

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDE PZR – RFLP (POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU – RESTRİKSİYON BÖLÜMÜNÜN UZUNLUK
DEĞİŞKENLİĞİ) YÖNTEMİ KULLANILARAK *LEISHMANIA*
PARAZİTLERİNİN TÜR TAYİNİ**

Parazitoloji Anabilim Dalı Programı
Doktora Tezi

Tıp Doktoru
Koray GÜNEŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ

İZMİR
2006

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDE PZR – RFLP (POLİMERAZ ZİNCİR
REAKSİYONU – RESTRİKSİYON BÖLÜMÜNÜN UZUNLUK
DEĞİŞKENLİĞİ) YÖNTEMİ KULLANILARAK *LEISHMANIA*
PARAZİTLERİNİN TÜR TAYİNİ**

Parazitoloji Anabilim Dalı Programı
Doktora Tezi

Tıp Doktoru
Koray GÜNEŞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ

İZMİR
2006

Gözbebeklerim Arya ve Sonat'a...

Bu alışma Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı'nın
2003/TIP/017 numaralı projesince desteklenmiştir.

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. M. Ziya ALKAN

.....

Üye : Prof.Dr. Selda ERENŞOY

.....

Üye : Prof.Dr. Sema ERTUĞ

.....

Üye : Prof.Dr. Yusuf ÖZBEL

.....

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

.....

ÖNSÖZ

Parazit infeksiyonlarının klinikte çalışan hekimler tarafından yeterince iyi bilinmemesi, tanı koyarken ve ayırıcı tanıya gitmek gereken durumlarda en son akla gelmelerine, bazen de hiç akla gelmemelerine sebep ola gelmiştir. Parazit hastalıkları genellikle sadece gastro intestinal sistemde yerleşenler ile sınırlı olarak algılanmakta, kan ve dokuda yerleşen parazitlerden sıtma etkeni olan *Plasmodium*'ların dışında kalanlar için herhangi bir eradikasyon çalışması uygulanmadığı için bu parazitler hastaları etkilemeye devam etmektedirler. Bunlardan ülkemiz için hiç de yeni olmayan *Leishmania* parazitlerinin yol açtığı hastalıklar dünyada önemli miktarda insanı etkilemeyi sürdürürken, ülkemizde de son yıllarda kullanılmaya başlanan gelişmiş yöntemler sayesinde daha iyi tanınır olmuş, bir yandan da bu alanda yapılan çalışmaların artmaya başlamasıyla klinikte çalışan hekimlere de daha ayrıntılı bilgiler sunulur hale gelmiştir. Bu çalışma, tanı alanında daha ayrıntılı bilgi edinme arzusu, bu bilginin tedavi düzenlenirken daha etkin seçimler yapılmasına yardım edeceği bilgi ve beklentisi, daha da önemlisi, gün geçtikçe bu gruptaki hastalıklara farklı bölgelerde rastlanıyor olması nedeniyle elde edilmesi zorunlu hale gelen epidemiyolojik bilgiler ve bunların gelecekteki yaklaşımlara ışık tutması motivasyonu ile tasarlanmıştır.

Bu noktada doktora tezi yolculuğuna çıktığım ilk andan itibaren yalnızca engin bilgi ve deneyimiyle yoluma ışık tutmakla kalmayıp, bunun da ötesine geçerek, her zaman bir abla ve meslektaş tevazusu içinde objektif yaklaşımını profesyonellikle yoğurarak çalışmalarımda istikrarlı olmama yardım eden danışmanım Prof. Dr. Seray Özensoy Töz' e şükranlarımı sunarken; bütün süreç boyunca hiç bir yardımı esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf Özbel'e; getirdiği farklı açılımlarla çalışmamın temellerini sağlamlaştırmamda yardımcı olan, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Selda Erensoy'a; eğitimim boyunca yetişmemde katkısı ve emekleri bulunan tüm Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Farklı ve objektif bir göz olarak yardımlarıyla bana destek olan kadim dostlarım Uz. Dr. Aydın İlker Alp ve Av. Füsün Singi'ye; en önemlisi tüm doktora eğitimim ve elbette tez çalışmaları sürecim boyunca karşılık beklemeyen sevgisi, desteği ve kocaman kalbiyle yanımda duran eşim Uz. Dr. Nurece Güneş'e teşekkürlerimi sunarım.

En büyük dileğim bu çalışmadan aynı hastalık grubu ile ilgilenen başka araştırmacıların da yararlanabilmeleridir.

İzmir, 26.08.2006

Dr. Koray GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	5
2.2. PARAZİT	14
2.2.1. Morfoloji Ve Taksonomi	14
2.2.2. Parazitin Yaşam Döngüsü	16
2.3. VEKTÖR.....	19
2.3.1. Kum Sineği Örneklerinin Toplanması ve Saklanması ...	24
2.3.2. Kum sineklerinden Korunma ve Kontrol	25
2.4. REZERVUAR	26
2.5. EPİDEMİYOLOJİ	31
2.5.1. Dünyada Leishmaniasis	31
2.5.2. Türkiye’de Leishmaniasis	40
2.6. LEİSHMANİASİS’İN KLİNİK FORMLARI	43
2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis	43
2.6.2. Mukokutanöz Leishmaniasis	47
2.6.3. Visseral Leishmaniasis (Kala-Azar)	49
2.7. MOLEKÜLER DÜZEYDE PATOGENEZ	53
2.7.1. Konaktaki gelişim ve çoğalma	53
2.7.2. Vektördeki gelişim ve çoğalma	55
2.8. PATOLOJİ	56

2.9. TANI	59
2.9.2. Parazit DNA'sının gösterilmesi.....	62
2.9.3. İmmunolojik yöntemler.....	64
2.9.3.1. Antijen saptama	64
2.9.3.2. Antikor saptama	65
2.9.3.3. Leishmanin deri testi.....	69
2.10. TÜRLERİN VE ALT TÜRLERİN SAPTANMASI.....	70
2.10.1. İzoenzim Analizi	71
2.10.2. Ekskresyon Faktörü (EF)	72
2.10.3. DNA'ya dayalı yöntemler	72
2.10.3.1. Klasik yöntemler; hibridizasyon ve restriksiyon: .	72
2.10.3.2. PZR'na dayalı yöntemler:	74
2.10.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	74
2.10.3.2.2. Restriction Fragment Length Polymorphism	
Analizi	78
2.11. TEDAVİ.....	84
2.11.1. Kala – Azar.....	84
2.11.1. Şark Çıbanı ve mukokütanöz hastalık.....	87
2.12. KORUNMA	92
2.12.1. Vektör kontrolü	92
2.12.2. Aşı.....	95
2.12.3. Kontrol Programları	95
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	97

3.1. ÖRNEKLER.....	97
3.2. YÖNTEMLER.....	97
3.2.1. Promastigotların Çoğaltılması.....	97
3.2.2. Promastigotların toplanması	99
3.2.3. DNA Ekstraksiyonu	100
3.2.4. PZR Amplifikasyonu.....	105
3.2.5. Agaroz jel elektroforezi	109
3.2.6. RFLP analizi	112
4. BULGULAR	116
4.1. ITS-PZR	116
4.1.1. İzolatlardan elde edilen ITS dizilerinin RFLP analizi ...	116
4.1.2. Varsayımsal RFLP analizi	119
5. TARTIŞMA	121
6. SONUÇ	136
7. ÖZET	137
8. KAYNAKLAR.....	140
ÖZGEÇMİŞ.....	167

ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

Resim 1. Peru' da bulunan insan kafası şeklinde çanak	6
Resim 2. <i>Leishmania</i> parazitinin ilk isim babaları	9
Resim 3. Ekrem Kadri Unat	13
Resim 4. Amastigot ve promastigotlar	15
Resim 5. Parazitin yaşam döngüsü	17
Resim 6. Promastigot'un makrofaja girişi	18
Resim 7. Kum sineğinin erkeği ve dişi	20
Resim 8. Kum sineği cinslerinin dünya üzerindeki dağılımı	23
Resim 9. <i>Phlebotomus</i> yakalamada tuzakları	25
Resim 10. Köpeklerdeki leishmaniasisin dağılımı	30
Resim 11. Dünya'da leishmaniasis	33
Resim 12. Türkiye'de leishmaniasis ve klinik formları	42
Resim 13. KL	44
Resim 14. MKL ve komplikasyonları	47
Resim 15. VL	50
Resim 16. ITS operonu; 950-1130 bp	105
Resim 17. VL olgularında ITS-PZR-RFLP sonuçları	116
Resim 18. KL olgularında ITS-PZR-RFLP sonuçları	117
Resim 19. Varsayımsal RFLP modelleri	120

Tablo 1. Bölgelere göre immunokompetan hastalarda visseral leishmaniasis için seçilen tedavi şekilleri (Murray ve arkadaşlarından).....	89
Tablo 2. Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların sık görülen yan etkileri (Murray ve arkadaşlarından).....	90
Tablo 3. Kutanöz ve mukokutanöz leishmaniasis için seçilmiş tedavi rejimleri (Murray ve arkadaşlarından).....	91
Tablo 4. Çalışmaya Alınan İzolatlar.....	98
Tablo 5. ITS-PZR için Master miks	107
Tablo 6. ITS-PZR protokolü.....	108
Tablo 7. ITS-RFLP analizinin MM hazırlanışı.....	..107

1. GİRİŞ

Leishmaniasis antrozo-zoonotik kökenli bir infeksiyondur. Gerçekte insan için kendi türdeşlerinden ya da diğer canlılardan edindiği bir çok infeksiyon hastalığından biridir. Ancak dünya üzerinde görülen tropikal hastalıklar içinde, risk altında bıraktığı nüfusun kalabalıklığı ile önde gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verileri her yıl 350 milyon insanın bu hastalığa herhangi bir şekilde yakalanma riskiyle karşı karşıya kaldığını bildirmektedir. Yerkürenin belirli bir iklim kuşağını yakından ilgilendiren bu hastalık, daha çok yoksul insanları tehdit etmesi nedeniyle, belki de hak ettiği ilgiyi yeterince görememektedir. Özellikle gelişmiş ülkeler açısından bakıldığında; geçmişte öncelikle diğer ülkeleri ziyaret eden vatandaşları nedeniyle önem kazanan hastalık, geçen yüzyılın son dekatlarında tüm dünyanın korkulu rüyası haline gelen, edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromu (AIDS) ile yaptığı adeta "işbirliği" sayesinde, batılı ülkelerin ilgisini daha da çok çekmeye başlamıştır. Böylece uzun yıllardır yalnız başlarına ve olmayan kaynaklarla hastalık mücadelesini yürütmeye çalışan yoksul ülkeler, soruna Dünya Sağlık Örgütü'nün el koyması sonucu, yanlarına gelişmiş ülkeleri de alarak hastalıkla mücadelede yeni bir sürece başlamışlardır.

Daha önceleri Türkiye’de belirli bölgesel odakların hastalığı ve sorunu durumunda olan leishmaniasis, teknolojinin gelişmesi ve ülkemize transferinin doğal bir sonucu olarak artan insan ilişkileri, gelişen yolculuk olanakları, ülkenin barındırdığı kendine özgü sosyo-politik ve demografik koşullar, bunların yıllar boyunca durmaksızın değişmesi ve son yıllarda yer küremizin maruz kaldığı göz ardı edilemeyecek ölçüde iklim değişikliklerinden topraklarımızın aldığı pay sonucunda yeni odaklarla kendini göstermeye başlamış; bu durum bu güne dek hastalıkla savaşta tutulmuş olan geleneksel yolun tekrar gözden geçirilmesine sebep olmuştur. Özellikle biyolojik bilimlerde ortaya çıkan ve halen sürmekte olan baş döndürücü gelişmeler, tüm diğer hastalıklarda olduğu gibi, leishmaniasiste de yeni yöntem ve araçların kullanılarak, yeni mücadele stratejilerinin tutulmasını sağlamıştır. Bu bağlamda moleküler biyolojik yöntemlerin tıp alanına tanıtılması, tedavi, izlem ve korunma konularında getirdiği yenilikler tartışılmaz olmuştur. Bu araçların kullanılmasıyla elde edilecek yeni bilgiler ülkemiz halkına sunulacak sağlık hizmetlerindeki kaliteyi artıracak, leishmaniasisten etkilenen hastalar ve risk altındaki topluluklar, bu hizmetten yeni araçlar kullanılarak daha etkin bir şekilde yararlanabileceklerdir.

Leishmaniasisin etyolojik olarak ileri düzeyde değerlendirilmesi, değişen epidemiyolojik verilerin ortaya çıkarılması, daha önce tanısız olarak uygulanmayan tür ve alt tür farklılıklarının ortaya konulması; özellikle Ege bölgesi, Şanlıurfa ve Orta Anadolu bölgelerinde hastalığa neden olan parazitlerin ve dağılımlarının moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak incelenmesi, bunların kendi aralarındaki etkileşimlerin kısmen de olsa değerlendirilmesi, bu çalışmanın ilerleyen bölümlerinde incelenecektir. Bunların sonucunda kazanılacak yeni bilgilerle tanı alanında var olandan bir adım ileriye gidilerek, tür düzeyinde bilgi edinmek, elde edilen bilgilerin klinik alanlara sunulması ve eldeki epidemiyolojik verilere "moleküler-epidemiyolojik" yöntemleri kullanarak katkı sağlamak bu çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

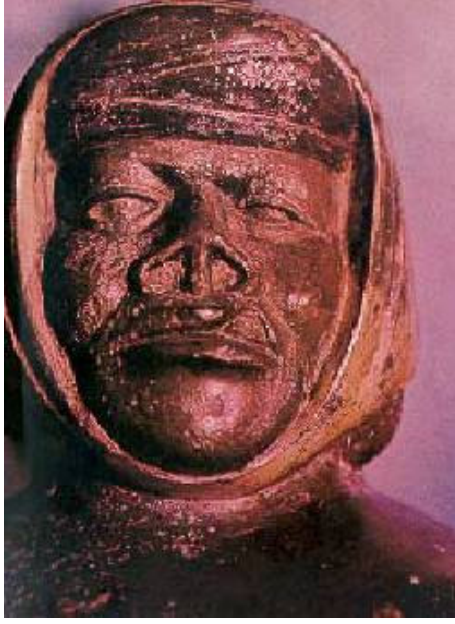
2. GENEL BİLGİLER

Leishmania paraziti bir çok türü ve alt türü olan, hem insanlarda hem de hayvanlarda hastalık oluşturabilen, ancak kendi başına hasta organizmadan bir diğerine geçip infekte etme yeteneği olmayan, bu yolu kat etmek için de bir başka canlıya ihtiyaç duyan; yani bütün yaşamını parazit olarak geçiren bir mikroorganizmadır. *Leishmania* paraziti oldukça geniş yelpazedeki bir omurgalı grubunu infekte eder. Aslına bakılırsa, böyle bir yaşam sürecini tutmuş olan

canlılar için varlığını ve türünü sürdürmek oldukça zordur. Çünkü her şeyden önce jenerasyonun devamı için başka türde canlılara ihtiyaç duyarlar. Serbest yaşayarak türünün devamını sağlamak gibi bir şansı yoktur. Bir memelide yerleşerek beslenme ve çoğalma şansını bulduysa bile, bu yerleşme biçiminin sonucu o memeli için enfeksiyondur. Bunun anlamı ya konak, ya da parazit eninde sonunda yok olacak; ya da hem besin, hem de 'mekan' kaynağı görevini yerine getiren memelinin yaşam kalitesi gittikçe düşecek demektir. Jenerasyonun devamı için bir organizmadan diğerine geçme şansını yakaladığında, bu şansı ona tanıyan, beslenmek için o memeliden kan emmek üzere orada bulunan bir tür kanatlıdır. Esasen kendisi de o memeli için 'ektoparazit' olan bu kanatlının orada bulunuşu, *Leishmania* açısından baktığımızda tamamıyla rastlantısaldır. Bu durum jenerasyonun devamlılığının bir rastlantılar zincirine bağımlı olduğunu gösterir. Sömürdüğü memeliden ayrılma şansını yakalamış olan parazit jenerasyonu için, kanatlının vücudunda yoğun çalışma ile geçen bir kolonizasyon döneminin ardından, yine kendi seçmediği bir memelide yeniden yerleşmek ve enfeksiyon oluşturarak adeta "bindiği dalı kesmek" şansı doğar. Ancak kanatlı kan emerek beslenmek üzere parazitin adaptasyonunun güç olacağı bir konak seçerse, bundan daha büyük bir şanssızlık olamaz. Bu seçim belki de o jenerasyonun sonu olacaktır. Gerçekten de, bir parazit için hayat kolay değildir...

2.1. TARİHÇE

Aslında leishmaniasis yaşlı gezegenimiz için çok da yeni bir hastalık değildir. Güney Amerika'da, özellikle de Peru ve Ekvador'da M.S. 1. yüzyıla ait çömleklerde, pre-Kolombiya dönemine ait bazı çömlekler üzerine çizilmiş desenlerde, Peru'daki "Moche" çanaklarında, binlerce yıl öncesine ait bazı insan kafataslarında deri leishmaniasisinin o zamanlar da var olduğunu güçlü bir şekilde düşündüren bir takım kanıtlara rastlanmıştır (27,78,144). Inca'lardan kalma 15.-16. yüzyıllara ait yazıtlarda hastalıktan söz edilmekte, daha sonraki İspanyol işgali zamanında kaleme alınmış bazı belgelerde de, And dağlarından dönen mevsimlik tarım işçilerinde görülen bir takım deri lezyonlarından söz edilmekte, bu hastalığa "Vadi Hastalığı" veya "And Hastalığı" gibi isimler verildiği anlatılmaktadır. Daha sonra hastalardaki bu görünüm; lezyonların burun ve ağız çevresindeki yerleşimleri ve lepraya benzer görünüşleri nedeniyle "Beyaz Cüzzam" diye isimlendirilmiştir (77). Hastalık Orta ve Doğu Afrika ile Asya'da, en azından 18. yüzyıl ortalarından bu yana bilinmektedir (144).



Resim 1. Peru’ da bulunan insan kafası şeklinde çanak (DSÖ’nün internet sitesinden)

Öte yandan leishmaniasisin M.Ö. 650 yılları civarında Mezopotamya’da var olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Üstelik bulguların daha eskiye ait olma olasılığı hiç de zayıf değildir. Hastalık M.S. 10. yüzyılda Avicenna tarafından tanımlanmış olup, 18. yüzyıla kadar Halep–Bağdat yöresinde iyi bilinmekteydi. *Leishmania infantum*’un neden olduğu kutanöz leishmaniasisin 18. yüzyılda Girit’te ortaya çıkmış olması da güçlü bir olasılıktır. Aynı yüzyıl içinde Cezayir’e de yayılmıştır (19). 1756’da Alexander Russel bir Türk hastayı değerlendirmesinin ardından, o zamanlar bölgede “Halep çıbanı” olarak bilinen hastalığı aynen şöyle tarif etmiştir: “Sikatrizasyonun ardından aylar boyunca morumsu renkte

görünmekte ve sonra hayat boyu kaybolmayan bir skar oluşturmaktadır; eğer sürekli irritasyona maruz kalmıyorsa, nadiren ağrılı olabilmektedir.” (78). Archibald’ın 1922 yılında bildirdiğine göre, 1870’de Suudi Arabistan’da bir Kala–Azar epidemisi yaşanmıştır (57). Yine, hekim olmamakla birlikte, gezginci bir yazar olan Robert Ruby, 1873’te Orta Doğu ve Filistin’e (bugünkü Filistin ve İsrail Devleti’nin olduğu topraklar) yaptığı seyahati anlattığı “Hayaller, Hayaletler ve Söylentiler” adlı kitabında, deri leishmaniasisine bağlı lezyon ve skarları tarif etmiş, bölgede yaşayan halk arasında son derece yaygın olduğunu anlatmıştır .

1850’lerde ve öncesinde muhtemelen “Kala–Azar” olduğu düşünülen yaygın epidemiler kuzeydoğu Hindistan’ı kırıp geçirmiştir. Tanımlaması hastalığa uygun bir şekilde yapılabilen ilk Kala–Azar epidemisi 1824 yılında, bugün Bangladeş sınırları içinde yer alan Jessore’de meydana gelmiştir. Bundan birkaç yıl sonra da hastalık tüm Ganj havzasına yayılmıştır. 1875–1900 yılları arasında tüm nüfusun %25’i bu hastalık yüzünden ölmüştür. Yirminci yüzyılın başında bu epidemi kendiliğinden sona ermiştir. Bu kendiliğinden sonlanmanın nedeni hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (142). “Kala” sözcüğü bölgesel dilde “kara”, “azar” sözcüğü de “hastalık” anlamına gelmektedir. Parazitin deri lezyonlarından alınan biyopsi materyalindeki varlığını ilk kez 1885’te İngiliz Binbaşı D. D. Cunningham bildirmiştir. 1898’de Rus Askeri Doktoru Peter

Fokitsch Borovsky benzer bildirilerde bulunmuş, 1903 yılında Massachusetts'de bir hastanede ermeni bir hastayı tedavi eden James Homer Wright hastalığı klinik olarak ilk tanımlayan kişi ünvanını almıştır (27). Wright makrofajların içinde amastigotları görmüş ve *Helcosoma tropicum* adını vermiştir (61). Oysa ki, aynı yıl içerisinde Ross tarafından zaten *Leishmania* cinsi taksonomik olarak tasarlanmış ve bu taksonomi 3 yıl sonra, Alman yazar Lühe tarafından tropikal hastalıklar hakkında yayınlanan bir kitapta kullanılmıştır. Aynı yıl içinde Kalküta yakınlarındaki Dum–Dum köyünde bulunan İngiliz birliklerine mensup İrlandalı bir askerinin bu hastalıktan dolayı ölmesi sonucu, İngiliz ordusundan İskoç doktor Albay W. B. Leishman (daha sonra İngiliz ordusunun sağlık bölümünün genel direktörü olmuştur) bu askerin otopsisinde gerçekleştirdiği dalak biyopsisi ile, hastalıktan bir protozoonun sorumlu olduğunu göstermiş ve bunu yayınlamıştır. O sırada hastalığa Dum–Dum humması denilmiştir. Bu asker, hastalanmasının ardından ölümüne kadar geçen yedi ayı; düşmeyen ateş, ağır anemi, belirgin bir kaşeksi ve oldukça büyük bir dalak ile geçirmişti. Leishman'ın yayınlanan makalesi Madras'ta benzer bulgularla hastalanan üç Hintli hastanın otopsisini gerçekleştiren bir başka İngiliz askerî doktor, İrlandalı Albay C. Donovan'ı, bu bulgularını bilim dünyası ile paylaşmak konusunda cesaretlendirmiştir. Donovan, hastalarının dalaklarından ölmeden

hemen önce aldığı biyopsisi örneklerinden hazırladığı yayma preparatlarda da paraziti göstermişti. 1904 yılında bu parazit önce Leishman-Donovan cisimcikleri, ardından da *Leishmania donovani* olarak isimlendirilmiştir (142,155). 1908'de Nicolle, içlerinde köpeklerin de bulunduğu bir grup memelinin *Leishmania* paraziti için rezervuar rolü oynadığını bildirmiştir. 1942'de Swaminath ve arkadaşları gönüllü insan denekleri kullanarak leishmaniasisin *Phlebotomus* cinsi sineklerle taşınabileceğini göstermişlerdir (57) 1913'te Migone tarafından Güney Amerika kıtasında leishmaniasis olarak tanımlanabilecek ilk olgu bildirimi yapılmıştır. 1937'de sınıflaması Cunha ve Chagas tarafından yapılmıştır (36). 1914 yılında iki Rus bilim adamı, Yakimoff ve Schokhor, Özbekistan'da yaptıkları çalışmalarda Buhara'dan elde ettikleri örneklerle



Resim 2. *Leishmania* parazitinin ilk isim babaları: Solda Leishman ve sağda Donovan. (Pauline Ward'dan).

hazırladıkları preparatta gördükleri amastigotları *Leishmania tropica minor*, Termiz'den elde ettikleri preparatta gördükleri amastigotları ise *Leishmania tropica major* diye adlandırmışlardır. Bu isimler *L. tropica* ve *L. major* isimlerinin başlangıcını oluşturuyordu (61).

1918–1923 yılları arasında Hindistan'ın Assam bölgesinde 200 binden fazla insan Kala–Azar nedeniyle ölmüştür. Bu epidemiyi yine aynı bölgede yaşanan 1944 epidemisi izlemiştir. Bu nedenle Hindistan'da Kala–Azar için kullanılan eş anlamlı isimlerden biri de “Assam Humması” olagelmıştır (142).

Hastalığın nasıl bulaştığı ve yayıldığı uzun süre bir sır olarak varlığını korumuştur. Bununla ilgili ilk ipucunu 1904'te Leonard Rodgers bulmuştur. Rodgers bir hastanın dalağından elde ettiği bir miktar biyopsi materyalini basit bir sıvı besiyerine koymuş, parazitin *in vitro* ortamda zorluk çekmeden çoğalmaya başladığını görmüştür. Ancak sıvı besiyerinden alınan örneklerin ilk inceleme sonuçları Rodgers için oldukça şaşırtıcı olmuştur: Alanda gördüğü parazitler, daha önceden görmeye alışmış olduğu yuvarlak ve küçük Leishman–Donovan cisimciklerine hiç benzememektedir. Bunun yerine ince, uzun ve kamçılı bir protozoonla karşılaşmıştır. Rodgers'a göre insanda görülen Leishman–Donovan cisimcikleri parazitin doğada görülen evrelerinden sadece biridir. Ona göre bu incelemede karşılaştığı “promastigot” formunun doğada yaşadığı bir başka yer veya organizma olmalıdır; bu bilgi hayatidir. Ancak bunu

izleyen yıllar boyunca bir sürü yanlış savlar ileri sürülmüş, sayısız başka araştırmalar yapılmıştır. Bunların birisinde İrlandalı John Sinton, hastalığın Hindistan'da rastlandığı bölgelerle, "gümüş ayaklı kum sineği" *Phlebotomus argentipes*'in coğrafi yayılım haritası arasında şaşırtıcı bir uyuşma olduğunu görmüştür. Buna rağmen Knowles tarafında promastigotun ilk kez *Phlebotomus* içinde gösterilmesi bundan 25 yıl sonra gerçekteşebilmiştir. Sineğin parazitin yayılımında doğrudan rol oynadığının gösterilmesi ise, ancak 14 yıl daha geçtikten sonra mümkün olabilmüştir (142).

İsviçreli Kimyager Paul Muller 1940 yılında oldukça yüksek potansiyeline rağmen düşük maliyetli bir insektisit olması ile bir ilki oluşturan DDT'nin önce patentini, ardından 1948 yılında bundan dolayı Nobel ödölünü alınca; Dünya Sağlık Örgütü, ABD hükümetinin de yardımı ile Tennessee Nehri havzasında DDT'yi kullanarak bir malaria kontrol pilot programı uygulamaya karar vermiştir. Bu programın 1945 yılındaki başarısı, Dünya Sağlık Örgütü'nün bundan birkaç yıl sonra başlatmayı planladığı global malaria eradikasyon programı için cesaretlenmesini sağlamıştır. Bu programın uygulanışındaki temel strateji çok basit ve tekti: İnsan ve hayvan barınaklarının yılda iki kez DDT ile ilaçlanması (142).

Bu kampanyanın öngörülemeyen etkisi Kala-Azar hastalığı üzerine olmuştur. Son derece dayanıksız bir sinek olan ve genelde barınakların çevresinde yaşayan *Phlebotomus*'lar ilaçtan çok

etkilenmiş ve bu sayede 1955 yılına kadar Hindistan'da neredeyse hiç Kala-Azar olgusu görülmemiştir. Bununla birlikte kontrol programının tamamıyla başarılı olamayışı yüzünden 1970 yılında Hindistan'da ilaçlamalar durdurulmuş ve Kala-Azar geri dönmüştür. Bu yıllarda, ardından 1975'te, 1980'de, 1992'de ve 2000'de çeşitli epidemiler görülmüştür. 1992'deki epidemide kuzeydoğu Hindistan'da 80 bin hastaya rastlanmıştır. Bugün için, tüm bu süreç ve uygulanan tedaviler sonrasında bütün parazitlerin %10'unun antimon bileşiklerine dirençli olduğu bilinmektedir ve bu oran yıldan yıla artmaktadır (142).

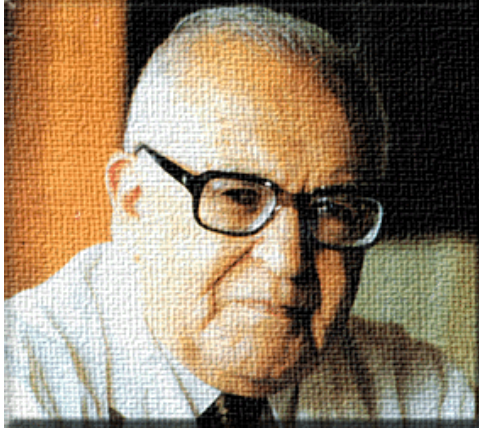
Afrika kıtasında hastalığın görülmesi ve duyulması 20. yüzyıla ait olaylardır. Sudan'da ilk kez 1938 yılında kayıtlara geçen leishmaniasis, Etiyopya'da 1942'de bildirilmiştir. Buradan sonra Kenya'da görülen hastalığa, ilerleyen yıllarda Afrika kıtasının birbirinden farklı bir çok bölgesinde rastlanmıştır (58). Buna rağmen, daha çok orta ve kuzeydoğu Afrika'nın hastalığı olagelmıştır. Nitekim 1962'de Satti tarafından bildirilen bir salgında, Güney Mavi Nil bölgesindeki Jum-Jum kabilesinin neredeyse tamamı yok olmuştur. Bundan sonra görülen bir takım epidemiler yüksek mortalite hızları ile seyretmiştir. 1969 yılında Hoogstraal ve Heyneman Sudan'da ilk hayvan rezervuarı tespit etmişler, paraziti içlerinde nil faresi *Arvicanthis niloticus*'un da bulunduğu bir takım vahşi hayvanlardan izole etmeleri, hastalığın silvatik bir döngü

içinde doğadaki evrimini geçirebileceğini düşündürmüştür. Bu gün için henüz hastalığın Afrika'daki yayılım mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamıştır (59).

Yönümüzü Türkiye'ye çevirip leishmaniasis için tarihin sayfalarını araladığımızda şu kilometre taşlarına rastlayabiliriz:

Unat'a göre Türkiye'de ilk vaka bildirimini 20. yüzyıl başlarında Doğu Karadeniz Bölgesi'nden yapılmıştır. 1916'da Bağdat'taki 11 Osmanlı askerinin karaciğer ve dalak biyopsilerinden hazırlanan preparatlarda *Leishmania* amastigotları gösterilmiştir. 1918'de de

Resim 3. Ekrem Kadri Unat



İzmir'den bir hastalık bildirilmiştir.

1980 yılına kadar özellikle hastalığın iç organları tutan formu için yapılan bildirimlerin çoğunluğu Ege Bölgesi'nden yapılmıştır. Örneğin; 1954-1964 yılları arasında yapılan bildirimlerin sayısı 55; 1974-1980

yılları arasında yapılan bildirimlerin sayısı ise 74'tür. Hastalığın deri formu aslında Anadolu'da yüzyıllardır bilinmesine ve değişik yöresel adlarla isimlendirilmesine rağmen, Unat'a göre 1833 yılı bilinen ilk bildirim yapıldığı yıldır. Bu konuda Reinhart ve Server Tefvik tarafından 1910 yılında hazırlanan bir broşür, Türkiye bağlamında halkı aydınlatıcı ilk basılı materyal olarak kayıtlara geçmiştir. 1911'de parazit ilk kez kültürde üretilmiş, ünlü deri hastalıkları

uzmanı Hulusi Behçet, 1916'da ülserin altındaki epitel hücresi tabakasını 'stub sign' olarak tanımlamış ve tanındaki önemini göstermiştir. Hastalığın deri formunun Türkiye içinde en endemik olduğu bölge Gramiccia ve arkadaşları tarafından 1984'te bildirildiğine göre Şanlıurfa'dır. 1996 yılında Şanlıurfa'da Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından bu hastalıkla savaş, vektör mücadelesi ve hastaların tanı ve tedavilerinin kolaylaştırılması amacıyla özel bir merkez kurulmuştur (96).

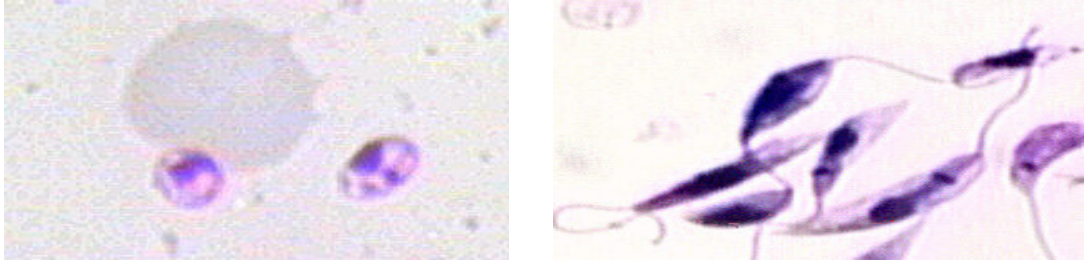
2.2. PARAZİT

2.2.1. Morfoloji Ve Taksonomi

Leishmania parazitleri taksonomik olarak *Protista* aleminin *Protozoa* alt aleminde, *Sarcomastigophora* filumunun *Mastigophora* alt filumunda, *Zoomastigophora* sınıfının *Kinetoplastida* ordosundaki *Trypanosomatidae* ailesinin *Salivaria* bölümünde yer alan *Leishmania* cinsinde yer alırlar. *Leishmania* cinsi içerisinde yirmiden fazla tür bulunmaktadır.

Morfolojik olarak parazitin iki formu vardır: Kamçısız, hareket etmeyen "Amastigot" ve kamçılı, hareket edebilen "Promastigot" formu (Resim 4.). Amastigot formu ortalama 2-5 µm çapında olup, memeli konak monositlerinde ve makrofajlarında hücre içinde yaşarken, promastigot formunun uzunluğu kamçı hariç olmak üzere 15-30 µm arasındadır ve vektör olan *Phlebotomus* sineklerinin

sindirim kanalında, hücre dışında bulunmaktadır (96,136). Makrofajların içindeki amastigotlar hücrenin asidik fagolizozomlarınca alınmalarına rağmen bunların içinde yaşamlarını devam ettirebilir ve çoğalabilirler (7). Makrofajların içinde çoğalan amastigotlar buldukları hücreden serbest kaldıktan sonra, hemen ardından başka amastigotları infekte edip, oralarda çoğalmaya başlarlar. Böylece infeksiyon sürüp gitmektedir (85) .



Resim 4. Solda amastigot (M.Lisci ve G. Sera!dan) ve sağda giemsa ile boyanmış promastigotlar)

Parazitin başlıca iki önemli organeli vardır. Bunlar nükleus ve kinetoplasttır. Esasen, kinetoplastın canlılar alemindeki tüm hücrelerde bulunmadığı doğrudur, ama yalnızca *Leishmania*'ya ait bir organel de değildir. *Kinetoplastida* sınıfındaki tüm protozoonlar bir kinetoplasta sahiptir. Kinetoplast, şekli daha çok çubuğa benzetilebilecek mitokondrial bir yapıdır. İçerisinde sayısı 10 bin civarında olan minik DNA halkaları ve 50 civarında olan büyük DNA halkaları bulunmaktadır. Bu halkalara "minicircle" ve "maxicircle" denmektedir. Bunlara da topluca kinetoplastik DNA denmekte ve

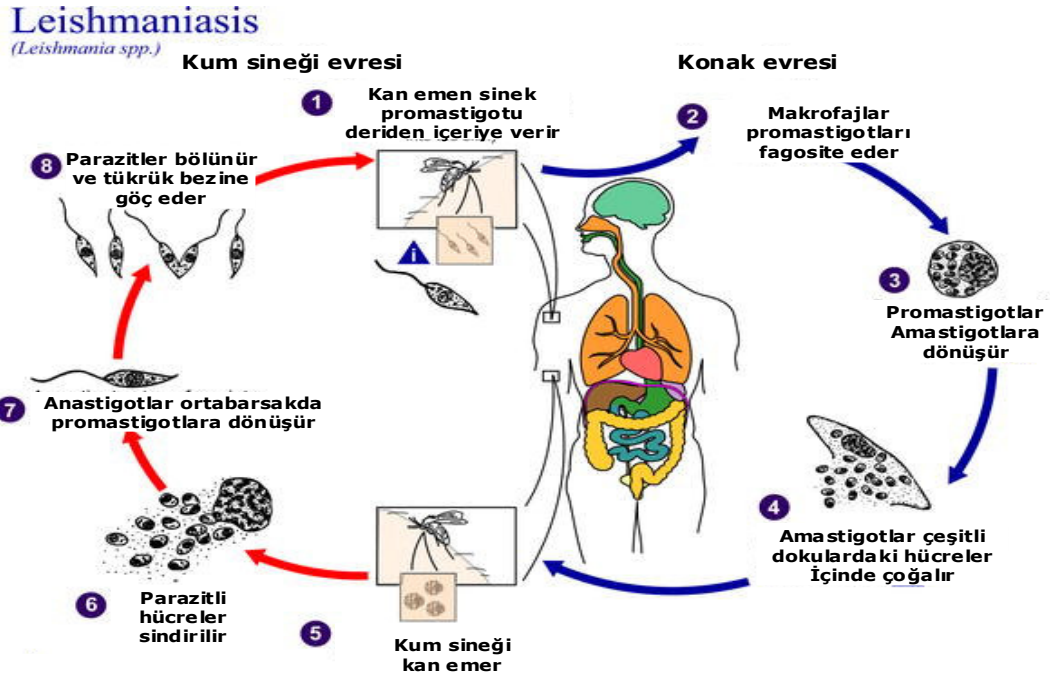
k-DNA şeklinde kısaltılmaktadır. Kinetoplastın hücre içindeki işlevi tam olarak aydınlanmamakla birlikte, büyük halkaların mitokondrial ribozomal RNA'yı kodladığı; küçük halkaların ise mRNA'nın edisyonunda rol oynadığı bilinmektedir (20). *Leishmania* parazitinin nükleik asit sentezi, salvaj yol kullanılarak glukozom adlı organelde gerçekleşir. Bu organel tüm kinetoplastidlere özgü, özelleşmiş bir yapıdır. Parazitin tüm glikolitik enzimleri de burada yer almaktadır.

Hem amastigotlar, hem de promastigotlar Giemsa boyasıyla iyi boyanırlar ve sitoplazmanın rengi soluk mavi görülür. Nükleus görelî olarak büyük ve kırmızı, kinetoplast ise nükleusa göre daha koyu kırmızı veya morumsu görünümündedir (136).

2.2.2. Parazitin Yaşam Döngüsü

İnfeksiyon, dişi bir kum sineğinin (*Phlebotomus* cinsi sinek) çiftleşme öncesi veya hemen sonrasında beslenmek ve üremek amacıyla memeli rezervuardan kan emmesiyle başlar. Erkek sinek sadece bitki özsuvarı ile beslendiği için hastalığın yayılımında rol oynamaz. Eğer kan emmenin ardından sineğin gastrointestinal kanalında yeterli zaman geçmezse, parazitin döngüsünün sağlanması imkansızlaşır. Bu ilk emilen kanın ardından sinek doğada başka yerlerde bitki özsuvarıyla beslenmeye devam eder. Böylece parazit çoğalmak için gereken zamanı bulur. Eğer sinek, hasta rezervuardan kan emdikten hemen sonra başka bir

memeliden de kan emerse, parazit gelişmeye zaman bulamaz ve bunların hepsi sadece sindirilir (142).



Resim 5. Parazitin yaşam döngüsü (CDC'den)

Parazitin yaşam döngüsündeki promastigot evresi sineğin orta bağırsak ve toraks bölümünde gerçekleşir. Bitki öz sularıyla beslenmeye devam eden sineğin orta barsağında parazitler öylesine yüksek bir sayıya ulaşırlar ki, sonunda sineğin gastroözofajeal sfinkterini felce uğratırlar. Ve bunun ardından regürjitasyon başlar. Buralardaki promastigotlar sineğin farinksine ve yanak kavitesine göç etmeğe son derece meyillidirler ve bu bölgelerde yerleşirler. Kan emmenin altıncı ile dokuzuncu günleri arasında sinek ağır bir

farenjit geçirmektedir. Bu esnada bir sonraki kan emme sırasında promastigotların regürjite edilmeleri sürmektedir (142).

Resim 6. Promastigot'un makrofaja girişi (C. De Duve'den)



Parazitler konak derisinden içeriye sineğin tükürüğüyle birlikte bırakılır. Bu promastigotların bir kısmı doğrudan kan dolaşımına katılır ve konak tarafından yok edilirler. Ancak geri kalan kısmı muhtemelen lektin–ligand etkileşimleri sayesinde hücre dışı sahada tutunur. Makrofajlar bunları yutarlar. Parazit içeren bu makrofajlar o bölgede kalmaya devam ederler, ya da mukokutanöz bileşkelere taşınırlar, ya da retikuloendotelial dokuya giderler. Parazit her üç durumda da hücre içinde süratle amastigot formuna dönüşüp replikasyonunu başlatır. Bu replikasyon konak hücrenin tamamen

amastigotlarla dolup en sonunda patlamasıyla son bulur. Serbest kalan amastigotlar başka makrofajları infekte etmeye hazırdırlar. Artık dolaşan kanda veya lezyonun hemen altında hem serbest amastigotlar, hem de infekte makrofajlar vardır. Sinek tekrar kan emmek için hortumunu batırdığında hem bu serbest amastigotları, hem de tekrar infekte makrofajları alır. Parazit sineğin mide kanalında bir dizi kompleks gelişim süreci geçirir. Bu döngü sineğin beslenmek için bir başka konak bulmasıyla devam edecektir (36). Tüm bu döngü özellikle çevre ısısına bağımlı olarak 4–25 gün (ortalama 7–12 gün) sürer (142).

2.3. VEKTÖR

Bilinen 500'ün üzerinde *Phlebotomus* türünden ancak 30 civarındaki sayıda tür leishmaniasis için vektör olarak tanımlanmıştır. Bu türler de dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde yaşarlar.

Kum sinekleri *Diptera* takımı, *Psychodidae* ailesi ve *Phlebotominae* alt ailesine ait kan emen küçük sineklerdir. Leishmaniasis, bartonellosis ve birçok arboviral hastalık taşımalarından dolayı sağlık açısından önemlidirler (15). *Phlebotominae* alt ailesi muhtemelen kretase periyodunda ortaya çıkmış eski kökenli bir ailedir (81). *Phlebotominae*'yi ilk kez 1691'de Phillippo Bonnani (bilinmeyen bir türün erkeğini) tanımlamıştır. Tıp

tür *Phlebotomus papatasi* ise 1786' da J. A. Scopoli tarafından tanımlanmıştır (15). *Phlebotomus* cinsine bağlı türler için özellikle bilimsel yayınlarda en çok kullanılan isim Türkçe'de "kum sineği" anlamına gelen "sand fly"dır. Ülkemizde bu canlılar "tatarcık" olarak bilinmektedir (9).



Resim 7. Kum sineğinin erkeği (solda) ve dişisi(sağda)

Ergin kum sinekleri küçük vücuda sahip böcekler olup, çok azının vücut büyüklüğü 3 mm'yi aşar. Renkleri beyazdan siyaha kadar değişebilir . Tüylü vücutları, nispeten uzun bacak ve ağız parçaları, pronotumun çıkık olması özelliklerindedir (Resim 7).

Kum sinekleri, iyi uçucu değildir (15). Sivrisineklere benzemelerine rağmen, onların aksine, konaklarına sessizce ve küçük zıplamalarla yaklaşmaları karakteristiktir. Bu zıplama davranışından dolayı, üreme alanlarından fazla uzaklaşamadıkları düşünülmektedir . Sinek beslenmek için kan ararken biraz önce

sayılan doğal habitatından birkaç metre ile birkaç yüz metre uzağa kadar gidebileceği bir yarıçapı olan daire içerisinde dolaşır.

Kum sinekleri krepuskular ya da nokturnal davranış gösterirler, çok azı gündüzleri sokma faaliyeti gösterir. Gündüz dinlenme alanları; evler, hayvan barınakları, kümesler, duvar çatlakları, kayalık alanlar, mağaralar, sık vejetasyon, ağaç kovukları, rodent ve diğer küçük memelilerin kazdıkları yuvalar, kuş yuvaları ve termit dağları gibi serin ve nemli yerlerdir (65). Dişi kum sineği, yumurtalarını bina yıkıntıları, duvarlardaki çatlaklar, hayvan barınakları, ev atığı yığınları ve benzeri gibi gelişmekte olan larvanın organik materyal bulabileceği, sıcak ve nemli yerlere bırakır.

Sadece dişiler, yumurta oluşturmak için kanla beslenirler. Kum sineklerinin konak seçimi türlere göre değişir; *Phlebotomus*, *Lutzomyia* ve *Sergentomyia* gibi cinsler omurgalılarından beslenir (115). Örneğin Eski Dünya türlerinden olan *P. papatasi*'nin antropofilik olmasına rağmen sığır, köpek ve kuş üzerinden de beslendiği tespit edilmiştir (101). *Sergentomyia*'ya ait türler ise genellikle sürüngenler üzerinden beslenmektedirler. Bununla birlikte az sayıda tür de amfibiler ve kuşlar üzerinden beslenmektedir (115). Ancak bazı türlerde, örneğin *P. papatasi*'de, uygun konağın bulunamadığı zor koşullarda populasyonun devamını

sağlamaya yönelik bir adaptasyon olarak otojenik yumurta gelişimi de görülmektedir (15,65).

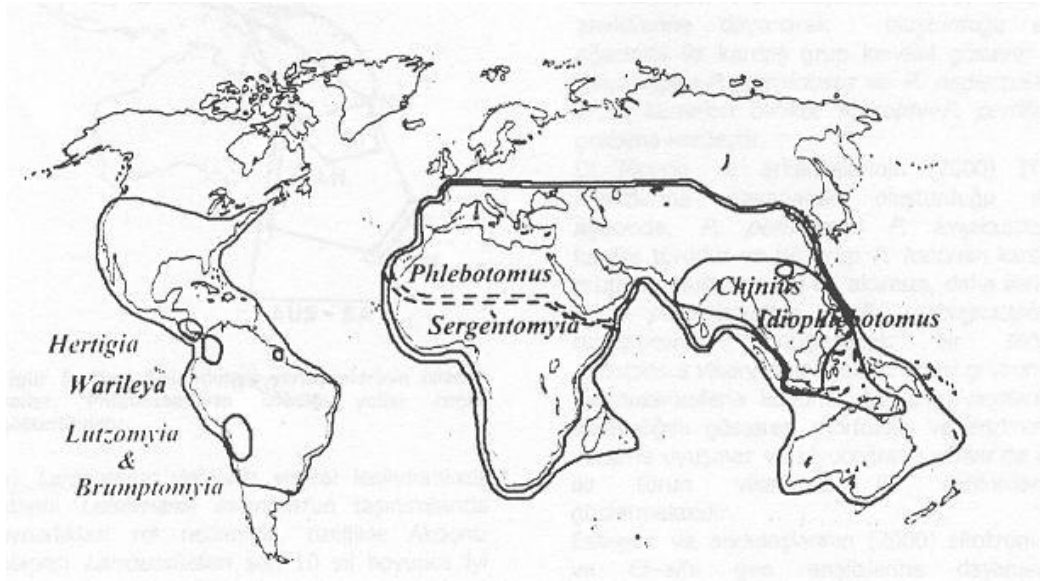
Phlebotomus cinsine ait bazı türlerin çeşitli parazitik ve viral hastalıkları taşıdıklarının anlaşılması, bu cinsin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan gruplardan biri olmasına sebep olmuştur. Özellikle hastalığın epidemiyolojisinde hangi türün vektör olduğunu tespit etmek çok önemlidir. Morfolojik olarak birbirine çok yakın türlerin, çoğu zaman farklı biyolojik özellikler gösterdikleri ve hastalıkları taşımada değişik roller üstlendikleri bilinmektedir. Bu nedenle türlerin doğru bir biçimde tanımlanarak, birbirlerinden ayrılması gerekmektedir.

Kum sineklerinin sınıflandırması phylum *Arthropoda*, sınıf *Insecta*, takım *Diptera*, alt takım *Nemotocera*, aile *Psychodidae* (*Phlebotomidae*) alt aile *Phlebotominae* şeklindedir. Son yirmi yılda yapılan çalışmalar sonucunda *Phlebotominae* alt ailesi 6 cinse bölünmüştür. Bunlar; Yeni Dünya'da üç cins; *Brumptomyia*, *Warileya* ve *Lutzomyia*, Eski Dünya'da üç cins; *Chinius*, *Phlebotomus* ve *Sergentomyia*'dır (39).

Kum sinekleri genellikle Avrupa'nın güneyi, Asya, Afrika, Avustralya ve Orta ve Güney Amerika gibi tropik ve subtropik bölgelerde görülmekle birlikte dağılımları tam olarak 50° kuzey enleminin hemen altından, Kanada'nın güneybatısından başlar ve Fransa'nın kuzeyinde sona erer. Güney yarı küre dağılımları

yaklaşık 40° güney enlemine kadar gelir. Ancak Yeni Zelanda ve Pasifik kıyılarında görülmezler (65,103).

Kum sineklerinin dünyada dağılımı kısaca şu şekilde özetlenebilir: Avrupa'da; Fransa, Yunanistan, İtalya, Portekiz, Romanya, İspanya, Türkiye, Bağımsız Devletler Topluluğu, Yugoslavya, Arnavutluk, Bulgaristan, Orta Doğu'da; Mısır, İsrail, Lübnan, Libya, Malta, Suriye, Afganistan, Irak, İran, Ürdün, Kuveyt, Suudi Arabistan, Yemen, Afrika'da; Cezayir, Fas, Tunus, Djibouti, Etyopya, Kenya, Somali, Sudan, Çad, Orta Afrika Cumhuriyeti, Mali, Namibya, Senegal, Yukarı Volta, Zaire, Zambiya, Güney Afrika Cumhuriyeti Asya'da; Bangladeş, Çin, Hindistan, Pakistan, Sri Lanka, Tayland, Vietnam, Malezya, Borneo, Sumatra, Endonezya, Kore, Amerika'da; Meksika sınırından başlayarak, Şili And Dağları'na kadar olan bölgenin tümü (9). Kum sineklerinin başlıca cinslerinin dünya üzerindeki dağılımı Resim 8' de verilmiştir.



Resim 8. Başlıca kum sineği cinslerinin dünya üzerindeki dağılımı

Anadolu havzasında ise *Larroussius*, *Adlerius*, *Paraphlebotomus* ve *Phlebotomus* alt cinslerine ait önemli türler bulunmaktadır. *Larrousius* ve *Adlerius* alt cinslerine ait bazı türler visceral leishmaniasis etkeni *Leishmania infantum* vektörleri oldukları için son zamanlarda önem kazanmışlardır. *Paraphlebotomus* alt cinsine ait 14 türün 7 tanesi kanıtlanmış veya şüpheli *Leishmania major* vektörleridir. *P. alexandri*, *P. caubaudi*, *P. jacusieli*, *P. kazeruni*, *P. riouxi*, *P. sergenti* ve *P. similis* bu türlerdendir.

2.3.1. Kum Sineği Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Kum sineklerinin her iki eşeyi geceleri beslenirken ya da gündüzleri dinlenirken çok çeşitli metodlarla toplanabilir. Bu metodların başında ışık ve CO₂ tuzakları, yapışkan kağıtlar, hayvan ve insan tuzakları ve aspiratörler gelmektedir. Işık ve CO₂ tuzakları uzak mesafelerden organizmaların dikkatini çekerler (149) ve bunlarla tüm gece boyunca örnek toplanabilir. Bu tuzaklarla toplanan örnekler canlı olabilir, fakat bu tür tuzaklar diğer böceklerin de dikkatini çektiği için yakalanan diğer böcekler kum sineklerine zarar verebilir. İnsan ve hayvan tuzaklarıyla da genellikle aç, beslenmemiş dişiler yakalanır. Yapışkan kağıtlara her iki eşeyden bireyin yakalanması mümkündür, ayrıca bu tuzağa başka türler de yakalanabileceğinden bölgenin faunasını çıkartmak açısından avantajlı bir yöntemdir. Kum sineği örneklemesinde

yakalamada en çok kullanılan yöntem ise gündüz dinlenme alanlarından aspiratörlerle yapılan toplamadır. Bu yöntemle her iki eşeyden bireyler canlı olarak yakalanabilir (6). (Şekil 7)



Resim 9. *Phlebotomus*'ları yakalamada kullanılan tuzak çeşitleri. **A:** Yağlı kağıt; **B:** Işık tuzağı; **C:** Ağız aspiratörleri (Özbel'den).

2.3.2. Kum sineklerinden Korunma ve Kontrol

Tatarcıkların üreme, dinlenme ve beslenme ortamlarının farklı olması, erişkin ve larvaları ile yapılacak mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Tatarcıklar, organik besinlerin bol olarak bulunduğu nemli olan her ortamda üreyebilmekte, erişkinleri gündüzleri karanlık, rüzgar almayan her yerde saklanabilmektedir. Bu özellikleri ve biyoeolojik özellikleri de dikkate alındığında, larva döneminde mücadele hemen hemen olanaksızlaşırken, erişkinler için farklı dönemlerde farklı mücadele teknikleri uygulama gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Üreme yerleri belli olmadığı için

yumurta ve larva formuna karşı kontrol yöntemleri uygulama olasılığı yoktur (5).

Leishmaniasis açısından vektör kontrol yöntemleri pahalı olup iyi bir altyapıya gereksinim göstermektedir. Kalıcı insektisitlerle vektör kontrolü, evin etrafında ve içinde meydana gelen bulaşmaları önlemede etkili olabilmekte fakat vahşi doğada kendi içinde olan bulaşmaları önlemek mümkün olmamaktadır. Kişiler doğada bireysel korunma yöntemlerini kullanmalıdırlar.

2.4. REZERVUAR

Akdeniz ülkelerinde ve dünya üzerindeki diğer endemik bölgelerin önemli bir bölümünde (Çin ve Amerika kıtası) visseral leishmaniasisin temel rezervuarı köpek ve köpekgiller olarak kabul edilmektedir (91,98). Eski dünyada köpeklerde görülen leishmaniasisin etkeni *L. infantum*, yeni dünyada ise çoğu yazar tarafından *L. infantum*'un sinonimi kabul edilen (bazı yazarlarca halen aralarında bir takım ayrımlar olduğu belirtilse de) *L. chagasi*'dir (47). Son yıllarda Akdeniz havzasındaki bazı bölgelerde köpeklerdeki VL'in tırmanışta olduğu; hastalığın seroprevalansının yer yer %30–40'lara ulaştığı bildirilmiştir (147). Bazı endemik bölgelerde belirlenen ve %63'e kadar dayanan seroprevalans değerleri söz edilen tırmanışın en çarpıcı örneklerindendir (131). Üstelik Rosypal ve arkadaşlarının 2003 ve 2005 yıllarında

bildirdiklerine göre, Amerika kıtasında da tırmanışa geçtiği yolunda bildiriler bulunmaktadır (147).

Genellikle ölümcül bir seyir izlemektedir (148). Hastalığın evcil döngüsü evcil köpeklerde, silvatik döngüsünün önemli bir kısmı ise başıboş köpeklerle vahşi köpekgillerde görülür. Bu döngüler çevredeki insan hastalığıyla çok yakın ilişkilidir. Hasta bir köpeği kan emmek üzere ısırarak dişi yakarcanın hasta olmayan bir köpeği ısırmasıyla hastalığın doğrudan (köpekten köpeğe) taşınması gerçekleşir. Esasen insan bu zincirde araya kazara giren konaktır, ve enjektör paylaşan ilaç bağımlıları dışında, kesinlikle *L. infantum* için rezervuar rolü yoktur (91). İnsandaki infeksiyon kontrolü köpek VL' ini kontrol etmekle çok yakından ilişkilidir (8).

Köpeklerdeki hastalık deri lezyonları, lenfadenopati, anemi, göz lezyonları, kilo kaybı ve ateş başta olmak üzere poliüri, polidipsi, ishal, kusma, melena, iştahsızlık, aşırı yorgunluk, burun akıntısı ve kanaması, öksürük, tırnaklarda aşırı uzama, tüylerde dökülme, ekzfoliyatif dermatit, eklem tutulumu, asit gibi pek çok klinik bulguya yol açar (10,133). Klinik bulgular hastalığın bulunduğu safha, köpeklerin bağışıklık durumu ve uygulanan tedaviye göre farklılıklar gösterir. İnfekte köpeklerin üçte birinde ise herhangi bir bulguya rastlanmaz (44,148). Bu nedenle hastalığın klinik tanısının oldukça zor olduğu bildirilmiştir (148). Laboratuvar bulgularında dikkat çekici olan hiperglobulinemi hakimiyeti altında seyreden

hiperproteinemidir. Albumin/globulin oranı albumin aleyhine değişmiştir. VL'deki alışıldık pansitopeni tablosu görülmekle birlikte, olasılıkla araya giren diğer enfeksiyonlar nedeniyle hasta köpeklerin dörtte birinde kandaki beyaz küre sayısında artış saptanmaktadır. Karaciğer enzimleri yükselebilir, böbrek fonksiyonları genellikle bozular, proteinüri ve hatta hyalen silendirüri sık görülen bulgulardır (133).

Köpeklerdeki enfeksiyon yaş grubu, ırk, cinsiyet ayırımı yapmaksızın oluşmaktadır. Bununla birlikte, özellikle küçük köpeklerde semptomatik enfeksiyon çok nadirdir. İster semptomatik, isterse asemptomatik olsun; parazitlerle karşılaşan köpeklerin önemli bir kısmında humoral bir yanıt oluşur (133). Bu sayede çeşitli serolojik yöntemlerle anti - *Leishmania* antikollarını saptamak mümkündür. Bugün için en kullanışlı yöntemler IFA, ELISA, DAT ve rK39 immünokromatografik yöntemleridir. Köpeklerdeki hastalığın en güvenli tanı yöntemi halen parazitin amastigot formunun lenf düğümü, kemik iliği ve dalak biyopsisi yoluyla elde edilen materyalde gösterilmesidir. Bununla birlikte infekte olmuş köpeklerin ancak %20-30'unda etkeni göstermek mümkün olabilmektedir. Bu yüzden köpeklerdeki kesin tanı ancak serolojik yöntemler ve moleküler bazlı yöntemler ile konulabilmektedir (148).

Türkiye’ de VL’in rezervuarı köpektir (96). Köpeklerdeki hastalıktan sorumlu tür de *L. infantum*’dur (99,148). 2000 yılında Özbek ve arkadaşları tarafından bildirildiğine göre, Manisa ilinin 24 köyündeki 490 köpekten toplanan örneklerin incelenmesi sonucunda 26 köpek (%5.3) leishmaniasis için seropozitif bulunmuş, 20 seropozitif köpeğin %85’inde, PZR ve/veya mikroskopik yöntem kullanılarak infeksiyon doğrulanmıştır. Bu bulgular köpeklerin Türkiye’de *Leishmania infantum* için ana rezervuar olduğunun kanıtıdır (96). Diğer çalışmalara göre hastalığın seroprevalansı Manisa yöresindeki köpeklerde %7, Alaşehir’de %16,1 , Karabük yöresinde %8, Eskişehir’de %21 olarak bildirilmiştir (98,100,148). 2004 yılında Voyvoda ve arkadaşları tarafından, Kuşadası’ndaki 158 köpek ile gerçekleştirilen bir çalışmada %3,2’lik bir seroprevalans oranı elde edilmiş, Manisa ve Karabük oranları ile benzer olduğu bildirilmiştir (148).



Resim 10. Köpeklerdeki leishmaniasisin bölgelere göre dağılımı (Özbel'den)

Bir köpekte leishmaniasis tespit edildiğinde iki yol izlenebilir: Tedavi ya da itlaf. Köpeklerde visseral leishmaniasisi tedavi etmek kolay değildir. Beş değerlikli antimon bileşikleriyle yapılan tedavi süresince klinik bulgular gözle görülür biçimde geriler. Bununla birlikte klinik anlamda tedavi edilmiş köpeklerin incelenmesi sonucu ortaya şöyle bir sonuç çıkmıştır: Steril kür mümkün değildir. Bir yıl sonra tedavi edilen köpeklerin %80'ine yakınında relaps görülür. Tedavinin etkeni elimine etme etkisinin yanı sıra, hücrel immüniteyi de stimüle edici etkisi vardır (91). Ancak tedavinin kesilmesinden sonra 3-5 ay içinde parazitin bölünmesi yeniden başlayabilir ve hücrel immünite de eski seviyelerine geri döner. Klinik deneyimler göstermiştir ki, köpeklerin VL tedavisinde tüm kemoterapi girişimlerinden daha önemlisi destek tedavidir. Hastalığın seyri esnasında köpeğin sahibi tarafından bakımı, bu sırada güçlü bir beslenme rejiminin uygulanmasının da

semptomların geriletmesinde önemli olduğu gözlenmiştir (98). Köpeğin itlafı, gerek sosyal, gerekse de etik açıdan kabul edilebilir bir çözüm değildir. Ancak insanlardaki hastalıkla savaş köpeklerdeki hastalıkla savaş gerçekleştirilirse mümkün olabilir. Son yıllarda deltamethrin emdirilmiş tasmalar kullanılarak köpekleri yakarca ısırığından korumanın etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Tedavi edilen köpeklerin de yaşamları boyunca insektisitli tasma kullanmaları dirençli suşların ortaya çıkmaması açısından önem taşımaktadır (102). Ayrıca evcil köpeklerin güneşin doğuşundan sonraki bir saat ve günbatımından önceki bir saat boyunca kapalı yerlerde tutulmaları ve evlerin sineğe karşı korunması için repellent ve insektisit kullanılması da önerilen yöntemler arasındadır.

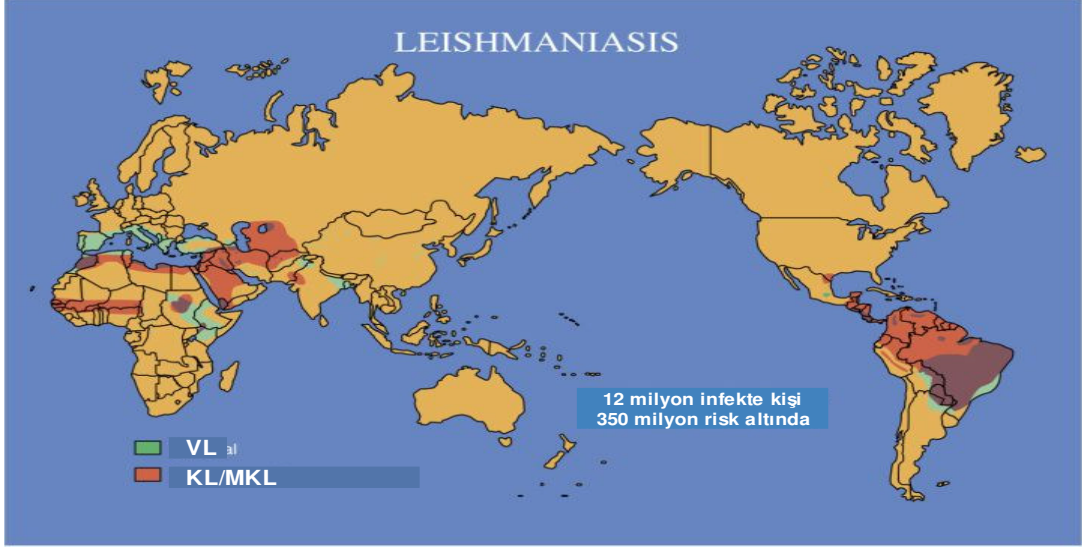
2.5. EPİDEMİYOLOJİ

2.5.1. Dünyada Leishmaniasis

Leishmaniasis bir protozoon olan *Leishmania* cinsine ait 20 adet türün neden olduğu vektör kaynaklı paraziter hastalıklar grubudur. Bu grup içinde, ya da leishmaniasisin klinik formları arasında kendi kendine iyileşebilen deri leishmaniasisinden (kutanöz leishmaniasis-CL) zaman zaman yaşamı tehdit edebilecek boyutlara varan iç organlar leishmaniasisine (visseral leishmaniasis-VL) değişebilen tablolar sayılabilir. Aslında bu klinik formlar genel olarak;

1. Kutanöz leishmaniasis
2. Mukokutanöz leishmaniasis (deri ve mukozaları birlikte tutar)
3. Visseral leishmaniasis

şeklinde üç başlığa ayrılır. Leishmaniasis dünya üzerindeki bir çok tropikal ve subtropikal ülkede endemiktir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre bu ülkelerin sayısı 88'dir. Bunların 66'sı Eski Dünya'da, 22'si Yeni Dünya'da yer almaktadır (35). Bu yaygınlık sadece ılıman ve sıcak iklimlerde yaygın olmakla kalmayıp topografik çeşitlilik de gösterir (131). Örneğin yağmur ormanlarında (Bolivya, Brezilya), çölde (Ortadoğu ve Kuzey Afrika), Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde ve hatta binlerce metre yükseklikteki dağlık bölgelerde ve platolarda (Peru'da And Dağları, Etiyopya'nın platoları) endemiktir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre dünya çapında 350 milyon insan leishmaniasis riski altındadır ve 12 milyon kişi de hastalıktan bir şekilde etkilenmiştir. Hastalığın yıllık insidansı 1-1.5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis, 500 bin civarında da visseral leishmaniasis olgusudur. Yıllık ortalama 600 bin bildirimden de anlaşılacağı gibi hastalanan insanların büyük bir kısmı bildirim dışı kalmaktadır (159).



Resim 11. Dünya’da leishmaniasis (Walter & Eliza Hold Institute internet sitesinden)

Dünyadaki genel leishmaniasis insidansı tırmanmaktadır. Son zamanlarda yeni endemik odaklar ortaya çıkmış, epidemiler tam olarak kontrol altına alınamamıştır. Epidemik bölgeler demografik değişkenlik ve hareketlere bağlı olarak yayılım göstermektedir (34). Örnek olarak Güney Sudan’daki Yukarı Batı Nil bölgesi verilebilir. Burası daha önceden endemik bir bölge olmadığı halde bugün endemik bölgeler arasına girmiştir (35).

Batı ülkelerinde ise bu artışın nedeni turizm ile HIV-*Leishmania* ko-infeksiyonları olarak gösterilmektedir. Son yıllarda Güneydoğu Avrupa’da AIDS hastalarının %1,5-9,5’u leishmaniasisten etkilenmiş, bu da HIV-*Leishmania* ko-infeksiyonlarını bu bölgelerde

çok önemli bir sorun haline getirmiştir. Bunların içinde en önemli risk grubunu intravenöz ilaç kullanıcıları oluşturmaktadır. Tüm bunlara rağmen yıllar boyunca leishmaniasisin halk sağlığındaki yeri ve etkileri küçümsenmiştir. Günümüzde hastalıktan etkilenen insanların sayısı giderek artarken, 88 ülkeden ancak 32'sinin hastalıktan bir şekilde etkilendiklerini deklare etmesi, olguların büyük bir kısmının hiç kayıtlara geçmemiş olması sorunu daha da büyütülmektedir. Bu riskler nedeniyle DSÖ ile birleşmiş milletlerin AIDS savaşım kolu UNAIDS birleşerek, dünyanın çeşitli yerlerinde takip merkezleri kurmuşlardır. HIV-*Leishmania* ko-infeksiyonu hakkındaki bir başka kötü haber de endemik bölgelerde ilaca dirençli suşların ortaya çıkmış olması ve hastalığın epidemiyolojisinin tehlikeli biçimde değişime uğramasıdır. İlaç bağımlıları arasında görülen şırınga paylaşımı nasıl AIDS'in yayılımı için çok kuvvetli bir kolaylaştırıcı faktör ise, HIV-*Leishmania* ko-infeksiyonu için de aynısı geçerlidir (28). Bu iki infeksiyon aynı bireyde bir araya geldiğinde ölümcül bir sinerji yaratmaktadır. Bu güne dek Asya, Avrupa, Afrika ve Güney Amerika'da bulunan 34 ülkeden ko-infeksiyon bildirimleri yapılmıştır (158).

Klinik formların yaygınlığına bakıldığında; visseral leishmaniasis olgularının %90'ı Bangladeş, Brezilya, Hindistan, Nepal ve Sudan'da; mukokütanöz leishmaniasis olgularının %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru'da; kutanöz leishmaniasis olgularının

%90'ı Afganistan, Brezilya, İnan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de meydana gelmektedir. Dnyadaki leishmaniasis haritasını Gney Avrupa'dan Afrika'ya, Gney Asya'dan Orta ve Gney Amerika'ya uzanan geniş bir kuşak oluşturmaktadır. Doęu yarımkürede (ya da Eski Dny) insanda infeksiyon oluşturana başlıca beř tür göze çarpmaktadır: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica* (36). Son yıllarda bunların arasına altıncı bir tür olarak *L. archibaldi*, yedinci tür olarak da *L. killicki* girmiştir (52). *L. archibaldi*'nin daha önce *L. donovani*, *L. killicki*'nin de *L. tropica* olduğu düşünülürken, Afrika'da infeksiyona yol ačan *Leishmania* türleri arasında ayrı iki tür olarak kabul edilmeye başlanmış, *donovani* ve *tropica* kompleksleri içine yerleşmişlerdir. *L. killicki* bugün Afrika'daki diğer antroponotik KL etkeni olarak kabul görmektedir (52).

Aslında *L. donovani*'nin taksonomik durumu hala tartişılmaktadır. Bazı yazarlara göre *L. donovani sensu lato* terimi iki ayrı türü içerir (69,74): *L. donovani sensu stricto* ve *L. infantum*. Başka bir görüşe göre ise *L. donovani* iki alt türe ayrılır; *L. d. donovani* ve *L. d. infantum* (13,69). Lainson ve Shaw dört grubu *L. donovani* kompleks türü içinde birleştirmişlerdir (69).

Batı yarımkürede (ya da Yeni Dny) ise en az on dört hastalık etkeni olan tür bulunmaktadır. Bunları iki adet alt cins içinde sınıflamak mümkündür: *Safyanova* ve *Viannia*. Türlerin her biri

kendi özgün coğrafi bölgesinde yerleşmişken, bazıları yalnızca isimlendirmesiyle bile bu konuda açık bir bilgi vermektedir. Örneğin; *L. aristedesi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. colombiensis*, *L. garnhami*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. venezualensis* (36).

Leishmaniasisin değişen epidemiyolojik özelliklerinin arkasında yatan faktörlerin her biri birer epidemiyolojik risk faktörü olarak tanımlanabilir. Bu risk faktörlerinin bir kısmı net olarak insan kaynaklıdır. Bunlar arasında göç, ormanların yok edilmesi, artan kentleşme, enfeksiyona duyarlılıktaki değişim (immünosupresyon, malnütrisyon v.b.) sayılabilir. Bir kısmı ise doğal çevreye ait değişikliklerdir, ki bunlar dahi, dolaylı yoldan insan ile ilişkilendirilebilir. İnsanın *Leishmania* paraziti ile enfeksiyona maruz kalması, onun aktivitesi ile rezervuar sistemler arasındaki ekolojik ilişkiye de bağlıdır. Özellikle ekolojik faktörlerdeki herhangi bir değişiklik parazitin yayılımında da önemli değişmelere yol açabilir (13,35). Bu anlamda, gerek leishmaniasis, gerekse epidemiyolojik risk faktörleri eko-epidemiyolojik olarak incelendiğinde dört gruba ayrılabilir:

1. Zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL) ve risk faktörleri
2. Antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL) ve risk faktörleri
3. Zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL) ve risk faktörleri

4. Antroponotik visseral leishmaniasis (AVL) ve risk faktörleri

1. Zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL) ve risk

faktörleri: ZKL için ana odak Latin Amerika, Orta ve Güneybatı Asya ve Kuzey Afrika'dır. Yeni dünyada başlıca etken *L. (Viannia) braziliensis* ve *L. (Leishmania) mexicana* kompleksleridir. Buralarda vektör (*Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*) çok geniş bir alana yayılmıştır. Rezervuarlar daha çok insansız bölgeler ile orman ve kırsallarda yaşayan kemirgenler ve büyük memelilerdir. Burada en önemli risk faktörü kentleşme, ormanların yok edilmesi nedeniyle hastalık yayılımının insanlı alanlara kayması; yeni barajların inşası, sulama kanalları ve tarımsal gelişim sonucu yeni odakların oluşmasıdır. Eski dünyada ise kentleşme en büyük risk faktörüdür. Eski dünya'da hastalığın sorumlusu *L. major*'dur. Şehirler *P. papatasi* gibi vektörlerle *Psammomys obesus* gibi kemirgen rezervuarların bir arada buldukları doğal habitata doğru kaymaktadır. Ortadoğu ve Kuzey Afrika'da *Meriones* sp. (35,118), Asya'da *Rhombomys opimus* (35,118) böyle bölgelerde yaşamakta ve *L. major* için iyi birer rezervuar görevi görmektedirler. Yine eski dünyada yapılan yeni baraj ve sulama sistemleri ile bitki örtüsü değişmekte, *Psammomys obesus* , *Nesokia indica* gibi hayvan rezervuarların yaşamalarına uygun yeni alanlar ortaya çıkmaktadır (35).

2. Antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL) ve risk

faktörleri: AKL eski dünyada sınırlıdır ve rezervuarların neredeyse hepsi kentler veya kent çevresi kaynaklıdır. Parazit *L. tropica* ve vektörü de çoğunlukla *P. sergenti*'dir. Ancak *L. aethiopica* rezervuarı olan küçük kemirgenlerden, köpeklerden ve bir fareden izole edilmiştir . Antroponotik form için en iyi önleyici çözüm hastaların olabildiğince erken tedavi edilip, insan rezervuar sayısının olabildiğince azaltılmasıdır. Kırsal alandan kentlere göç AKL için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Tüm sosyal ve ekonomik olaylar doğrudan doğruya demografik hareketleri etkilemekte, bu da dolaylı yoldan hastalığın yayılmasına neden olmaktadır. 1950'li yıllarda insanların üçte birinden azı kentlerde yaşarken, bugün bu oranın yarı yarıya seviyesine gelmesi, hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin değişimini açıklamayı oldukça kolaylaştırmaktadır. Örneğin bugün Şanlıurfa (Türkiye); Tahran, Şiraz ve Barn (İran); Musul (Irak); Kabil, Kandahar ve Herat (Afganistan); Halep (Suriye); Taşkent (Özbekistan) gibi eski dünya şehirlerinde nüfus yoğunluğu çok yüksek, hijyenik ve kentsel alt yapı koşulları çok kötü, gecekondulaşma çok fazla olduğundan, vektörün yaşaması için son derece uygun ortamlar oluşmakta ve bu durum AKL'in yayılmasının da oldukça yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır (35).

3. Zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL) ve risk

faktörleri: Ana odaklar Latin Amerika, Akdeniz Havzası ve Asya'dır. Yeni dünyada sorumlu parazit *L. chagasi* , vektör *Lu. longipalpis*; eski dünyada parazit *L. donovani* kompleksi (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. archibaldi*) ve vektör birden fazla *Phlebotomus* türüdür, ama Asya'da *P. argentipes* önde gelmektedir. Evcil rezervuar köpek, silvatik rezervuarlar tilki ve çakal gibi köpekgillerdir. Ancak köpekler aynı zamanda VL hastasıdırlar ve en az üçte biri tipik deri belirtileri sergilerler. Aynı şekilde Latin Amerika'da da *L. chagasi* insanın dışında köpeği de hastalandırır. Akdeniz havzası ve Ortadoğu'da *L. infantum*'un vektörü *Larrossius* alt cinsinde yer alan çeşitli türlerdir. Ana risk faktörlerinden birisi yine kırsal bölgelerden kentlere göçtür. Bu faktör sosyal ve ekonomik faktörlere bağlı olduğu kadar, iklim değişiklikleri ve doğal afetler gibi şartlardan da etkilenmektedir. Eskiden kırsal olan alanlar kente yakın ya da banliyö niteliği kazanınca, kum sinekleriyle rezervuar köpeklerin bir araya gelmesi ve bu alanların gittikçe artması kaçınılmaz sonucu doğurmaktadır. Bu durum hem eski, hem de yeni dünya için aynıdır (35).

4. Antroponotik visseral leishmaniasis (AVL) ve risk

faktörleri: AVL daha çok eski dünyada Doğu Afrika ile Hindistan ve çevresindeki ülkelerle sınırlıdır. Parazit genellikle *L. donovani* ve *L. archibaldi* olup, bir çok *Phlebotomus* türü vektör rolünü

üstlenmektedir. İnsanın yegane rezervuar olduğu, özellikle de hastalık sonrasında Post Kala–Azar dermal leishmaniasis (PKDL) gelişen, olguların epidemiyolojik açıdan son derece önemli olduğu gruptur. Doğu Afrika ülkelerinde göçün rolü çok büyüktür. Özellikle AVL'in endemik olduğu bölgelerde yaşayan veya bu bölgelerden dönen mülteciler, mevsimlik işçiler, eski deniz–aşırı askerler gibi geçici süre için buralara veya buralardan göç etmiş topluluklar risk gruplarını oluşturmaktadır. Aynı şekilde, AVL'in endemik olduğu bölgelerdeki kontrolsüz sınır geçişleri de bu kategoride değerlendirilmektedir (35). Bu sayede parazit yer değiştirebilmekte, uygun vektör varlığında yeni endemik odaklar ortaya çıkmaktadır.

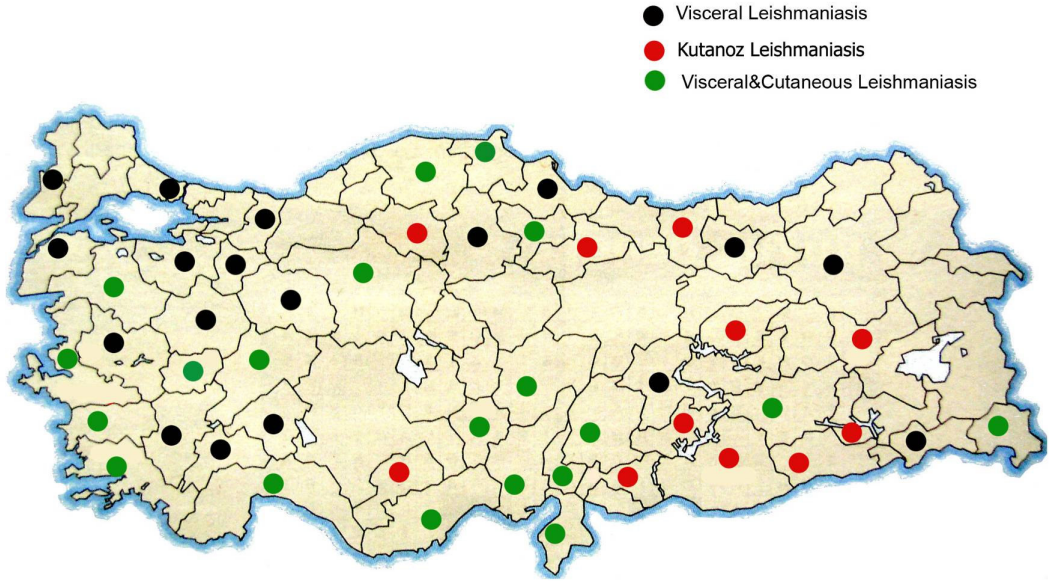
2.5.2. Türkiye’de Leishmaniasis

Leishmaniasis epidemiyolojisi, Türkiye'nin hem Asya hem de Avrupa kıtalarında toprağı bulunması nedeniyle, bir geçiş ülkesi olduğu, çeşitli bölgeleri arasında farklı topografik ve iklimsel özellikler gösterdiği unutulmadan değerlendirilmelidir. Türkiye’de hem zoonotik VL, hem de antroponotik KL görülmektedir. ZVL için başlıca rezervuar köpektir. Köpeklerdeki Kala–Azar odakları ile insanlarda hastalığın görüldüğü yerler birbirleriyle büyük ölçüde örtüşmekle birlikte, hastalığın köpeklerdeki insidansı ile insanlardaki insidansı arasında çok belirgin bir fark bulunmaktadır.

KL, endemik bölgelerde şark çıbanı, Halep çıbanı, güzellik izi, yıl çıbanı gibi yerel isimlerle anılır. Başlıca endemik bölgeler

Şanlıurfa, Orta Anadolu ve Ege bölgeleridir. Şanlıurfa'da KL etkeni *L. tropica* olarak saptanmıştır (96). Ancak coğrafi olarak güney ve doğudaki komşularımızda zoonotik KL görülmesine karşın ülkemizde bu güne kadar yalnızca bir tek çalışmadaki bir KL izolatından (Adana ilinden) ZKL etkeni olan *L. major* elde edilmiştir. Aynı çalışmada Kars ilinden bir KL izolatında *L. major* gen bölgesinde yalnızca bir bazlık bir değişimle *L. major varyant 1* ve Ege Bölgesinden iki VL ile iki KL izolatında ise aynı gen bölgesinde dört bazlık değişimle *L. major varyant 4* genotipleri saptanmıştır. Araştırmacılar değişik bölgelerden elde edilecek daha fazla sayıda izolat ile çalışmaların devam etmesi gerekliliğini belirtmişlerdir (3). Son 20 yıl içinde Güneydoğu Anadolu bölgesinde hayata geçirilen Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamında inşa edilen barajlar ve sulama kanalları, bölgenin iklimini leishmaniasisin yayılımı açısından yeni riskler oluşturacak şekilde değiştirmiştir. Tıpkı diğer dünya kentlerinde olduğu gibi, Türkiye'de de kırsal bölgelerden kentlere olan yoğun ve alt yapısız göç, hastalığın epidemiyolojisinin değişmesi açısından başka bir risk olmayı sürdürmektedir. Başka bölgelerden bu bölgeye yapılan ziyaretler sonucunda ülkenin diğer bölgelerinde sporadik olgulara rastlanmaktadır. Türkiye Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 1988-1993 yılları arasında yıllık ortalama KL hastasının sayısı 1951, 1994-1996 arasında ise 4466'dır. 1996-2000 yılları arasında yıllık ortalama 1204'e düşmüş,

bunda Şanlıurfa'da 1996 yılında başlatılan, evlerin ve hayvan barınaklarının yoğun biçimde ilaçlanması şeklinde uygulanan kum sineği kontrol programının etkisi büyük olmuştur. 1994–2000 yılları arasında Tüm Türkiye'den bildirilen KL olgularının %61,6'sının Güneydoğu Anadolu bölgesinden olduğu düşünülürse, bu kontrol programının ülke ortalamasına olan etkisi daha iyi anlaşılabilir (96).



Resim 12. Türkiye'de leishmaniasis ve klinik formları (EUTF Parazitoloji AD)

Türkiye'de görülen Kala-Azar hastalığı zoonotik orijinlidir. Hastalıktan kesin olarak *L. infantum* sorumludur. Olgular bu güne dek sporadik bir seyir izlemiş, Ege , Akdeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden hastalara rastlanmıştır (96). Ege ve Akdeniz bölgelerinin iklim özellikleri vektör ve hastalık için daha uygunmuş gibi görünmekle birlikte, Kala-Azar'ın dünya üzerindeki

epidemiyolojik sınırının ancak iklim kuşaklarıyla çizilebildiği; oldukça geniş bir topografik spektruma sahip olduğu düşünüldüğünde; Orta Anadolu bölgesinin görece olarak daha sert sayılabilecek iklim koşullarının önemli bir sorun oluşturmadığı sonucuna varılabilir. Sonuçta, ülke kuşak olarak ılıman kuşakta olması itibariyle VL endemik bir bölge sayılmaktadır. Türkiye’de *L. infantum*’un vektörü ve *P. neglectus*, *P. tobbi* ve *P. syriacus* olarak bildirilmiştir (Yusuf Özbel’den alınan sözlü bilgi). Yukarıda sayılan bölgelere ek olarak Karadeniz bölgesinden bildirilen üç VL olgusunun ardından *P. syriacus* olası vektör olarak değerlendirilmiştir. Ancak bugüne değin her hangi bir kum sineğinden *Leishmania* sp.’ne ait parazit izole edilmemiştir (96). Hastalığın rezervuarı köpeklerdir. VL Türkiye’de, insanlara göre köpeklerde çok daha yaygın görülmektedir.

2.6. LEİSHMANİASİS’İN KLİNİK FORMLARI

2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis

Eski dünyadaki endemik bölgelerde “Şark çıbanı, Halep çıbanı, güzellik izi, yıl çıbanı, Bağdat çıbanı, Delhi çıbanı, Eriha gülü” gibi isimlerle bilinen KL, ilk olarak kendisini vücudun açık bölgelerinden birinde; sıklıkla yüz, boyun, kollar veya bacaklarda; daha çok da yüzde, sınırları belirgin, ülseratif bir deri lezyonu şeklinde gösterir. İlk ısırılmanın ardından geçen ve birkaç hafta ile birkaç ay arasında

değişen inkübasyon periyodunun sonunda, kum sineğinin ısırıldığı bölgede bir papül veya nodül ortaya çıkar. Bu papül daha sonra ülser dönüşür. Zamanla çapı birkaç santimetreye ulaşabilir. Büyüdükçe ortasında altın rengi veya kahverengi bir kabuk oluşur. Büyük olasılıkla etrafında daha küçük "satellit" lezyonlar da ortaya çıkacaktır. Bu ülser ortalama 3-4 ay kadar varlığını koruyacak, bazen bu süre bir yılı da geçecek, sürenin sonunda sekonder infeksiyon oluşmadıkça lezyon kendiliğinden gerileyecektir. Eğer sekonder bakteriyel infeksiyon varsa lezyon ağrılıdır. Bunun dışında lezyon ağrısızdır. Sonunda deriden çökük ve hipopigmente görünümlü bir skar oluşur. İyileşen lezyon, etkeni olan türe karşı hayat boyu bağışıklık ile kalır. *L. tropica* infeksiyonları *L. major* infeksiyonlarına göre daha ciddi olmaya meyillidir. Üstelik çok az da olsa küçük çocuklar ve immün sistemi baskılanmış kişilerde visseralize olma potansiyeli taşıdıkları bildirilmiştir (82, 114). Buna karşın, Tunus, Lübnan (66), İran (92)'dan da *L. infantum*'un yol açtığı KL olguları bildirilmiştir.



Resim13. KL (EUTF Parazitoloji AD)

Türler arasında küçük de olsa bir takım klinik farklılıklar gözlenmektedir. Etken *L. major* ise daha kısa bir inkübasyon periyodu, daha akut bir klinik seyir, daha kısa bir iyileşme süreci görülür. Özellikle epidemiler sırasında fazla sayıda ve deriyi derinlere doğru invaze etmiş lezyonlar görülür. Lezyonlarda hızlı gelişen nekroz sonrasında eksudasyon oluşumu sık olduğu için yaş tip olarak da değerlendirilir. Mukozaları tutmaz. Eğer etken *L. tropica* ise tüm süreler *L. major* için söz edilenlerin iki katına yakındır denilebilir. Prognoz daha yavaş ve daha sakin seyreder. Lezyonda belirgin bir eksudasyon oluşmadığı için kuru tip olarak değerlendirilir. *L. aethiopica*'nın yol açtığı lezyon yüzde ve tektir. Ancak satellit oluşursa bunlar da yayılma ve birleşme eğilimine girerler. Lezyon mukokütanöz bileşkelere yakınsa daha sonra mukozaya da sıçrayabilir. Bu haliyle Güney Amerika'da görülen mukokütanöz hastalığa benzer. Ancak bundan önemli bir farkı asla oronazal kaviteye atlamamasıdır. Normal şartlar altında iyileşme çok uzun sürer (2-5 yıl). *L. infantum*-*L. chagasi* tarafından meydana getirilen KL infeksiyonlarında çok daha az saldırgan, uzun sürede iyileşen nodüler lezyonlara rastlanır (85).

Yeni dünyada etken *L. braziliensis* ve *L. mexicana* kompleksleridir. *L. mexicana*'nın yol açtığı infeksiyonlar düzgün sınırlı ve komplikasyonsuzdur. Ama eğer infeksiyonun yerleştiği bölge dış kulak sayvanı ise, infeksiyon, kıkırdak hasarı ve bunun

sonucunda sayvanın şeklinin ileri derecede bozulması ile sonuçlanır. Bu enfeksiyona özel olarak Chiclero ülseri adı verilir. *L. braziliensis* kompleksine ait türlerin yol açtıkları enfeksiyonlar KL olarak başlar. Ancak özellikle *L. braziliensis*'in yol açtığı enfeksiyon daha sonra mukokütanöz leishmaniasise dönüşme konusunda yüksek risk taşır. 1991'de Ponce ve arkadaşları, 1997'de Noyes ve arkadaşları Honduras'tan; 1999'da Belli ve arkadaşları Nikaragua'dan atipik KL olguları bildirmişlerdir. Burada etken normalde VL'e yol açan *L. chagasi*'dir. Bu enfeksiyonun kliniğinde semptomlar tamamen cilt ile ilgilidir. Lezyonlar uzun süren, nodüler ve hatta lepraya benzeyen lezyonlardır.

L. tropica'nın neden olduğu lupoid leishmaniasis, KL'in kronik bir formudur (4,61). Tam olarak tamamlanmayan iyileşme ile skarın sağlam deriyle birleştiği yerde yıllar sonra ortaya çıkan yeni lezyon lupus vulgarisi (deri tüberkülozu) andırır. Lezyonlardan alınan örneklerin incelenmesinde çok nadir parazit görülebilir. Kronik deri lezyonları daha çok hiperaktif immün yanıtla bağlıdır. Diffüz KL, KL'in bir başka kronikleşmiş formudur. Her 10 bin enfeksiyonun birinde gelişir. Lezyonlar daha büyük alanlara yayılmıştır. Leishmanin deri testi negatiftir. Çok bol miktarda amastigot görülür. Hücrel immünitede yetmezlikle seyreden bir anerjiye bağlıdır. Eski dünyada daha çok *L. aethiopica* enfeksiyonları ile ilişkilidir ve Etiyopya'da görülür. Lepramatöz lepraya benzer.

Hastalar yanlış tanı ve tedaviye maruz kalmanın yanı sıra, bir kısmı da olmamaları gerektiği halde, uzun süre lepra tedavi merkezlerinde kalırlar. Yeni dünyadaki etyolojik ajan *L. amazonensis*'tir. *L. amazonensis* infeksiyonları %30 olasılıkla diffüz KL ile sonuçlanır. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde etyolojik olarak her hangi bir türe bağlı olmaksızın diffüz KL meydana gelir. Bu anlamda HIV-*Leishmania* ko-infeksiyonu en sık rastlanan sebeptir (51,61,80,108,110).

2.6.2. Mukokutanöz Leishmaniasis

Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) "Espundia" adıyla da anılır. Bu sözcük Portekizce'de sünger anlamına gelmektedir. Neredeyse tamamen Orta ve Güney Amerika'da görülür. Kronik ve çok ciddi bir durumdur. Kendiliğinden iyileşen kutanöz lezyonların ardından yıllar sonra meydana gelir. Ancak MKL olgularının %15'inde daha önceden geçirilmiş bir deri lezyonu öyküsü yoktur. Başlangıçta burun septumunda veya civarında bir nodül oluşur. İlk semptomlar burun tıkanıklığı ve burun kanamasıdır. Bundan kısa bir süre sonra burun septumu perforer olur. İnfeksiyon komşu organlara yayılmaya başlar.

Resim 14. MKL ve komplikasyonları. (Derek Zelmer'den)



Burun ve farinks ve hatta larinks mukozasında, kıkırdak ve kemiklerinde ciddi bir yıkım ile seyreder. Bunun sonucunda yüzün yapısı ileri derecede bozulur. Hipertrofik bir ağız, dudak ve burun yapısı oluşabilir. Nazal kavite, farinks ve larinksteki fibrotik ve stenotik komplikasyonlar ölümcül sonuçlar doğurabilecek olası komplikasyonlardır. Ölümle sonlanan aspirasyon pnömonisi, sepsis ve hatta beslenememe sonucu açlık olguları hiç de az değildir (85). MKL etkenleri *L. braziliensis* başta olmak üzere, *L. braziliensis* kompleksine ait türlerdir. KL tedavisi sonrasında MKL gelişmesi riski %40'tan fazladır. *L. panamensis* ve *L. guyanensis* infeksiyonları nadiren MKL ile sonuçlanırken, *L. peruviana* olgularının MKL ile ilgisi bulunmamaktadır. *L. guyanensis*'in yol açtığı infeksiyona "pian bois" adı da verilir. Pian bois'in multilezyoner bir kliniği vardır. Birkaç ay içinde kendiliğinden iyileşen ve "uta" olarak da adlandırılan *L. peruviana* olguları daha selim karakterlidir. *L. braziliensis* infeksiyonlarında lenfadenopati sık görülen bir bulgudur (64,111).

MKL için Afrika'ya gözetildiğinde Sudan'da *L. donovani*'nin yol açtığı bu formda infeksiyonlar görülmektedir. Sudan'da hastalık iki formda görülmektedir: Parazit doğrudan mukozada infeksiyon oluşturur, ya da, visseral hastalığa mukozal tutulum eşlik eder. Doğrudan tutulum çok daha yaygındır. Güney Amerika'daki MKL'den farkı, daha az saldırgan seyirli olmasıdır (83). MKL, Kala-Azar'a

eşlik bile etse, hastaların kliniğinde Güney Amerika'dakilerin tersine, genellikle mukozal tutulum Kala-Azar'ın veya deri leishmaniasisinin klinik bulgularının önünde yer alır (83).

2.6.3. Visseral Leishmaniasis (Kala-Azar)

Visseral Leishmaniasis (VL/Kala-Azar) etkenleri *L. donovani* kompleksine ait türlerdir. Bunlar *L. donovani* (Hindistan, Doğu Afrika), *L. infantum* (Akdeniz Havzası, Orta Doğu ve Orta Asya), *L. chagasi* (Latin Amerika) ve *L. archibaldi* (Doğu Afrika)'dir (69). Kala-Azar oldukça ciddi bir sistemik hastalıktır. Özellikle Akdeniz havzasında hastalığın hedefi daha ziyade küçük çocuklar ile immün sistemi baskılanmış kişilerdir.

VL hastasının muayenesinde karşılaşılan bulgular hastalığın ciddiyeti ve kronik olup olmadığı ile doğrudan ilişkilidir. İnkübasyon zamanı 3 haftadan 2 yıla kadar uzayabilir, ancak ortalama 2-4 aydır. Hastalığı geçirmiş kişilerde yıllar sonra oluşabilecek bir immün supresyon durumunda sekonder özellikte yeni olgular ortaya çıkabilir.

Eğer hasta endemik bölgeye yeni gelmiş ise, ya da yeni başlayan bir endemide hastalığın gelişimi akut olur. Bazı hastalarda üşüme ve titreme ile ani başlayan ateş, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, öksürük, burun kanaması, diyare, ödem gibi semptomlar görülebilir. Ancak spesifik bir semptom yoktur ve kolaylıkla malaria, bruselloz, bakteriyel endokardit, tifo, tüberküloz

ve hemopoetik maligniteler ile karışabilir (85). Ancak endemik bölgede yaşayan insanlarda hastalığın başlangıcı çok daha sessizdir (85). Muayenede erken splenomegali ve hepatomegali görülür, organlar bazen pelviste bile palpe edilebilir. Bu hastalarda karın ağrısı ve kilo kaybı belirgindir. Hint yarımadası ve çevresinde hiperpigmentasyon önemli bir bulgu iken, Afrika için periferik

Resim 15. VL (EÜ Parazitoloji AD)



lenfadenopati dikkate değerdir.

Hastalık ilerledikçe şikayetler ve bulgular artmaya başlar. Karın ağrısı büyümüş dalak yüzündendir.

Eğer öksürük, diyare gibi

semptomlar söz konusu ise araya giren ikincil infeksiyon düşünülmelidir. Sarılık var ise Kala-Azar'a bağlı hepatit veya başka bir sekonder hepatiti işaret eder. Deride, kıllarda değişikliklere eşlik eden ve görünümü adeta kwashiorkoru anımsatan abdominal ödem olguların ¼'ünde görülür. *L. infantum*'un neden olduğu olgularda deri ve kıl değişiklikleri pek yoktur (85). Hindistan'da ise neredeyse hastaların tamamının derisi kararır. Bazen hastada üveit ve retinal kanama da görülebilir. Hasta endemik bölgede yaşıyorsa bütün bu semptom ve bulgulardan daha çok halsizlik, kilo kaybı ve zaman zaman ortaya çıkıp zaman zaman kaybolan daha hafif ve nonspesifik bulgulardan fazlasına rastlamak zordur. Bunların da bir kısmı 3-4 yıl içinde iyileşir. Geri kalanlar ise VL prognozunu izlerler.

Hasta yavaş yavaş daha halsiz bir hale gelir; zamanla adeta bir deri bir kemik kalır. Abdominal distansiyon organomegaliler nedeniyle iyice belirginleşir. Tedavi edilmeyen olguların %80–90'ı ölümlle sonuçlanır. Tedavi edilenlerden ise iyice terminal döneme gelmiş olanlarda başarısızlık söz konusudur. Tedavi edilenler için her hangi bir sekel beklenmemekle birlikte, siroz bildirilen bir olgu da olmuştur (85).

1986'dan bu yana HIV ile VL yan yana anılmaktadır (85). Bu durum özellikle Avrupa'nın güneyi için önemlidir. Çünkü burada hem HIV, hem de *L. infantum* endemiktir. İspanya'da VL hastalarının yarısı HIV pozitifdir. HIV pozitif hastalarının %3'ünde VL gelişmesi beklenmektedir (85). Böyle bir durumda VL'in semptomları sebebi bilinmeyen ateş, splenomegali ve lökopenidir. Amastigotlar genellikle rastlantı sonucu görülür. Özellikle de başka bir tetkik ya da prosedürün uygulanışı sonucunda elde edilen materyal incelenirken rastlanır (Örneğin; rektal biyopsi, bronko-alveoler lavaj v.b.). Bunun nedeni immün sistemi baskılanmış kişide, VL'in normal seyrinde tutulmayan organ ve dokuların, parazit tarafından tutulması veya normalde visseralize olmayan türlerin HIV pozitif bireylerde bu sınırların dışına çıkmasıdır. Buna örnek olarak sindirim kanalının tamamı verilebilir. Aslında bu tür hastaların kemik iliği adeta parazitlerce istila edilmiştir. Ama zemindeki immün sistem baskılanması nedeniyle olguların önemli

bir kısmında pozitif antikor yanıtı oluşmayabilir. Olguların %90'ında CD4 lenfositlerinin sayısı litrede 300 binin altındadır. CD4/CD8 oranı ise 1'in altına düşmüştür (85). Hastalığın tedaviye yanıtı oldukça yavaş gerçekleşir. Ancak büyük olasılıkla daha sonra yeniden alevlenecektir. VL diğer immün sistemi baskılanmış hastalar için de tehdit oluşturmaktadır.

Kala-Azar'lı bir gebenin bebeği inutero yaşamda hastalığı edinebilir. Buna konjenital VL denmektedir. Parazitler fetusa infekte makrofajlar yoluyla taşınırlar. Yenidoğanın konjenital VL'inde klinik özellikler yetişkinlerde görülen semptom ve bulgulara bir hayli benzer (138).

Bazen VL tedavi olduktan yıllar sonra da, uzun bir latent fazın ardından bir takım lokal veya yaygın deri lezyonlarıyla yeniden kendini gösterebilir. Bu tablo'nun özel bir adı vardır: Post Kala-Azar dermal leishmaniasis (PKDL). PKDL yalnızca *L. donovani*'nin endemik olduğu bölgelerde görülür. Tedavi edilmiş VL olgularından sonra Sudan'da görülme oranı %50, Hindistan'da ise %5 civarındadır. Sudan'da iyileşmeyi takiben 0-6 ay içinde, Hindistan'da 2-3 yıl içinde başlar. Genelde ilk önce yüzde yanaklar ve elmacık kemikleri üzerine yayılmış kızarıklık şeklinde görülmesine rağmen, aslında vücudun başka bölgelerinden de başlayabilir. Başlangıç lezyonu maküler, makülopapüler veya nodüler olabilir (156). Lezyonlarda bol miktarda parazit bulunur. Bu

yüzden PKDL'nin epidemiler arasındaki periyotlarda rezervuar görevini sürdürmesi bakımından epidemiyolojik önemi büyüktür. Patogenezinde immünolojik bir mekanizma yer almakta, periferik kanlarında yüksek interlökin 10 (IL10) bulunan VL hastalarında PKDL beklenmektedir. VL esnasında monositlerde interferon γ (IF γ) sentezlenmez. Ancak PKDL'de bu durum değişmiştir. VL tedavisinin ardından deride bulunan bir miktar parazite karşı monositlerde sentezlenen IF γ derideki inflamasyon reaksiyonunu artırır. Hindistan PKDL'sinde tedavi şarttır. Ancak Sudan'da kronikleşip kronikleşmediğine göre karar verilir.

2.7. MOLEKÜLER DÜZEYDE PATOGENEZ

2.7.1. Konaktaki gelişim ve çoğalma

Kum sineğinin tükrüğünde bulunan bazı maddeler parazitin infeksiyon oluşturmaya yardımcı olur (138). *Phlebotomus papatasi*'nin tükrüğü makrofajlardaki protein fosfataz 1 ve 2 ile nitrik oksit yapımını inhibe ederken, aynı zamanda T helper 1 yanıtını azaltır, T helper 2 yanıtını da artırır. Hücresel ve moleküler düzeydeki bu durum konağın aleyhinedir (138). Dahası, kum sineğinin tükrüğünde güçlü bir vazodilatör olan ve sineğin daha bol kan emebilmesini sağlayan maxidillan a adında 7 kDa'luk bir peptid vardır. Maxidillan a'nın cAMP'yi etkileyerek kalsiyum kanallarını açtığı ve hücre içindeki kalsiyumu azaltarak arteriollerde

dilatasyona neden olduğu düşünölmektedir (138). Maxidillan a'nın reseptörü olan protein bir çok vücut hücresinde bulunur. Bu hücrelerin içinde düz kas hücreleri ve makrofajlar da sayılabilir. Bu peptidin konaktaki diğer etkileri TNF- α salınımını inhibe etmek, makrofajlardaki IL-6 sentezini arttırmak, prostaglandin E2 yapımını stimüle etmek olarak sayılabilir. Bunların hepsinin, parazitin konaktaki yerleşimine katkıda bulunan mekanizmalar oldukları var sayılmaktadır (138).

Isırık yerinden vücuda giren ve ekstrasellüler alanda toplanan promastigotların makrofajlar tarafından fagosite edilmelerinin ardından, hücre yüzeylerinde bol miktarda bulunan lipofosfoglikanlar (LPG) sayesinde hücre içinde tutundukları düşünölmekle birlikte, makrofajlardaki C3 reseptörlerinin de bunda rolü olduğu bilinmektedir (138). LPG ve parazitin yüzeyindeki diğer glukokonjugatlar, girdikleri hücrenin içinde daha infeksiyonun başlangıç evresinde lizozomlar tarafından yok edilmelerini engellerler. Hem lizozomların oluşum mekanizmalarına, hem de parazitofor vakuolle birleşmelerine olumsuz etki yaparlar. Böylece parazit lizozomların asidik içeriğine dirençli olan ikinci evresine dönüşmek için ihtiyaç duyduğu rahatlama zamanını bulmuş olur (138). Ayrıca promastigot başka bir mekanizmayla da makrofaj sitokinlerini kendisine göre regüle eder. Böylece parazitofor vakuölü içinde varlığını sürdürebilir (138). Amastigot için, içine alındığı

intraselüler kovuk hiç de güvenli değildir. Lizozomların asit hidrolazlarına ne kadar dayanıklıysa o kadar yaşar. Hücrel immün yanıtı geciktiren IL-12 salınımını yeniden düzenler. Ayrıca endoproteazlar aracılığıyla makrofajların antijen sunum mekanizması ile etkileşime girer. Sonra parazitofor vakuol içinde bölünmeye başlar ve sonunda hücreyi patlatır. Siklosporin A bölünmeyi inhibe eder. İnterstisyel aralığa geçen amastigotlar başka makrofajlar tarafından fagosite edilirler (138).

Promastigot membranında 63 kDa'luk bir metalloproteaz olan leishmanolysin vardır. Daha önce bu proteinin, yani gp63'ün parazitin hücre içi yaşamında rolü olduğuna inanılıyordu. Ancak zaman içinde bu proteinin parazitin bölünmesinde bir işlevi olmadığını göstermiştir. Bununla birlikte gp63 kompleman sistemine bağlı bir lizis mekanizması ile etkileşime girip, promastigotun hücreye girerken güvenli geçişini sağlar (138).

2.7.2. Vektördeki gelişim ve çoğalma

Kum sineğinin içinde amastigotlar bulunan kanı almasından sonra, sinekte amastigotun promastigota dönüşümü parazitin yüzeyinde LPG'lerin artması ile başlar. Böylece sineğin ön bağırsağındaki epitel hücrelerinin yüzeyindeki karbonhidrat bağlayan ligand ile etkileşir. Bu da parazitin tutunmasını kolaylaştırır. Parazitin sonraki evrelerinde LPG'nin terminal karbonhidrat yapısı değişir. Bu sayede devam eden evrelerde

parazit, değişik karbonhidrat-LPG etkileşimlerini kullanarak sineğin bağırsağının alt bölümlerine doğru ilerler (84). Amastigot kitinden yoğun peritropik membranını kullanarak sineğin orta bağırsağında asit hidrolazlardan korunur (106). Eğer bu membran kitinaz enzimi kullanılarak ortadan kaldırılırsa, emilen kanın sindiriminden birkaç saat sonra amastigot yok edilir.

2.8. PATOLOJİ

VL'li hastada dalak tutulumu çok yoğundur. Bütün kırmızı pulpa parazit tarafından infiltre edilmiştir. Kesitlerde yaygın infarkt alanları görülür. Karaciğerde ise Kupffer hücreleri hipertrofik ve hiperplastik olup, ağır bir şekilde parazit infiltrasyonuna uğramış durumdadır. Sinuzoidlerin dışına taşmak üzeredir. Ağır infeksiyonlarda bu infiltrasyon santral venlere kadar uzanabilir. Eğer venöz konjesyon varsa karaciğerde güve yeniği nekrozları da nadir değildir. Bununla birlikte ciddi bir karaciğer hasarından söz edilemez. Ayrıca bol miktarda makrofaj, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan yaygın granülomlar da vardır. Bu durumda bile granülomlarda az miktarda parazit vardır ve hepatositler de normaldir (85). Bazen bunların ardından perisinuzoidal fibrosis gelişebilir. Uzun süre kalıp adeta kronikleşmiş VL olgularında siroz oldukça nadir görülen bir komplikasyondur. Gastrointestinal sistemde duodenal ve jejunal mukoza incelmış olup, villus atrofisi

vardır. Submukoza, tamamen parazitle dolu olan makrofajlar, lenfositler ve plazma hücrelerince infiltre edilmiştir (85). Kemik iliği hiperplastiktir, ancak hem eritropoez, hem de eritrosit gelişimi bozulmuştur. Deride ve kan dolaşımında parazitlere rastlanabilir. Hastaların 1/3'ünde içinde amastigot bulunan monositlerin bol bulunduğu interstisyel pnömoni vardır . Retiküloendoteliyal sistemin hem hücrelerce hem de parazitlerce işgal edilmesi elbette ki bir takım laboratuvar bulgularını da beraberinde getirir. Globulinler, özellikle de IgG ve IgM aşırı miktarda yapılırlar. Bazen bu değerler IgG'de normalin beş katına, IgM'de de iki katına kadar çıkabilir (85). Bunların bir kısmı anti-*Leishmania* antikoru, bir kısmı plazma hücreleri tarafından üretilen poliklonal antikordur. Bu sayede kompleman aktive olur, kompleman düzeyleri düşer , kriyoglobulin ve romatoid faktör gibi immün kompleksler hatırı sayılır miktarda yüksek titrelere çıkarlar. Üveit ve nefrit immün komplekslerin neden olduğu komplikasyonlardır; nadir de olsa bazen görülebilirler. Bir kısım hastalarda proteinüri görülür. Bu kişilere uygulanan renal biyopsi sonucunda, IgG ve kompleman içeren kompleksler saptanmış, hücreye ise rastlanmamıştır. Hindistan'da görülen olguların %5'inde geriye dönebilen bir böbrek yetmezliği gelişir. Ölümcül olgularda ise interstisyel nefrit görülür (85).

Rutin biyokimya incelemesinde karaciğer enzimleri normal bulunur (85). Plazma albumini çok düşmüştür. Bazen 2 g/dl değerinde bile bulunabilir. Ancak bunun nedeni azalan sentez mi, artmış katabolizma mı, yoksa intestinal kayıplar mı, halen bilinmemektedir. Hastalığın erken evrelerinde burun kanaması görülebilmektedir. Protrombin düzeyleri normaldir. Geç dönemlerde görülen kanamalar ise muhtemelen azalmış pıhtılaşma faktörleri ve trombosit sayısına bağlıdır. Bazı olgularda ciddi diyare gelişir. Sekonder bağırsak infeksiyonları da VL'de sık görülür. Bunu kas, yağ ve vitamin eksiklikleri izler. VL'de görülen kardiyak ya da pulmoner ödemin ise ölçütü ve özgün bir belirtisi yoktur (85). Pansitopeni mutlaka görülür. Dalakta tutulan ve hemolize uğrayan eritrositlerin yarı ömrü kısalmıştır. Gittikçe hemolitik karakterde bir anemi gelişir. Retikülositoz da baskılanmıştır. Hemoglobin seviyeleri 7 g/dl civarlarında olup, bazen 4 g/dl'nin altına düştüğü bile olabilir. Anemi çok hızlı gelişir. Aynı şekilde nötrofiller de dalakta tutulur, daha tam gelişmeden yıkıma uğrarlar. Lökosit sayıları genellikle 2–3 bin/mm³ seviyelerindedir. Eozinopeni mevcuttur. Trombosit seviyeleri de yıkımın artmasından dolayı 100–150 bin/mm³ civarında dolaşmaktadır (85).

2.9. TANI

Leishmaniasis tanısı bir çok farklı laboratuvar yöntemi kullanılarak konulabilir (136):

1. Direkt parazitolojik tanı : Doku, in vitro kültür, deney hayvanı inokülasyonu gibi kaynaklardan izole materyalin lam üzerine yayılıp boyanması ile elde edilen preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesidir. Bu şekilde doğrudan parazit görülerek tanı konulur. Ayrıca histopatolojik inceleme de bu grupta değerlendirilebilir.

2. Moleküler tanı: Klinik örneklerden elde edilen materyal kullanılarak parazit DNA'sının saptanması. Bunun için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılır.

3. Serolojik tanı: Doku, kan, idrar gibi örneklerde immünohistokimyasal ya da bir başka deyişle serolojik yöntemlerle spesifik veya nonspesifik anti-*Leishmania* antikörlerinin (immünglobulinlerin) saptanması.

2.9.1. Parazitin izolasyonu ve gösterilmesi

Tanı koymak için en sık kullanılan yöntemdir. Dalak, kemik iliği, karaciğer, deri lezyonu, lenf düğümü gibi dokulardan aspirasyon yoluyla elde edilen örnekler; periferik kan 'buffy coat' örnekleri bu yöntemde kullanılır. Amastigotlar 2-5 µm boyutunda, yuvarlak ya da oval şekillidirler; monosit ve makrofajlar içinde intrasellüler ya da ekstrasellüler olarak bulunurlar. Sitoplazmaları

Giemsa boyasıyla soluk mavi, nükleusları da görece olarak büyük ve kırmızı boyanırlar. Nükleusa benzeyen ama daha küçük ve hücrenin bir köşesinde yerleşmiş olan çubuksu şekilli kinetoplast da seçilir. İncelemede görülen parazit yoğunluğu daha önceden hazırlanmış logaritmik bir tabloya göre 0'dan +6'ya kadar değişen bir ölçek ile belirlenir (0: İmmersiyon objektifi ile yapılan incelemede hiçbir alanda parazit yok; +6: Alandaki parazit sayısı>100) (135). Kemik iliği ince yayması mikroskopik incelemesinin tanısal duyarlılık değeri %60–85 civarındadır. Son derece riskli bir invaziv girişim olan dalak ince iğne biyopsisi ehil ellerde yapıldığında, bu örnekle hazırlanan yaymaların mikroskopik incelemesi %95'in üzerinde duyarlılık değerine ulaşabilmektedir. Ancak son derece fragil, büyük ve yumuşak dalağı kanatmak da kolaydır. Alınan materyalin *in vitro* kültüre ekilmesi elbette ki duyarlılığı artıracaktır. Kültür, diagnostik amaçlar dışında immünolojik tanı yöntemleri için yeterli sayıda antijen elde etmek ve tür belirleme çalışmalarında yeterli sayıda parazit kullanabilmek; hayvan inokülasyonlarında kullanılmak üzere yeterli sayıda parazit elde etmek; *in vitro* ilaç çalışmaları yapabilmek ve makrofajlarla amastigotlar arasındaki ilişkiyi incelemek için de birinci sırada gelen bir yöntemdir (135).

Leishmania suşları besiyerlerinde promastigot formunda bulunurlar. Kültür amaçlı besiyerleri monofazik ya da difazik

olabilirler. Birinci gruba örnek olarak Schneider besiyeri, M199, Grace besiyeri; ikinci gruba örnek olarak Novy-McNeal Nicolle besiyeri, Tobies besiyeri gibi besiyerleri verilebilir. Genelde difazik besiyerleri daha yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar.

Makrofaj ile amastigot arasındaki ilişkilerin incelendiği çalışmalarda amastigot doku kültüründe ya da hücre kültüründe üretilir. Hücre kültürü serileri;

a) İnsan periferik kanında bulunan monositler, ki bunlar lenfosit ayırma besiyeri içinde yoğunluğuna göre lenfositlerden ayrıldıktan sonra kullanılırlar;

b) Daha önceden hazırlanmış makrofaj hücre kültürü serileri (örneğin fareden hazırlanan P388D ve J774G8 gibi seriler);

c) Köpek sarkoma ya da hamster peritoneal hücre eksudatlarından elde edilirler (135).

Deney hayvanlarına inokulasyon aslında tanısal olarak pek de kullanışlı bir yöntem sayılmaz. Çünkü inokulasyonun ardından aylar sonra da sonuç verebilir. Deney hayvanı olarak hamster, kobay ya da fare kullanılabilir (135). Bununla birlikte altın hamster *L. donovani* kompleksine ait olan türler için en iyi seçimdir (138). İnokulasyon çeşitli şekillerde uygulanabilir: Örneğin muköz membranlar yoluyla, intraperitoneal, intrasplenik gibi... İnokulasyonun ardından hayvan haftalık olarak izlenmeye başlanır. Deri lezyonları, organomegali, metastatik lezyonlar bu incelemede

aranacak bulgulardır. İnfeksiyon bulguları görüldüğünde biyopsi yoluyla amastigotlar elde edilir. Ama eğer herhangi bir infeksiyon bulgusu oluşmamışsa, hayvan dört ay sonra itlaf edilerek, direkt parazitolojik inceleme gerçekleştirilir.

Sonuç olarak, yapılan tüm mikroskopik incelemelerde sadece tek bir amastigota dahi rastlanmış olsa, ya da, sadece besiyerine ekim sonucunda promastigotlar da görülse, hastalık açısından pozitif diyebilmek için yeterlidir. Ancak direkt parazitolojik inceleme her şeyden önce son derece deneyimli ve mikroskopta amastigotu görmeye ileri derecede alışık personel gerektirir. Üstelik besiyerine ekim yöntemi tanısal açıdan değerlendirildiğinde en az üç hafta gerektirmesi yönüyle zaman alıcıdır (135). Böyle olsa da laboratuvar koşullarının ileri yöntemler için yetersiz olduğu durumlarda başvurulabilecek tek yöntem olarak kalabilmektedir.

2.9.2. Parazit DNA'sının gösterilmesi

1980'lerin başından bu yana parazit DNA'sının gösterilmesi için hibridizasyon ve benzeri çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin duyarlılığı göz önüne alındığında, hibridizasyonun karışık bir prosedürü olması nedeniyle rutin uygulamalar arasına dahil etmek mümkün olmamıştır. PZR tekniği *Leishmania* moleküler biyolojisine ve tanı yöntemlerine son derece güçlü bir katkı yapmıştır. Hedef olarak kinetoplast DNA'sının (kDNA) seçimi bu konuda son derece isabetli olmuştur. kDNA içinde yer alan

“minicircle” bölümünün binlerce kopyası bulunduğundan , PZR için ideal bir hedef haline gelmiş, testin duyarlılığını arttırmak için eşsiz bir fırsat olmuştur. Son yıllarda tanı amaçlı PZR yöntemi için bir çok yeni hedef DNA bölgeleri tanımlanmış, yüksekduyarlılık ve özgünlük değerleriyle kendilerine popüler bir kullanım alanı bulmuşlardır (12,30,105,135). Sudan’da yapılan bir çalışmada kDNA PZR’nun duyarlılığı, lenf düğümü ve kemik iliği biyopsileriyle elde edilen materyalin mikroskopik incelemelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak VL olgularında, perifer kandan alınan örneklerle yapılan çalışmada duyarlılık değeri sadece %70 olarak saptanmıştır (30,135). Hindistan’da VL olgularının kan örnekleri ile yapılan bir çalışmada %96 duyarlılığa ulaşılmış, PKDL hastalarının deri örneklerini kullanarak yapılan çalışmada da duyarlılık değeri %93,8 olarak bulunmuştur.

Bir başka DNA tabanlı yöntem olan PZR–ELISA yöntemi VL tanısında periferik kan kullanımını daha da kolaylaştırmaktadır (135). Bu yöntem biraz daha zaman alıcı olmakla birlikte, özellikle periferik parazit yükü daha fazla olan immün sistemi baskılanmış VL’li kişilerde bir damla kan emdirilmiş filtre kağıdı test materyali olarak daha da değer kazanmaktadır. Bu kişilerin kanları kullanılarak yapılacak mikroskopik inceleme duyarlılığı (%26,3) ile kan kültürünün duyarlılığının (%42,3) yanında PCR–ELISA yönteminin duyarlılığı (%75) göz önüne alındığında, bu tür bir

toplulukta tarama testi olarak da son derece yararlı olacaktır (135). Ayrıca biyopsi materyali elde etmenin riskli olduğu durumları elimine etmek için de kullanışlıdır (37). Diagnostik amaçlı olarak kullanılan en popüler PZR hedef bölgeleri şöyle sıralanabilir:

- kDNA minicircle sabit bölgesi
- Nükleusta ssu rRNA geni ile lsu rRNA genleri arasındaki ITS operonunun ITS-1 bölgesi
- Gp63 proteinini kodlayan gp63 geni
- Nükleustaki, ribozomun küçük alt ünitesini kodlayan ve türden türe polimorfizm gösteren ssu rRNA geni

2.9.3. İmmunolojik yöntemler

2.9.3.1. Antijen saptama

Antijen saptama yöntemlerinin özgünlüğü antikora dayalı yöntemlere göre daha yüksektir. Ayrıca hasta kişide antikor üretiminde bir eksiklik varsa (örneğin AIDS'liler) antijen saptama tercih edilmelidir. De Colmenares ve arkadaşları (136) Kala-Azar'lı hastaların idrarlarında 72-75 kDa ve 123 kDa büyüklüğünde iki polipeptid fraksiyonu saptamışlardır. Bunların ilkinin duyarlılığı %96, özgünlüğü %100 olarak bulunmuştur. Bu antijenler, tedavinin başlamasından sonraki üç hafta içerisinde idrardan kaybolmaktadırlar. Bu nedenle prognozun takibinde de önem taşıdıkları bildirilmektedir. Hastaların idrarlarındaki antijeni belirlemek için yeni bir lateks aglütinasyon testi (KATEX)

geliştirilmiştir. Bunun duyarlılığı %68–100 arasında değişmekte olup, özgünlüğü de %100 değerindedir. Bu antijen infeksiyonun çok erken dönemlerinde saptanabilir. Deney hayvanı çalışmaları göstermiştir ki; tedaviden hemen sonra bu antijenler ciddi biçimde düşme eğilimine girmektedir. Bu yöntemin uygulanması oldukça kolaydır ve saha koşullarında uygulanabilmektedir.

2.9.3.2. Antikor saptama

Napier'in formol jel ya da aldehid testi, Chopra'nın antimon testi ve benzeri gibi testler oluşan nonspesifik antikorları göstermektedir. Bunların özgünlüğünün eksik olması, devamlı değişen duyarlılıkları bu testleri son derece güvenilir yapmaktadır. Bu yüzden vücutta gerek parazit antijenlerine, gerekse başka nonspesifik antijen ve haptenlere karşı immünglobulinlerin sentezlendiği bilindiğinden beri, bunların saptanmasına dayalı metodlar VL'in varlığının saptanmasını çok kolaylaştırmıştır (136). Geleneksel antikor saptama yöntemleri arasında jel difüzyonu, kompleman fiksasyon testi, indirekt hemaglütinasyon testi (IHA), indirekt fluoressan antikor testi (IFA), karşı akım immünelektroforezi sayılabilir (136). Küçük laboratuvarlardaki pratik güçlükleri bir yana bırakırsak, yukarıdaki testlerin hepsinin özgünlük ve duyarlılıkları bir takım sınırlayıcı faktörlere bağlıdır.

IFA tekniği ilk kez 1972'de Walton ve arkadaşları tarafından leishmaniasis hastalarının serumlarındaki antikor titrelerinin ölçümü için kullanılmıştır. 1991'de Rachamim ve arkadaşları köpek serumları kullanarak yaptıkları bir çalışmada ELISA yönteminin IFA ile karşılaştırılabilecek doğrulukta sonuçlar verdiğini bulmuşlardır. Bu, aynı anda çok daha fazla hasta serumu ile çalışılabilecek olması ve pratikteki uygulanabilirliği nedeniyle ELISA'nın tercih edilebileceği anlamına gelmektedir. 1995'te Manciani ve arkadaşları 290 köpek serumu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ELISA ve IFA teknikleri için duyarlılık değerlerini sırasıyla %99,5 ve %98,4 olarak bulmuşlar, ancak IFA tekniğinin özgünlük değeri (%100) ELISA'ninkinden (%97,1) daha yüksek olarak elde edilmiştir.

Direkt aglütinasyon testi (DAT), görece olarak uygulaması daha basit, güvenilir ve saha çalışmalarında kolaylıkla uygulanabilecek bir yöntemdir. Hasta serumundaki antikorların işaretli promastigotlarla plak kuyucuğunda aglütinasyon oluşturması ilkesine dayanır (1,2,129). 1988 yılında, Kala-Azar'da oldukça kullanışlı olduğu belirtilen modifiye bir DAT kullanılmış; daha stabil olduğu bildirilen ve dondurulup liyofilize edilerek hazırlanan antijen sayesinde, bir çok ülkede endemik takip amacıyla yararlı bulunarak saha çalışmalarında uygulanmaya başlamıştır (41). DAT'nin bir çok avantajı bulunmakla birlikte, tedavi sonrasında tam iyileşme durumunda bile uzun süre

serumdaki antikorları gösterdiğinden prognozu izlemek için iyi bir araç olup olmadığı tartışmalıdır (41,129).

ELISA yönteminin leishmaniasiste kullanımı için şunlar söylenebilir: Duyarlılığı oldukça yüksek olmakla birlikte, özgünlüğü tamamen kullanılan antijene bağlıdır. Sıklıkla kullanılan antijen ham eriyik antijendir (crude soluble antigen, CSA). CSA parazitlerin defalarca dondurulup eritilmesinin ardından çok yüksek devirlerde santrifüj edilmeleriyle hazırlanır. Bundan sonra çökeltiden ayrılarak PBS içindeki eriyik kullanılır. Ancak burada ELISA plaklarının kaplanacağı bu sıvının protein içeriği çok önemlidir. Bu değer 100–5000 ng/ml olabilir. Bu konsantrasyonda CSA kullanıldığında ELISA testinin duyarlılığının %80–100 değerlerine ulaştığı bildirilmiş, ancak trypanosomiasis, tuberculosis ve toxoplasmosisli hastalardan alınan serumlarla karşılaştırıldığında oluşan çapraz reaksiyonlar engellenememiştir. Öte yandan 66, 72, 116 kDa'luk antijenlerle gerçekleştirilen ELISA testlerinin özgünlükleri %100'e çıkmış, ancak duyarlılıkları %37,5'ta kalmıştır (136). Sundar ve Rai, 2002 yılında Palatnik–de–Souza ve arkadaşlarının, 36 kDa'luk fukoz–mannoz ligand glikoproteinini antijen olarak kullandıkları ELISA testinde %100 duyarlılık ve %96 özgünlük değerlerini elde ettiklerini bildirmişlerdir (136). Son çalışmalara göre ise eğer CSA'nın elde edileceği promastigotlar proteinsiz bir besiyerinde çoğaltılırlarsa, ELISA testinin visseral leishmaniasis tanısında %95-100'e varan

duyarlılık ve özgünlük değerleri sergileyebilmesi mümkündür (113,129,136).

rK39 adı verilen ve *L. donovani* kompleksine ait tüm türlerin neden olduğu VL'li hastaların serumlarında antikor yanıtı oluşturduğu gözlenen rekombinant bir antijen, hastalığın akut evresi daha başlarken bile olumlu yanıt vermektedir (129,136). Antijen ilk kez *L. chagasi*'den elde edilmiştir. Bu antijen kullanılarak VL'li ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda yüksek antikor düzeyleri gösterilmiştir. Bu antijen ile gerçekleştirilen ELISA sonuçları %100 duyarlı ve özgün bulunmuştur (68,136). Daha da önemlisi anti-rK39 antikorlarının titreleri doğrudan hastalığın ne kadar aktif olduğuyula ilişkilidir. Bu sayede VL'li hastaların tedaviye verdikleri yanıtı değerlendirmek açısından da değerlidir. Hasta kişilerin rK39 antijenine verdikleri antikor yanıtının titreleri, CSA'ya verdikleri titre yanıtından 59 kat daha güçlü bulunmuş, tedavi sonrasında görülen düşüşün de çok daha keskin olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu hastalığın takibi açısından çok değerlidir. Hastalık alevlendiğinde antikor titreleri görünür biçimde artmaktadır (68,136). Endemik bölgelerde saha koşullarında ileri teknoloji gerektiren ve uygulanması karmaşık testler kullanılmayacağı için, hızlı, ucuz, uygulanışı basit ve herhangi bir uzmanlık gerektirmeyecek testlere daima ihtiyaç vardır. Bu bağlamda rK39'a dayalı, saha koşullarında son derece kolay

kullanılabilecek bir "immüno-kromatografik strip test" geliştirilmiş, VL hastalarını içeren ilk geniş kapsamlı saha çalışmasında %100 duyarlı ve %98 özgün bulunmuştur (134). Bunun ardından Hindistan ve çevresinde yapılan çalışmalarda da benzer değerler bulunmuştur (16,134,136). Ancak daha sonra Sudan'da yapılan bir çalışmada duyarlılık %67 (136,157), Güney Avrupa'da yapılan bir çalışmada %71,4 (62,135) olarak bulunmuş, PKDL'li hastalarda yapılan bir çalışmada ise %91 değeri elde edilmiştir (116,136). Bu farklılıklar farklı etnik grupların verebileceği farklı immün yanıtlara bağlanmıştır. Özgünlük açısından değerlendirildiğinde ise %97-100 arasında rakamlar elde edilmiştir. Bütün bu çalışmalar göstermiştir ki, rK39 immüno-kromatografik strip testi, VL tanısını saha koşullarında koyabilmek ve tarama çalışmaları yapabilmek açısından; üstelik de herhangi bir eğitim de gerektirmediği ve çok ucuz olduğu için son derece kullanışlıdır (141).

Özgün antikolar Western Blotting (WB) yöntemiyle tespit edilir. Bu yöntemin avantajı çok küçük antijenik varyasyonları ve çapraz reaksiyon veren antijenleri bile gösterebilmesidir. Ancak zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir (127,136).

2.9.3.3. Leishmanin deri testi

Diğer adıyla Montenegro deri testi *Leishmania* parazitlerine karşı oluşan gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterir. Bu yöntemde fenol ile öldürülmüş 0,5 ml parazit (5-10 promastigot

olacak şekilde), ön kolun dış yüzünde cilt altına enjekte edilir. Diğer kola da fenol-salin solusyonu enjekte edilir. 48-72 saat sonra her iki kolda oluşan endurasyon ölçülerek karşılaştırılır. Halihazırda herhangi bir leishmanin standardı bulunmamaktadır. Tüm türlere ait leishmaninler birbirine benzer ve üstelik de nonspesifiklerdir. Test akut VL hastalarında henüz gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşmadığı için negatif; tedavi olmuş hastalarda ise pozitifdir (136).

2.10. TÜRLERİN VE ALT TÜRLERİN SAPTANMASI

Leishmaniasis epidemiyoloji çalışmaları temel olarak hangi *Leishmania* tür ve alt türlerinin dünya üzerinde nasıl dağıldığını ve ait oldukları bölgedeki vektör ve konaklarla olan ilişkilerini inceler. Bu konuda son yıllarda yapılan çalışmalar epidemiyolojik verilerin zaman içerisinde dinamik bir şekilde değiştiğini ve asla sabit kalmadığını göstermiştir. Dünya üzerinde gittikçe artan demografik hareketlilik, çevresel ve iklimsel koşullardaki hiç durmayan değişkenlik epidemiyolojik verilerdeki dinamizmin temel nedenleridir. Bunların incelenmesinde ilk yapılması gereken saha çalışmaları ve kliniklerden toplanan örneklerin tür ve alt türlerinin belirlenmesidir. Öte yandan hastalığa klinik yaklaşımda doğru takip, etkenin patojenite potansiyeli ile hastalığın prognozu arasında doğru ilişkiyi kurabilmek sayesinde mümkün olur. Parazitin türünü

belirlemek hangi etkenin ne şekilde tedavi edileceğinin belirlenmesi, doğru bakım ve izlem yöntemlerinin tercih edilmesini kolaylaştırmaktadır. *Leishmania* türleri günümüz koşullarında şu yöntemler kullanılarak ayırt edilmektedirler:

2.10.1. İzoenzim Analizi

İzoenzim analizi genel olarak *Leishmania* türlerinin tanısı için referans yöntemi olarak kabul edilir. Suda eriyen enzimlerin poliakrilamid veya selüloz asetat jel kullanılarak elektrik alandaki mobilitelerinin değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu yöntem sayesinde belirli türlerle ilişkili olarak değişmeyen enzim kalıp modelleri elde edilmiş ve bunların her biri ayrı bir zimodem olarak referans haline getirilmiştir. Yeni bir türün hangi zimodeme ait olduğunun belirlenebilmesi için 10–20 enzim izoelektrik fokuslama (IEF) yöntemiyle çalışılmalıdır (66,88,104). Örneğin; 1992’de Gramicca ve arkadaşları zimodem analizi yoluyla *L. infantum*’un visserotropik ve dermatotropik suşlarını bulmuşlardır. İzoenzim analizi yöntemi, yoğun çalışma gerektiren, zaman alıcı ve sıradan laboratuvar koşullarına uygulanamayacak kadar karışık bir yöntemdir. Bu nedenle sadece özel bazı merkezlerde gerçekleştirilmektedir. Bu merkezler kendi zimodem sınıflaması olan, uluslararası kabul görmüş, bilgi ve arşiv desteği uluslararası düzeyde sağlanan ve desteklenen; kendilerine özgü kodlar kullanarak sınıflama yapan laboratuvarlardır. Örneğin Londra

Hijyen ve Tropikal Tıp Okulu analizini yaptığı *Leishmania* suşlarına LON ile başlayan; Fransa'daki Montpellier Üniversitesi ise MON ile başlayan kodlar verir .

2.10.2. Ekskresyon Faktörü (EF)

Bu yöntem tür düzeyinde tanı koyabilmek için kullanılır; ancak bazı türler ayrılır, bazıları da ayrılamaz. EF sıvı besiyerindeki promastigotların, buldukları ortamda oluşturdukları suda eriyebilen antijenik glukokonjugat bileşikleri anlamına gelir (32). Bu yöntemde sıvı besiyeri EF bileşiklerinin anti-*Leishmania* antikoru ile presipite edildikleri jel difüzyon yönteminde, doğrudan jele konulur.

2.10.3. DNA'ya dayalı yöntemler

2.10.3.1. Klasik yöntemler; hibridizasyon ve restriksiyon:

Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun bilim dünyasına sunumundan önce radyoaktif elementlerle işaretlenmiş probler kullanılarak yapılan hibridizasyon, yani "Southern Blotting" (SB) DNA'nın tayini için kullanılan en duyarlı yöntem olmuştur. 1989'da Van Eys ve arkadaşları nükleer DNA'dan türettikleri iki rekombinant prob ile (143) bu yöntemi leishmaniasis için ilk kez kullanmış, aynı yıl Smith ve arkadaşları bu yöntemle rutin uygulama içinde 10 bin promastigotun varlığını göstermiştir (130). 1992'de Gramiccia ve arkadaşları *L. infantum* için spesifik bir kinetoplast probu

geliştirmişler, bundan bir yıl önce de Laskay ve arkadaşları ezilmiş kum sineklerini naylon membranlara emdirdikten sonra, *L. aethiopica* DNA'sını prob olarak kullanıp, bir dot blot hibridizasyon işlemi gerçekleştirmişler, infekte olduğu mikroskobik incelemeye doğrulanmış olan her bir kum sineğinde, aynı seviyede hibridizasyon tespit edilmiştir (72). Bu sıralarda tüm araştırmacılar dikkatlerini minicircle'a yöneltmişlerdir. Çünkü kDNA'nın içeriğinde minicircle'dan 10 bin kopya vardır (20). Lambson ve arkadaşları 2000 yılında kDNA minicircle'ından bir bölümü klonlayarak sadece *L. donovani* kompleksine ait türlerle hibridize olan bir prob geliştirmişlerdir (70). 1995 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *L. amazonensis*'in kDNA'sının "maxicircle"ında, sadece bu türe özgü, Adenin ve Timin'den zengin, üstelik de insan için patojen olmayan türlerde bulunmayan ve tekrarlanan bir DNA dizisi bulunmuş (75), 1991'de Howard ve arkadaşları Lmet2 probunun dizisini yeniden düzenleyerek, 60 baz parçası (bp) uzunluğunda tekrarlayan bir hibrid elde etmişlerdir. Bu dizi *L. donovani*'den elde edilmiş ve sadece *L. donovani* kompleksindeki türlerle hibridize olmuştur . Bu prob, radyoaktif olarak işaretlenip dot blot analizi için kullanıldığında 1000–10000 promastigotu saptayabilecek duyarlılıktadır (56).

1984'te ilk kez ekstrakte edilerek saflaştırılmış olan kDNA'ya restriksiyon enzimleri aracılığıyla Jackson ve arkadaşları tarafından

tanı amaçlı olarak RFLP yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin duyarlılığı klinik örneklerde doğrudan uygulamayı zorlaştıracak kadar düşüktür.

2.10.3.2. PZR'na dayalı yöntemler:

2.10.3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu 1985'te ABD'nin California eyaletinin Emeryville kentindeki Cetus Corporation adlı firmanın araştırmacılarından Kary B. Mullis tarafından bulunmuştur. Mullis'in yöntemi son derece zaman alıcı bir yöntemdi. Termostabil Taq DNA polimeraz enzimi geliştirilmeden, her bir siklusta taze enzim eklemek gerekiyordu (İlk olarak *Thermus aquaticus* adındaki termofilik bir bakteriden izole edildi). Hemen ardından termostabil enzimle birlikte ilk termal döngü makinesi yine Cetus içinde geliştirilmiştir. "Mr. Cycle" adı verilen makine saatler süren prosedürü oldukça kısaltmıştır. 1980'lerin sonlarına doğru PZR ve ilgili teknolojilerin patenti 300 milyon Amerikan Doları karşılığında Roche firması tarafından satın alınmış, Kary Mullis 1993'te bulunduğu ve geliştirdiği PZR tekniği sayesinde Nobel Kimya Ödülü'nü kazanmıştır (138).

Polimeraz enzimi DNA ve RNA'nın yapımı ve tamirinde ana rolü oynayan enzimdir. PZR'nun olmazsa olmazıdır. Zincir reaksiyonu terimi ise bir DNA parçasının yinelenme teknikleri kullanılarak tekrar tekrar sentezlenmesi anlamına gelmektedir. Bunun

sonucunda istenen DNA dizisinin milyonlarca kopyası elde edilir. DNA polimeraz 1989'da yılın molekülü seçilmiş, aynı yıl Science dergisinin editörü Daniel Koshland Jr. PZR'nu şöyle tanımlamıştır: "PZR için başlangıç malzemesi herhangi bir gen dizisi veya DNA segmentidir. Birkaç saat içerisinde bu 'hedef dizi' milyonlarca kez çoğalır. Çift zincirli DNA molekülünün birbirini tamamlayan iki zinciri ısıtılarak birbirinden ayrılır; iki küçük sentetik DNA parçası ; ki her biri hedef dizinin bir ucundaki özel bir diziyi tamamlayıcıdır; reaksiyonu başlatıcı 'primer' olarak davranırlar. Her primer kendi tamamlayıcı dizisine bağlanır, polimeraz her bir primerden başlayarak uzun zincirin bu dizisini kopyalamaya başlar. Kısa bir zaman içerisinde hedef dizinin eksiksiz kopyaları elde edilmiştir. Ardından gelen döngülerde hem çift zincirli orijinal DNA, hem de kopyaları ayrılır; tekrar primerler bağlanır ve polimeraz kopyaları çıkartmaya koyulur. Bir çok döngünün sonunda ortam, içinde hedef diziyi bulunduran küçük DNA parçalarıyla dopdolu hale gelir. Artık bu çoğaltılmış genetik bilgi başka analizler için hazırdır." (109).

Bundan da anlaşılacağı gibi PZR'nun amacı herhangi bir gen veya DNA parçasının devasa miktarda kopyasını elde etmektir. Özellikle DNA dizi analizi yapılacaksa yeterli miktarda başlangıç kalıbı olması açısından son derece gereklidir. Reaksiyonun önemli aşamaları şöyle sayılabilir: **a) Denatürasyon.** 90–95 °C'de gerçekleşir. Bu aşamada DNA'nın çift zinciri açılarak tek zincirli hale

geçer, bu sıcaklıkta tüm enzimatik reaksiyonlar durur (145). Bu süre genellikle 30–60 saniye arasındadır. **b) Tutunma (Annealing).** 55–65 °C’de gerçekleşir. Primerler ortamda Brownian hareketi yapmaktadırlar. Tek zincirli DNA kalıbı ile tek zincirli primer arasında iyonik bağlar kurulup kırılmaktadır. Daha stabil bağların kurulması biraz daha sürecektir. Böylece bu küçük çift zincirli DNA’ya (kalıp ve primer) polimeraz bağlanabilir ve kalıbı kopyalamaya başlayabilir (145). Eğer sıcaklık çok düşükse primerler kalıp DNA’ya özgün olmayan bir şekilde bağlanırlar. Eğer sıcaklık çok yüksekse de primerler DNA’ya tutunamazlar . İlk birkaç baz bağlandıktan sonra artık primer ile kalıp arasındaki iyonik bağlar çok kuvvetlidir ve bir daha kırılmaz (145). Primerlerin kalıba bağlanması doğrudan erime sıcaklığı (melting temperature = Tm) ile ilgilidir. 25 bazdan kısa primerler için

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

formülü kullanılarak hesaplanır. Genelde Tm değerinin 5 °C aşağısı PZR’nda “annealing temperature” olarak kullanılır.

c) Uzama (Elongation). 72 °C civarında gerçekleşir. Bu sıcaklık polimeraz için ideal çalışma sıcaklığıdır. Kalıbın tamamlayıcısı olan bazlar polimeraz tarafından 5’ ucundan 3’ ucuna doğru eklenmeye başlarlar. Ne zaman ki kalıp tamamlanır; ondan sonra yeniden denatürasyon adımı ile yeni bir döngü başlar. PZR sırasında her iki zincir de kopyalandığı için, hedef gen veya DNA zincirinin

miktarında süratle artan bir büyüme vardır. Bu artış 2'nin kuvvetleri Şeklinde gider (145).

Son yıllarda PZR'nun ęeŐitli parazitler için farklı klinik materyallerde kullanılabilecek hızlı, duyarlı ve yeterli özgünlüğe sahip bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. ęeŐitli gruplar *Leishmania* infeksiyonunu gösterebilmek için değişik PZR teknikleri geliştirmişlerdir (138). Bir tek *Leishmania* parazitini bile saptayabilecek kadar duyarlı olduğu bildirilen PZR (126), mikroskopik incelemeye göre daha duyarlı bulunmuş (138), serolojik yöntemlerle karŐılaŐtırınca da daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür (14).

Leishmania türlerini ve bunların suşlarını, aralarındaki ilişkiyi ve genetik uzaklıkları saptamak için son on yıl içinde geliŐtirilen PZR tabanlı yöntemler; rRNA'yı, miniekson genlerini, kDNA'yı, tekrarlayan nükleer DNA dizilerini ve "microsatellite" DNA dizilerini hedef alır (42,120,139). Bunların bazıları tüm *Leishmania* türlerini saptarken, bazıları da infeksiyon etkenini daha ayrıntılı bir Şekilde türe özgü olarak belirler. Bu bilgi, tanı amacıyla kullanıldığında genellikle yeterlidir. Ancak ileri seviyede epidemiyolojik bilgi gerektiğinde daha yüksek ęznrlkl tür tayini yöntemlerine ihtiyaç duyulur (41). Bunlardan biri klasik hibridizasyon yönteminin PZR ile birlikte kullanılmasıdır. Bir başkası RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), en ęok kullanılanı ise RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism = Kesim parçası uzunluğu değişkenliği) yani şizodem (schizodeme) analizidir.

2.10.3.2.2. Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi

Bu yöntem çeşitli organizmaların DNA'larının özel restriksiyon enzimleri (Restriksiyon Endonükleazları: RE) kullanılarak kesilmesi sonucunda, türlere ve hatta bazen suslara özgü farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşması ile karakterize DNA modellerinin elde edilmesidir. Elde edilen modellere, belli bir popülasyona ya da bireye özgü olduğu için "DNA parmakizi" (DNA fingerprinting–DNA profiling) denir. Restriksiyon enzimleri DNA'yı 4–6 bp'lik özel tanıma bölgelerinden keserler. Daha sonra ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları jel elektroforezi yoluyla görüntülenir (60).

Restriksiyon Endonükleazları: DNA metilasyon ve restriksiyon enzim sistemleri, bakterilerde yabancı DNA'ya karşı korunma amacıyla geliştirilmişlerdir. İlk restriksiyon endonükleazı 1970 yılında Hamilton Smith ve Kent Wilcox tarafından izole edilmiştir. Bu enzimin adı Hind II konulmuştur (71). DNA zincirini özel bölgelerden kesen bu enzimler üç gruba ayrılırlar: Tip I, Tip II ve Tip III.

Tip I ve III'e ait enzimler DNA zincirlerini Tanıma bölgelerinden uzak ve rasgele keserler. Buna karşın Tip II restriksiyon endonükleazları (RE), tanıdıkları nükleotid dizisinin içinde ya da

hemen yakınında keserler. Moleküler biyolojide Tip II RE'nın çok geniş kullanım alanı bulunmaktadır (125). Tip II'ye ait restriksiyon enzimleri de üç gruba ayrılabilirler:

a) DNA üzerinde belirlenmiş bölgeyi sağdan uzun bölümlere ayıranlar: Örnek Eco R1 (kesim yeri * ile belirtilmiştir)... *Escherichia coli* RY13

5'-G*AATTC-3'

3'-CTAA*G-5'

b) Soldan uzun bölümlere ayıranlar: Örnek Pst1... *Providencia stuartii*

5'-CTGCA*G-3'

3'-G*ACGTC-5'

c) Küt uçlu bölümlere ayıranlar: Örnek Sma I... *Serratia marcescens*

5'-CCC*GGG-3'

3'-GGG*CCC-5'

Aynı nükleotid dizisini tanıyan RE'lere izoşizomer denir. İzoşizomerler diziyi aynı ya da farklı yerlerden kesebilirler. Farklı yerlerden kesenler neoşizomer olarak adlandırılır (125). RE için bir enzim ünitesinin tanımı: 1 µg test DNA'sının (genellikle lambda bakteriyofaj DNA'sıdır) tamamının özel bölgelerden kesimini optimal şartlarda 1 saat içinde yapabilen enzim miktarıdır (125). Ancak bu optimal şartlar her RE için aynı değildir. Bazıları ısıya karşı çok duyarlı iken, bazıları görece olarak yüksek sıcaklıklarda

çalır (125). Her enzimin optimum aktivite gösterdiği çözeltilerin iyon içeriği, tamponu ve pH'sı farklıdır. Bu yüzden kendi çözeltileriyle birlikte satılırlar. RE, ortamdaki Mg ve gliserol (ki enzimler gliserol içinde saklanırlar) düzeylerinin yüksekliği durumunda özel bölgelerinin dışında başka DNA dizilerini de keserler. Buna yıldız (star) aktivitesi denilir. Bazen DNA birkaç farklı RE ile kesilir (125). Bunun kullanım alanları türe özgü tanı elde etmekten farklıdır (moleküler klonlama, rekombinant teknolojiler v.b.).DNA fingerprinting ilk kez İngiliz genetikçi Alec Jeffreys tarafından 1985'te tanımlanmıştır. Jeffreys, belirli DNA dizilerinin defalarca tekrarlanan DNA bölümleri içerdiğini, bu tekrarların sayısının bireyden bireye değiştiiğini; bu tekrarlanan dizilerin uzunluklarındaki değişkenliğin ölçülebilir ve karşılaştırılabilir olduğunu bulmuştur. Bu tekrar bölgelerine "ard arda tekrarların değişken sayısı" anlamına gelen VNTRs (Variable nucleotide tandem repeats) demiş; bunları incelemek için daha önce ilk kez 1980 yılında Ray White tarafından tarif edilen RFLP yöntemini kullanmıştır. Bunun sebebi DNA'yı VNTRs yakınlarından kesebilmek için restriksiyon enzimlerine başvurmuş olmasıdır. RFLP ilk kez adli tıpta kullanılmıştır. Bugün aynı konuda çok geniş bir kullanım sahası bulmaktadır (55).

RFLP yönteminin tüm DNA zinciri hedef alınarak kullanılmasının yanında, bir DNA dizisi hedef alınarak, PZR yöntemiyle çoğaltılıp,

elde milyonlarca kopyası bulunan bu diziyi RE ile keserek daha keskin rezolusyonlu bantlar elde etmek mümkündür. Özellikle tür düzeyinde tanı koyabilmek amacıyla bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu yöntem uygulanırken, önce yukarıda sayılan özel DNA bölgelerinden birisi PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılır. Sonra bir ya da birden fazla RE kullanılarak, çoğaltılan hedef DNA optimum koşullarda parçalara ayrılır. Ardından agaroz jel elektroforezi ile bu parçaların uzunluklarına göre ayrılması sağlanır. Elde edilen modellerin birbirleriyle karşılaştırması yapılarak, benzerlik ve farklılıklar, yakınlık ve uzaklıklar vurgulanır. Bu yöntem PZR-RFLP ya da RFLP-PZR (ya da PCR-RFLP) yöntemi denir.

PZR-RFLP'nin *Leishmania*'larda kullanımına göz atıldığında, moleküler yöntemlerin leishmaniasisdeki geçmişine görece olarak uzun bir süredir başarı ile uygulanmakta olduğu görülür (89). Hem *Trypanosoma* hem de *Leishmania* türlerinde önemli minicircle sınıflarının şizodem analizi (PZR uygulanmadan yapılan direkt RFLP) 20 yıldan uzun bir süredir güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır (89). Bir mikroorganizma için kullanılacak olan PZR-RFLP yönteminin duyarlılığı, öncelikle PZR'da hedef olarak seçilen gen ya da DNA bölgesinin tekrar sayısına ve ne kadar az polimorfizm gösterdiğine; ardından da PZR ürünlerinin kesimi için kullanılacak olan RE'nin diziyeye olan özgünlüğüne bağlıdır. Duyarlılığı artırmanın

sık kullanılan bir yolu bir DNA bölgesini hedefleyerek çoğalttıktan sonra, ilk PZR ürününün içinde yer alan daha özgün bir dizi hedefleyen ve ilkinden farklı primerler kullanan ikinci bir PZR uygulayarak çok daha özgün bir DNA bölgesini elde etmektir. Bu yöntem "nested PZR" denir. Eğer hedef DNA bölgesi başka organizmalarda da varsa özgünlüğü daha düşük olacaktır. Yalnız şunu unutmamak gerekir ki; tanı amacıyla popüler olarak kullanılan PZR bölgeleri tür ya da suş ayrımı için yeterince iyi olmayabilir.

Leishmania parazitleri için kullanılan başlıca PZR-RFLP yöntemleri şunlardır .

1-kDNA PZR-RFLP: kDNA minicircle 10 binden fazla kopyası ve 600-800 bp'lik uzunluğuyla *Leishmania* tanısında mükemmel bir araçtır (24). Ancak *Trypanosoma*'larda çapraz reaksiyon verebildiği için Amerikan ve Afrika leishmaniasisinde özgünlüğü %100 değildir. Bu yöntem ve bunun nested olanının daha çok tek türün neden olduğu epidemilerde, prognoz takibi, relapslarla re-infeksiyonlar arasındaki ayrımı ortaya koymak açısından oldukça yararlı olduğu bildirilmektedir (24,90). Ancak türler arasında ayırım için zaman zaman yetersiz kalabilmektedir. Çünkü kDNA zaman içinde, bazen suştan suşa ve türler arasında polimorfizm gösterebilmektedir (G. Schönian-sözlü bilgi).

2-ITS PZR-RFLP: Herhangi bir proteini kodlamayan bu bölge, tanısal olarak son derece özgün olmasına rağmen, genel kanı az

sayıda tekrarlanan uzun bir DNA dizisi olması itibariyle, kültürde çoğaltılan parazitleri tespit edebilecek duyarlılık düzeyinde olduğu yönündedir (121). Bununla birlikte 2000 yılında El Tai ve arkadaşları *Leishmania* genusuna özgün primerler kullanıldığı sürece ITS operonunun klinik örneklerden de çoğaltılabildiğini bildirmişlerdir (42,122). Ancak sergilediği genetik heterojenite sadece tür düzeyinde değil; alt türler düzeyinde de identifikasyonu mümkün kılmaktadır (42,122).

3-ITS1 PZR-RFLP: 18S ve 5.8S rRNA genleri arasındaki operonu çoğaltmaya yönelik bir yöntemdir. 300-350 bp uzunluğundaki bu bölgenin hedeflendiği PZR, hem klinik örneklerde, hem de kültürden elde edilen parazitlerde son derece duyarlıdır. İdentifikasyondaki avantajı sadece bir RE kullanılarak (Hae III) tıbbi önemi olan neredeyse tüm *Leishmania* türlerinin ayırt edilebilmesidir. *L. aethiopica*'nın ayırımında bazı sorunlar yaşanmakla birlikte, farklı bir RE kullanılarak (Cfo I) bu sorun da çözülebilmektedir (122).

4-gp63 PZR-RFLP: Sıkça tekrarlanan ve genomik yapısı heterojen (farklı izogenlerin varlığı) olan gp63 geni hem *Leishmania* parazitinin tanısını, hem de tür ve hatta suş ayırımını kolaylaştırır. Bu amaçla saflaştırılmış DNA ile gp63 PZR-RFLP yöntemi uygulandığında Amerikan KL ve MKL türlerini gayet iyi ayırabildiği, hatta *L. peruviana*'yı alt türlerine de ayırdığı görülmüştür (38).

5–CPB intergenik PZR–RFLP: “Sistein proteinaz tip B” geninin intergenik bölgesi çoğaltılarak *L.donovani* kompleksinde yer alan türlerin kendi aralarındaki ve hatta coğrafi orijinlerine göre tür ayrımı yapılır (140).

6–Miniexon PZR–RFLP: Kendisi nükleusta bulunan, mRNA’nın yapışma ve tutunma işlevi ile ilgili olan ve her parazitte 100–200 kopyası bulunan miniexon geni çoğaltılmaktadır. Sabit bölgesi (39 bp’lik), kısmen sabit bölgesi (55–101 bp’lik) ve cinse ya da türe göre değişen uzunluktaki intergenik birleştirici parçasının (51–1350 bp arasında) bulunması özelliklerinden yararlanılarak, RE’nın kestiği parçalarla tür ayrımına gidilmektedir (86,122).

2.11. TEDAVİ

2.11.1. Kala – Azar

Leishmania parazitlerinin yaşamlarını hücre içinde sürdürmeleri kullanılacak ilaçlarda farklı farmakokinetik özellikler olmasını gerektirir. Bu ilaçlar beş başlık altına alınabilir:

a) Beş değerlikli antimon bileşikleri: Bunlar sodyum stiboglukonat ve meglumin antimoniattır. Görece olarak ucuz olmaları ve yararlanımlarının yüksek olması ile hala çok değerli ilaçlardır. Ancak yine de Sudan ve Hindistan’dan antimon bileşiklerine dirençli olgular bildirilmiştir (94,135,155). HIV–*Leishmania* ko–infeksiyonu bulunan hastalarda relaps sık görülür.

Sodyum stiboglukonat (Sb) 20 mg/kg/gün dozunda 30 gün süre ile uygulanır. Ancak yan etkiler ve toksik etkiler nedeniyle yakından takip edilmelidir . Kalp ve karaciğerle ilgili toksik etkiler görülebilir (53). Sb ile paromomisin ya da Sb ile interferon- γ birlikte kullanıldığında da oldukça etkilidir. Üstelik de gereken Sb dozu azalacağından yan etkiler de azalacaktır. Dünya üzerindeki endemik bölgelerin ekonomik koşulları göz önüne alındığında, tedavi maliyetleri en az olan beş değerlikli antimon bileşikler tercih edilmektedir. Aynı sebepten dolayı DSÖ tarafından önerilen tedavi seçeneklerinin de başında gelmektedirler (73,112,128).

b) Pentamidin: Geleneksel ilaçlardan birisidir. 15 gün boyunca 2–4 mg/kg/gün dozunda kullanılır. Aslında oldukça etkili bir ilaç olmakla birlikte, güçlü yan etkileri vardır. Bunlar hipoglisemi ve diyabet, hipotansiyon, bulantı, kusma, karın ağrısı ve baş ağrısıdır (128).

c) Amfoterisin B: Anti-Leishmanial ilaç olarak antimon bileşiklerine göre 400 kat daha güçlü olduğu kanıtlanmıştır. Çünkü, amastigotların en önemli membran sterolü olan ergosterole bağlanır (128). Böylece membran bütünlüğünü bozarak etki eder. Ancak klasik Amfoterisin B dezoksikolat, infüzyon sırasında yol açtığı flebit ve ateş; bunlar dışında da anemi, böbrek yetmezliği ve hipokalemi yan etkileri nedeniyle çok tercih edilmez (79). Bunun yerine lipidle birleştirilmiş formulasyonunun çok daha az yan

etkileri olduğu ve son derece de etkili olduğu gösterilmiştir. Liposomal amfoterisin B denilen bu formun hem ilaç yarı ömrü, hem de yararlanımı yüksektir (45). Bu sayede tedaviden uzun süre sonra bile kandaki varlığı tespit edilebilir. Amfoterisin B'ye göre yirmi beş kat daha az yan etki ve toksisiteye sahiptir (50).

d) Paromomisin: Aslında bir aminoglikozid antibiyotiktir. Kullanılan dozlarda, böbrek fonksiyonları yerinde bir hasta için non-toksik özelliktedir. Ama sonuç olarak bir aminoglikoziddir ve renal toksisite veya ototoksisite potansiyeli yine de dikkatli olunmasını gerektirir. 16-20 mg/kg/gün dozunda üç hafta boyunca kullanıldığında, antimon bileşikleri ile birlikte kullanıldığı zaman elde edilen terapötik etkiden bile daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (63).

e) Allopurinol: Allopurinoln VL tedavisinde beş değerlikli antimon bileşikleriyle kullanımı tedavi etkinliğini artırmaz. Ancak dirençli suşlar için tedavi etkinliğini yükseltir. Gerek Hindistan' da, gerekse Latin Amerika' da allopurinoln VL'e karşı tek başına kullanımı terk edilmiştir (128).

f) Miltefosin: Miltefosinin bulunmasıyla yüksek yararlılık, daha az toksik ve oral yoldan kolayca uygulanabilecek bir seçenek ortaya çıkmıştır (150). Miltefosinin *Leishmania* paraziti üzerindeki etki mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır. Bununla birlikte, bir lizofosfolipid analoğu olması nedeniyle parazit

proliferasyonunu etkilediği ve yağ metabolizmasını bozduğu gösterilmiştir. Hindistan'daki Kala-Azar hastalarında miltefosininin oral etkinliğin değerlendirildiği çeşitli faz IV alışmalar yapılmış, hem Hindistan'da (2002), hem de Kolombiya'da (2005) tedavide kullanılmaya başlamıştır (26). Yapılan çalışmalarda dişi üreme kapasitesine, erkek üreme yetisine ve hatta fetus üzerine olumsuz etkileri olduğu görülmüş, bu yüzden tedavi bitiminden iki ay sonrasına kadar gebe kalınmasına engel olunması gerektiği bildirilmiştir (150).

2.11.1. şark çıbanı ve mukokütanöz hastalık

L. major'un yol açtığı basit KL genellikle tedavi edilmeden iyileşir. Hele hele hasta endemik bölgede yaşıyorsa bu şekilde iyileşmeye bırakmak genellikle tercih edilen yoldur. Böylece kalıcı bağışıklık da kazanılmış olur. Ama eğer kozmetik ya da fonksiyonel olarak önemli vücut bölgeleri tutulmuşsa tedavi gereklidir. Amaç skar oluşumunu önlemek veya lezyonu minimum skarla sonlandırmaktır (94). *L. tropica* infeksiyonları çoğunlukla tedavi edilir. Lokal tedavi amacıyla;

a) İntralezyonal olarak sodyum stiboglukonat, ketokonazol veya kriyoterapi, sıvı nitrojen veya ısı uygulaması yapılabilir.

b) Sb ile sistemik tedavi gerekliyse, VL'de olduğu gibi uygulanır (54). Yine de, KL'in tedavisi konusunda dünyada halen

tam bir fikir birliği yoktur. Topikal tedavilerden çok, intralezyonal Sb kullanımı halen oldukça tercih görmektedir (94).

c) Topikal olarak paromomisininin beyaz yumuşak parafin baz içindeki %12 metil benzetonyum kloridli veya % 15 üreli %15'lik pomadı eğer düzenli olarak günde iki kez on-yirmi gün boyunca uygulanırsa, *L. major*'un sebep olduğu eski dünya KL'ini tedavi edebilmektedir. Ancak üreli olan daha az yan etkiye yol açmakla birlikte daha az etkilidir (54).

d) *L. braziliensis* kompleksine ait türlerin yaptığı infeksiyonlar genelde Sb ile sistemik olarak tedavi edilirler. MKL olgularında erken tanı ve tedavi çok önemlidir. *L. braziliensis* infeksiyonları için seçilecek ilaç sodyum stiboglukonattır; ketokonazol etkisizdir. Relaps nadir görülmekle birlikte, eğer olursa başka bir ilaçla ikinci kez tedavi düzenlenmelidir (örneğin amfoterisin B). *L. mexicana* infeksiyonları ise Sb'a zayıf yanıt verir, ketokonazol daha etkilidir (17,94).

VL ve MKL'in tedavileri hayatı tehdit edebilen infeksiyonlar oldukları için hastaneye yatmayı gerektirir. MKL'de en az 24 günlük parenteral Sb uygulaması esastır. Ağır olmayan olgularda %75 oranında iyileşme ile sonuçlanır. Ama ağır olgularda, özellikle de Sb direnci söz konusuysa, amfoterisin B kurtarıcı ilaç olarak uygulanabilir (94). Haftalarca hastanede kalarak pahalı ve yan etkileri yüksek ilaçları kullanmak gereklidir.

Tablo 1. Bölgelere göre immunokompetan hastalarda visseral leishmaniasis için seçilen tedavi şekilleri (94) (Murray ve arkadaşlarından)

	Tedavi ve şekil	İyileşme Oranı
Bihar Bölgesi dışında Hindistan	Sb:IM/IV 20 mg/kg/gün 28-30 gün	%90-95
Bihar, Hindistan	Amfoterisin B:IV 1 mg/kg qod X15 doz veya Hergün,X 20 gün	%96-100
	Lipozomal Amfoterisin B: IV 1-3 mg/kg/gün X 5 gün	%93-97
	5-7.5 mg/kg/gün X 1 doz	%90-91
	Amfoterisin B lipid kompleks: IV 2-3 mg/kg/gün X 5 gün	%90-100
	Paromomisin: IM 16-20 mg/kg/gün X 21 gün	%93-97
	Miltefosine: oral 2-5 mg/kg/gün X28 gün	%94-96
Akdeniz	Lipozomal Amfoterisin B: IV 3 mg/kg/gün X 5 gün + 10. günde 20 mg/kg/gün X 28 gün	%95-98
		%98

Tablo 2. Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların sık görülen yan etkileri (Murray ve arkadaşlarından).

Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların sık görülen yan etkileri		
	Kutanöz ve visseral Leishmaniasisli hastalarda görülen reaksiyonlar	Öneriler
Pentavalan antimon		
KL için intralezyoner	Ağrı, eritem, ödem	Sık, geçici
Parenteral	Yüksek amilaz/lipaz veya LFT'ler	Çok sık, pankreatit çoğunlukla asemptomatik
	Myalji ve artralji	Sık. Hafif veya orta düzeyde
	Abdominal ağrı, bulantı	Sık. Hafif veya orta düzeyde
	Trombositopeni veya lökopeni	Ender. Hafif azalma
	EKG değişikliği veya kardiyotoksisite	Ender. KL'de hafif; VL'de hafiften ağıra kadar (fatal bile olabilir)
Paromomisin		
KL için topikal	Eritem, ağrı, ödem, blister	Ender, geçici. Formülasyonlarla reaksiyonlar değişebilir.
VL için parenteral	Ototoksisite	Ender. Nefrotoksisite saptanmamıştır.
Miltefosin		
	Bulantı, kusma veya diare	Çok sık
	Hiperглиsemi	Ender. VL'de çok ağır olabilir.
	Karditoksisite	Ender. VL'de çok ağır olabilir.
VL için Amfoterisin B		
	İnfüzyona bağlı	Çok sık
	Azotemi	Sık
	Anemi veya hipokalemi	Ender

Tablo 3. Kutanöz ve mukokutanöz leishmaniasis için seçilmiş tedavi rejimleri (Murray ve arkadaşlarından).

	Tür	Tedavi Rejimi	3 ayda iyileşme oranı
Kutanöz Hastalık			
Eski Dünya	<i>L. major</i>	Sadece izlem	%60-70
		Sb: IL \geq 3 ml lezyon başına; qodX8-15 enjeksiyon veya her 1-2 haftada X 3-8 enjeksiyon	\geq %75
		Sb:IM/IV 20 mg/kg/gün X 10 gün	İnceleniyor
		Flukanazol: oral 200 mg/gün X 6 hafta	%90
		Paromomisin: Topikal, 2 kez/gün X 2 hafta	İnceleniyor
	<i>L. tropica</i>	Sb:IL (yukarıdaki gibi) haftada bir X 8-11(ortalama)	\geq %90
		Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 10 gün	İyi dökümente edilmemiş
Yeni dünya	<i>L. mexicana</i>	Sadece izlem	>%75
		Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 10 gün	%90
	<i>L. panamensis</i>	Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 20 gün	%80-90
		Miltefosine: oral 2-5 mg/kg/gün X 28 gün	%80-90
		Pentamidine: IM 2 mg/kg qod X 7 enjeksiyon	%60-95
	<i>L. braziliensis</i>	Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 20 gün	%80-90
		Pentamidine: IM 2 mg/kg qod X 7 enjeksiyon	<%50
	Diğer türler	Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 20 gün	%80-90
Mukozal Hastalık			
Yeni Dünya	Herhangi bir tür	Sb: IM/IV 20 mg/kg/gün X 28 gün	Hafif hastalıkta %75
			Ağır hastalıkta %10-67
		Amfoterisin B: IV 2 mg/kg/ qod X 20 infüzyon	>%75

2.12. KORUNMA

Leishmaniasisin rastlandığı bölgelerin genel özellikleri itibariyle olgulara ulaşmak zor olmaktadır. Hastaların tedaviye uyumsuzluğu, yanlış düzenlenen reçeteler ve uygulanan yoğun tedaviler sonucunda direncin artması, kolay ulaşılabilir ucuz ilaçların eksikliği gibi durumlar antroponotik infeksiyonun varlığını rahatça sürdürmesini desteklemektedir. Yeni korunma stratejileri sürekli geliştirilmeye çalışılmakta, eğitim programları düzenlenmektedir (94).

2.12.1. Vektör kontrolü

Leishmaniasisi bulaştıran *Phlebotomus* cinsi kum sineklerinden korunabilmek için daha çok kişisel önlemler ön plana çıkmaktadır. Hindistan'daki kum sineklerinin dirençli olduğu organoklorin DDT insektisit grubundaki tek insektisit piretroid olmasına rağmen, ilaçlama çalışmaları başlıca bu ilaca dayalıdır (24,31). Evlerde uygulanacak ilaçlama çalışmaları özellikle KL için içeride yerleşen kum sineklerine karşı insanları koruyabilir. Ancak ilaçlama programları pek de sürdürülebilir değildir (94). Kum sinekleri geceleri beslendiklerinden endemik bölgelerde yatakların üzerinde cibinlik kullanımı yararlı bir uygulamadır (17,18,94). Akşam saatlerinden başlayarak uzun kollu giyinmek ve repellent kullanmak önerilir . Ancak kum sineklerinin 3 -6 mm boyutlarında olduğu unutulmamalı, seçilecek cibinliğin gözenekleri özel olarak

hesaplanmalıdır. Etkili olabilecek cibinlikte en az 30 delik / cm² olmalıdır. Ama bu sayıda dar gözenekli bir cibinliğin sıcak iklimlerde kullanımı zor olduğu için halk tarafından kullanım eksiklikleri oluşabilir. Çünkü hava geçirgenliği de o derecede az olacaktır. Daha geniş gözenekli bir cibinlik kullanıldığında piretroid ile güçlendirilirse, kum sineği ısırıklarını %64-100 oranında azalttığı bildirilmiştir (94). Ancak insektisit emdirilmiş cibinliklerin belirli aralıklarla insektisitle muamelesine devam etmek gerekir. Bugün için Afganistan, İran ve Hindistan yarımadasında üretimi esnasında kalıcı olarak insektisit emdirilen ve daha uzun dayanabilen malzemeler kullanılmaktadır. Halihazırda bir çok ticari insektisitli yatak tülü geliştirilme aşamasındadır. Bunlarda iki tanesi DSÖ Pestisit Değerlendirme Projesi'nce (WHOPES) sivrisinek mücadelesinde kullanılmak üzere kabul edilmiştir (151). Ancak bu tür uzun dayanan insektisitli tüller oldukça pahalı malzemeler olduğundan, leishmaniasisin endemik olduğu bölgelerde dağıtılması sorun oluşturmaktadır. Bununla birlikte yakın gelecekte sıradan tülleri insektisit solusyonları ile ıslatarak kullanılmak üzere yeni bir polimer reçinenin üretimi üzerinde çalışılmaktadır. Bu sayede bir çok endemik bölgede alışıldık insektisitlerin uzun süreli olarak kullanımı mümkün olacaktır (94). Evin içini kum sineğine karşı korumak gereken KL endemik bölgelerde de cibinlik yerine

insektisitle muamele görmüş yatak çarşafı ve hatta perde tülleri bile kullanılabilir .

VL'nin zoonotik orijinli olduğu bölgelerde rezervuara yönelik önlemler tercih edilir. Bunlar arasında köpeklerin tedavi edilmesi ve aşılması, böylece kanın VL'nin önlenmesi sayılabilir. Hastalanan köpeklerin itlaf çalışmaları da önlemleri olarak görünmekle birlikte, tüm popülasyona uygulanmadığı ve düzensiz yapıldığı için Brezilya'da başarısız olmuştur. Üstelik köpeklerden kan alınması, tanının konması, ardından itlaf gibi konulardaki gecikmeler, köpek popülasyonunun hızla üremesi ve hedef kitlenin büyümesi başarısızlığı artıran faktörler olmuştur. (94). Bu tür önlemler etik açıdan bakıldığında da uygulanabilirliği sınıra yakın seçenekler olarak karşımızda durmaktadır. Köpeklerin insektisitli solüsyonlar uygulanarak enfeksiyondan korunmaları yararlı olarak görünmekle birlikte, düzenli olarak uygulama gerekliliği zorluk yaratmaktadır. Bu ortamda, ticari olarak kullanıma sunulmuş olan ve deltametrin içeren tasmaların sekiz aya varabilen sürelerde köpekleri koruması bir umut ışığı yaratmıştır. Bu tasmaların İtalya'daki kullanımı sonucunda kum sineklerinin köpeklerden kan emerek beslenmesinin %90'a varan ölçülerde azaldığı, buna paralel olarak *L. infantum* enfeksiyonlarında da azalma görüldüğü bildirilmiştir (94). İran'da yapılan bir başka çalışmada tasma kullanımı sonucu köpeklerdeki VL insidansında %54'lük bir azalma olduğu, daha da

önemlisi çevre bölgelerde çocuklarda görülen VL insidansında %40'lara varan bir düşüş kaydedildiği bildirilmiştir (46,94).

2.12.2. Aşı

Aşı çalışmalarının 1970'li yılların başlarına kadar uzanan bir geçmişi vardır. *Leishmania* parazitleri hücre kültürü ve hayvan modellerine çok iyi adapte olabilmektedirler. Bu nedenle günümüze dek bir çok aşı adayı moleküller ve karışımlar *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla denenmiştir. Şu ana kadar yapılan insandaki iş görürlüğü kanıtlanmış tek *Leishmania* aşısı KL'e karşı leishmanizasyondur. Ancak artık pek yapılmamaktadır, çünkü bir takım kişilerde beklenmeyen lezyonlar oluşmasına sebep olmuştur (94). Günümüzdeki laboratuvar çalışmaları, yeni antijen ve adjuvanlara, canlı attenüe aşıya, saflaştırılmış rekombinant proteinlere, hedef olarak da dendritik hücrelere odaklanmıştır (94).

2.12.3. Kontrol Programları

Leishmania kontrol programlarında ilerlemeler sağlanmış olmasına rağmen, halen uygulamada olan kontrol programları çoğunlukla başarısız olmaktadır. Bunun en önemli nedeni dünya üzerindeki endemik bölgelerde, koruyucu sağlık hizmetlerinin sunumundaki yetersizlikler ve kaynakların kısıtlılığıdır. DSÖ, leishmaniasisi 1. kategorideki hastalıklar listesine almıştır. Bunun anlamı artmaya devam eden ve halen kontrol edilemeyen hastalık demektir. Olguların bildirimindeki aksama ve yetersizlikler de

kontrol programlarının tasarlanmasındaki başka bir problemi oluşturmaktadır. Bununla birlikte dünya üzerindeki Kala-Azar olgularının %70'nin Hindistan yarımadasında olması, endemik bölgelerin kesin sınırlarla birbirinden ayrılması ve bu bölgedeki olguların tamamının antroponotik kökenli olması, geniş çaplı kontrol programlarının uygulanarak, hastalığın önemli bir bölümünün eradikasyonu konusunda umut vericidir (94).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLER

EÜTF Parazitoloji AD Etkensel Tanı ve Poliklinik Laboratuvarında 1996 yılından beri NNN besiyerinde alt pasajlarla sürekliliği sağlanan, ülkemizin farklı bölgelerindeki insan ve köpeklerden elde edilen 37 *Leishmania* izolatu çalışmamıza dahil edilmiştir. Bu 37 izolatu dokuz tanesi çeşitli hasta köpeklerden, 28 tanesi (7 VL 21 KL) insanlardan izole edilmiştir (Tablo 4).

KL'li hastalardan elde edilen izolatu deri lezyonu aspirasyonu, VL hastalarından elde edilenler ise kemik iliği biyopsisi materyallerinden izole edilmiştir.

Örneklerin NNN besiyerine ekimi yapıldıktan sonra yaklaşık 2-3 hafta içerisinde promastigot şekilleri görülebilir. Laboratuvarımızda izole edilen parazit suşlarının pasajları 15 günde bir düzenli olarak sürdürülmektedir. Tüm bu pasajı sürdürülen izolatlara "EP" (Ege Parazitoloji) ile başlayan ve bir numara ile devam eden kodlar verilmektedir: (Tablo 4).

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Promastigotların Çoğaltılması

PZR'nda kullanılacak kalıp DNA'nın elde edilmesi amacıyla her bir izolattan alınan promastigotlar önce sıvı besiyerinde sayıca

Tablo 4. Çalışmaya Alınan İzolatlar

	Lab No.	Tip	Konak	Bölge
1	EP1	HVL	İnsan	Manisa
2	EP31	HVL	İnsan	Denizli
3	EP61	HVL	İnsan	Denizli
4	EP62	HVL	İnsan	İzmir
5	EP86	HVL	İnsan	İstanbul
6	EP105	HVL	İnsan	Bodrum
7	EP39	KL	İnsan	Urfa
8	EP40	KL	İnsan	Urfa
9	EP84	KL	İnsan	Aydın
10	EP87	KL	İnsan	Urfa
11	EP90	KL	İnsan	Ödemiş
12	EP91	KL	İnsan	Aydın
13	EP92	KL	İnsan	Kayıt yok
14	EP94	KL	İnsan	Aydın
15	EP93	KL	İnsan	Milas
16	EP97	KL	İnsan	Urfa
17	EP98	KL	İnsan	Urfa
18	EP99	KL	İnsan	Urfa
19	EP100	KL	İnsan	Urfa
20	EP103	KL	İnsan	Urfa
21	EP104	KL	İnsan	Urfa
22	EP106	KL	İnsan	Urfa
23	EP108	KL	İnsan	Urfa
24	EP109	KL	İnsan	Urfa
25	EP110	KL	İnsan	Urfa
26	EP111	KL	İnsan	Aydın
27	EP120	KL	İnsan	Aydın
28	EP16	KanL	Köpek	Manisa
29	EP17	KanL	Köpek	Manisa
30	EP33	KanL	Köpek	Kuşadası
31	EP35	KanL	Köpek	Kuşadası
32	EP43	KanL	Köpek	Kuşadası
33	EP50	KanL	Köpek	Kuşadası
34	EP80	KanL	Köpek	İzmir
35	EP 88	KanL	Köpek	Çorum
36	EP127	KanL	Köpek	Bodrum
37	EP32	HVL	İnsan	Denizli

fazlalaştırıldı. Bu amaçla sıvı besiyeri olarak iine %10 Fetal Bovin Serum (FCS, Sigma-F9665) eklenmiş Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, BiochromAG-FG1235) besiyeri (154) kullanıldı.

Besiyeri, 12,5 cm²'lik hücre kültürü flasklarına üçer ml dağıtıldı. Bu flaskların ilerine her bir NNN besiyeri tüpünden 0,5'er ml ekim yapılarak, flasklar izolatların alındığı besiyeri tüpleriyle aynı isimleri taşıyacak biçimde etiketlendi. Sonra flasklar 24 °C'de inkübe edildi. 3 gün sonra inverted ışık mikroskopunda çoğalma olup olmadığı incelendi. Mantar ya da bakteri infeksiyonu olmadığına emin olunan flaskların içlerindeki sıvı koyu kirli sarıya döndükçe ikişer ml daha %10 FCS + RPMI 1640 besiyerinden üzerlerine eklendi. Toplam 5'er ml olan flasklardaki sıvıların koyu kirli sarıya dönüşmeleri beklendi. Tüm inkübasyon işlemleri 24 °C'ye ayarlanmış etüvde gerçekleştirildi.

3.2.2. Promastigotların toplanması

Flasklardan istenen renge ulaşanların içindeki promastigotlar toma lamında sayıldı. Miktar, 2-4 X 10⁷/ml 'ye ulaştığında santrifügasyon uygulandı (47). Her flaskın içeriği 15 ml'lik plastik kapaklı steril tüplere alınarak 2500 rpm'de 10 dk evirildi. Ardından üstte kalan sıvılar dikkatli bir şekilde dökülerek tüplerin dibinde yalnızca pellet bırakıldı.

3.2.3. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyon yöntemi olarak fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Literatür bilgisine göre fenol-kloroform ekstraksiyonu, içinde bir çok lizis, denatürasyon, ekstraksiyon, yıkama adımı olan eksiksiz bir saflaştırma yöntemidir . Bu nedenle bu yöntem tercih edilmiştir.

- **Malzemeler:**

Kültürden hazırlanan pellet

Lizis tampon çözeltisi

SDS %10 (kütle/hacim) (AppliChem-A2263)

Proteinaz K (20 mg/ml) (AppliChem-A3830)

Fenol:Kloroform:İAA (25:24:1,h/h) (AppliChem-A2493)

Kloroform (AppliChem-A3633)

İzoamil alkol (Sigma-I9392)

Etanol-absolü (Smyras-64175)

Etanol %70

Sodyum asetat (3 M, pH 5.2)

TE (pH 8.0)

- **Eriyikler ve tampon çözeltileri:**

Lizis tampon çözeltisi

NaCl 1,46 g

EDTA (0,5 M, pH 8,0) 10 ml (AppliChem-A2937)

Tris Cl (1 M; pH 7,4) 25 ml

Tüm bu kimyasallar karıştırıldıktan sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. 15 dk otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

SDS %10

Önce 90 ml distile su içinde 10 g elektroforetik SDS çözüldü. Isıtıcıli manyetik karıştırıcıda 68 °C'ye kadar ısıtılırken bir yandan da karıştırıldı. Sonra karışımın pH'sı konsantre HCl kullanılarak 7,2'ye ayarlandı. Distile su ile hacim 100 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K 20 mg/ml

5 ml steril bidistile su içerisine 100 mg liyofilize toz halindeki proteinaz K konularak çözüldü. Ardından eppendorf tüplere 200'er µl hacminde dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

Etanol %70

Absolü etanolden 70 ml alınarak 30 ml distile su ile karıştırılarak 4 °C'de saklandı.

EDTA; 0,5 M-pH 8,0

Disodyum EDTA-2H 2O	186,1 g
NaOH tabletleri	20 g

Bu karışım hızlı bir şekilde manyetik karıştırıcıda hazırlandı. Bu esnada gerektiğinde EDTA'yı çözebilmek için NaOH tabletleri eklendi.

Solüsyon karıştırma sırasında hafifçe ılıtılarak çözünme hızlandırıldı. Oda sıcaklığına soğuması beklendikten sonra pH'sı ayarlanıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. 100'er ml'lik şişelere bölünüp otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

Tris Cl; 1M-pH 7,4

Tris baz 121,1 g (AppliChem-A2264)

Distile su 800 ml

HCl konsantre 70 ml

(pH 8,0'a ayarlanmak isteniyorsa 42 ml HCl kullanılır.)

Distile suyun içine 121,1 g Tris baz konuldu ve çözüldü.

Manyetik karıştırıcıda damla damla HCl'in tamamı eklenerek pH 7,4'e ayarlandı.

Na-Asetat; 3M-pH 5,2

Na-Asetat (ma=136,1) 40,83 g (ICN-194012)

Distile su

Glasiyal asetik asit (konsantre) (Sigma-A6283)

Sodyum asetat 60 ml distile su içinde çözüldü. Daha sonra konsantre glasiyal asetik asit kullanılarak pH 5,2'ye ayarlandı. Hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

TE; pH 8,0

Tris Cl 1 M pH 8,0 2 ml

EDTA 0,5 M-pH 8,0 400 µl

Distile su

170 ml distile su içinde Tris Cl ve EDTA karıştırıldı. pH, 1 N HCl ile 8,0'a ayarlandı. Ardından hacim distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. 20 dk otoklavlandıktan sonra, oda sıcaklığında saklandı.

- **Ekstraksiyon Protokolü (87)**

1) Tüplerdeki pelletlerin üzerine 1200 µl lizis tampon çözeltisi konuldu. 2-3 dk nazikçe karıştırıldı.

2) Karışımlar izolat kodları ile etiketlenmiş olan 1,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine %10'luk SDS çözeltisinden son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde 65'er µl eklendi. Tüpler iyice ve nazikçe karıştırıldı.

3) Üstlerine son konsantrasyonu 100 µ/ml olacak şekilde, 20 mg/ml'lik proteinaz K'dan 6'şar µl eklendi. Tekrar nazikçe karıştırıldı.

4) Bütün eppendorf tüpler 60 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerinde gece boyunca (o/n) inkübasyona bırakıldı.

5) Ertesi gün eppendorf tüplerdeki karışımlar etiketli başka tüplere paylaştırılarak ikiye bölündü. Her eppendorf çiftinden birisi yedekleme amacıyla 4 °C'ye kaldırıldı. İşleme diğer tüpler ile devam edildi.

6) Bütün tüplere içlerindeki sıvıyla eşit hacimde, 620'şer µl Fenol:Kloroform:İzoamil alkol (25:24:1) karışımından eklendi. Bu

son karışım, tüpler ters/düz edilmek suretiyle nazikçe 5 dk karıştırıldı.

7) Tüm tüpler mikrosantrifüje konularak 14000 g'de 10 dk boyunca çevrildi. En üstteki sıvı faz başka etiketli tüplere alındı. Bunu yaparken kullanılan pipet uçlarının ara faza dokunmamasına özen gösterildi. Her tüpteki yeni sıvı yaklaşık 550 µl kadardı.

8) Her bir tüpteki bu sıvıların üzerine 525 µl kloroform ve 25 µl İzoamil alkol konuldu. Tüpler 5 dk boyunca ters/düz yapılarak karıştırıldı.

9) Ardından bu karışımlar 14000 g'de 10 dakikalığına mikrosantrifüje konuldu. Santrifügasyon sonunda tüplerin içindeki sıvının en üstte kalan fazı başka etiketlenmiş eppendorf tüplere alındı. Her tüpteki sıvı yaklaşık 450 µl kadardı.

10) Tüplerin üzerine içlerindeki sıvı miktarına göre 1/10 hacimde, yani 45 µl Na-asetat, tüpün kalan bütün boşluğuna -20 °C'den çıkarılan absolü etanol konuldu. 5 dk boyunca nazik bir şekilde ters/düz yapılarak karıştırılıp, o/n -20 °C'de inkübasyona bırakıldı.

11) Ertesi gün bütün tüpler mikrosantrifüjde 14000 g'de 30 dk boyunca çevirildi. Santrifügasyondan sonra tüplerin içindeki sıvılar yavaşça döküldü.

12) Tüplerin içine ağızlarına kadar %70 etanol konulup tekrar yavaşça bütün sıvılar döküldü. Böylece her tüp bir kez yıkanmış

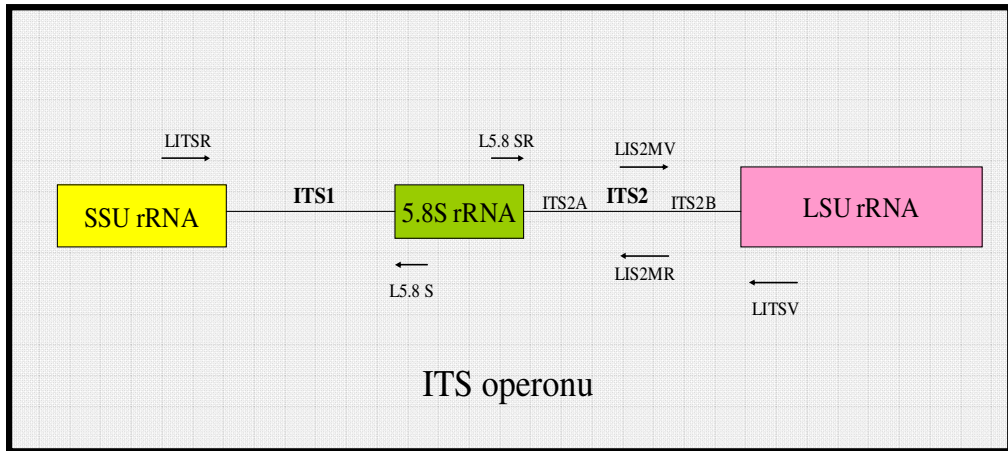
oldu. Bunun ardından tüpler ağızlarına kadar tekrar %70 etanol ile dolduruldu. Tüpler 14000 g'de 15 dk çevrildi.

13) Santrifüj işlemi bitince tüplerin içindeki sıvılar yavaşça döküldü. Tüpler ters çevrilerek havada kurumaya bırakıldı.

14) Tüplerin hepsi tamamen kurduğunda (çeperde bir damla bile kalmayınca kadar), içlerine 100'er µl bidistile su konulup yavaşça karıştırıldıktan, böylece DNA süspanse edildikten sonra 4 °C'ye kaldırıldı.

3.2.4. PZR Amplifikasyonu

PZR ile çoğaltılacak DNA bölgesi olarak small subunit rRNA (SSU rRNA) ve large subunit rRNA (LSU rRNA) genleri arasında bulunan; ancak hiçbir proteini kodlamayan, sadece bu iki geni ayıran; ama üzerinde aynı zamanda 5.8S rRNA genini de taşıyan ve yaklaşık 1 kbp uzunluğundaki Internal Transcribed Spacer (ITS) operonu seçildi (45, 47, 48).



Resim 16. ITS operonu; 950-1130 bp (El Tai ve ark., 2000)

Malzemeler:

DNA'sı ekstrakte edilmiş kültür örnekleri

Negatif kontrol (bidistile su)

dNTP miks; 10 mM (MBI Fermentas-R0192)

10X PCR Buffer (- MgCl₂); (MBI Fermentas)

Tris-HCl; 100 mM (pH 8,8 oda sıcaklığında)

KCl; 500 mM

Nonidet P40; %0,8 (Nonilfenil-Polietilen Glikol)

MgCl₂ ; 25 mM (MBI Fermentas-R0971)

Primer çifti

LITSR; 25 pmol/μl (İontek)

LITSV; 25 pmol/μl (İontek)

Taq DNA Polimeraz; 5 U/μl (MBI Fermentas-EP0401)

DMSO (Dimetilsulfoksid) (AppliChem-A3006)

Bidistile su

• Primer sulandırımı:

Kullanılan primer çifti ve sekansları şöyleydi:

LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG- 3'); 90,7 pmol/μl (Stok)

LITSV (5'-ACACTCAGGTCTGTAAAC- 3'); 84,4 pmol/μl (Stok)

Sulandırım için $M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$ formülünden yararlanıldı:

LITSR için

27,6 μl stok + 72,4 μl ddH₂O = 100 μl LITSR (25 pmol/μl)

LITSV için

29,6 µl stok + 70,4 µl ddH₂O = 100 µl LITSV (25 pmol/µl)

Böylece kullanma solüsyonları elde edildi.

• **Master Miks hazırlanması ve PZR:**

1) Master miks (tüm PZR solüsyonlarının bir araya konulduğu ana karışım) 10 ml'lik tüp içerisinde hazırlandı. Master miks'in hazırlanışı Tablo 5'te gösterilmiştir.

2) Master miks (MM) vortekslendikten sonra çeperlere yapışan damlacıklardan da yararlanmak için çok kısa bir santrifüj (spin) ile tüm sıvı bir araya toplandı.

Tablo 5. ITS-PZR için Master miks (Hesaplamalar toplam 40 örneğe göre yapıldı. PZR toplam hacmi için 100 µl esas alındı.)

No.	Malzeme	İlk Konsantrasyon	İstenen Konsantrasyon (100 µl'de)	Miktar	Toplam miktar (42)
1	PCR Buffer	10X	1X	10 µl	400 µl
2	MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	6 µl	240 µl
3	dNTPs	10 mM	200 µM	2 µl	80 µl
4	LITSR	25 pmol/µl	50 pmol	2 µl	80 µl
5	LITSV	25 pmol/µl	50 pmol	2 µl	80 µl
6	DMSO	...	2,5 µl	2,5 µl	100 µl
7	Taq Poly.	5 U/µl	4 U	0,8 µl	32 µl
8	ddH ₂ O	70,7 µl	2828 µl
Toplam				96 µl	3840 µl

3) 0,5 µl'lik 38 adet (37 örnek, 1 negatif kontrol) steril PZR tüpleri etiketlendikten sonra MM'deki sıvı karışımdan bunların her birine 96'şar µl konuldu.

4) Her bir etiketli PZR tüpüne aynı etikete sahip DNA ekstrakt tüplerinden 4'er µl DNA eklenerek, her tüpün içinde 100 µl'lik PZR karışımı oluşturuldu. Negatif kontrol de aynı şekilde eklendi. Pozitif kontrol kullanılmadı. Çünkü ekstraktlar zaten parazitolojik bakı yöntemi ile pozitif olduğu bilinen örneklerden hazırlanmıştı. Ayrıca bunların bir kısmı da Montpellier Üniversitesi'nde zimodem analizi yöntemi ile suş tayini yapılmış örneklerdi.

5) Kalıp DNA'lar eklendikten sonra, her tüpün üzerine steril mineral yağından 1 damla konularak, reaksiyonun gerçekleşmesi esnasındaki buharlaşma engellendi.

6) Bütün tüpler Thermocycler® (Biometra) termal siklus cihazına yerleştirildi. Tablo 6'daki PZR protokolü programlanarak çalıştırıldı.

Tablo 6. ITS-PZR protokolü (114)

Siklus No.	Denatürasyon	Tutunma	Uzama
Başlangıç	5 dk, 95 °C	0	0
35 siklus	20 sn, 95 °C	30 sn, 50 °C	1 dk, 72 °C
Son siklus	0	0	6 dk, 72 °C
Sonuna dek	4 °C		

7) Ardından termal siklus cihazından çıkarılan tüpler görüntüleninceye kadar 4 °C'ye kaldırıldı.

3.2.5. Agaroz jel elektroforezi

PZR ürünlerinin, görüntüleme amacıyla agaroz ile hazırlanan jele yüklenerek, elektrik alanda belirli bir süre boyunca boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamaktır. ITS-PZR ürünlerini görüntülemek için %1'lik (k/h) agaroz jel kullanıldı.

- **Malzemeler:**

PZR ürünleri

Agaroz (AppliChem-A2114)

TAE (Tris Asetat EDTA) tampon çözeltisi; 50X

Loading dye (yükleme boyası); 6X (MBI Fermentas-R0611)

Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (MBI Fermentas-SM0372)

*Jel elektroforezlerinde DNA ölçeği olarak kullanılan GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder'ın içerdiği bant uzunlukları:
Sırayla 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031bp (üreticinin verdiği prospektüs bilgisi)

Etidyum Bromid; 10 mg/ml (AppliChem-A1152)

Distile su

- **Eriyikler ve tampon çözeltileri:**

TAE; 50X

Tris baz 121 g

Glasiyal asetik asit 28,55 ml

EDTA; 0.5 M 50 ml

Yukarıdaki kimyasallar karıştırıldıktan sonra bidistile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Daha sonra manyetik karıştırıcı ile tamamen homojenize oluncaya kadar düşük devirde karıştırıldı. En son pH'sı 8,5'a ayarlandı. Bu eriyik stok solüsyon olarak hazırlandı ve gerektiğinde 50 kat sulandırılarak kullanıldı.

Etidyum bromid; 0,5 µg/ml çalışma solüsyonu

10 mg/µl'lik stok solüsyonundan 1 lt'lik soğuk su banyosuna 50 µl konularak homojenize olması beklendi.

• **Elektroforez ve görüntüleme:**

1) 2 g toz agaroz tartılarak 500 ml'lik bir cam şişeye konuldu. Bunun üzerine 200 ml TAE 1X solüsyonu eklendi.

2) Bu karışım mikrodalga fırınına konularak, 180 Watt güçte 8-10 dk boyunca homojenize edildi. Tamamen berraklaştıktan sonra banko üzerinde soğumaya bırakıldı.

3) El yakmayacak kadar soğuyuncaya dek beklendi (50-55 °C). Jelin polimerize olmaması için oda sıcaklığına kadar beklenmedi.

4) Büyük jel hazırlama tepsisinin "stoper" ları takılarak iki sıra tarak uygun pozisyona yerleştirildi. Bunun üzerine ılınmış olan %1'lik sıvı agaroz yavaşça boşaltıldı. Bunu yaparken hava kabarcığı oluşmaması için azami dikkat gösterildi. Yine de oluşan hava kabarcıkları bir pipet ucu yardımıyla tepsinin bir köşesine itildi.

5) Oda sıcaklığında jelin iyice soğuyarak tamamen polimerize olması beklendi. Ardından taraklar dikkatle ve çok yavaş hareketlerle jelin içinden çıkarıldı.

6) En son olarak "stoper" lar da çıkarıldıktan sonra jel tepsi elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine jelin üst yüzeyini 1 mm geçecek şekilde TAE 1X solüsyonu dolduruldu.

7) PZR ürünlerinin ve DNA ölçeğinin yüklenmesine geçildi. DNA ölçeği yüklenirken 2 µl ladder, 2 µl yükleme boyası ile karıştırılıp 8 µl elektroforez tampon solüsyonu eklenerek jelde uygun bulunan çukurlara konuldu. Örnekler ise 10 µl PZR ürünü, 2 µl loading dye ile karıştırılarak hazırlandı. Çukurlara tüm DNA-boya karışımları 10'ar µl konuldu. Örnekler tüplerden alınırken üst tabakadaki mineral yağı ile karışmamasına özen gösterildi. Bunun için pipetleme esnasında pipet uçlarının yağ tabakasını geçtiği görülerek, pipet uçlarının tüplerin en dibine değmesi sağlandı. Her bir karışımdan jeldeki çukurlara çok nazik biçimde 10'ar µl konuldu.

8) Elektroforez tankının kapağı kapatıldı, elektrotlar kırmızı ve siyah renkleri birbirini tutacak şekilde güç kaynağına bağlandı.

9) Voltaj, 1-5 V/cm (anot ve katot arasındaki mesafe ölçülerek) ilerleme sağlayabilmek için yaklaşık 110-120 Volt olarak ayarlandı. Güç kaynağı çalıştırıldı.

10) Yükleme boyasının açık mavi fraksiyonu jelin 2/3'üne ulaştığında elektroforez durduruldu. Kapak açılıp jel tepsi sıvısının

içinden çıkarıldı. Jel tepsiden ayrılarak etidyum bromid (EB) çalışma solüsyonunun içine konuldu.

11) Boyanma aşaması 20 dk sürdü. 20 dk sonra jel EB içinden çıkarılarak distile su içine konularak durulanması beklendi. Bu aşama 10 dk sürdü.

12) Durulama bittiğinde jel distile su içinden alınarak transilluminatör cihazının üzerine konuldu. Ultraviyole ışığı altında görüntülendi. Ardından elde edilen görüntüler fotoğraf makinesi ile kaydedildi.

3.2.6. RFLP analizi

Leishmania tür ayrımını gerçekleştirebilmek için PZR ile çoğaltılan hedef DNA bölgesini RE kullanarak kesmek en pratik yöntemdir. Bu amaçla ITS-PZR ürünlerini kesmek için Taq I enzimi seçilmiştir (48).

- **Malzemeler:**

ITS-PZR ürünleri

"Buffer Taq"; 10X

RE: Taq I (MBI Fermentas-ER0671)

Bidistile su; steril

Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder

Yükleme boyası; 6X (Fermentas)

Agaroz jel; %2:

Agaroz	4 g
--------	-----

TAE tampon solüsyonu; 1X 200 ml

Etidyum bromid çalışma solüsyonu

• **Master Miks hazırlanması, RFLP ve görüntüleme:**

1) Master miks 1,5 ml'lik eppendorf tüp içinde hazırlandı. Toplam reaksiyon karışımı 20 µl olacak şekilde ve 40 örneklilik hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7. ITS-RFLP analizinin MM hazırlanışı (40 örneklilik)

No.	Malzeme	İlk Konsantrasyon	İstenen Konsantrasyon (20 µl'de)	Miktar (1 Tüp)	Toplam miktar
1	Buffer Taq	10X	1X	2 µl	80 µl
2	Taq I (Enzim)	10 U/µl	20 U	2 µl	80 µl
3	ddH ₂ O	6 µl	240 µl
Toplam				10 µl	400 µl

2) Yukarıdaki tabloda verilen kimyasallar belirtilen miktarlarda karıştırıldı. Öncelikle su ve tampon sonra da enzim karışıma eklendi. Ardından vorteks ile karıştırılıp, kısa bir spin santrifüj ile tüm sıvının tüpün alt kısmında toplanması sağlandı. Enzim miktarının asla toplam reaksiyon miktarının %10'unu aşmamasına dikkat edildi. Böylece, enzim solüsyonu daima -20 °C'de saklandığından ve bu ancak gliserol içinde mümkün olduğundan dolayı %10'u aşan enzim miktarlarında, solüsyondaki gliserolün doğrudan reaksiyonu inhibe edici etkisi engellenmesi amaçlandı.

3) 0,5 µl'lik steril tüpler PZR ürünleri ile eşleşecek şekilde etiketlenip, içlerine 10'ar µl MM karışımından konuldu.

4) Tüplere aynı isimli PZR ürünlerinden 10'ar µl eklendi. Bu yapılırken mineral yağının da alınmamasına dikkat edildi.

5) Kısa bir spin santrifüj ile tüm damlacıklar bir araya toplandı. Ancak buharlaşmayı önlemek için tüm tüplerin kapak kenarları parafilm® ile sıkıca sarıldı. Sonra tüplerin tamamı, daha önceden, enzim üreticisinin tavsiyesi doğrultusunda 65 °C'ye ısıtılan "heat block" üzerine yerleştirildi.

6) 65 °C'de 1,5 saatlik bir inkübasyonu takiben tüpler alınarak 4 °C'de soğumaya bırakıldı. Bu arada yukarıda anlatılan yöntemle, bu kez %2'lik agaroz jel hazırlandı.

7) Tüm RFLP ürünleri ve DNA ölçeği, yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Bu esnada 3 µl DNA ölçeği ve 1 µl yükleme boyası; 5 µl ürün ve 1 µl yükleme boyası karıştırılıp, çukurlara 5'er µl karışım yüklendi. Yükleme esnasında pipetlemeler çok dikkatle gerçekleştirildi. Sonra aynı şartlarda elektroforez başlatıldı.

8) 80-90 dk sonra elektroforez durduruldu. Jel tepsisinden çıkarılarak ethidium bromid içerisinde 20 dk boyunca boyandı. Bundan sonra da 10 dk durulama tankında durulandı.

9) 10 dk'nın sonunda UV ışık altında transilluminatörde incelenen PFLP jeli, fotoğraf makinesi yardımıyla görüntülendi ve bu görüntüler kaydedildi.

4. BULGULAR

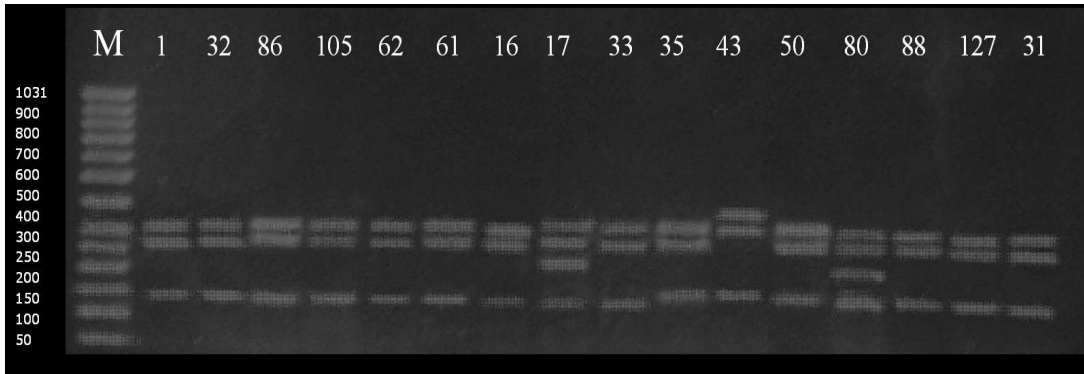
4.1. ITS-PZR

UV ışığı altında yapılan görüntülemelerde 37 örneğin hepsinde 1 kbp uzunluğunda DNA bantları görüldü. Bazı örneklerde üst üste çakışan iki bant görüntüsü ya da daha kalın bantlar vardı.

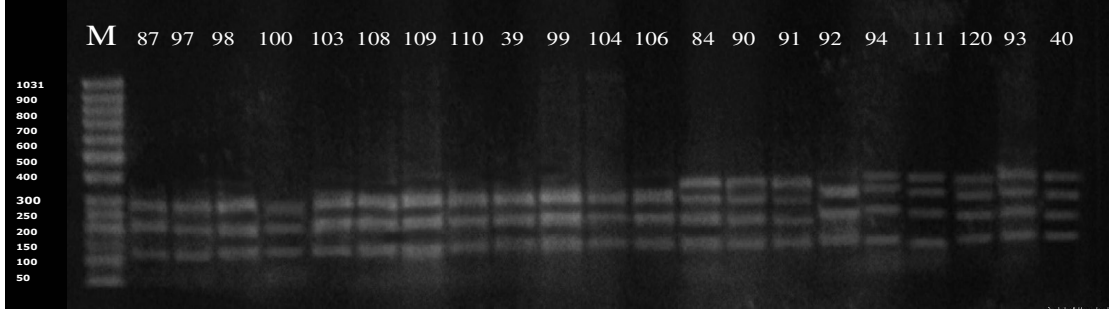
Tüm ITS bantlarına bakıldığında, hepsinin de düz bir çizgi gibi aynı hizada olmadığı görüldü. Bunun nedeni de ITS operonunun bütün *Leishmania* cinsi için bire bir aynı uzunlukta olmayıp, 950-1130 bp arasında değişiyor olmasıdır. Bu yüzden ITS operonunun uzunluğunu yaklaşık 1 kbp olarak kabul edildi.

4.1.1. İzolatlardan elde edilen ITS dizilerinin RFLP analizi

PZR sonucunda elde edilen 37 adet ayrı izolata ait ITS dizileri TaqI RE kullanılarak kesildi. TaqI RE ile yapılan kesim işlemi, bütün örneklerde başarıya ulaştı. Beş farklı ana kesim modeli elde edildi (Resim 17 ve Resim 18):



Resim 17. İnsan ve köpek VL olgularından elde edilen ITS-PZR- RFLP sonuçları



Resim 18. Şanlıurfa ve Ege bölgesindeki KL olgularından elde edilen ITS-PZR-RFLP sonuçları

1. Visseral leishmaniasisli 13 olgudan elde edilen izolatların restriksiyon modeli (insan ve köpek)
2. Visseral leishmaniasisli 2 olgudan elde edilen izolatların restriksiyon modeli (köpek)
3. Visseral leishmaniasisli 1 olgudan elde edilen izolatın restriksiyon modeli (köpek)
4. Ege bölgesine ait kutanöz leishmaniasisli olguların restriksiyon modeli
5. Urfa ve çevresine ait kutanöz leishmaniasisli olguların restriksiyon modeli

Gerek insan, gerekse köpekten elde edilen 16 örneğin restriksiyon modelleri benzerdi. İnsandan elde edilen 7 izolatın RFLP analizinde, üç banttıan oluşan model ortaya çıktı. Bu bantların yaklaşık değerleri 320 bp, 275 bp ve 150 bp olarak bulundu. Elde

edilen bantların tüm insan VL izolatlarında aynı olduğu (identik) görülerek 1 nolu modele uygun olduğu kabul edildi.

Leishmaniasisli köpeklerden izole edilen parazit DNA'sı ile yapılan RFLP analizi de çok benzer sonuçlar verdi. Toplam dokuz köpek VL izolatından, altı tanesinin restriksiyon modelleri, insan VL olgularında ortaya çıkan restriksiyon modelleri ile identik idi. Geriye kalan iki örnekte de tamamıyla aynı bantlar vardı. Ancak bunlarda ek olarak 225 bp'lik bir bant daha elde edildi. Son olarak, bir örnek yaklaşık değerleri 370, 320 ve 150 bp civarında tahmin edilen üç bantlı değişik bir restriksiyon modeli sergiledi.

Kutanöz leishmaniasisli olgulardan elde edilen örneklerden izole edilerek çoğaltılan PZR ürünlerinin RE ile kesimi sonucu ortaya çıkan modeller VL'li olguların modelinden tamamen farklı idi. 21 adet KL olgusundan elde edilen izolatların 14 tanesi Şanlıurfa'dan, 5 tanesi Aydın'dan, 1 tanesi Ödemiş ve 1 tanesi de Milas'tan gelen hastalardan elde edilmiştir.

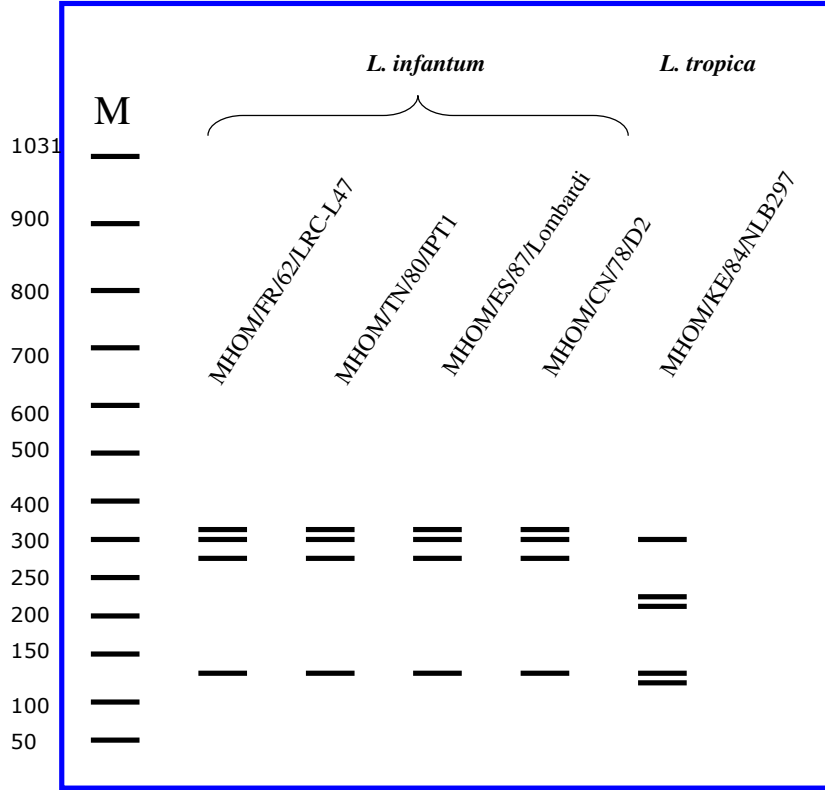
Şanlıurfa kaynaklı ondört izolatın PZR ürünleri kullanılarak uygulanan RFLP analizinde elde edilen restriksiyon modellerinde görülen bantların yaklaşık boyutları şöyle idi: 275 bp, 200 bp, 130 bp. Bir tanesinde ek olarak 350 bp'e yakın bir bant görünümü daha elde edildi. Bunun dışında, hepsi son derece homojen bir görünümdeydiler. Ege bölgesi kaynaklı yedi izolatın DNA'larından amplifikasyonla elde edilen PZR ürünlerine uygulanan RFLP analizi

sonunda ortaya çıkan restriksiyon modellerinde görünen bantların yaklaşık boyutları ise şöyle idi: 275, 200 ve 130 bp'lik bantlara ek olarak 350 bp'lik bir bant daha vardı.

4.1.2. Varsayımsal RFLP analizi

Elde edilen restriksiyon ürünleriyle karşılaştırabilmek amacıyla Avrupa Gen Bankası arşivinde bulunan *L. infantum* ve *L. tropica* ITS dizileri bulunarak, bu dizilere Taq I RE'nin kesim dizilerinin yerlerini belirlemek suretiyle varsayımsal bir RFLP analizi uygulandı. Elde beş adet suşun ITS dizisi mevcuttu. Bunların dördü *L. infantum* suşları, birisi de *L. tropica* suşuydu. *L. infantum* suşları sırasıyla Fransa, Tunus, İspanya ve Çin kaynaklı; *L. tropica* suşu ise Kenya'ya aitti. Elde edilen sonuçlar yine aynı şekilde varsayımsal bir jelde gösterildi ve çalışmamızda elde edilen modeller ile karşılaştırıldı.

Resim 19. Avrupa Gen Bankası arşivinde bulunan ITS dizilerine varsayımsal olarak uygulanan RFLP analizi modelleri.



5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı, *in vitro* kültürde üretilmeye devam edilen örneklerin tür tayinlerinin yapılması ve çeşitli klinikler ile başka hastanelerden tanı konulması amacıyla laboratuvarımıza gönderilen leishmaniasis şüpheli örneklerin sonuçlarını tür düzeyinde verebilmek, aynı zamanda bundan sonra yapılacak saha çalışmaları ve sonrasındaki epidemiyolojik verileri moleküler biyolojik yöntemlerle güçlendirerek, daha açık bir şekilde yorumlamak üzere rutin hizmete sunulabilecek bir testi değerlendirmek olarak belirlenmiştir. Çok geniş bir coğrafyaya sahip olan ülkemizde, *Leishmania* parazitlerinin şimdiki dağılımı ile türler arası ve aynı tür içerisindeki genetik çeşitliliğin de araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen görüntüler, çalışmayı başlangıçtaki amacının bir adım daha ötesine taşıyarak, türler içerisindeki ve ülkemizin bölgeleri arasındaki ayrımlar hakkında da yeni bulgular ortaya koymuştur.

PZR-RFLP yöntemi, elde edilmek istenen sonuçlar için en uygun yöntem olarak seçilmiştir. Çünkü tür ayırımına gidebilmek için yeterli derecede duyarlılık ve özgünlüğe sahip bir yöntem kullanmak gerekmektedir. Bu yöntemin aynı zamanda çok karmaşık olmaması, görece olarak ucuz olması; en önemlisi de, elde edilen sonuçların ilk bakışta yeterli fikir verebilmesi tercih edilmesi için önemli nedenlerdir.

Araştırmada kullanılan RFLP yöntemi ülkemizde 2005 yılında Serin ve arkadaşları tarafından bölgesel olarak Adana Çukurova Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran hastalardan elde edilen klinik örneklerle uygulanmıştır. Hedef DNA bölgesi olarak seçilen miniexon geni amplifiye edilerek o bölgedeki restriksiyon modelleri ortaya çıkarılmıştır (124). lke çapında farklı bölgelerden elde edilen suşların karşılaştırıldığı başka çalışma yoktur.

oğaltılması için seçilen DNA dizisi ise daha önce Türkiye'de bir başka araştırmacı tarafından değerlendirilmemiştir. 1997'de Bozkurt ve arkadaşları tarafından Ege Bölgesinde, sadece klinik tanıya dayanılarak yapılan bir bildiride, "acaba şark çıbanı garplılaşıyor mu?" sorusu gündeme getirilmemiştir. İlerleyen satırlarda, özellikle bu çalışmadan sonra, sınırlı da olsa bu soruya daha kolay yanıt vermek mümkün olacaktır.

Leishmania rRNA genleri ardışık olarak tekrarlayan, farklı farklı birden fazla kromozomda yer alan, ard arda dizilmiş ünitelerden oluşur. Bu genler bütün ökaryot organizmalarda var olan, ribozomal RNA'yı kodlayan nükleer genlerdir (29). Bunların hepsi "non-transcribed spacer" (NTS) denilen ve herhangi bir proteini kodlamayan diziler (46) arasında yer alırlar. Bu genlerin isimleri daha önce de söz edildiği gibi, SSU rRNA, 5.8S RNA ve LSU rRNA olup; son derece iyi korunmuş olan cinse özgü bölgelerdir (122). Bu genler ITS denilen ara dizilerle ayrılmıştır. Hem NTS hem de ITS

bölgeleri çok geniş bir değişkenlik göstermektedir (11,29). Cupolillo ve arkadaşlarına göre (2003) ITS dizisindeki polimorfizm veya değişiklikler parazitin yeni bir ekolojik çevreye adapte olduğunu ya da adapte olma yeteneğini göstermez. Çünkü ITS herhangi bir proteini kodlamayan bir dizidir. Sadece genetik değişkenliğinin ve dolayısı ile epidemiyolojik çalışmalara uygunluğunun bir göstergesidir (29). Özellikle ITS görece olarak küçük boyutu nedeniyle, moleküler biyolojik araştırmalar için daha ilgi çekicidir. Aynı organizmada birden çok kromozom içinde tekrarlayan diziler helinde yer almaları ve çok iyi korunmuş olmaları, "moleküler marker" olarak değerlerini artıran özelliklerdir (29,42,119). Bu yüzden bu çalışma için ITS operonunu seçilmiştir.

Bu çalışmada değerlendirilen 37 örnek ile türe özgün ve hatta aynı tür içerisinde bölgelere göre farklı "DNA parmak izi" elde edilmiştir. Çalışmaya alınan örneklerin seçiminde in vitro kültürasyonu sürdürülen izolatlar içinden olabildiğince farklı bölgelere ait örnekler seçilmeye çalışılmıştır. Bunun sonucunda bir birine yüzlerce kilometre uzakta yer alan bölgesel odaklardan elde edilmiş olan örneklerin karşılaştırılarak değerlendirilmesi olanağı elde edilmiştir. Bu 37 örneğin 21 tanesi KL'li hastalardan, 16'sı ise VL'li (7'si insan, 9'u köpek) hastalardan izole edilen örneklerdir. Bölgelere göre bakıldığında; toplam 16 VL'li olgunun PZR ürünlerinin restriksiyon analizi sonucunda üç tanesi hariç (EP17,

EP43, EP80), geri kalan 13 örnekte tamamen identik modeller ortaya çıkmıştır. İdentik olan 13 örneğin dördü Kuşadası, ikisi Manisa, ikisi İzmir, üçü Denizli, biri İstanbul, biri Çorum ve biri de Bodrum kaynaklıdır. Geriye kalan üç örneğin birisi Manisa, birisi Kuşadası, diğeri de İzmir kaynaklı üç köpekten izole edilmişlerdir. Yani, ister köpek, ister insan kaynaklı olsun, VL olgularının büyük bir kısmında identik bir restriksiyon modeli bulunmuştur.

Schnur ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada amplifiye edilen ITS operonu Taq I ve Cfo I enzimleriyle kesilmiş, Taq I ile yapılmış kesim görüntülerinde iki *L. infantum* izolatının 200 ile 300 bp'lik ölçek bölümü hizasında oldukça kalın bir bant modeli sergilediği dikkati çekmiştir. Bunların daha ileri düzeyde DNA dizi analizleri yapılmamıştır. Schönian ve arkadaşlarının 2000 yılında bildirdiklerine göre *L. donovani* kompleksinde yer alan türlerin ITS bölgelerinde çok belirgin olmasa da bir heterojeniteden söz edilebilir. Fakat 2000 yılında El Tai'nin bildirdiğine göre, bu minimal heterojen dizilim sadece nokta mutasyonlarından kaynaklanmakta, bu mutasyonlar da DNA dizisi üzerindeki restriksiyon bölgelerini etkilememekte; bu sayede tüm *L. donovani* kompleksi ITS-RFLP bantları identik çıkmaktadır (42). Bu bağlamda iki adet ekstra bantlı VL-DNA sonuçlarının (EP17 ve EP80) türe özgün olup olmadığına karar verebilmek için hem bu iki örnek ve ekstra bant sergilemeyen, ancak RFLP modeli diğerlerinden farklı

bulunan EP43'ün, hem de birbiriyle aynı bulunan örneklerden seçilecek birkaç örneğin DNA dizi analizlerinin yapılarak, elde edilecek sonuçların diğer ortak dizilerle karşılaştırılması gerekmektedir. Bu örnekler dışında, geriye kalan VL'li örneklerin sergilediği bant modeli tamamıyla identik olarak yorumlanabilir.

Bu 37 örneğin bir kısmı daha önceden Fransa'da Montpellier referans merkezinde izoenzim analizi yöntemi ile suş tayini yapılmış ve *L. infantum* veya *L. tropica* olduğu saptanmıştır. Az sayıda bir kısmında ise ABD'de tek kopyalı özgün bir gen olan NAGT (N-asetil glukozamin 1-fosfat transferaz) gen bölgesinin DNA dizi analizi ile tür tayini gerçekleştirilmiştir. Yapılan izoenzim analizlerinde VL'li köpeklerden elde edilen EP33 ve EP35 *L. infantum* MON-1; ABD'nde NAGT geni kullanılarak yapılan DNA dizi analizinde yine VL'li köpeklerden elde edilen EP16 ile insandan elde edilen EP61 aynı şekilde *L. infantum* olarak bulunmuştur. Zimodem analizleri sonucu EP33 ve EP35'in *L. infantum* MON-1 olarak tespit edildiği ve Türkiye'den alınarak Fransa'da zimodem analizine tabi tutulan diğer örnekler içinde MON-1'den başkası da saptanmadığı, benzer şekilde Frank ve arkadaşları tarafından 1993'te bildirildiğine göre Akdeniz havzasında görülen ve VL'e yol açan *L. infantum* suşlarının hep MON-1 olduğu (21,107) göz önünde tutulursa, bu örneklerle aynı restriksiyon modellerini sergileyen izolatlar için, *L. infantum*'dur ve identiktir denilebilir. Bununla birlikte, daha kalın veya ekstra bant

görünümü elde edilen örneklerin başka enzimler de kullanılarak yapılacak RFLP analizleri, sonuçları doğrulamaya yardımcı olacaktır. Bir başka dikkat çekici nokta da, bu fenomeni sergileyen örneklerin köpek izolatları olması ve insandan elde edilen izolatlar arasında bu fenomene rastlanmayışıdır. Bu durum restriksiyon modelinin başka enzimlerle de çalışılmasını gerektirmektedir; bununla birlikte insanla karşılaştırıldığı zaman, VL'in köpekte çok daha fazla görülmesi; bir başka deyişle köpek popülasyonunda insan popülasyonuna göre kat be kat fazla VL olgusunun olması, elbetteki suş çeşitliliği konusundaki olasılıkları artırmaktadır. Çalışmaya alınan köpek VL olgularını ayrı olarak değerlendirdiğimizde, üç farklı RFLP modeli elde edilmiş olması da bu düşüncüyü destekleyen bir bulgudur. Buna karşın insan VL örneklerinin sergilediği restriksiyon modellerine bakıldığında, kendi içlerinde tamamen identik oldukları, %100 benzerlik gösterdikleri görülmektedir.

Çalışmaya alınan 37 örneğin 21 tanesi KL'li hastalardan izole edilen parazitlerden amplifiye edilen DNA'lardır. Bu örneklerden 13 tanesi (%61,9) Şanlıurfa'da yaşayan, biri de (%4,75) İzmir'de oturmakla birlikte, her yıl düzenli olarak memleketi Şanlıurfa'ya giden bir hastadan; geriye kalan yedi örnek ise (%33) farklı şehirlerden gelseler de, hepsi Ege Bölgesi'nde yaşayan hastalardan elde edilen örneklerdir.

İlk onüç örnekten birisi olan EP39 Fransa'da uygulanan izoenzim analizi sonucunda *L. tropica* MON-53 olarak bulunmuş; Ege bölgesinden elde edilen EP84'e ise, 2003 yılında ABD'nde K.P. Chang ve arkadaşları tarafından NAGT gen dizi analizi uygulanmış, burada ki tür tayini *L. tropica* olarak belirlenmiştir.

Beklemediğimiz bir şekilde, uygulanan RFLP analizleri sonucu iki farklı restriksiyon modeli elde edilmiştir. Bu modeller üçer ve dörder bantlıdır. Üç bantlı model son derece homojen bir görüntü ortaya koymuştur. Daha önce de belirtildiği gibi, üç bantlı model gösteren 13 örnek de Şanlıurfa kaynaklı olup, bunların birisi ülkenin batısında oturan, ancak düzenli olarak Şanlıurfa'ya giden bir hastadır. Ondördüncü örnek de yine Şanlıurfa kaynaklı olmakla birlikte, dördüncü bir bant daha sergilemiş, çalışmaya Ege bölgesi orijinli olarak dahil edilen örneklerle oldukça identik görünmüştür. Bu görünüm biri dışında Şanlıurfa kaynaklı izolatların, aynı türün aynı suşu olduğu yönünde önemli bir bulgudur. ITS operonu aynı parazit türü içinde bile heterojenite gösterebilirken, bu suşun Şanlıurfa gibi küçük bir bölgede böylesine homojen bir genotipe sahip olması, tür özelliklerinin bu bölgede çok iyi korunmuş olduğunu göstermektedir. ITS-PZR-RFLP'nin DNA parmak izi yöntemi olarak kullanıldığı ve RE'nin de Taq I olduğu çok sınırlı sayıda çalışmada bu biçimde bir DNA modeline rastlanamamıştır. Bu durumda literatürdeki referans sayılabilecek örneklerle

karşılaştırılarak tür tayini yapmak mümkün görünmemiştir. Çünkü ITS intergenik bağlantı dizisi çoğaltılıp, RFLP analizinde RE olarak Taq I enzimi kullanılan iki çalışmadan ilki 2003 yılında Cupolillo ve arkadaşları tarafından yapılmış, ancak burada tamamıyla Latin Amerika suşları incelenmiştir (29). Diğeri olan ve 2004'te Schnur ve arkadaşlarınca gerçekleştirilen çalışmada elde edilen restriksiyon modellerinde dört bantlı bir görünüm ortaya çıkmıştır (123). Bunun üç bandı Şanlıurfa suşlarınıninki ile aynı olmakla birlikte, ek olarak bir tane daha bant bulunmuştur. Fakat bu noktada daha önceden gerçekleştirilmiş olan bir analizden oldukça yararlanılmıştır. Bunlardan biri olan EP39'un daha önce Fransa'da yapılan zimodem analizi, bu izolatın *L. tropica* MON-53 suşu olduğunu ortaya çıkarmıştır. İdentik bant modeli sergileyen diğer 12 izolat da EP39 ile aynı görüntüyü verdiği göre bunların da *L. tropica* olduğunu artık tartışmaya gerek yoktur. Dolayısı ile Şanlıurfa kaynaklı VL hastalarından alınacak örnekler için identifik bir *L. tropica* RFLP modeli elde edilmiştir.

21 örneğin kalan yedi tanesi ülkenin diğer KL odağından kaynaklanan, yani Ege bölgesine ait izolatlardır. Ege bölgesinde ilk KL olgusu 1989 yılında bildirilmiştir (117). 1833'den bu yana KL olgularının görüldüğü Şanlıurfa yöresiyle karşılaştırıldığında (96) , Ege bölgesinden yeni bir epidemiyolojik odak olarak söz etmek yanlış olmaz (96,117). Ege bölgesinden çalışmaya dahil edilen

örneklerden beş tanesi Aydın, biri Ödemiş, biri de Milas kaynaklıdır. Bu yerleşim birimleri birbirine komşu olmakla birlikte, vektörün uçuş menzili son derece kısa olduğu için, bu yerler arasında infeksiyon transmisyonundan çok, her birine demografik hareketler sonucu parazitin taşınmış olabileceği düşüncesi akla yatkın görünmektedir. Kum sineği Ege bölgesinde yaygın olarak görülmektedir. Dolayısıyla infeksiyonun görülebilmesi için yeter ölçüde kum sineği türü vardır. Ege bölgesinde rastlanan visseral ve kutanöz leishmaniasis olgularının oldukça dağınık bir yerleşim göstermesine karşın, buradan elde edilen sonuçlar şaşırtıcı derece birbirine benzemektedir. KL izolatları, Şanlıurfa'dan izole edilen örneklerden farklı bir model sergilemektedir. Sonuçta bu çalışmada Ege bölgesine ait tüm KL örneklerinden elde edilen dört bantlı modelin görünümü kendi aralarında açık bir homojenite oluşturmuştur.

Schnur ve arkadaşları tarafından 2004'te yapılan çalışmada *L. tropica*'dan elde edilen restriksiyon haritasındaki dört bantlı model görünümüyle, diğer *Leishmania* türlerinden ayrıldığı bildirilmiştir. Bu örnekler üç tane olup, bir tanesi Dünya Sağlık Örgütü'nden elde edilen referans suşu, diğer ikisi ise İsrail'in Kfar Adumim bölgesinden elde edilen iki örneğe aittir (123). Bu bant modelleri, çalışmamızda Ege bölgesine ait örneklerde elde ettiğimiz modellerle aynı sonucu vermiştir. Daha önce K.P. Chang ve

arkadaşları tarafından yapılmış olan bir çalışmaya göre, Schnur ve arkadaşlarının elde ettikleri dört bantlı modelle aynı olan Aydın izolatlarından EP84'ün NAGT geni DNA dizi analizi sonucunun da *L. tropica*'yı işaret ettiği görülmüştür. Dolayısı ile Ege bölgesindeki KL hastalarından alınacak materyallerden izole edilecek parazit DNA'sı ile gerçekleştirilecek restriksiyon analizi sonucunda ilk olarak beklenecek model dört banttandır.

Leishmania parazitleri içinde ITS dizisindeki heterojenitenin en yüksek olduğu tür *L. tropica*'dır. Tür içindeki heterojenlik bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (40,122,123). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da bu heterojenliği desteklemektedir. Ancak çalışmada elde edilen bant modelleri esas alınarak, ülkenin neresinden gelirse gelsin, her hangi bir KL hastasından alınacak aspirasyon materyallerine ait DNA örneklerinin kullanılacağı RFLP analizi hakkında yorum yapılabilir. Bu iki tür restriksiyon modeli, Fransa'da gerçekleştirilen zimodem analizlerinde iki suş görülmesi ile de desteklenmektedir (MON-53 ve MON-55). Şanlıurfa'da parazitin başlıca vektörü *Phlebotomus sergenti* olmakla birlikte, her hangi bir kumsineğinde bu güne kadar *Leishmania* promastigotları gösterilememiştir. *Phlebotomus papatasi*'nin de adı geçmekle birlikte, *P. sergenti*'nin ezici bir dominansı söz konusudur (96). İsrail'de yapılmış olan ve yukarıda da bahsedilen çalışmada vektör

öncelikle *P. sergenti* ve yakındaki bir başka odakta da *P. arabicus* olarak belirlenmiştir. Ancak Ege bölgesinde henüz *P. sergenti*'ye rastlanmamış, üstelik de bölgede yakalanan diğer kum sineği türlerinden de *Leishmania* paraziti izole edilmemiştir. Vektörle ilgili çalışmalar sürmektedir (Y. Özbel' den alınan sözlü bilgi). Bu vektörlerin Batı Anadolu'da ki varlığı ispatlanmadığı için, başka endemik odaklardan gelen hastaların, antroponotik rezervuar rolünü oynayıp oynamayacaklarını söylemek çok zordur. Bölgeler arası suş değişimlerinin yaşanması, bir kum sineğinin bu kadar çok mesafeyi kat edip doğal habitatından böylesine uzaklara varabilmesinin imkansız olması nedeniyle, yeni bölgelerde rastlanan vektör türlerinin parazitle adaptasyonuna bağlıdır. Doğu veya Güneydoğu'da rastlanan *L. tropica* alt türünün (ya da suşunun) bu şartlar altında Batı Anadolu'da görülmeye başlanmasının teoride zor olduğu sonucunu çıkarmak kolay olmakla birlikte; Ege bölgesinde yerli KL olgularının görülüyor oluşu, hastalığın varlığının olmazsa olmaz şartının kum sineği cinsi bir vektörün varlığı olması, bu bölgede henüz vektörlerin tam olarak belirlenemediği, literatürde baskın kum sineği türü olarak anılan *P. sergenti*'nin dışında da vektör şüphesi taşıyabilecek türlerin varlığı, ülkemizde demografik hareketliliğin hiç durmadığı ve bu gidişle pek de durmayacağı göz önünde tutulduğunda hastalığın Şanlıurfa'dan Batı Anadolu'ya taşınabilmesi olasılığından söz edilebilir. Çünkü KL antroponotik bir

hastalıktır. İnsanın, yani rezervuarın olduğu yerde, eğer vektör de varsa hastalıktan söz etmek çok kolaydır. Bu konudaki en güncel örnek olan, çalışmaya alınan EP87, Ege bölgesinde yaşayan, ancak hastalığı ülkenin diğer köşesindeki endemik bölgede (Şanlıurfa'da) edildiği düşünülen ilk ve tek kişi değildir. Bu noktada araştırmacıya düşen görev bu potansiyel rezervuarları bulmak, ekolojik çevreyi araştırmak ve özellikle doğrulama için bu çalışmada da kullanılan moleküler araçlardan yararlanmaktır. Çalışmada EP39'dan elde edilen DNA restriksiyon modelinin Şanlıurfa'dan edinilen diğer örneklerin modelleriyle identik bulunması, henüz moleküler tanı araçları kullanılmadan hastanın öyküsü ve klinik seyri ile yapılan epidemiyolojik tahminlerin doğru olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Kutanöz leishmaniasisli olgulardan elde edilen örneklerden izole edilerek çoğaltılan PZR ürünlerinin RE ile kesimi sonucu ortaya çıkan modeller VL'li olguların modelinden tamamen farklıdır. Bu görüntüyle bile, KL ve VL restriksiyon modellerinin farklı türler tarafından ortaya konduğunu söylemek mümkündür.

Bu çalışmada elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi için bir diğer alternatif yaklaşım kurgusal olarak elde olduğu var sayılan bazı DNA dizilerinin restriksiyon paternlerinin elde edilmesidir. Avrupa Gen Bankası arşivlerinde bulunan dört ayrı *L. infantum* suşuna ait ITS operonu dizisi ile, var olan iki *L. tropica* ITS operonu dizisinden birinin Taq I RE ile sanal olarak kesilmesi sonucu ortaya

çıkması beklenen restriksiyon modelleri Resim 19'da gösterilmiştir. Burada çok farklı ülkelere ait olmakla birlikte hepsi Akdeniz havzası kaynaklı *L. infantum* suşlarının çok homojen olduğu görülmüştür. *L. tropica*'nın ise daha fazla bant modeli vermesi pek sürpriz sayılmaz. Çünkü daha önce de söz edildiği gibi ITS operonunun en çok polimorfik olduğu tür *L. tropica*'dır. Eldeki bu dizi Etiyopya kaynaklı bir suşa aittir. Birbirine çok yakın olan ikili bant gruplarının, rezolüsyonu çok iyi olmayan bir jel elektroforezinde kalın tek bant görünümü vereceği düşünülerek, Şanlıurfa'ya ait olan homojen suş modellemesine çok benzediği söylenebilir. Burada gerekli olan Şanlıurfa suşlarının bazılarının DNA dizi analizi yapılarak kurgusal RFLP modelinin elde edilmesi ve diğer sanal modellerle karşılaştırılmasıdır. Bu yöntem alternatif olabilecek başka bir uygulama da, eldeki PZR ürünlerinin restriksiyon reaksiyonunun ardından, jel olarak %12 poliakrilamid jel ya da Metaphor™ agaroz jel gibi çok yüksek çözünürlüklü jel sistemlerinden birini kullanarak, aynı modeli verip vermediğini bulmaktır. Çalışmada elde edilen *L. infantum* restriksiyon modelleri ile bu dört örnek suşun modellerinin karşılaştırılması sonucunda, dört adet *L. infantum* modeli ile, çalışmada homojenite görülen insan VL izolatlarına ait suşların RFLP modellerinin çok benzer olduğu görülür. Elbette bu benzerlik bir şarta bağlıdır: En ağır görünen ve adeta birbirinin üzerine binecekmiş gibi yakın baz uzunluklarına sahip bantların tek ve

kalın bant gibi görülmesi. Bu durumda kurgusal bantlar çalışmada elde edilenlerle neredeyse tıpa tıp gibidir. Tüm bu handikaplar öncelikle jel rezolüsyonunun artırılması ile çözülebilir. Bu durumda elde edilen bantlar gerçekten identik, referans bantlar olarak sayılabilirler. Bu durum Akdeniz havzasında görüldüğü bildirilen MON-1 suşunun varlığını ülkemizde de doğrulamaktadır. *L. infantum*'un, dünya üzerinde çok önemli bir bölge olan Akdeniz havzasındaki varlığı ve homojen görünümü, elde edilen identik bantlarla da gösterilmiştir. Diğer yandan Şanlıurfa kaynaklı *L. tropica*'ların Etiyopya' dan elde edilen suşla bu kadar benzeme olasılığı (üstelik de bu kadar çok sayıda bant modeline rağmen), Eski Dünya'da tarih boyunca süregelen demografik hareketlilik ile açıklanabilir. Her iki bölgede de vektörün (*P. sergenti*) bulunması, hastalığın veya lezyonun rezervuarlarca taşınmasını kolaylaştırmaktadır.

Aynı hedef DNA bölgesinin amplifiye edilerek, aynı RE'nin kullanıldığı diğer iki çalışmaya bakıldığında (Cupolillo ve ark., 2003; Schnur ve ark., 2004) birden fazla RE kullanılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Taq I bu konudaki beklentileri neredeyse tamamıyla karşılamıştır. Ülkemizde bir yöntemin rutin hizmetin içine yerleştirilmesi aynı zamanda "maliyet/yararlılık" kavramının da gözetilmesini şiddetle gerektirmektedir.

Çalışmada seçilen hedef DNA bölgesinin ITS operonu oluşu, klinik örneklerle uygulanabilirliği konusunda bazı zorlukları beraberinde getirmiştir. Pratik olarak besiyeri örneklerinden ITS operonunun amplifiye edilmesi çok daha kolay görünmektedir (G. Schönian'ın sözlü ifadesi). Bunun yerine ITS'in 5.8S geninden önceki bölümü olan ITS-1 bölümü hem klinik örneklerden, hem de saha çalışmalarında elde edilen örneklerden direkt moleküler tanı ve bunların tür ayrımında kullanışlı bir araç olarak önerilmiştir (45, 47). Fakat ITS-1 için, tür içi farklılıkları göstermek konusunda elde veri bulunmamaktadır. Ancak El Tai ve arkadaşlarının 2000 yılında bildirdiğine göre özellikle saha çalışmalarında ve klinik örneklerde "southern blotting" in ardından ITS-PZR ile de tanı koymak olanaklıdır. Ancak bunu rutin laboratuvar koşullarında uygulamak pratik görünmemektedir.

Bu çalışmaya dahil edilen izolatlara genel olarak yeniden bakıldığında özellikle Çukurova bölgesinden elde edilen hiçbir örneğin olmadığı görülmektedir. Halbuki Akdeniz ve daha da özelleştirilirse Çukurova bölgesi, gerek Şanlıurfa odağına olan komşuluğuyla, gerek daha önceden bildirildiğine göre *L. infantum*'un etyolojik ajan olarak tesbit edildiği bildirilen KL olgularının varlığıyla epidemiyolojik çalışmalara dahil edilmesi kaçınılmaz olan önemli bir bölgedir (3,96,122). Özellikle bu bölge olmak üzere KL olgularının görüldüğü diğer odakların da dahil

edileceği karşılaştırmalı moleküler epidemiyolojik çalışmalar lkemizdeki *Leishmania* suşlarının dağılımlı hakkında çok daha değerli bilgiler verecektir.

6. SONUÇ

Son söz olarak Bozkurt ve arkadaşlarının daha önce sordukları soruyu kısmen de olsa yanıtlatmak gerekirse; çalışmanın sonuçlarına bakılarak denilebilir ki; şark ıbanının batılılaştığı söylenebilir. En azından Ege bölgesi odağındaki olguların Güneydoğu'daki odaktan kaynaklanmadığı ortadadır. Ege bölgesinde olan daha çok kendi odağına özgün, yerli olgulardır. Böylece leishmaniasisin moleküler epidemiyolojisi konusunda ülkemizde yapılması gerekenlerin çok fazla olduğu açıklığa kavuşmuştur. Özellikle lkemizin bulunduğu coğrafyada leishmaniasis konusunda yapılan çalışmalar ve çalışma alanlarına bakıldığında; yabancı bir araştırmacının söylediği gibi: "Türkiye adeta başlı başına bir kıta ve bu kıtada leishmaniasis konusunda daha yapılacak çok şey bulunmaktadır."

7. ÖZET

Klinik Örneklerde Pzr – Rflp (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Bölümünün Uzunluk Değişkenliği) Yöntemi Kullanılarak *Leishmania* Parazitlerinin Tür Tayini

Leishmaniasis *Leishmania* genusunda yer alan parazitlerinin yol açtığı antroponozoonotik bir infeksiyondur. Dünya Sağlık Örgütü verileri her yıl 350 milyon insanın bu hastalığa yakalanma riskiyle karşı karşıya kaldığını bildirmektedir. Hastalık AIDS ile birlikte görüldüğünde ölümcül olabilmektedir. Hastalığın klinik formları temelde visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olarak incelenir. Bunlardan ilk ikisi ülkemizde görülmektedir. Birincisinin başlıca rezervuarı köpek, ikincisinin ki de insandır. Bu çalışmada EÜTF Parazitoloji AD'nda 1996 yılından beri NNN besiyerinde alt pasajlarla sürekliliği sağlanan ve ülkemizin farklı bölgelerinden elde edilen 37 *Leishmania* izolatu incelenmiştir. Bu örneklerden fenol-kloroform yöntemi ile DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, ITS-PZR yöntemi kullanılarak ribozomal DNA'nın protein kodlamayan ITS bölgesi çoğaltılmış, ardından TaqI enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle ortaya çıkan DNA bantlarının uzunlukları karşılaştırılmıştır. PZR sonucunda örneklerin hepsinde 1 kbp'lik DNA bantları görülmüştür. RFLP ile beş farklı kesim modeli elde edilmiştir. Gerek insan,

gerekse köpekten elde edilen 13 örneğin restriksiyon modelleri benzerdir. Ancak üç adet köpek izolatının sonuçları insan ve diğer altı köpek izolatından biraz farklı bulunmuştur. Kutanöz leishmaniasisli olgulardan elde edilen PZR ürünlerinin restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu ortaya çıkan modeller VL'li olguların modelinden tamamen farklı bulunmuş, 21 adet KL olgusundan 14 tanesi Şanlıurfa'dan, yedi tanesi Ege Bölgesi'nden elde edilmiş, Şanlıurfa örnekleri biri hariç son derece homojen bulunmuş, Ege bölgesine ait olanlarsa Şanlıurfa'dan farklı ancak kendi içinde homojen bulunmuş; ülkemizde bu bölgelerde VL'den sorumlu parazit *Leishmania infantum* ve KL'den sorumlu parazitin de *Leishmania tropica* olduğu bir kez daha görülmüş, ancak KL etkeninin farklı odaklarda farklı genotipe sahip olduğu görülmüştür. Bu sonucun epidemiyo-demografik açıdan incelenmesi gerekmektedir.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infection that caused by the parasites belonging to the genus *Leishmania*. According to WHO, 350 million people confront the risk of having leishmaniasis every year. The disease can be fatal if it is complicated with AIDS. The clinical forms of the disease can be summarized in three topics: Visceral (VL), cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL) leishmaniasis. The

first two of these forms are seen in Turkey and the reservoirs are the dog and the man respectfully. In our study, 37 *Leishmania* isolates that have been cultivated in the NNN medium in EUMF Parasitology Department since 1996 were analyzed by using molecular tools comparing the restriction patterns of the DNA bands belonging to the ribosomal ITS region amplified with PCR method. By using one of the restriction nucleases, Taq I, different restriction patterns were obtained between the isolates from VL and CL, and also CL isolates from Şanlıurfa and Ege Region. There were different patterns in three of dog isolates while rest of the VL isolates that originated from the man and the dog were similar. In addition to this, RFLP patterns of 14 Şanlıurfa isolates out of 21 CL isolates were almost totally homogenous except one. And the causative agents were confirmed as *Leishmania infantum* for VL, and *Leishmania tropica* for CL in these regions in Turkey. But the RFLP patterns of the isolates obtained from the patients with CL in Şanlıurfa were not the same as the isolates from Ege Region except one in comparison by the genotype. Obviously it is necessary to analyze these results epidemio-demographically to reach the final epidemiological aspect.

8. KAYNAKLAR

1. Abdallah K.A.A., Nour B.Y.M., Schallig H.D.F.H., Mergani A., Hamid Z., Abd Elkarim A., Saeed O.K. (2004). Mohamadani A. A., Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients. *Trop. Med.Int. Health.* 9(10); 1127-1131.
2. Agrawal V.K. (2006). Field Adaptable Tests For Kala-Azar. *Medical Journal Armed Forces India.* 62; 178-179.
3. Akman L., Aksu H. S. Z., Wang R.-Q., Ozensoy S., Ozbel Y., Alkan Z., Ozcel M. A., Culha G., Ozcan K., Uzun S., Memisoglu H. R. Chang K.-P. (2000). Multi-site DNA polymorphism analyses of *leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific Region. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 47(6),. 545-554.

4. Al-Jawabreh A., Schnur L.F., Nasereddin A., Schwenkenbecher J. M., Abdeen Z., Barghuthy F., Khanfar H., Presber W. Schönian G. (2004). The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Tropical Medicine and International Health*. 9(7); 812–816.
5. Alexander B., Maroli M. (2003). Control of Phlebotominae sand flies. *Med. Vet. Entomol.* 17;1-18.
6. Alexander B. (2000). Sampling methods for *Phlebotomus* sand flies. *Med. Vet. Entomol.* 14; 109-122.
7. Alexander J., Satoskar A.R., Russell D.G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.*;112 (18);2993-3002.
8. Almeida M.A.O, Jesus E.E.V., Sousa-Atta M.L.B, Alves L.C., Berne M.E.A., Atta A.M. (2005). Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106; 151–158.
9. Alten B., Çağlar SS. (1998). Tatarcıklar, Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi. *Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara*. S.192 – 208.
10. Alvar J., Cañavate C., Molina R., Moreno J., Nieto J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*. 57; 1-88
(Özet)

11. Aly R., Argaman M., Halman S., Shapira M.A. (1994). Regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 11; 22(15); 2922-9.
12. Andresen K., Gasim S., Elhassan A.M., Khalil E.A., Barker D.C., Theander T.G., Kharazmi A. (1997). Diagnosis of visceral leishmaniasis by the polymerase chain reaction using blood, bone marrow and lymph node samples from patients from the Sudan. *Trop. Med. Int. Health.* 2(5); 440-4.
13. Ashford R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30; 1269–1281.
14. Ashford D.A., Bozza M., Freire M., Miranda J.C., Sherlock I., Eulalio C., Lopes U., Fernandes O., Degraeve W., Barker R.H. Jr. (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53(3); 251-5. (Özet)
15. Beaty B.J., Marquardt W.C. (1996). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado. S.117– 127.
16. Bern C., Jha S.N., Joshi A.B., Thakur G.D., Bista M.B. (2000). Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63; 153 - 157.

17. Bern C., Joshi A.B., Jha S.N., Das M.L., Hightower A., Thakur G.D., Bista M.B. (2000.) Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed-net use is strongly protective. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(3-4); 184-8.
18. Bern C., Hightower A.W., Chowdhury R., Ali M., Amann J., Wagatsuma Y., Haque R., Kurkjian K., Vaz L.E., Begum M., Akter T., Cetre-Sossah C.B., Ahluwalia I.B., Dotson E., Secor W.E., Breiman R.F., Maguire J.H. (2005). Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 11(5); 655-62.
19. Bray R.S. (1987). Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. *Parassitologia* 29(2-3);175-9. (Özet)
20. Brewster S., Aslett M., Barker D. C. (1998) Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitology Today.* 14 (11); 437-438.
21. Bulle B., Millon L., Bart J.M., Gallego M., Gambarelli F., Portus M., Schnur L., Jaffe C.L., Fernandez-Barredo S., Alunda J.M., Piarroux R. (2002). Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40(9); 3391-7.
22. Burden of Disease
<http://www.who.int/entity/leishmaniasis/en/> (07.03.2006)
23. Butler J.M. (2005). Brief History of Forensic DNA Typing.
<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/ppt/intro.pdf> ;

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/FDT2e.htm>

(16.03.2006)

24. Chicharro C. , Morales M. A., Serra T., Ares M., Salas A., Alvar J. (2002). Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96,Supp.1, S1/93-S1/99.
25. Cohen D., Zaide Y., Karasenty E., Schwarz M., LeDuc J.W., Slepon R., Ksiazek TG., Shemer J., Green MS. (1999). Prevalence of antibodies to West Nile fever, sandfly fever Sicilian, and sandfly fever Naples viruses in healthy adults in Israel. *Public Health Reviews*, 27(1-3); 217-230.
26. Croft L.S., Barrett P.M., Urbina A.J. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Trends in Parasitology.* 21(11); 508-512.
27. Crum N.F., Aronson N.A., Lederman E.R., Rusnak J.M, Cross J.H. (2005). History of U.S. Military Contributions to the Study of Parasitic Diseases. *Military Medicine.* 170, 4;17.
28. Cruz I., Morales M.A., Noguera I., Rodriguez A., Alvar J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 359(9312); 1124-1125.
29. Cupolillo E, Brahim L. R., Toaldo C. B., de Oliveira-Neto M. P., de Brito M. E. F., Falqueto A., de Farias Naiff M., Grimaldi Jr.

- G. (2003). Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41(7); 3126–3132.
30. Da Silva E. S., Gontijo C. M. F., Da Silva Pacheco V., Peçanha R. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Online Journal Genetics and Molecular Research*
http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2004/vol2-3/gmr0082_full_text.htm (16.03.2006)
31. Davies C.R., Kaye P., Croft S.L., Sundar S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *B.M.J.* 15; 326(7385); 377-82.
32. Decker J.E., Janovy J. (1974). *Leishmania donovani* and *L. mexicana*: Production of the excretion factor, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 49(3); 513-523.
33. Değer S., Yaman M. (2005). Van Yöresi *Phlebotominae* (*Diptera: Psychodidae*) Türleri. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 16 (1);55-59.
34. Desjeux P. (1999). Global control and *Leishmania* HIV co-infection. *Clinics in Dermatology.* 17(3); 317-325.

35. Desjeux P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95; 239-243.
36. Despommier D.D. (2000). Introduction To The *Leishmania*, Parasitic Diseases, 4. Baskı. Apple Trees Corporation LLC. S. 13-30
37. Doncker S., Hutse V., Abdellati S., Rijal S., Karki B.M.S., Decuypere S., Jacquet D., Ray D.L., Boelaert M., Koirala S., Dujardin J-C. (2005). A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99; 25-31.
38. Dujardin J. C., Victoir K. , De Doncker S., Guerbouj S. Arévalo J. Le Ray D. (2002). Molecular epidemiology and diagnosis of *Leishmania*: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96; 81-86.
39. Dujardin J.P., Le Pont F., Martinez E. (1999). Quantitative phenetics and taxonomy of some Phlebotominae taxa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(6); 735-741.
40. Eisenberger C., Jaffe C.L. (1999). *Leishmania*: identification of Old World species using a permissively primed intergenic polymorphic-polymerase chain reaction. *Exp.Parasitol.* 91(1); 70-7.

41. El Harith A., Kolk A.H., Leeuwenburg J., Muigai R., Huigen E., Jelsma T., Kager P.A. (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26(7); 1321–1325.
42. El Tai N.O., Osman O.F., El Farl M., Presber W., Schönian G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94; 575-579
43. Ferroglio E., Romano A., Trisciuglio A., Poggi M., Ghiggi E., Biglino A., Sacchi P. (2006). Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* Basilmamış makale
44. Fisa R., Gallego M., Castillejo S., Aisa M.J., Serra T., Riera C., Carrio J., Gallego J., Portus M. (1999). Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* 83; 87-97.
45. Gangneux J.P., Sulahian A., Garin Y.J., Farinotti R., Derouin F. (1996). Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of

- AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(5); 1214-1218.
46. Gavgani A.S., Hodjati M.H., Mohite H., Davies C.R. (2002). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet.* 3; 360(9330); 374-9.
47. Gramiccia M., Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. (2005). *International Journal for Parasitology.* 35; 1169-1180.
48. Guerbouj S., Guizani I., De Doncketi S., Dujardin J. C., Nuwayri-Salti N. (2001). Identification of Lebanese dermatropic putative *Leishmania archibaldi* isolates by gp63 PCR-RFLP. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95; 687-688.
49. Guzman H.,i Tesh RB. (2000). Effects on temprature and diet on the growth and longevity of phlebotomine sand flies (Diptera:Psychodidae), *Biomedica*, 20: 190-199,.
50. Güneş A.M., Sevinir B., Baytan B., Günay Ü., Çalışkan-Aynacı D. (2004)., Kala-azar ve lipozomal amfoterisin B ile tedavi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 47: 103-106.

51. Handman E. (2001). Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(2); 229-243.
52. Haouas N., Chargui N., Chaker E., Ben Said M., Babba H., Belhadj S., Kallel K., Pratlong F., Dedet J.-P., Azaiez R., Mezhoud H. (2005). Anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Tunisia: Presence of *Leishmania killicki* outside its original focus of Tataouine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99; 499—501.
53. Hepburn N.C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J. Postgrad. Med.* 49; 50-4
54. Herwaldt B.L. Leishmaniasis (1999). *The Lancet*. 354/9185; 1191-1199.
55. History of Forensic DNA Analysis
<http://www.dna.gov/basics/analysishistory/> (16.03.2006)
56. Howard M.K., Kelly J.M., Lane R.P., Miles M.A. (1991). A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44(1); 63-72. (Özet)
57. Humber D. P. Introduction to Leishmaniasis (01.03.2006)
<http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/intro.htm>

58. Humber D. P. Visceral Leishmaniasis (05.03.2006)
<http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/geog.htm#dist>
59. Ibrahim M. E. (2002). The epidemiology of visceral leishmaniasis in East Africa: hints and molecular revelations, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, Suppl. 1 S1/25-S1/29.
60. ISCID Encyclopedia of Science and Philosophy
<http://www.iscid.org/encyclopedia/RFLP> (15.03.2006)
61. Jacobson R.L. (2003). *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)–a perplexing parasite. *Folia Parasitologica.* 50: 241–250.
62. Jelinek T., Eichenlaub S., Löscher T. (1999). Sensitivity and Specificity of a Rapid Immunochromatographic Test for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis.* 18(9); 669 – 670.
63. Jha T.K., Olliaro P., Thakur C.P.N., Kanyok T.P., Singhania B.L., Singh I.J., Singh N.K.P., Akhoury S., and Jha S. (1998). Randomised controlled trial of aminosidine(paromomycin)versus sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ.* 316; 1200-1205

64. Keeling III J.H. Tropical Parasitic Infections, Textbook of Military Medicine–Military Dermatology kitabında bölüm, Ed: Zajtchuk R., Bellamy R.F., S. 255-290.
65. Killick-Kendrick R. (1999). The biology and control of Phlebotominae sand flies. *Clin. Dermatol.* 17; 279-289.
66. Knio K.N., Baydoun E., Tawk R., Nuwayri-Salti N. (2000). Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from Lebanon and Syria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 63(1-2); 43-47.
67. Kokozidou M. (2003). Evaluation of PCR methods for detection, species identification and determination of genetic variation in *L. infantum*. Doktora Tezi. *Institute for Medical Parasitology, University Clinics of the Rheinische Friedrich-Wilhelm-University Bonn, Almanya ve The Institute of Parasitology of the Justus-Liebig-University Giessen, Almanya*
68. Kumar R., Pai K., Pathak K., Sundar S. (2001). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis. *Clin. Diagn Lab. Immunol.* 8(6); 1220–1224.
69. Kuhls K., Mauricio I.L. , Pratlong F., Presber W., Schönian G. (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex, *Microbes and Infection.* 7; 1224–1234

70. Lambson B., Smyth A., Barker D.C. (2000). *Leishmania donovani*: development and characterisation of a kinetoplast DNA probe and its use in the detection of parasites. *Exp. Parasitol.* 94(1); 15-22.
71. Lane J. A. (1994) History of Genetics Timeline. Woodrow Wilson Collection
<http://www.accessexcellence.org/AE/AEPC/WWC/1994/geneticstln.html> (17.03.2006)
72. Laskay T., Gemetchu T., Teferedegn H., Frommel D. (1991). The use of DNA hybridization for the detection of *Leishmania aethiopica* in naturally infected sandfly vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85(5); 599-602. (Özet)
73. Leandro C., Campino L. (2003). Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int. Antimicrob. Agents.* 22(3); 352-7.
74. Le Blancq S.M., Peters W. (1986). *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani sensu lato* zymodemes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80(3); 367-77. (Özet)
75. Lee S.T., Chiang S.C., Singh A.K., Liu H. (1995). Identification of *Leishmania* species by a specific DNA probe that is conserved only in the maxicircle DNA of human-infective *Leishmania* parasites. *J. Infect. Dis.* 172(3); 891-4. (Özet)

76. (39) Leishmania Treatment Center at Walter Reed Army Medical Center. *Leishmaniasis* Information for Clinicians. <http://www.pdhealth.mil/leish.asp> (25.07.2006)
77. Leishmaniasis, a brief history of the disease, www.who.int/entity/leishmaniasis/en/ (01.03.2006)
78. Leishmaniasis: Background information <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (01.03.2006)
79. Luber A.D., Maa L., Lam M., Guglielmo B.J. (1999). Risk factors for amphotericin B- induced nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 43; 267-271.
80. Lesho E.P., Wortmann G., Neafie R.C., Aronson N.E. (2004). Cutaneous Leishmaniasis: Battling The Baghdad Boil. *Federal Practitioner*. 59-67.
81. Lewis D.J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist (Ent)*. 45(2); 121-209.
82. Magill A.J., Grogl M., Gasser R.A., Sun W., Oster C.N. (1993). Visceral Infection Caused by *Leishmania tropica* in Veterans of Operation Desert Storm. *The New England Journal of Medicine*. 328:1383-1387.
83. Mahdi M., Elamin E. M., Melville S. E., Musa A. M., Blackwell J.M., Mukhtar M. M., Elhassan A. M., Ibrahim M. E. (2005). Sudanese mucosal leishmaniasis: isolation of a parasite

within the *Leishmania donovani* complex that differs genotypically from *L. donovani* causing classical visceral leishmaniasis. *Infection, Genetics and Evolution* 5; 29–33

84. Mahoney A.B., Sacks D.L., Saraiva E., Modi G., Turco S.J. (1999). Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*. 3;38(31); 9813-23.
85. Manson's Tropical Diseases, Ed: Gordon C. Cook, WB Saunders Co. Ltd, S 1224–1229.
86. Marfurt J., Nasreddin A., Niederwieser I., Jaffe C.L., Beck H.P., Felger I. (2003). Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis, *J. Clin. Microbiol.* 41; 3147-3153.
87. Meredith S.E.O., Zijlstra E.E., Schoone G.J., Kroon C.C.M., Van Eys G.J.J.M., Schaeffer K.U., El Hassan A.M., Lawyer P.G. (1993). Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 70; 419-431.
88. Miles M.A., Povoas M.M., de Souza A.A., Lainson R., Shaw J.J., (1980). Some methods for the enzymic characterization of

Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 74(2); 243-52. (Özet)

89. Morales M.A., Chicharro C., Ares M., Canavate C., Barker D.C., Alvar J. (2001). Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95; 104-107
90. Morales M. A. , Cruz I., Rubio J. M. , Chicharro C. , Cañavate C, Laguna F., Alvar J. (2002). Relapses versus Reinfections in Patients Coinfected with *Leishmania infantum* and Human Immunodeficiency Virus Type 1. *The Journal of Infectious Diseases.* 185; 1533-1537
91. Moreno J., Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology.* 18(9); 399-405.
92. Motazedian H., Noamanpoor B., Ardehali S, (2002). Characterization of *Leishmania* parasites isolated from provinces of the Islamic Republic of Iran. *Eastern Mediterranean Health Journal.* Sayı 8, http://www.emro.who.int/Publications/EMHJ/0802_3/Characterization.htm

93. Mullis K. B. Kary B. Mullis – Autobiography.
<http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1993/mullis-autobio.html> (16.03.2006)
94. Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G.(2005)
Advances in Leishmaniasis. *Lancet*, 366; 1561-77
95. Noyes H.A., Reyburn H., Bailey J.W., Smith D. A. (1998).
Nested-PCR-Based Schizodeme Method for Identifying *Leishmania* Kinetoplast Minicircle Classes Directly from Clinical Samples and Its Application to the Study of the Epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan, *J. Clin. Microbiol.* 36; 877-2881.
96. Ok Ü.Z., Balçioğlu İ.C., Taylan Özkan A., Özensoy S., Özbel Y. (2002) Leishmaniasis in Turkey, *Acta Tropica* 84; 43-48
97. Osman O.F., Oskam L., Zijlstra E.E., Kroon N.C.M., Schoone G.J., Khalil E.A.G., El-Hassan A.M., Kager P.A. (1997).
Evaluation of PCR for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis, *J. Clin. Microbiol.* 35; 2454-2457.
98. Özbel Y., Turgay N., Özensoy S., Özbilgin A., Alkan M.Z., Özcel M.A., Jaffe C.L., Schnur L., Oskam L., Abranches P. (1995) Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89; Suppl 1:89-93.

99. Özensoy S. (2001) .Leishmaniasis'de rezervuar olarak köpeklerin önemi,12. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Elazığ. *Program ve Özet Kitabı, S. 30.*
100. Özensoy S., Özbel Y., Turgay N., Alkan M.Z., Gü, K., Gilman-Sachs A., Chang K.P., Reed S.G., Özcel M.A. (1998). Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59; 363-369.
101. Pandya AP. (1985). Bloodmeals of Phlebotomine sand flies in Surat District (Gujarat State) India. *Indian J. Med. Res.* 81; 46-48.
102. Paşa S., Özensoy Töz S., Voyvoda H., Ozbel Y. (2005). Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate *Veterinary Parasitology.* 128; 243-249.
103. Perfiliev PP. (1968). *Sandflies (Family Phlebotomidae). Fauna of the USSR, New Series. No. 93, Insects, Diptera 3, 2, 382 pp., [In Russian: English translation titled Phlebotomidae (sandflies) (Moskity), x+363 pp., Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem,].*
104. Peters W., Elbihari S., Liu C., Le Blancq S.M., Evans D.A., Killick-Kendrick R., Smith V., Baldwin C.I. (1985). *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 1. General survey, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79(6); 831-9. (Özet)

105. Piarroux R., Gambarelli F., Dumon H., Fontes M., Dunan S., Mary C., Toga B., Quilici M. (1994). Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral Leishmaniasis in immunocompromised patients *J. Clin. Microbiol.* (3); 746-9.
106. Pimenta P.F., Modi G.B., Pereira S.T., Shahabuddin M., Sacks D.L. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 115 (Pt4); 359-69. (Özet)
107. Pratlong F., Dedet J.P., Marty P., Portus M., Deniau M., Dereure J., Abranches P., Reynes J., Martini A., Lefebvre M., et al. (1995). *Leishmania*-human immunodeficiency virus coinfection in the Mediterranean basin: isoenzymatic characterization of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J. Infect. Dis.* 172(1); 323-6. (Özet)
108. Puig L., Pradinaud R. (2003). *Leishmania* and HIV co-infection: Dermatological Manifestations. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 97(1); 107-114.
109. Rainbow P., What is PCR.
<http://sunsite.berkeley.edu/PCR/whatisPCR.html>
(16.03.2006)
110. Ramos-Santos C., Hernandez-Montez O., Sanchez-Tejeda G., Monroy-Ostria A. (2000). Visceral leishmaniasis caused by

- Leishmania (L.) mexicana* in a mexican patient with human immunodeficiency virus infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95(5); 733-737.
111. Romero G.A.S., Sampaio R.N.R., de Oliveira Macêdo V., Marsden P.D. (1999). Sensitivity of Lymph Node Aspiration in Localized Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(4); 509-511.
112. Rosenthal E., Marty P. (2003). Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49;61-8
113. Ryan J.R., Smithyman A.M., Rajasekariah G.H., Hochberg L., Stiteler J.M., Martin S.K., (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40(3);1037-43.
114. Sacks D.L., Kenney R.T., Kreutzer R.D., Jaffe C.L., Gupta A.K., Sharma M.C., Sinha S.P., Neva F.A., Saran R. (1995). Indian kala-azar caused by *Leishmania tropica*. *Lancet.* 345(8955); 959-61. (Özet)
115. Sadlova J. (1999). The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta. Soz. Zool. Bohem.* 63; 331- 366.

116. Salotra P., Sreenivas G., Ramesh V., Sundar S. (2001). A simple and sensitive test for field diagnosis of post kala-azar Dermal leishmaniasis. *British J. Dermatol.* 145(4); 630-2.
117. Savk E., Sendur N., Karaman G. (1999). Cutaneous leishmaniasis in Aydın, Turkey. *International Journal of Dermatology.* 38 (12), 949-950.
118. Schlein Y., Warburg A., Schnur L.F., Gunders A.E. (1982). Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*76(5);582-6. (Özet)
119. Schönian G., Akuffo H., Lewin S., Maasso K., Nylén S., Pratlong F., Eisenberg C. L., Schnur L. F., Presber W. (2000). Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with the clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 106, 239-248.
120. Schönian G., Alberts S., Zlateva K., Oksam L., Schnur L., Presber W. (1999). Identification of Species and Strains of *Leishmania* by Using Different PCR-Based Methods. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 23(6) S. 439.
121. Schönian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig H.D.F.H., Presber W., Jaffe C.L. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and

- imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 47;349–358.
122. Schönian G., Schnur L., El Fari M., Oskam L., Kolesnikov A. A. (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95; 217-224.
123. Schnur L.F., Nasereddin A., Eisenberger C.L., Jaffe C.L., El Fari M., Azmi K., Anders G., Killick-Kendrick M., Killick-Kendrick R., Dedet J.-P., Pratlong F., Kanaan M., Grossman T., Jacobson R.L., Schönian G., Warburg A. (2004). Multifarious characterization of *Leishmania tropica* from a judean desert focus, exposing intraspecific diversity and incriminating *Phlebotomus sergenti* as its vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(4); 364–372.
124. Serin M. S., Dağlıoğlu K., Bagirova M., Allahverdiyev A., Uzun S., Vural Z., Kayar B., Tezcan S., Yetkin M., Aslan G., Emekdaş G., Köksal F. (2005). Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53; 209–214.

125. Simmer M., Secko D. (2003). Restriction Endonucleases: Molecular Scissors For Specifically Cutting DNA. *The Science Creative Quarterly*, 2006. <http://www.scq.ubc.ca/?p=249>
126. Singh N., Curran M.D., Rastogil A. K., Middleton D., Sundar S. (1999). Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast minicircle DNA. *Tropical Medicine & International Health*. 4; 448 – 453.
127. Singh S., Sivakumar R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.* 49; 55-60.
128. Singh S., Sivakumar R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* 10; 307–315.
129. Singh S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123; 311-330.
130. Smith D.F., Searle S., Ready P.D., Gramiccia M., Ben-Ismael R. (1989). A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania major*: sequence homologies between regions of *Leishmania* minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37(2); 213-23. (Özet)
131. Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using

- PCR on Several Tissues and Serology. *J. Clin. Microbiol.* 39(2); 560–563.
132. Stark C.G., Wortmann G. (2006). Leishmaniasis. <http://www.emedicine.com/med/topic1275.htm> (28.02.2006)
133. Strauss-Ayali D., Baneth G. (2001) Canine Visceral Leishmaniasis. International Veterinary Information Service. Ithaca, NY (www.ivis.org).
- http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/baneth/chapter_frm.asp?LA=1 (05.04.2006)
134. Sundar S., Reed S.G., Singh V.P., Kumar P.C., Murray H.W. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet.* 351(9102):563-565.
135. Sundar S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* 6(11); 849-54.
136. Sundar S., Rai M. (2002). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 951-958
137. The Disease and Its Epidemiology
<http://www.who.int/entity/leishmaniasis/en/> (07.03.2006)
138. The History of PCR.
<http://www.si.edu/archives/ihd/videocatalog/9577.htm>
(16.03.2006)

139. Tashakori M., Kuhls K., Al-Jawabreh A., Mauricio I., Schonian G., Farajnia S., Alimohammadian M. H. (2006). *Leishmania major*: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *ActaTropica*. Basilmamış makale.
140. Tintaya K. W. Q. , Ying X., Dedet J-P. , Rijal S., De Bolle X., Dujardin J-C. (2004). Antigen Genes for Molecular Epidemiology of Leishmaniasis: Polymorphism of Cysteine Proteinase B and Surface Metalloprotease Glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* Complex. *The Journal of Infectious Diseases*. 189;1035-1043
141. Töz S.Ö., Chang K.P., Özbel Y., Alkan M.Z., (2004). Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J. Parasitol.* 90(6);1484-6.
142. Van Den Enden E. (2002). Leishmaniasis.
http://www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/Teksten/sylabus/05_Leishmaniasis.doc (02.03.2006)
143. Van Eys G.J., Schoone G.J., Ligthart G.S., Alvar J., Evans D.A., Terpstra W.J., (1989). Identification of 'Old World' *Leishmania* by DNA recombinant probes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34(1; 53-62. (Özet)

144. Vidyashankar C., Agrawal R. (2002). Leishmaniasis.
<http://www.emedicine.com/ped/topic1292.htm> (07.02.2006)
145. Vierstraete A., Principle of the PCR.
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>
(16.03.2006)
146. Volpini Angela C., Passos V.M.A.,Oliveira G.C., Romanha A. J.
(2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. 90; 31–37.
147. Vouldoukis I., Dugas B., Rougier S., Pino P., Mazier D.,
Woehrle F. (2006). Canine visceral leishmaniasis:
Comparison of in vitro leishmanicidal activity of
marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium
stibogluconate. *Veterinary Parasitology*. 135; 137-146.
148. Voyvoda H., Paşa S., Özensoy Töz S., Özbel Y., Ertabaklar H.
(2004). Aydın'ın bazı ilçe ve köyleriyle İzmir'in Selçuk
ilçesindeki köpeklerde leishmaniosis ve dirofilariasisin
prevalansı. *Turk J. Vet. Ani. Sci.* 28; 1105-1111.
149. Wheeler A.S., Feliciangeli M.D., Ward R.D., Maingon R.D.C.
(1996). Comparison of sticky-traps and CDC light traps for
sampling Phlebotomine sandflies entering houses in
Venezuela. *Med. Vet. Entomol.* 10; 295-298.

150. WHO, Weekly Epidemiological Record. (2002). No. 25, 77; 210-212
151. WHOPEPES. Guidelines for laboratory and field testing of longlasting insecticidal mosquito nets. WHO/CDS/WHOPEPES/GCDPP/2005.11, Cenevre, İsviçre: World Health Organization, 2005.
152. Yaghoobi-Ershadi M.R., Javadian E. (1996). Epidemiological study of reservoir hosts in an endemic area of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Bull. World Health Organ.*74(6); 587-90. (Özet)
153. Zicardi M., Lourenço-de-Oliveira R., Nogueira N. (1996). The Haemoculture of *Trypanosoma minasense* Chagas 1908, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*91(4); 501-505.
154. Zijlstra E.E., El Hassan A.M. (2001). Leishmaniasis in Sudan: 3. Visceral Leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95; Supp.1, S1/27-S1/58.
155. Zijlstra E.E., Musa A.M., Khalil E.A.G., El Hassan I.M., El-Hassan A.M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infect Dis.* 3; 87-98
156. Zijlstra E.E., Nur Y., Desjeux P., Khalil E.A., El-Hassan A.M., Groen J. (2001). Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Trop. Med. Int. Health, Şubat* 6(2):108-13.

157. http://www.who.int/Leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/index.html (16.03.2006)
158. http://www.who.int/Leishmaniasis/disease_epidemiology/en/ (16.03.2006).

ÖZGEÇMİŞ

1968 yılında Ankara'da doğdum. İlk öğrenimimi Bursa Orhaneli Merkez İlkokulu'nda, ortaokulu Hakkari Lisesi orta bölümünde ve liseyi Malatya Turan Emeksiz Lisesi'nde bitirdikten sonra 1985 yılında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'ne başladım. 1991 yılında Tıp Doktoru ünvanı ile mezun oldum. 1991-1993 yılları arasında Tokat Artova Merkez Sağlık Ocağı'nda zorunlu hizmetimi tamamladım. 1993-1996 yılları arasında Balıkesir Merkez 4 No.lu Sağlık Ocağı'nda çalıştım. Bu esnada 1994-1996 yıllarında Hakkari İl Jandarma Komutanlığı Tabibi olarak askerlik görevimi yerine getirdim. 1996 yılında İzmir Narlıdere Ilica Sağlık Ocağı'nda göreve başlamamın ardından 1999 yılı sonuna kadar Sorumlu Hekimlik görevini yerine getirdim. 2000 yılı Mart öğretim yarıyılı ile birlikte Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Doktora Programına başladım. Bu esnada 2002-2006 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezinde tabip olarak çalıştım. 19 Eylül-4 Ekim 2004 tarihleri arasında "*Molecular and Immunohistochemical Approaches in Diagnosis and Survey of Cystic Echinococcosis*" isimli proje kapsamında Slovak Bilimler Akademisi Parazitoloji Enstitüsü'nde davetli araştırmacı olarak çalıştım. Evliyim ve iki kız çocuk babasıyım. İyi derecede İngilizce bilmekteyim.

Katıldığı Kitap Bölümleri

- Ekinokokkoziste Moleküler Tanı Yöntemleri. Editörler; N. Altıntaş, R. Tınar, A. Çoker. *Ekinokokkozis, Hidatidoloji Derneği yayını*. İzmir, 2004.

Katıldığı Projeler

- Kistik Ekinokokkozisin Tanı ve İzleminde Moleküler ve İmmünohistokimyasal Yaklaşımlar. Destekleyen Kuruluşlar: TÜBİTAK ve The Slovak Academy of Science (SAV), 2002.
- PZR – RFLP ve Southern Blotting Yöntemleri Kullanılarak *Leishmania* Parazitlerinin Tür Tayini. Destekleyen Kuruluş: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2003.

Sözlü Bildiriler:

- Güneş K, Yetkin Caner A., Dağcı H, Gürüz Y, Özensoy Töz S. (10–15 Nisan 2005). Spreading of Cutaneous Leishmaniasis from Southeastern to Western Turkey. Worldleish III, Palermo , Sicilya, İtalya.
- Alveolar Echinococcosis'te Serolojik Tanı. İkinci Ulusal Hidatidoloji Kongresi, Bursa, Türkiye. (15–18 Eylül 2004).

Posterler:

- Yolaşmaz A., Turčeková L., Türk M., Reyhan E., Šnábel V., Dubinský P., Güneş K, Altıntaş N. Türkiye ve Slovakya'dan *Echinococcus granulosus* izolatlarında genetik farklılıkların SSCP

analizi ile gösterilmesi. İkinci Ulusal Hidatidoloji Kongresi. Bursa Türkiye. (15 –18 Eylül 2004)

- Ertabaklar H., Gunes K., Rastgeldi S., Ozensoy Toz S., Ozbel Y. Balıkesir'in Dutluca köyünde zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL) araştırması. 31. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, Aydın. (14 – 23 Eylül 2004).

- Yolasigmaz A, Turčeková L, Turk M, Reyhan E, Šnábel V, Dubinský P, Gunes K, Altintas N. Genetic variation in *Echinococcus granulosus* from Turkey and Slovakia demonstrated by sequence and SSCP Analyses. *Proceedings of 21st International Congress of Hydatidology*, Nairobi, Kenya. (16 - 21 August 2004)

- Özensoy Töz S., K Güneş, Uslu U., Ülker T., Döşkaya M., Yetkin Caner A. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Ocak 2002 – Temmuz 2003 tarihleri arasında başvuran 11 CL olgusunun sonuçları. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya. (8 – 12 Eylül 2005).

- Dağcı H., Özensoy Töz S., Ülker T., Döşkaya M., Yetkin Caner A, Güneş K., Uslu U., Üner A. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına Ocak 2002 – Temmuz 2003 tarihleri arasında 107 *Pneumocystis carinii* pnömonisi şüpheli olgunun sonuçları. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Konya. (8 – 12 Eylül 2005).

Katıldığı Kongre Organizasyonları

- Organization committee member of the 20th International Congress of Hydatidology Kusadasi, Aydın, Turkey, 5 – 8 June 2001
- 2. Ulusal Hidatidoloji Kongresi organizasyon komitesi üyesi, Bursa, Türkiye (15 – 18 Eylül 2004).

Katıldığı Kurslar ve Sertifikaları

- Transfüzyon Tıbbı ve Kan Bankacılığı Kursu. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı ve Kan Merkezi. Bornova, İzmir. 22 Ağustos 2005 – 22 Şubat 2006.
- Training Course in Molecular Epidemiology of Leishmaniasis, Leish – Med Organization / Jordan University for Science and Technology, Irbid, Jordan, 19 – 29 September 2005.
- Protein Teknikleri ve Proteomik Kursu, Ege Üniversitesi EBİLTEM, Bornova, İzmir, 21 – 25 Temmuz 2004.
- Moleküler Biyolojik Yöntemler Kursu, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gebze, İzmit, 30 Haziran-4 Temmuz 2003.
- Course in Community Oriented Primary Care Workshop, Dokuz Eylül University School of Medicine Department of Public Health & Hebrew University Hadassah School of Public Health and Community Medicine, Inciralti, Izmir, 2 – 5 April 2001.