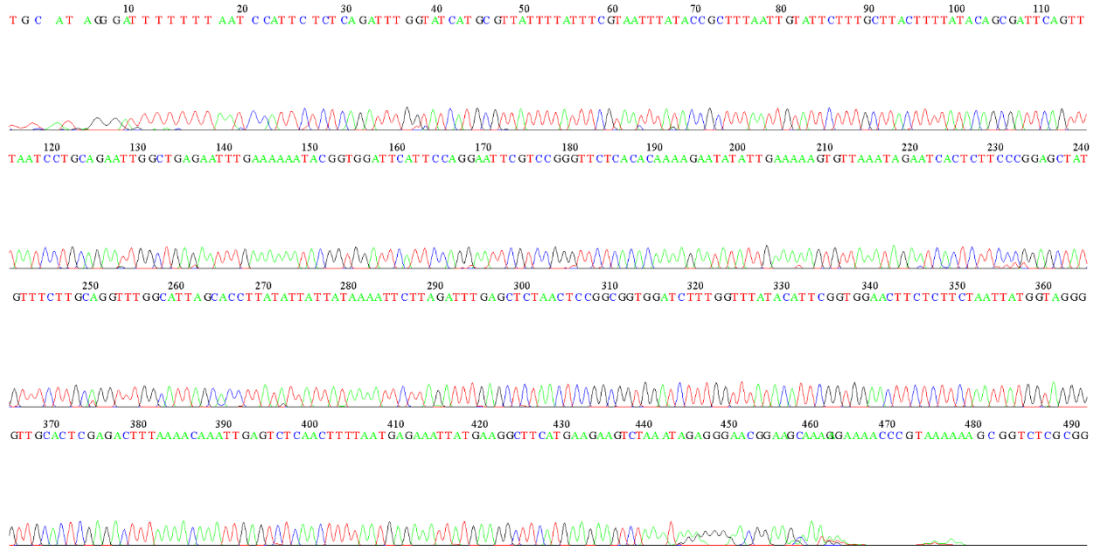
Şekil 9. 8153 numaralı örneğe ait geri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



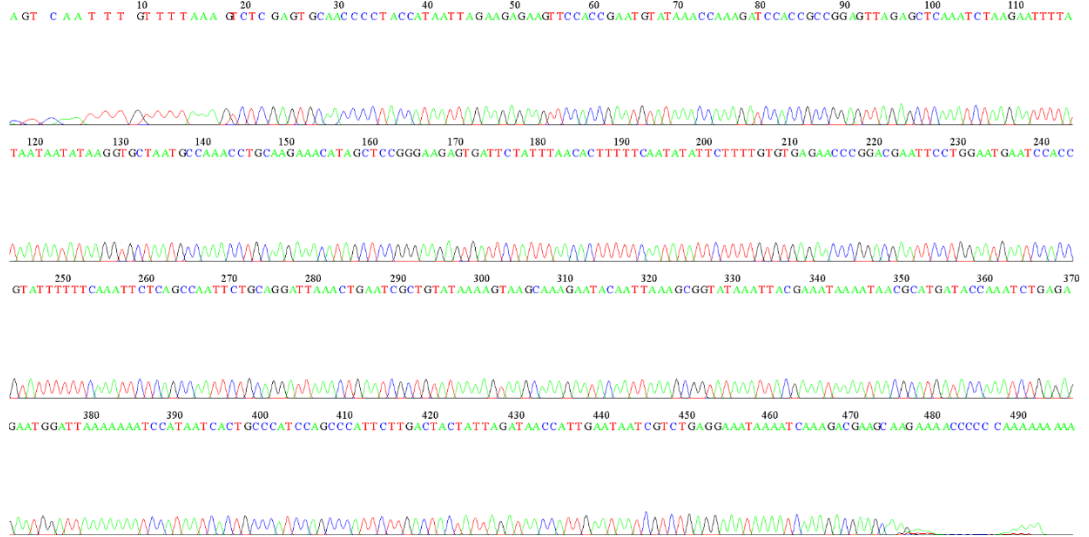
Şekil 10. 8155 numaralı örneğe ait ileri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



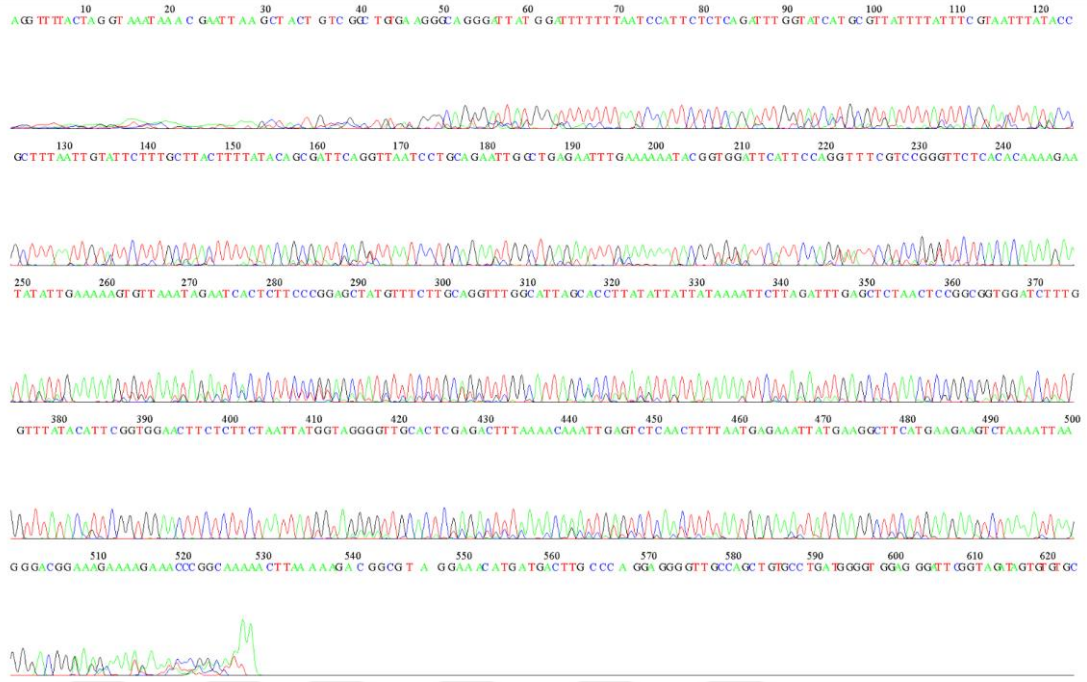
Şekil 11. 8155 numaralı örneğe ait geri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



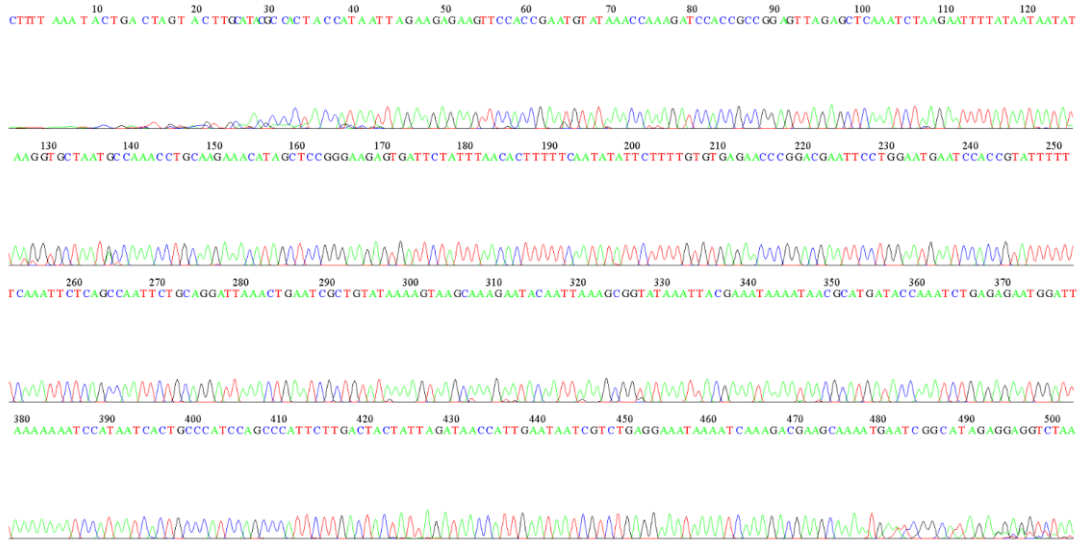
Şekil 12. 8167 numaralı örneğe ait ileri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



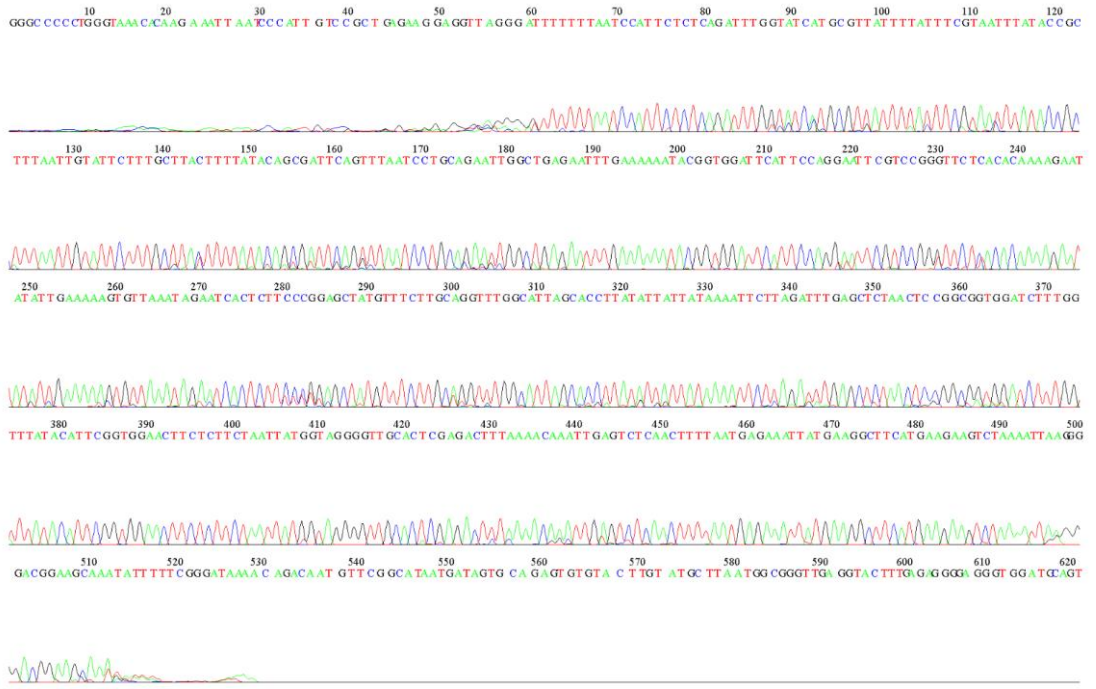
Şekil 13. 8167 numaralı örneğe ait geri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



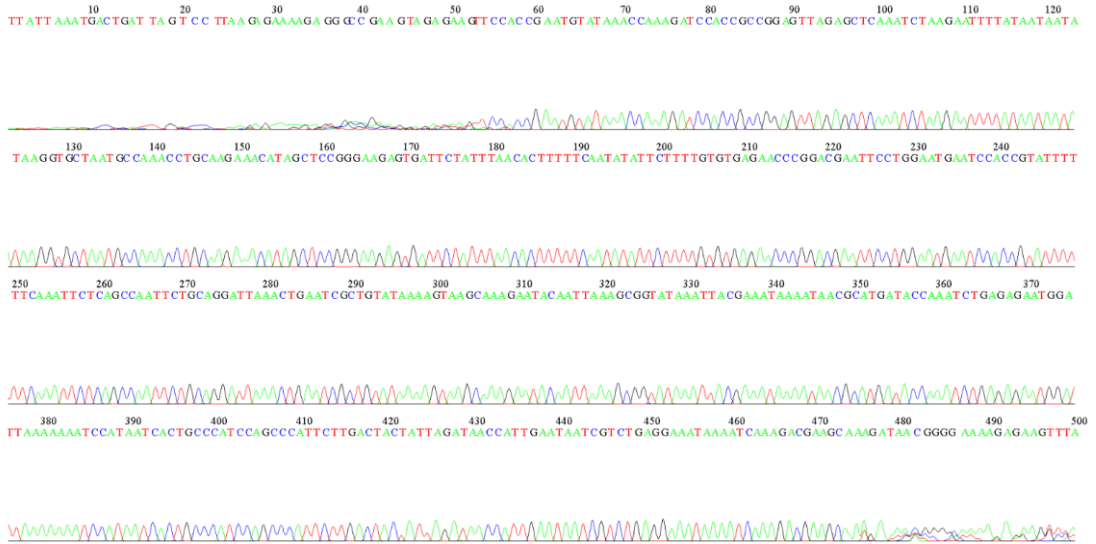
Şekil 14. 8175 numaralı örneğe ait ileri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



Şekil 15. 8175 numaralı örneğe ait geri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



Şekil 16. 8233 numaralı örneğe ait ileri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı



Şekil 17. 8233 numaralı örneğe ait geri yönlü primer ile yapılan dizi analizi elektroferogramı

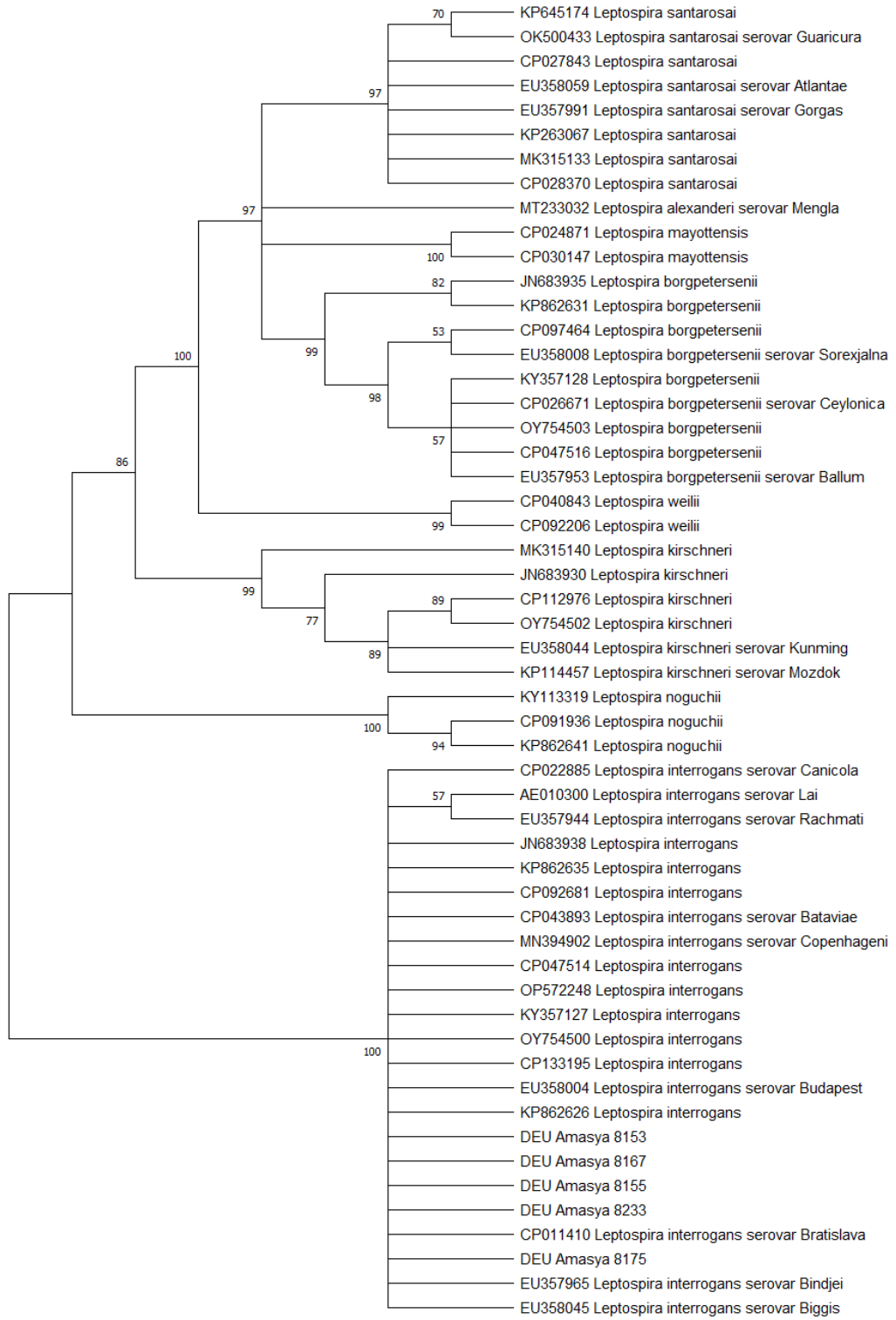
Nükleotit Sırası; Örnekler	Nükleotit Dizilimi
1 – 40; 8153 8155 8167 8175 8233	ATGCCGATCATTTTTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCCCTC ATGCCGATCATTTTTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCCCTC ----- TTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCCCTC ATGCCGATCATTTTTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCCCTC ----- TTTGCTTCGTCTTTGATTTTATTTCCCTC
41 – 80; 8153 8155 8167 8175 8233	AGACGATTATTCAATGGTTATCTAAT <u>C</u> GTAGTCAAGAATG AGACGATTATTCAATGGTTATCTAAT <u>A</u> GTAGTCAAGAATG AGACGATTATTCAATGGTTATCTAAT <u>A</u> GTAGTCAAGAATG AGACGATTATTCAATGGTTATCTAAT <u>A</u> GTAGTCAAGAATG AGACGATTATTCAATGGTTATCTAAT <u>A</u> GTAGTCAAGAATG
81 – 120; 8153 8155 8167 8175 8233	GGCTGGATGGGCAGTGATTATGGATTTTTTTAATCCATTC GGCTGGATGGGCAGTGATTATGGATTTTTTTAATCCATTC GGCTGGATGGGCAGTGATTATGGATTTTTTTAATCCATTC GGCTGGATGGGCAGTGATTATGGATTTTTTTAATCCATTC GGCTGGATGGGCAGTGATTATGGATTTTTTTAATCCATTC
121 – 160; 8153 8155 8167 8175 8233	TCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTT TCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTT TCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTT TCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTT TCTCAGATTTGGTATCATGCGTTATTTTATTTTCGTAATTT
161 – 200; 8153 8155 8167 8175 8233	ATACCGCTTTAATTGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGC ATACCGCTTTAATTGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGC ATACCGCTTTAATTGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGC ATACCGCTTTAATTGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGC ATACCGCTTTAATTGTATTCTTTGCTTACTTTTATACAGC
201 – 240; 8153 8155 8167 8175 8233	GATTCAGTTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAA GATTCAGTTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAA GATTCAGTTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAA GATTCAGTTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAA GATTCAGTTTAATCCTGCAGAATTGGCTGAGAATTTGAAA

241 – 280; 8153 8155 8167 8175 8233	AAATACGGTGGATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGGTTCTC AAATACGGTGGATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGGTTCTC AAATACGGTGGATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGGTTCTC AAATACGGTGGATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGGTTCTC AAATACGGTGGATTCATTCCAGGAATTCGTCCGGGTTCTC
281 – 320; 8153 8155 8167 8175 8233	ACACAAAAGAATATATTGAAAAAGTGTTAAATAGAATCAC ACACAAAAGAATATATTGAAAAAGTGTTAAATAGAATCAC ACACAAAAGAATATATTGAAAAAGTGTTAAATAGAATCAC ACACAAAAGAATATATTGAAAAAGTGTTAAATAGAATCAC ACACAAAAGAATATATTGAAAAAGTGTTAAATAGAATCAC
321 – 360; 8153 8155 8167 8175 8233	TCTTCCCGGAGCTATGTTTCTTGCAGGTTTGGCATTAGCA TCTTCCCGGAGCTATGTTTCTTGCAGGTTTGGCATTAGCA TCTTCCCGGAGCTATGTTTCTTGCAGGTTTGGCATTAGCA TCTTCCCGGAGCTATGTTTCTTGCAGGTTTGGCATTAGCA TCTTCCCGGAGCTATGTTTCTTGCAGGTTTGGCATTAGCA
361 – 400; 8153 8155 8167 8175 8233	CCTTATATTATTATAAAATTCTTAGATTTGAGCTCTAACT CCTTATATTATTATAAAATTCTTAGATTTGAGCTCTAACT CCTTATATTATTATAAAATTCTTAGATTTGAGCTCTAACT CCTTATATTATTATAAAATTCTTAGATTTGAGCTCTAACT CCTTATATTATTATAAAATTCTTAGATTTGAGCTCTAACT
401 – 440; 8153 8155 8167 8175 8233	CCGGCGGTGGATCTTTGGTTTATACATTCGGTGGAACCTC CCGGCGGTGGATCTTTGGTTTATACATTCGGTGGAACCTC CCGGCGGTGGATCTTTGGTTTATACATTCGGTGGAACCTC CCGGCGGTGGATCTTTGGTTTATACATTCGGTGGAACCTC CCGGCGGTGGATCTTTGGTTTATACATTCGGTGGAACCTC
441 – 480; 8153 8155 8167 8175 8233	TCTTCTAATTATGGA <u>A</u> AGGGGTTGCACTCGAGACTTTAAAA TCTTCTAATTATGG <u>T</u> AGGGGTTGCACTCGAGACTTTAAAA TCTTCTAATTATGG <u>T</u> AGGGGTTGCACTCGAGACTTTAAAA TCTTCTAATTATGG <u>T</u> AGGGGTTGCACTCGAGACTTTAAAA TCTTCTAATTATGG <u>T</u> AGGGGTTGCACTCGAGACTTTAAAA
481 – 520; 8153 8155 8167 8175 8233	CAAATTGAGTCTCAACTTTTAATGAGAAATTATGAAGGCT CAAATTGAGTCTCAACTTTTAATGAGAAATTATGAAGGCT CAAATTGAGTCTCAACTTTTAATGAGAAATTATGAAGGCT CAAATTGAGTCTCAACTTTTAATGAGAAATTATGAAGGCT CAAATTGAGTCTCAACTTTTAATGAGAAATTATGAAGGCT

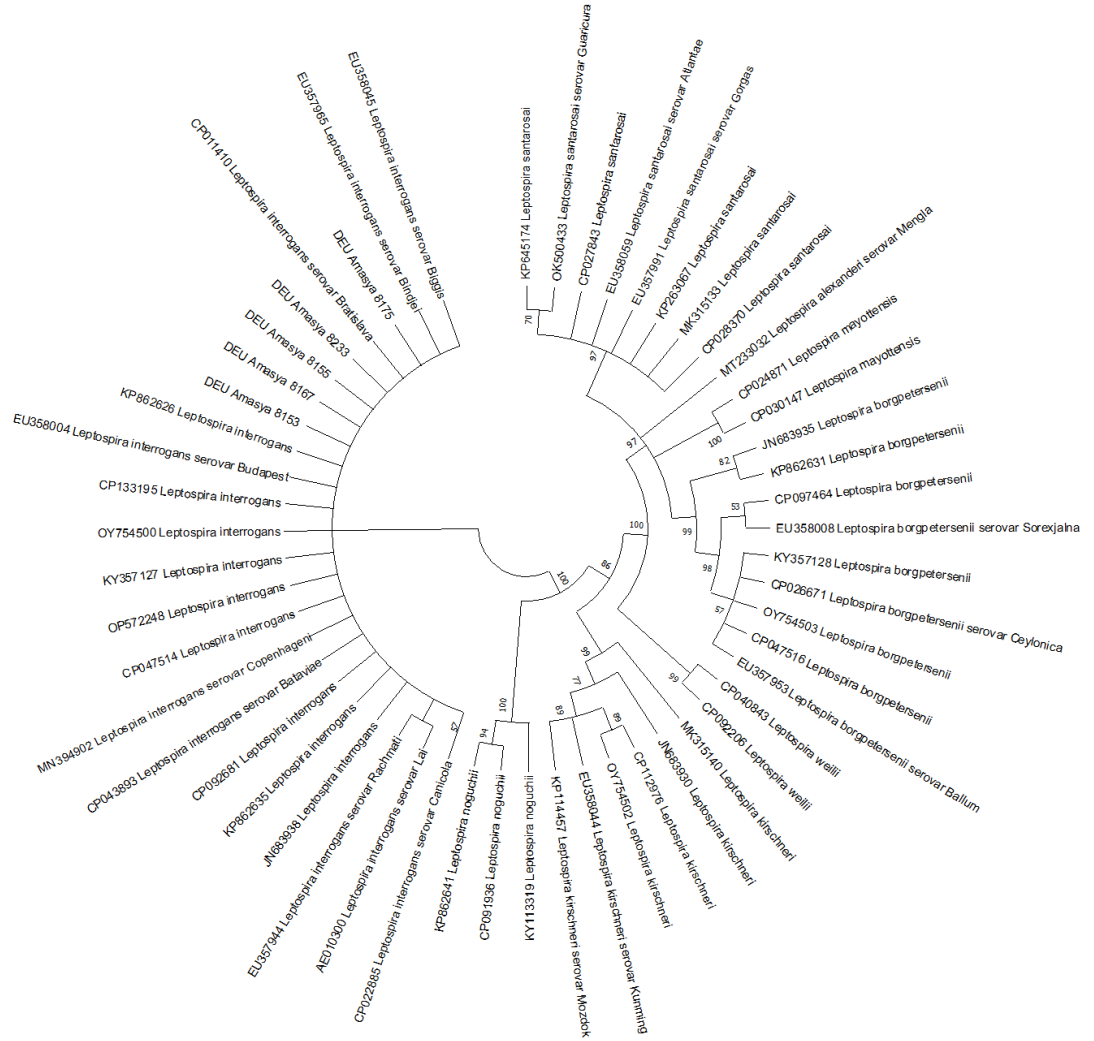
521 – 549; 8153	
8155	TCATGAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG
8167	TCATGAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG
8175	TCATGAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG
8233	TCATGAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG
	TCATGAAGAAGTCTAAAATTAAGGGACGG

Tablo 4. Örneklerin nükleotit dizileri. Dizilerde farklılık gösteren nükleotitler kalın ve altı çizili olacak şekilde belirtilmiştir.

GenBank nükleotit veritabanında bu primerlere karşılık gelen 49 adet dizi ve çalışmamızdaki 5 örneğin dizileri hizalanarak, Maximum Likelihood yöntemi ve Jukes-Cantor modeli kullanılarak yapılan filogenetik ağaçta bu bölgenin *Leptospira interrogans* türleri ile birlikte gruplandığı görüldü.



Şekil 18. Maximum Likelihood yöntemi ile çizilen filogenetik ağaç



Şekil 19. Maximum Likelihood yöntemi ile çizilen filogenetik ağacının dairesel görüntüsü

5. TARTIŞMA

Leptospiroz dünyada en sık görülen bakteriyel zoonozlardan biridir. Antarktika dışındaki tüm kıtalarda varlığı bildirilmiştir. Hastalığın etkeni patojenik *Leptospira* türleridir. İnsanlarda asemptomatik enfeksiyondan hayatı tehdit eden Weil hastalığına kadar geniş bir yelpazede hastalık yapabilmektedir.

Birçok memelide varlığı gösterilmesine rağmen leptospirozun en önemli kaynağı küçük memeliler ve kemiricilerdir. Çeşitli yollarla hayvana bulaşan bakteri dolaşım sistemi yolu ile böbreklere gelerek proksimal tübül epiteline kolonize olur ve sürekli salınım gerçekleşir. Taşıyıcı hayvanların idrarlarından salınan bakterilerin insanların kullandığı su kaynaklarını kontamine etmesi salgınların gelişmesindeki en önemli sebeplerden biridir. Gelişmiş ülkelerde daha sık olarak spontan vakalar görülse de leptospiroza bağlı salgınlar özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yüksek mortaliteye neden olmaktadır. Deprem ve sel gibi doğal afetler sonrası da salgınlar şeklinde ortaya çıkarak bölgede afet yönetimini zorlaştırmaktadır. Salgınlara ön görülebilmesi ve önlenmesi için leptospirozun doğal yaşamdaki kaynaklarının tespit edilip önlemlerin alınması önemlidir.

Birçok ülkede leptospiroz ve diğer zoonozların doğal yaşamdaki dağılımı ve epidemiyolojisi için saha çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda su ve toprak gibi çevresel örnekler ile hayvan örnekleri toplanarak hastalık etkenlerinin doğal kaynakları, yaşam döngüleri, patogenezi, genetik yapıları gibi birçok özellikleri incelenebilmektedir. Ülkemizde birçok zoonoz etkeni bulunmasına rağmen saha çalışmalarının sayısı yetersizdir.

Bu çalışmada 2016 yılında Doğu Anadolu ve Orta Anadolu bölgesinden toplanmış 211 adet kemiriciye ait böbrek örnekleri kullanıldı. Benzer birçok çalışmada moleküler testler için temel olarak böbrek ve idrar örnekleri kullanılmıştır (102–105). Bu örneklerin seçilmesinin nedeni patojenik Leptospiraların doğal yaşamdaki döngüsünde konak hayvanın böbreklerinde proksimal tübül epiteline kolonize olması ve idrar yolu ile sürekli salınımıdır. Bazı çalışmalarda karaciğer, beyin, akciğer gibi organ örnekleri veya BOS gibi örnekler de patojenik *Leptospira* varlığını göstermek için kullanılmıştır ancak bu örneklerdeki pozitifliğin veya negatifliğin bakterinin yaşam döngüsündeki önemi bilinmemektedir (106,107).

Kemiriciler, doğal yaşam alanlarından Sherman tipi kapanlar aracılığıyla toplanmıştır. Hayvanların fenotipik tür tayini, cinsiyet, boy, ağırlık gibi özellikleri belirlendikten sonra servikal luksasyon yöntemi ile sakrifiye edilmiş, organları ve doku örnekleri nükleik asitlerin bozunmasını engelleyici RNAlater solüsyonu içerisine alınarak -80 °C’de saklanmıştır. Örneklerin bu şekilde stoklanması nükleik asit yapılarının yıllarca sağlam kalmasını sağlar. Bu şekilde daha sonra yapılacak moleküler testlerin güvenilir olması sağlanır.

Metal boncuklarla homojenize edilmiş örneklerden nükleik asitlerin saflaştırılması için kimyasal saflaştırma yöntemlerinden biri olan guanidinyum tiosiyanat-fenol-kloroform ekstraksiyonu yöntemi tercih edildi. Bu yöntem DNA ve RNA’nın saflaştırılmasına ve birbirlerinden ayrı örneklerde saklanmasına olanak sağlar. Bu yöntemle yüksek saflıkta ve konsantrasyonda nükleik asit elde edilebilmesi diğer nükleik asit ekstraksiyonu yöntemlerine kıyasla avantajlıdır (108). Karışımındaki fenol ve kloroform insan sağlığına zararlı maddeler olduğu için bütün işlemler çeker ocak içerisinde gerçekleştirildi.

Birçok çalışmada kedi, köpek, sığır, at, koyun, keçi, domuz, tavşan gibi çeşitli evcil veya evcilleştirilmiş hayvan türlerinde moleküler veya serolojik testler ile *Leptospira* varlığı veya seroprevalansı araştırılmıştır (109–113). Bu hayvanlarla yapılan çalışmalar bölgede *Leptospira* varlığı konusunda genel bir bilgi verse de bu hayvanlara geçişin kaynağının araştırılması, bu hayvanların tekrar enfekte olmasının engellenmesi ve ileride olabilecek salgınların önlenmesi için bakterinin yaban hayatındaki asıl kaynağı olan kemiricilerde çalışmalar yapılması önemlidir.

Leptospiraların hayvanlardaki varlığını gösteren birçok serolojik çalışma da mevcuttur (29,110,114). MAT yöntemi insan ve hayvan serum örneklerinde leptospiralara karşı oluşan antikorları gösterme konusunda altın standart kabul edilmektedir. MAT hayvanın daha önce *Leptospira* ile karşılaşmış olduğunu göstermek ve seroprevalans analizi için başarılı bir testtir ancak uygulamada zorluklar, aktif enfeksiyonu göstermemesi ve çapraz reaksiyonlar gibi dezavantajları vardır.

Leptospira varlığının araştırılması için çalışmalarda temel olarak PCR kullanılmıştır. PCR çok düşük düzeydeki nükleik asit miktarlarını bile tespit edebilir.

Çalışmalarda *LipL32*, *gyrB*, *rrs*, *hap1*, *rpoB*, *LipL41*, *secY*, *flaB* gibi gen bölgesini hedefleyen farklı primerler kullanılmıştır (31,107,115). *LipL32* ve *flaB* gibi sadece patojenik *Leptospira* türlerinde bulunan genleri hedefleyen primerler patojenik türleri saprofit türlerden ayırmak için kullanılabilse de saprofit *Leptospira* türlerinin insanları veya hayvanları enfekte etmemesi, hayvan örnekleri üzerine yapılan çalışmalarda bu avantajı değersizleştirmektedir (116,117). Bu primerlerin su, toprak gibi çevresel örneklerde kullanılması saprofit türlerin elenmesini sağlayarak maliyet ve iş gücü açısından faydalı olacaktır.

Bu çalışmada örneklerin *Leptospira* açısından taranması ve pozitif örneklerin doğrulanması amacıyla *secY* gen bölgesini hedefleyen G1/G2 ve Fr549/Rv549 primer setleri kullanıldı. G1/G2 primer seti günümüze kadar birçok çalışmada kullanılmış, *L. kirschneri* dışındaki türlerde yüksek doğruluğa sahip başarılı bir primer setidir (31,118). Fr549/Rv549 primer seti ise yine *secY* geni üzerinde fakat G1/G2 primerlerine kıyasla daha uzun bir bölgeyi çoğaltan bir primer setidir (119,120). G1/G2 primer seti yüksek duyarlılığı sebebiyle örneklerin taramasında kullanılırken Fr549/Rv549 primer seti taramada pozitif bulunan örneklerin dizi analizi ile kesin tanısı ve tür tayininde kullanıldı. Tarama primerleri ile pozitiflik saptanan 5 örnekte aynı zamanda doğrulama primerleri ile de pozitif sonuç elde edildi.

PCR çalışmalarında testin başarısının değerlendirilmesi için farklı yöntemler kullanılabilir. Bu çalışmada olduğu gibi pozitif ve negatif kontrol örneklerinin kullanılması yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için önemlidir. Halk Sağlığı Laboratuvarı'ndan alınan pozitif kontrolün doğru çalışması PCR karışımının doğruluğunu, primerlerin hedef bölgeye bağlanabildiğini ve sıcaklık döngülerinin başarılı bir şekilde yerine getirildiğini gösterdi. Negatif kontrol olarak ise distile su kullanıldı ve negatif kontrol örneğinin elektroforez sonucunda bant görülmemesi PCR karışımının nükleik asitlerle veya amplikonlarla kontamine olmadığını gösterdi. Pozitif ve negatif kontrol genel olarak çalışmanın güvenilirliği hakkında bilgi verse de örnek başına doğruluğu gösterme konusunda yetersizdir. Bazı çalışmalarda her örnek tüpünde reaksiyonun doğru gerçekleştiğini göstermek amacıyla çalışmada kullanılan primerlerden farklı bir primer seti olan internal pozitif kontrol kullanılmıştır (104,121). Bu primer seti ya dışarıdan eklenen farklı bir nükleik asit

yapısını ya da çalışılan örneklerde ortak bulunan nükleik asitleri hedefler. Bu primerlere ait bandın jel elektroforezinde gözlenmesi o örnek için reaksiyonun gerçekleştiğini, örnekte reaksiyonu engelleyecek inhibitör maddelerin bulunmadığını gösterir. Bu sayede yalancı negatifliklerin önüne geçilebilir, fakat internal pozitif kontrol kullanılması çalışma prensibi açısından PCR yöntemini çoklu hedeflerin tarandığı multipleks PCR türüne çevireceğinden optimizasyonu zorlaştıracaktır.



Şekil 20. Türkiye Haritası üzerinde *Microtus* spp. kemiricilerinin dağılımı



Şekil 21. Türkiye haritası üzerinde *Mus* spp. kemiricilerinin dağılımı

Patojenik *Leptospira* saptanan böbrek örneklerinin üçü *Mus macedonicus*, ikisi *Microtus* spp. kemiricilerine ait olduğu görüldü. Bu kemiricilerin yakalandıkları bölge ise Amasya ilinin Suluova ilçesine bağlı Boyalı Köyünün çevresinde bulunan tarım arazilerinde olduğu görüldü. Amasya ilinden toplanan 80 örneğin tamamı Boyalı Köyü ve çevresinde toplanmıştır. Tarım arazisindeki kemiricilerde pozitiflik bu bölgedeki tarım çalışanlarının veya su ile teması olan kişilerin leptospiroz açısından risk altında olduğunu gösterir. Bu bölgede güncel bir çalışma ile çevresel örnek toplanması veya kemiricilerdeki pozitiflik durumunun gösterilmesi önemlidir. *Apodemus* spp., *Chionomys* spp., *Cricetulus* spp., *Crocidura* spp., *Meriones* spp. ve *Mesocricetus* spp. kemiricilerinde ise pozitiflik saptanmadı. Farklı birçok kemirici türlerinin değerlendirilmesi ise bu çalışmanın önemli özelliklerindendir.

Dizi analizi sonuçları incelendiğinde 3 örnekteki 549 bazlık dizinin tamamı elde edilebildi. 8167 numaralı örneğin ilk 13 bazlık bölgesinin ve 8233 numaralı örneğin ilk 12 bazlık bölgesinin dizisi saptanmadı. Bu bölge aynı zamanda ileri yönlü primerin hedef bölgesinin komplementer dizisine denk gelmektedir. Veritabanlarındaki diğer diziler ile karşılaştırıldığında bu bölgede nükleotit değişimlerinin olabileceği görüldü. Filogenetik ağaç oluşturulurken bu 13 bazlık bölge hesaba katılmadı. Geriye kalan 536 bazlık bölge için ise 8155, 8167, 8175, 8233 numaralı örneklerin dizilerinin tamamen aynı olduğu, 8153 numaralı örnekte ise dizinin 67. ve 455. bölgelerinde olmak üzere iki farklı bölgede polimorfizmin olduğu görüldü. Filogenetik ağaçta tüm örneklerin *Leptospira interrogans* türleri ile birlike gruplandığı görüldü.

Leptospira interrogans patojenik *Leptospira* türleri içerisinde en sık görülenlerden biridir. P1 alt dalı altında bulunan bakteri insanlarda sıklıkla asemptomatik veya hafif hastalık tablosu gösterse de Weil Hastalığı, pulmoner kanama, böbrek yetmezliği, miyokardit gibi ölümcül tablolara da yol açabilmektedir (5,59,122). *Icterohaemorrhagiae*, *Hardjo*, *Bataviae*, *Pomona*, *Pyrogenes*, *Copenhageni*, *Canicola* gibi birçok farklı serovar gruplarında bulunabilir (123,124). Serovar tayini için bakterinin izolasyonu gerektiğinden bu çalışmada serovar tayini yapılamadı.

Leptospiraların sınıflandırılması için günümüze kadar çok farklı yöntemler kullanılmıştır. Tarihsel olarak serolojik yöntemlerin yerini birçok bakteride olduğu gibi moleküler yöntemler almıştır. Taksonomik olarak sınıflandırmada günümüzde tüm genom dizileme veya multilokus dizi tiplendirme en başarılı yöntem olarak görülmektedir. Saha çalışmalarında bakteri izolasyonu için moleküler ve serolojik testlerle birlikte kültür yöntemi kullanan çalışmalar mevcuttur (104,107,125,126). Bu çalışmada 2016 yılında yakalanan hayvanların organları -80 °C’de saklandığından dolayısıyla örneklerde canlı bakteri bulunmadığından izolasyon yapılamadı.

Türkiye’de patojenik *Leptospira* türleri üzerine yapılan hayvan çalışmalarına bakıldığında özellikle son 20 yılda yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Eski çalışmalar daha sık serolojik yöntemler ile yapılmış olsa da güncel çalışmalarda moleküler yöntemler daha sık kullanılmıştır. Aslantaş ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada Ankara ilindeki sahipsiz köpeklerden toplanan serum örneklerinde *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum* etkenlerinin yanısıra bazı *Leptospira* etkenlerine karşı oluşan antikorlar için de test edilmiştir. Seroprevalans analizi için MAT yöntemi kullanılmış, serovar *grippotyphosa*, serovar *icterohemorrhagie*, serovar *bratislava*, serovar *pomona* ve serovar *canicola* serovarlarına karşı oluşan antikorlar tespit edilmiştir. Sonuç olarak test edilen 116 köpek serumundan 51’inde pozitiflik saptanmıştır (127). MAT yöntemi ile başarılı bir şekilde antikor tespiti yapılabilmesine rağmen tespit edilebilen antikorların testte kullanılan serovarlar ile kısıtlı olması nedeniyle yalancı negatifliklere neden olabileceği unutulmamalıdır.

Sağlam ve arkadaşları tarafından Erzurum’da yapılmış çalışmada immünohistokimyasal ve immünofloresan yöntem ile sığır böbreği örneklerinde *Leptospira interrogans* antikoru kullanılarak incelenmiş ve 70 örnekten beşinde her iki yöntemde de pozitiflik saptanmıştır (128). Böbrek tübül epitelindeki histolojik ve patolojik bulguların varlığı açısından değerlendirilebilmesi ve etkenin in-situ olarak gösterilebilmesi açısından başarılı bir çalışmadır ancak sadece *Leptospira interrogans* türüne karşı oluşan antikorların kullanılması yalancı negatifliklere yol açmış olabilir.

Geviş getiren hayvanların *Leptospira* türlerinin yaban hayatındaki döngüsündeki önemi kemiriciler kadar olmasa da etkenin insanlara geçişinde kritiktir. Sakmanoğlu ve arkadaşları tarafından yapılmış çalışmada Türkiye’deki tüm coğrafik bölgelerden gönderilen, düşük materyali olarak atılmış sığır, koyun ve keçi fetuslarının mideleri *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Coxiella burnetii*, *Campylobacter fetus*, *Chlamydia* spp. ve *Mycoplasma* spp. açısından PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir (129). Çalışmada *Leptospira* spp. tanısını koymak için *rrs* gen bölgesini hedefleyen primer seti kullanılmış ve pozitif çıkan sonuçlar restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi yöntemi ile doğrulanmıştır. Toplamda 250 örneğin test edildiği çalışmada 34 örnekte (%13,6) *Leptospira* pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmaya benzer başka bir çalışma Yeni ve arkadaşları tarafından da yapılmış ve *Leptospira* pozitifliği %10 olarak bulunmuştur (130).

Türkiye’de kemiricilerde yapılan *Leptospira* çalışmaları çok kısıtlıdır. Sünbül ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada Orta Karadeniz Bölgesi’nden toplanan 59 adet *Rattus norvegicus* kemiricisine ait böbrek, beyin ve serum örnekleri kullanılmıştır (106). Nükleik asit ekstraksiyonu için fenol-kloroform yöntemi kullanılmış, Leptospiraların tespiti için G1/G2 primer seti kullanılmıştır. Antikor tespiti için ise 10 farklı serovar kullanılarak MAT yöntemi uygulanmıştır. PCR sonucu 16 böbrek örneği (%27,1) ve 10 beyin örneği (%16,9) pozitif olarak saptanırken serum örneklerinde PCR pozitifliği saptanmamıştır. Beyin örneklerinde pozitiflik saptanan kemiricilerin tümünün böbrek örnekleri de pozitif bulunmuştur. Serum örneklerinde ise beş örnekte pozitiflik saptanmış olup, bu örneklerin üçünün PCR sonucu negatif, biri böbrek PCR sonucu pozitif olup beyin PCR sonucu negatif, biri ise böbrek ve beyin PCR sonucu pozitifdir. PCR ve serolojik yöntemlerin birlikte çalışılması seroprevalans ve prevalans açısından önemli olsa da pozitif saptanan PCR örneklerinin doğrulanmaması çalışmanın güvenilirliğini düşürmektedir. Beyin örneklerinde *Leptospira* varlığının araştırılmasının ise bakterinin doğal döngüsündeki önemi belirsizdir.

Azkur ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Kırşehir’den toplanan 43 adet *Microtus hartingi* türü kemiricide hantavirüs, cowpox virüs ve *Leptospira* varlığı araştırılmıştır (131). Bu çalışmada kemiricilere ait böbrek örneklerinden döndürme kolonu yöntemi ile nükleik asitler saflaştırıldıktan sonra ekstraksiyonun

başarısını değerlendirmek için *Microtus* sitokrom-b genini hedef alan primerler kullanılmış, ardından 16S rRNA bölgesini hedefleyen primerler kullanılarak yuvalanmış PCR yöntemi ile hedef bölge tespit edilmiştir. 20 örnekte (%46,5) PCR pozitifliği saptanmış olup bu örneklerden rastgele beş tanesi seçilerek dizi analizi yapılmış ve yaklaşık 270 baz çifti uzunluğunda diziler elde edilmiştir. Bu dizilerin filogenetik ağaçta *L. interrogans* ve *L. kirschneri* ile birlikte gruplandığı görülmüştür. Çalışmada hazırlanan filogenetik ağaçta kullanılan izolatların kısıtlılığı ve elde edilen dizinin uzunluğu nedeniyle kesin tür tayini yapılamasa da Türkiye’de *L. kirschneri* türünün yaygın olma ihtimalini gösterdiği için önemli bir çalışmadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Patojenik *Leptospira* türlerinin kemiricilerdeki dağılımının gösterilmesi o bölgedeki potansiyel salgınların önceden belirlenip önlem alınması açısından kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada beş farklı il üzerinde yedi farklı bölgede toplanan 211 doğal yaşam kemiricisine ait böbrek örnekleri kullanıldı. Sonuç olarak Amasya ilinden toplanan 80 örneğin beşinde tarama primerleriyle PCR pozitifliği saptandı. Doğrulama primerleri ile de pozitif bulunan örnekler DNA dizileme analizi ile incelenip filogenetik ağaç üzerinde yerleri belirlendiğinde bu örneklerin *Leptospira interrogans* türleri ile birlikte gruplandığı görüldü.

Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez Amasya, Kayseri, Malatya, Erzurum ve Elazığ illerindeki kemiricilerde *Leptospira* spp. taraması yapılmış ve Amasya ilindeki *Mus macedonicus* ve *Microtus* spp. kemiricilerinde patojenik bir tür olan *Leptospira interrogans* varlığı gösterilmiş oldu. *Apodemus* spp., *Microtus* spp., *Mus* spp., *Chionomys* spp., *Cricetulus* spp., *Crocidura* spp., *Meriones* spp. ve *Mesocricetus* spp. türlerinin bulunması birçok kemirici türünün birlikte çalışılması açısından da önemlidir.

Çalışmada 2016 yılında toplanmış örnekler kullanıldığı için bölgedeki patojenik *Leptospira* spp. yayılımının değerlendirilmesi açısından saha çalışmaları yapılması daha güncel verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Leptospiroz dışında birçok zoonoz etkeninin doğal yaşamdaki döngüsü açısından kemiricilerde yapılan çalışmalar önemlidir. Bu çalışmada hazırlanan nükleik asit saflaştırma işlemi tamamlanmış DNA örnekleri ve ön işlemleri yapılmış RNA örnekleri -80 °C’de saklanmaktadır. Bu sayede ileride yapılacak nükleik asit temelli testler için kolaylık sağlanmıştır.

Çalışmanın kısıtlılıkları açısından değerlendirildiğinde saflaştırılan nükleik asitlerin internal pozitif kontrol yöntemi ile test edilmemesi ve *L. kirschneri* konusunda başarılı olmayan tarama primeri seti kullanılması yalancı negatifliklere yol açabilir. Bakterilerin izolasyonunun gerçekleştirilememesi ise serovar tayini yapılamamasına neden olmuştur. İleride yapılacak çalışmalarda *L. kirschneri* türü

için özel primer setinin de çalışmaya dahil edilmesi ve saflaştırma protokolünün kontrolü için ek test uygulanması çalışmanın değerini arttıracaktır.

Sonuç olarak bu çalışmayla Türkiye'nin Orta Anadolu Bölgesi ve Doğu Anadolu Bölgesinden toplanmış kemiricilerde PCR yöntemi ve dizi analizi ile patojenik *Leptospira* spp. taraması yapılmış ve Amasya ilinde beş örnekten pozitiflik gösterilmiş oldu. Bu bölgenin Leptospiroz açısından riskli bölge olduğu ve ileride oluşabilecek salgınlar için önlemler alınması gösterildi. Patojenik *Leptospira* ve diğer zoonoz etkenlerinin Türkiye'de doğal yaşamdaki dağılımlarının gösterilmesi önemlidir ve bu konuda daha çok çalışma yapılması gerekir.



7. KAYNAKCA

1. Zoonoses [Internet]. [cited 2024 Mar 4]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>
2. Rees EM, Minter A, Edmunds WJ, Lau CL, Kucharski AJ, Lowe R. Transmission modelling of environmentally persistent zoonotic diseases: a systematic review. *The Lancet Planetary Health*. 2021 Jul 1;5(7):e466–78.
3. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. In: Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cited 2024 Mar 6]. p. 65–97. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
4. von Ranke FM, Zanetti G, Hochegger B, Marchiori E. Infectious Diseases Causing Diffuse Alveolar Hemorrhage in Immunocompetent Patients: A State-of-the-Art Review. *Lung*. 2013 Feb 1;191(1):9–18.
5. Dupont H, Dupont-Perdrizet D, Perie JL, Zehner-Hansen S, Jarrige B, Daijardin JB. Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 1997 Sep;25(3):720–4.
6. Li JM, Li LM, Shi JF, Li T, Wang Q, Ma QX, et al. Prevalence of *Leptospira* in murine in China: A systematic review and meta-analysis. *Front Vet Sci*. 2022 Sep 29;9:944282.
7. Hagedoorn NN, Maze MJ, Carugati M, Cash-Goldwasser S, Allan KJ, Chen K, et al. Global distribution of *Leptospira* serovar isolations and detections from animal host species: A systematic review and online database. *Tropical Medicine & International Health* [Internet]. [cited 2024 Mar 6];n/a(n/a). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tmi.13965>
8. Ricardo T, Azócar-Aedo L, Signorini M, Previtali MA. Leptospiral infection in domestic cats: Systematic review with meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*. 2023 Mar 1;212:105851.
9. Esteves SB, Gaeta NC, Batista JMN, Dias RA, Heinemann MB. *Leptospira* sp. infection in bats: A systematic review and meta-analysis. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2022;69(5):e2456–73.
10. Browne ES, Calfe JLR, Jesus ERSD, Zeppelini CG, Cremonese C, Costa F. A Systematic Review of the geographic distribution of pathogenic *Leptospira* serovars in the Americas, 1930-2017. *An Acad Bras Ciênc*. 2022 Sep 5;94:e20201026.
11. Arent Z, Pardyak L, Dubniewicz K, Płachno B, Kotula-Balak M. *Leptospira* taxonomy: then and now. *Medycyna Weterynaryjna*. 2022 Jan 1;78:6694–2022.
12. Adler B. History of Leptospirosis and *Leptospira*. In: Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015 [cited 2024 Mar 6]. p. 1–9.

(Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from:
https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_1

13. Schildkraut CL, Marmur J, Doty P. The formation of hybrid DNA molecules and their use in studies of DNA homologies. *Journal of Molecular Biology*. 1961 Oct 1;3(5):595-616.
14. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. - PMC [Internet]. [cited 2024 Mar 27]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC432104/>
15. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991 Jan;173(2):697–703.
16. Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, Steigerwalt AG, Mayer LW, Levett PN. Species-Specific Identification of Leptospiraceae by 16S rRNA Gene Sequencing. *J Clin Microbiol*. 2006 Oct;44(10):3510–6.
17. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019 May 23;13(5):e0007270.
18. Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance | *PLOS Neglected Tropical Diseases* [Internet]. [cited 2024 Mar 13]. Available from:
<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007374>
19. Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, Pfaller MA, Landry ML, Richter SS, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015 [cited 2024 Mar 15]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817381>
20. Abe K, Kuribayashi T, Takabe K, Nakamura S. Implications of back-and-forth motion and powerful propulsion for spirochetal invasion. *Scientific Reports*. 2020 Aug 18;10:13937.
21. Jorge S, Kremer FS, de Oliveira NR, Navarro G de OSV, Guimarães AM, Sanchez CD, et al. Whole-genome sequencing of *Leptospira interrogans* from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018 Feb;113(2):80–6.
22. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang YF, Zhang Y, Jiang X, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci Rep*. 2016 Feb 2;6(1):20020.
23. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Seventh edition, international edition. Philadelphia Baltimore New York London Buenos Aires Hong Kong Sydney Tokyo: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins; 2017. 1606 p.
25. Hsu SH, Yang CW. Insight into the Structure, Functions, and Dynamics of the *Leptospira* Outer Membrane Proteins with the Pathogenicity. *Membranes (Basel)*. 2022 Mar 7;12(3):300.

26. Murray GL, Srikrum A, Henry R, Hartskeerl RA, Sermswan RW, Adler B. Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Molecular Microbiology*. 2010;78(3):701–9.
27. Ghazaei C. Pathogenic *Leptospira*: Advances in understanding the molecular pathogenesis and virulence. *Open Vet J*. 2018;8(1):13–24.
28. Terpstra WJ. Typing leptospira from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leiden*. 1992;60(2):79–87.
29. Serological Studies on British Leptospiral Isolates of the Sejroe Serogroup: I. The Identification of British Isolates of the Sejroe Serogroup by the Cross Agglutinin Absorption Test on JSTOR [Internet]. [cited 2024 Mar 27]. Available from: <https://www.jstor.org/stable/3863218>
30. Dikken H, Kmety E. Chapter VIII Serological Typing Methods of Leptospirae. In: Bergan T, Norris JR, editors. *Methods in Microbiology* [Internet]. Academic Press; 1978 [cited 2024 Mar 26]. p. 259–307. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951708704938>
31. Lam JY, Low GKK, Chee HY. Diagnostic accuracy of genetic markers and nucleic acid techniques for the detection of *Leptospira* in clinical samples: A meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2020 Feb 12;14(2):e0008074.
32. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiology*. 2006 Oct 27;6(1):95.
33. La Scola B, Bui LTM, Baranton G, Khamis A, Raoult D. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiology Letters*. 2006 Oct 1;263(2):142–7.
34. Conservation of the S10-spc- α Locus within Otherwise Highly Plastic Genomes Provides Phylogenetic Insight into the Genus *Leptospira* | PLOS ONE [Internet]. [cited 2024 Mar 27]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002752>
35. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Sep 17;9(9):e0003898.
36. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Oct 2;9(10):e0004122.
37. Leptospirosis | CDC Yellow Book 2024 [Internet]. [cited 2024 Mar 16]. Available from: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/leptospirosis#epi>
38. Minter A, Costa F, Khalil H, Childs J, Diggle P, Ko AI, et al. Optimal Control of Rat-Borne Leptospirosis in an Urban Environment. *Front Ecol Evol* [Internet]. 2019 Jun 19 [cited 2024 Mar 19];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2019.00209>

39. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003 Dec;3(12):757–71.
40. De Brito T, da Silva AMG, Abreu PAE. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018 May 28;60:e23.
41. Healthcare Workers | Leptospirosis | CDC [Internet]. 2023 [cited 2024 Mar 19]. Available from: https://www.cdc.gov/leptospirosis/health_care_workers/index.html
42. Hamond C, Martins G, Bremont S, Medeiros MA, Bourhy P, Lilenbaum W. Predominance of *Leptospira interrogans* serovar Bratislava DNA in vaginal fluid of mares suggests sexual transmission of leptospirosis. *Animal Reproduction Science*. 2014 Dec 30;151(3):275–9.
43. Koe SLL, Tan KT, Tan TC. Leptospirosis in pregnancy with pathological fetal cardiocography changes. *Singapore Med J*. 2014 Feb;55(2):e20–4.
44. Wasiński B, Dutkiewicz J. Leptospirosis--current risk factors connected with human activity and the environment. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(2):239–44.
45. Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Research and Reports in Tropical Medicine*. 2016 Sep 28;7:49–62.
46. Kamath R, Swain S, Pattanshetty S, Nair NS. Studying Risk Factors Associated with Human Leptospirosis. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2014 Mar;6(1):3.
47. Sugunan AP, Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sehgal SC. Percutaneous exposure resulting in laboratory-acquired leptospirosis -- a case report. *J Med Microbiol*. 2004 Dec;53(Pt 12):1259–62.
48. Nardone A, Capek I, Baranton G, Campèse C, Postic D, Vaillant V, et al. Risk factors for leptospirosis in metropolitan France: results of a national case-control study, 1999-2000. *Clin Infect Dis*. 2004 Sep 1;39(5):751–3.
49. Benacer D, Thong KL, Min NC, Verasahib KB, Galloway RL, Hartskeerl RA, et al. Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004–2012. *Acta Tropica*. 2016 May 1;157:162–8.
50. Bradley EA, Lockaby G. Leptospirosis and the Environment: A Review and Future Directions. *Pathogens*. 2023 Sep 16;12(9):1167.
51. Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, et al. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. *Rev Panam Salud Publica*. 2020 Jul 15;44:e78.
52. Dechet AM, Parsons M, Rambaran M, Mohamed-Rambaran P, Florendo-Cumbermack A, Persaud S, et al. Leptospirosis Outbreak following Severe Flooding: A Rapid Assessment and Mass Prophylaxis Campaign; Guyana, January–February 2005. *PLoS One*. 2012 Jul 9;7(7):e39672.

53. Shaikh OA, Azam U, Naseem MU, Ochani S, Hasibuzzaman MdA, Ullah K. Outbreak of leptospirosis amidst COVID'19 in Tanzania: a new threat? Short communication. *Ann Med Surg (Lond)*. 2023 Apr 25;85(5):2287–8.
54. Chopra H, Bibi S, Aggarwal N, Singh I, Jose J, Emran TB. Leptospirosis: Recent outbreak and control measures. *International Journal of Surgery*. 2022 Oct 1;106:106907.
55. Akash S, Zaman NN, Rahman MdM. Recent leptospirosis outbreak: an urgent warning around the globe, genomic features, diagnosis, and treatment procedures—correspondence. *Int J Surg*. 2023 Mar 3;109(3):622–3.
56. Investigation and response to a large outbreak of leptospirosis in field workers in Lower Saxony, Germany - Dreesman - 2023 - Zoonoses and Public Health - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2024 Mar 20]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/zph.13027>
57. Rajapakse S. Leptospirosis: clinical aspects. *Clinical Medicine*. 2022 Jan;22(1):14.
58. Pavli A, Maltezou HC. Travel-acquired leptospirosis. *J Travel Med*. 2008;15(6):447–53.
59. Carvalho CRR, Bethlem EP. Pulmonary complications of leptospirosis. *Clinics in Chest Medicine*. 2002 Jun 1;23(2):469–78.
60. Segura ER, Ganoza CA, Campos K, Ricaldi JN, Torres S, Silva H, et al. Clinical Spectrum of Pulmonary Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity, with Quantification of Leptospiral Burden. *Clin Infect Dis*. 2005 Feb 1;40(3):343–51.
61. Puliyaath G, Singh S. Leptospirosis in pregnancy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Oct;31(10):2491–6.
62. Zhao H, Dai Y, Zhou YH. Overview of infection causing hepatitis other than non-A to E hepatitis virus during pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2020 Oct 1;68:89–102.
63. Shaked Y, Shpilberg O, Samra D, Samra Y. Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993 Aug;17(2):241–3.
64. Carles G, Montoya E, Joly F, Peneau C. [Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 1995;24(4):418–21.
65. Pinto GV, Senthilkumar K, Rai P, Kabekkodu SP, Karunasagar I, Kumar BK. Current methods for the diagnosis of leptospirosis: Issues and challenges. *Journal of Microbiological Methods*. 2022 Apr 1;195:106438.
66. Musso D, La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2013 Aug 1;46(4):245–52.
67. Budihal SV, Perwez K. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. *J Clin Diagn Res*. 2014 Jan;8(1):199–202.

68. Schreier S, Doungchawee G, Chadsuthi S, Triampo D, Triampo W. Leptospirosis: current situation and trends of specific laboratory tests. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013 Mar;9(3):263–80.
69. Yang B, de Vries SG, Ahmed A, Visser BJ, Nagel IM, Spijker R, et al. Nucleic acid and antigen detection tests for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Aug 1;2019(8):CD011871.
70. Qadir N, Sahetya S, Munshi L, Summers C, Abrams D, Beitler J, et al. An Update on Management of Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome: An Official American Thoracic Society Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*. 209(1):24–36.
71. Andrade L, Cleto S, Seguro AC. Door-to-dialysis time and daily hemodialysis in patients with leptospirosis: impact on mortality. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 Jul;2(4):739–44.
72. Fonseka CL, Lekamwasam S. Role of Plasmapheresis and Extracorporeal Membrane Oxygenation in the Treatment of Leptospirosis Complicated with Pulmonary Hemorrhages. *J Trop Med*. 2018 Dec 2;2018:4520185.
73. Wylie J a. H, Vincent E. The sensitivity of organisms of the genus leptospira to penicillin and streptomycin. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1947;59(1–2):247–54.
74. Ressler RA, Griffith ME, Beckius ML, Pimentel G, Miller RS, Mende K, et al. Antimicrobial Susceptibilities of Geographically Diverse Clinical Human Isolates of *Leptospira*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Aug;52(8):2750–4.
75. Murray CK, Hospenthal DR. Determination of Susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. Serovars to 24 Antimicrobial Agents by a Broth Microdilution Technique. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Oct;48(10):4002–5.
76. Murray CK, Hospenthal DR. Broth Microdilution Susceptibility Testing for *Leptospira* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 May;48(5):1548–52.
77. Suputtamongkol Y, Niwattayakul K, Suttinont C, Losuwanaluk K, Limpaboon R, Chierakul W, et al. An Open, Randomized, Controlled Trial of Penicillin, Doxycycline, and Cefotaxime for Patients with Severe Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Nov 15;39(10):1417–24.
78. Phimda K, Hoontrakul S, Suttinont C, Chareonwat S, Losuwanaluk K, Chueasuwanchai S, et al. Doxycycline versus Azithromycin for Treatment of Leptospirosis and Scrub Typhus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Sep;51(9):3259–63.
79. Guzmán Pérez M, Blanch Sancho JJ, Segura Luque JC, Mateos Rodríguez F, Martínez Alfaro E, Solís García del Pozo J. Current Evidence on the Antimicrobial Treatment and Chemoprophylaxis of Human Leptospirosis: A Meta-Analysis. *Pathogens*. 2021 Sep 2;10(9):1125.
80. Dhakal A, Sbar E. Jarisch-Herxheimer Reaction. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2023 [cited 2024 Mar 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557820/>

81. Guerrier G, Lefèvre P, Chouvin C, D'Ortenzio E. Jarisch–Herxheimer Reaction Among Patients with Leptospirosis: Incidence and Risk Factors. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Apr 5;96(4):791–4.
82. Sehgal SC, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Vijayachari P. Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *Int J Antimicrob Agents.* 2000 Feb;13(4):249–55.
83. Takafuji ET, Kirkpatrick JW, Miller RN, Karwacki JJ, Kelley PW, Gray MR, et al. An Efficacy Trial of Doxycycline Chemoprophylaxis against Leptospirosis. *New England Journal of Medicine.* 1984 Feb 23;310(8):497–500.
84. Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microb Cell Fact.* 2007 Dec 11;6:39.
85. Sonada RB, Azevedo SS de, Soto FRM, Costa DF da, Morais ZM de, Souza GO de, et al. Efficacy of leptospiral commercial vaccines on the protection against an autochthonous strain recovered in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2018 Apr 1;49(2):347–50.
86. Sant'Anna da Costa R, Di Azevedo MIN, dos Santos Baptista Borges AL, Aymée L, Martins G, Lilenbaum W. Effect of Vaccination against *Leptospira* on Shelter Asymptomatic Dogs Following a Long-Term Study. *Animals (Basel).* 2022 Jul 12;12(14):1788.
87. Azevedo IR, Amamura TA, Isaac L. Human leptospirosis: In search for a better vaccine. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2023;98(5):e13316.
88. García-Peña GE, Rubio AV, Mendoza H, Fernández M, Milholland MT, Aguirre AA, et al. Land-use change and rodent-borne diseases: hazards on the shared socioeconomic pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2021 Sep 20;376(1837):20200362.
89. Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL, Upham NS. How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy.* 2018 Feb 1;99(1):1–14.
90. Wood AE. A Revised Classification of the Rodents. *Journal of Mammalogy.* 1955 May 1;36(2):165–87.
91. Nowak RM. *Walker's Mammals of the World.* JHU Press; 1999. 930 p.
92. Bordes F, Blasdel K, Morand S. Transmission ecology of rodent-borne diseases: New frontiers. *Integrative Zoology.* 2015;10(5):424–35.
93. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology.* 2009 Aug 1;35(3):221–70.
94. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006 Aug;1(2):581–5.
95. Zuerner RL, Hartskeerl RA, van de Kemp H, Bal AE. Characterization of the *Leptospira interrogans* S10-spc- α operon. *FEMS Microbiology Letters.* 2000 Jan 1;182(2):303–8.

96. Fonseca C de A, Teixeira MMG, Romero EC, Tengan FM, Silva MV da, Shikanai-Yasuda MA. *Leptospira* DNA detection for the diagnosis of human leptospirosis. *Journal of Infection*. 2006 Jan 1;52(1):15–22.
97. Gravekamp C, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJ, et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J Gen Microbiol*. 1993 Aug;139(8):1691–700.
98. Cai HY, Hornby G, Key DW, Osuch MR, Maxie MG. Preliminary study on differentiation of *Leptospira grippotyphosa* and *Leptospira sejroe* from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest*. 2002 Mar;14(2):164–8.
99. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021 Jul 1;38(7):3022–7.
100. Felsenstein J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. *Evolution*. 1985 Jul;39(4):783–91.
101. Jukes TH, Cantor CR. CHAPTER 24 - Evolution of Protein Molecules. In: Munro HN, editor. *Mammalian Protein Metabolism* [Internet]. Academic Press; 1969 [cited 2024 Jul 3]. p. 21–132. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781483232119500097>
102. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, et al. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014 Aug;11(8):7562–74.
103. Krøjgaard LH, Villumsen S, Markussen MDK, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiology & Infection*. 2009 Nov;137(11):1586–92.
104. Hamond C, Browne AS, de Wilde LH, Hornsby RL, LeCount K, Anderson T, et al. Assessing rodents as carriers of pathogenic *Leptospira* species in the U.S. Virgin Islands and their risk to animal and public health. *Sci Rep*. 2022 Jan 21;12(1):1132.
105. Esfandiari B, Pourshafie MR, Gouya MM, Khaki P, Mostafavi E, Darvish J, et al. An epidemiological comparative study on diagnosis of rodent leptospirosis in Mazandaran Province, northern Iran. *Epidemiol Health*. 2015 Feb 23;37:e2015012.
106. Mustafa Sunbul SE Hakan Leblebicioglu, Murat Hokelek, Ayhan Pekbay, Cafer Eroglu. *Rattus Norvegicus* Acting as Reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea Region of Turkey, as Evidenced by PCR and Presence of Serum Antibodies to *Leptospira* Strain. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2001 Jan;33(12):896–8.
107. Boey K, Shiokawa K, Rajeev S. *Leptospira* infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Aug 9;13(8):e0007499.
108. Ali N, Rampazzo RDCP, Costa ADT, Krieger MA. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*. 2017;2017:1–13.

109. Alinaitwe L, Aturinda CJ, Lubega A, Kivali V, Bugeza J, Wainaina M, et al. Cross-sectional serosurvey of *Leptospira* species among slaughter pigs, goats, and sheep in Uganda. *PLoS Negl Trop Dis*. 2024 Mar;18(3):e0012055.
110. Ricardo T, Bazán Domínguez LR, Beltramini L, Prieto Y, Montiel A, Margenet L, et al. Seroprevalence of *Leptospira* antibodies in dogs and cats from Santa Fe, a city in East-Central Argentina endemic for leptospirosis. *Prev Vet Med*. 2024 May 29;229:106239.
111. Ulsenheimer BC, Dos Santos MY, Della Flora B, Matarrita DAR, de Avila Botton S, Von Laer AE, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. in unconventional pets. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2024 May;108:102158.
112. Ramos-Vázquez JR, Sánchez-Montes S, Esparza-González SC, Romero-Salas D, Pardo-Sedas V, Estrada-Coates AT, et al. Isolation and molecular identification of *Leptospira santarosai* and *Leptospira interrogans* in equines from eastern Mexico. *Acta Trop*. 2024 Aug;256:107242.
113. Macchi MV, Suanes A, Salaberry X, Dearmas BE, Rivas E, Piaggio J, et al. Leptospirosis as a cause of infertility in Uruguayan beef cattle. *Prev Vet Med*. 2024 Jul;228:106227.
114. Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, et al. Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Jun;78(6):957–61.
115. Gökmen TG, Soyal A, Kalayci Y, Önlü C, Köksal F. COMPARISON OF 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR AND OmpL1-PCR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2016 Sep 22;58:64.
116. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Oct;7(10):736–47.
117. Mohammed H, Nozha C, Hakim K, Abdelaziz F. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. *J Bacteriol Parasitol* [Internet]. 2011 [cited 2024 Jun 23];02(06). Available from: <https://www.omicsonline.org/leptospira-morphology-classification-and-pathogenesis-2155-9597.1000120.php?aid=1997>
118. 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 Sep 18;4(9):e7093.
119. Stone NE, Hall CM, Ortiz M, Hutton SM, Santana-Propper E, Celona KR, et al. Diverse lineages of pathogenic *Leptospira* species are widespread in the environment in Puerto Rico, USA. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 May 18;16(5):e0009959.
120. Ahmed N, Devi SM, de los Á Valverde M, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2006 Nov 23;5(1):28.
121. Garcia-Lopez M, Lurier T, Bouilloud M, Pradel J, Tatard C, Sepulveda D, et al. Prevalence, genetic diversity and eco-epidemiology of pathogenic *Leptospira* species in

- small mammal communities in urban parks Lyon city, France. PLoS One. 2024 Apr 10;19(4):e0300523.
122. Cetin BD, Harmankaya O, Hasman H, Gunduz A, Oktar M, Seber E. Acute renal failure: a common manifestation of leptospirosis. Ren Fail. 2004 Nov;26(6):655–61.
 123. White FH, Sutherland GE, Raynor LE, Cottrell CR, Sulzer KR. *Leptospira interrogans* serovars hardjo and pomona: causes of infections in dairy cows and humans in Florida. Public Health Rep. 1981;96(3):250–4.
 124. Petakh P, Kamyshnyi O. AMR mechanisms in *L. interrogans* serovars: a comprehensive study. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2024 Apr 11 [cited 2024 Jul 3];14. Available from: <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2024.1384427/full>
 125. Suepaul SM, Carrington CVF, Campbell M, Borde G, Adesiyun AA. Serovars of *Leptospira* isolated from dogs and rodents. Epidemiol Infect. 2010 Jul;138(7):1059–70.
 126. Woolf D, Sanchez C, Gonzalez-Astudillo V, Navarro M, Tapia CC, Franco M, et al. LEPTOSPIRA SPECIES STATUS OF CAPTIVE NONHUMAN PRIMATES AND FREE-RANGING RODENTS AT THE BARRANQUILLA ZOO, COLOMBIA, 2013. J Zoo Wildl Med. 2021 Jan;51(4):780–8.
 127. Aslantaş Ö, Özdemir V, Kiliç S, Babür C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. Veterinary Parasitology. 2005 May 15;129(3):187–91.
 128. Sağlam YS, Yildirim S, Ozkaraca M, Altun S. Investigation of leptospiral antigen with immunohistochemical and immunofluorescence methods in cattle kidney. Microbial Pathogenesis. 2022 Mar 1;164:105434.
 129. Sakmanoğlu A, Uslu A, Sayın Z, Gölen GS, İlban A, Padron-Perez B, et al. A one-year descriptive epidemiology of zoonotic abortifacient pathogen bacteria in farm animals in Turkey. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2021 Aug 1;77:101665.
 130. Yeni DK, Balevi A, Ashraf A, Shah Ms, Büyük F. Molecular detection of bacterial zoonotic abortive agents from ruminants in Turkey. Braz J Microbiol. 2024 Jun 1;55(2):1997–2004.
 131. Azkur AK, Kaygusuz S, Aslan ME, Gazyağci S, Gözütok S, Toyran K. A survey study on hantavirus, cowpox virus, and *Leptospira* infections in *Microtus hartingi* in Kırşehir Province, Central Anatolia, Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2013;37:434–42.

8. EKLER

8.1. Ek 1. Etik Kurul Onayı

 DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/Toplantı No/Yıl : 02/12/2023
Toplantı Tarihi : 14 Haziran 2023

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Sayın, Araş. Gör. Dr. Berken GÜR
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

30/2023 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Doğu Anadolu ve Orta Anadolu Bölgesindeki Bazı İllerde Doğal Yaşam Kemiricilerinde Patojenik Leptospira Türlerinin Varlığının Araştırılması" isimli: [Redacted] in araştırmacı olduğu projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca görülmediğine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

[Redacted] Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	[Redacted] Başkan Vekili
[Redacted] Üye	[Redacted] Üye
[Redacted] Üye	[Redacted] Danışman/
[Redacted] Üye	[Redacted] Üye
[Redacted] Üye	[Redacted] Üye
[Redacted] Üye	[Redacted] Üye
[Redacted] Üye	[Redacted] Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.