

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEDAVİYE CEVAP VERMEYEN ŞARK ÇIBANI
OLGULARINDA ELISA ve IFA YÖNTEMLERİNİN
TANISAL ÖNEMİ**

Nermin ULUCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

ŞANLIURFA

2019

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEDAVİYE CEVAP VERMEYEN ŞARK ÇIBANI
OLGULARINDA ELISA ve IFA YÖNTEMLERİNİN
TANISAL ÖNEMİ**

Nermin ULUCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

**Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığı tarafından
17058 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ŞANLIURFA

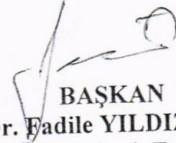
2019

T. C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

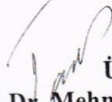
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nermin Uluca'nın hazırladığı "Tedaviye cevap vermeyen şark çibani olgularında ELISA ve IFA yöntemlerinin tanısal önemi" başlıklı çalışması 10/07/2019 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Mikrobiyoloji Anabilim Dalında

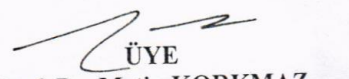
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



BAŞKAN
Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK
Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE
Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR
Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ÜYE
Prof. Dr. Metin KORKMAZ
Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18/07/2019 tarih ve
...2019-12-24... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Her türlü desteği ile yüksek lisans öğrenciliği eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bize aktararak bizi yetiştiren, oluşturduğu hoşgörü ve güven ortamında huzurlu çalışmamızı sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'e,

Yüksek lisans öğrenciliği eğitimim süresince yetişmemde katkıları ve emekleri olan, değerli hocam Prof. Dr. Mehmet BAYRAKTAR'a,

Çalışmalarımın bir bölümünü yaptığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Öğretim üyeleri Prof. Dr. Metin KORKMAZ ve Doç. Dr. Derya DİRİM ERDOĞAN ile Dr. Aylin BABAĞLU'na

Tezim için gerekli numunelerin toplanmasında çok büyük emekleri ve katkıları olan, Şanlıurfa Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezi çalışanları sayın Mehmet MURATOĞLU'na, Figen SAAT'e, Ömer ÖZDEMİR'e ve Ali ULAŞ'a,

Tez çalışmalarımın hazırlanmasında ve tamamlanmasında çok büyük katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Gülcan GÜRSES'e

Tez çalışmamın istatistiksel analizlerini yapmamda bana yardımcı olan ve değerli bilgilerini benden esirgemeyen çok değerli Öğretim üyesi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim KORUK'a

Tüm laboratuvar arkadaşlarıma, çok büyük manevi desteğini gördüğüm ilk göz ağrım sevgili arkadaşım Dilek ESEN'e ARYAM'a ve ANNEM'e

TEŞEKKÜR EDERİM.

NERMİN ULUCA

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
RESİMLER DİZİNİ.....	V
GRAFİKLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ.....	VII
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Morfoloji.....	3
2.2.1. Amastigot.....	3
2.2.2. Promastigot.....	3
2.3. Sınıflandırma.....	4
2.4. Klinik.....	5
2.4.1. Visseral Leishmaniasis (VL).....	5
2.4.2. Kala Azar Sonrası Deri Leishmaniasis.....	6
2.4.3. Kutanöz Leishmaniasis (Şark Çıbanı).....	6
2.4.4. Mukokutanöz Leishmaniasis.....	7
2.4.5. Yaşam Döngüleri.....	8
2.5. Tanı Yöntemleri.....	9
2.5.1. Visseral Leishmaniasis’de Tanı.....	9
2.5.2. Kutanöz Leishmaniasis’de Tanı.....	10
2.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Cihazlar ve Materyaller.....	13
3.1.1. Parazit Kültürü ve Mikroskopi.....	13
3.1.2. IFA Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler.....	13

3.1.3. ELISA Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Lezyon Sıvısı Örneklerinin Eldesi.....	15
3.2.2. N.N.N. Besiyerinin Hazırlanması.....	17
3.2.3. Kültür.....	17
3.2.4. Antijen Hazırlama.....	18
3.2.5. IFA.....	19
3.2.6. ELISA.....	19
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA.....	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	28
7. KAYNAKLAR.....	29
8. EKLER.....	34
EK.1. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararı.....	34
EK.2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu ve Beyan Belgesi.....	35
EK.3. İntihal Raporu.....	36
EK.4. Tez Veri Giriş Formu.....	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA NO

Şekil 2.1. Leishmania spp. Promastigot.....	4
Şekil 2.2. Leishmania spp. yaşam döngüsü.....	9
Şekil 3.1. Hastalardan alınan klinik örneklerde Leishmania amastigot formları.....	17
Şekil 3.2. NNN besiyerinde üreyen Leishmania promastigot formu.....	18



Resim 3.1. Çalışmaya dahil edilen şark çıbanı hastalarının lezyon görünüşleri.....16



GRAFİKLER DİZİNİ

SAYFA NO

Grafik 4.1. Hasta grupları arasındaki ELISA absorbans değeri.....	23
Grafik 4.2. Lezyon süresi ve IFA pozitifliği arasındaki ilişki.....	24
Grafik 4.3. Kür sayısı ve IFA pozitifliği arasındaki anlam.....	25



TABLolar DİZİNİ**SAYFA NO**

Tablo 4.1. Hasta gruplarının Yaş Dağılımı.....	20
Tablo 4.2. Hasta Gruplarının Aldıkları Kür Sayılarının Yaşlara Göre Dağılımı.....	20
Tablo 4.3. Hastaların Lezyon Özellikleri.....	21
Tablo 4.4. Lezyon Tipi ve Büyüklüğü Arasındaki İlişki.....	22
Tablo 4.5. Mikroskopi ile ELISA değerlerinin karşılaştırılması.....	22
Tablo 4.6. IFA sonuçlarının hasta gruplarına göre dağılımı.....	23
Tablo 4.7. Mikroskopi ve IFA değerlerinin karşılaştırılması.....	24
Tablo 4.8. Dirençli ve tedavi altındaki KL hastaları için iki serolojik yöntemin..... sonuçlarının değerlendirilmesi	25

KISALTMALAR VE İMGELER

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim Linked Immunosorbent Assay
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
IHA	: Indirekt Hemaglütinasyon
IFA	: Indirekt Floresan Antikor
IM	: Intramuscular
IV	: Intravenöz
kDNA	: Kinetoplast Deoksiribonükleik Asiti
KL	: Kutanöz Leishmaniasis
MCL	: Mucocutaneus Leishmaniasis
nDNA	: Nükleer Deoksiribonükleik Asit
NNN	: Novy, Nicolle, Mac Neal
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PKL	: Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis
PR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RES	: Retikuloendotelyal Sistem
RNA	: Ribonükleik Asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RFLP	: Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm
VL	: Visseral Leishmaniasis
TMB	: Tetrametilbenzidin
DMA	: Dimetilasetamid
DA	: Doğrudan Aglütinasyon
RAPD	: Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
TD-KL	: Tedaviye dirençli Kutanöz leishmania
A-KL	: Akut Kutanöz leishmania

ÖZET

Tedaviye Cevap Vermeyen Şark Çıbanı Olgularında ELISA Ve IFA Yöntemlerinin Tanısal Önemi

Nermin ULUCA

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Şark çıbanı (Kutanöz leishmaniasis-KL) tanısında, antikorların çok düşük titrede oluşması veya hiç tespit edilememesi sebebiyle serolojik yöntemler tercih edilmemektedir. Ancak bu hastalığın endemik olduğu bölgelerde, hastaların tespit edilerek hızlı bir şekilde tedavi edilmesi parazitle mücadelede ve hastalık kontrolünde büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple bölgede yaşayan insanların eğitimi ve bu kişilere koruyucu yöntemlerin aktarılması, endemik bölgede görülen hastalığın yok edilebilmesi için gerekli görülmektedir. Bu çalışmada şark çıbanı açısından yüksek endemisitiye sahip Şanlıurfa ilinde tanısı konulan fakat tedavi sonucu iyileşmeyen (dirençli) KL hastalarının serumlarında IFA ve ELISA yöntemleriyle anti- Leishmania antikorlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezi ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına başvuran 1-59 yaş arasında ve 1 ile 4 tedavi kürü aldığı halde tedaviye cevap vermeyen 60 tedaviye dirençli (TD-KL) hasta ile KL tanısı konulmuş halen tedavisi devam etmekte olan 40 akut KL hastası (A-KL) ve kontrol grubu olarak aynı yaş grubundan 40 sağlıklı kişi dahil edilmiştir. Tedaviye cevap vermeyen ve tedavisi devam eden kontrol grubundan lezyon sürüntü ve kan örneği, sağlıklı kontrol grubundan da yalnızca kan örnekleri alınmıştır. Hastalardan alınan lezyon örnekleri önce NNN besiyerine ekilmiş, üreme sonrası buradan RPMI-1640 besiyerine alınarak çoğaltma işlemi yapılmıştır. Logaritmik döneme ulaşan Leishmania spp. promastigotlarından ELISA ve IFA testinde kullanılmak üzere antijen elde edilmiştir. Alınan lezyon örneklerinden aynı zamanda yayma preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyanmış ve Leishmania amastigotları

araştırılmıştır. Alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra elde edilen serum örneklerinde ELISA ve IFA yöntemi ile anti-Leishmania IgG antikor tayini yapılmıştır.

Leishmaniasis tedavisi görüp iyileşmeyen 60 TD-KL hastanın 38'i (%63,3) kadın, 22'si erkek (%36,7) olarak bulunmuştur. İlk tedavilerini almış 40 A-KL hastanın ise 26'sı (%65) kadın 14'ü(%35) erkek, sağlıklı 40 kontrol grubunun 14'ü (%35) kadın 26'sı(%65) erkek olarak bulunmuştur. Lezyonların %56'sı yüz bölgesinde, %31'i el-kol bölgesinde, %13'ü vücudun 3 veya daha fazla bölgesinde görülmüştür. TD-KL ve A-KL hastalarının sırasıyla lezyon sayısı 1-16 ve 1-14 adet, lezyon süreleri ise 1 ay-10 yıl ve 1 ay-1 yıl arasında değişmekteydi. ELISA ile TD-KL hastaların 37'sinde (%61,7), A-KL hastaların 17'sinde (%42,5) pozitiflik bulunurken, IFA yöntemiyle TD-KL ve A-KL hastalarının sırasıyla 44'ünde (%73,3), 37'sinde (%92,5) pozitiflik bulunmuştur. TD-KL ve A-KL hastalarında ELISA ve IFA yöntemlerinin duyarlılıkları sırasıyla %54 ve %81 olarak bulunmuştur.

Şark çıbanının endemik olduğu Şanlıurfa'da tedaviye cevap vermeyen veya direk mikroskopisi ve kültür sonucu negatif olan klinik olarak KL olduğu düşünülen hastaların tanısında serolojinin önemli bir alternatif yöntem olduğu, klasik yöntemlerle tanı konulamayan şüpheli hastalarda mutlaka akılda tutulması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Leishmania IFA, Leishmania ELISA, Leishmania seroloji

ABSTRACT

Diagnostical Importance Of The Methods Of Elisa And Ifa In The Cases Of Cutaneous Leishmaniasis That Did Not Response To Leishmaniasis Treatment

Nermin ULUCA

Department of Medical Microbiology, Master Thesis

Serological methods are not preferred in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL) because the antibodies are too low or not detected at all. However, in the regions where this disease is endemic, the rapid detection and treatment of the patients is of great importance in the fight against parasites and disease control. For this reason, the education of people living in the region and the transfer of protective methods to these people is deemed necessary for the destruction of the disease seen in the endemic region. In this study, it was aimed to investigate anti-Leishmania antibodies in IFA and ELISA methods in the sera of patients with CL resistant to treatment who were diagnosed in Şanlıurfa with high endemicity.

The study included 60 patients, unresponsive to treatment, with the ages of 1 to 4 years who were admitted to the Leishmania Diagnosis and Therapy Center and Medical Microbiology Laboratory of Harran University Education and Research Hospital. 40 patients and 40 healthy subjects with the ages of 1 to 59 years were also included in the study. Blood samples were taken from the patient and control groups. Samples of the lesions from the patients were taken and inoculated in NNN medium and then for multiplication transferred to RPMI-1640 medium. Leishmania spp. antigen was obtained from logarithmic stage of the promastigotes growth and used in the ELISA and IFA tests. After the blood samples were centrifuged, anti-Leishmania IgG antibody was determined by ELISA and IFA methods. Smear preparations were prepared from the samples of the lesion and stained with Giemsa and Leishmania amastigotes were investigated.

Of the 60 treatment resistant leishmaniasis patients, 38 (63.3%) females and 22 (36.7%) were males. Of the 40 patients undergoing treatment, 26 (65%) were females and 14 (35%) were males and 14 (35%) were healthy males and 26 (65%) were healthy females. 56% of the lesions were found in the face area, 31% in the hand-arm region and 13% in 3 or more parts of the body. The number of lesions in patients who did not respond to treatment ranged from 1 to 16, and the duration of lesions ranged from 1 month to 10 years. ELISA results were found to be positive in 37 (61.7%) of the refractory patients, 17 (42.5%) in the normal treated patients, whereas IFA in refractory patients and the normally treated patients were positive in 44 (73.3%), 37 (92.5%) respectively. The sensitivity of ELISA and IFA methods in resistant and normally treated patients was 54% and 81%, respectively.

It is thought that Şanlıurfa where CL is high endemic, serology is an important alternative method in the diagnosis of patients who are considered to be CL clinically but they are considered to be unresponsive to treatment and they are also negative for leishmaniasis by direct microscopy and culture methods.

Keywords: Leishmania IFA, Leishmania ELISA, Leishmania serology

1.GİRİŞ

Leishmania, protozoonların Mastigophoraalt şubesinde bulunan Trypanosomatidaeailesinde yer alan, insanların kan ve dokularında yerleşerek leishmaniasis enfeksiyonuna neden olan kamçılı bir parazittir. Klinik olarak Visseral Leishmaniasis (VL, İç Organlar Leishmaniasis'i, Kala-Azar), Kutanöz Leishmaniasis (KL, Deri Leishmaniasis'i) ve Mukokutanöz Leishmaniasis (MCL, Espundia) olarak ayrılır (1).

Kala-Azar ve Deri Leishmaniasis'i eski ve yeni dünyada görülmekte ancak ayrı Leishmania türleri tarafından oluşturulmaktadır. Espundia ise sadece Amerika Kıtası'nda görülmektedir (2).

Hastalık etkeni, omurgalılarda hücre içi paraziti olarak, kamçısız ve hareketsiz amastigot şeklinde, vektör vücudunda ve kültür ortamında ise kamçılı ve hareketli promastigot şeklinde bulunur. Leishmania türleri memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olup, enfekte Phlebotomuscinsi tatarcıklar (yakarca, kum sinekleri, lutzomyia) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadır. Parazit kaynağı hasta insan, hayvan ve rezervuarlardır (1).

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen, 88 ülkede endemik olarak gözlenen bir hastalıktır. 5 kıtada toplam 350 milyon insan risk altındadır. Her yıl yeni hasta sayısının VL için 50.000, KL için 1.500.000 olduğu tahmin edilmektedir (2).

Ortadoğu'nun çeşitli tropikal ve subtropikal bölgelerinde Afrika, Hindistan ve Asya'da 'Halep çıbanı', 'Bağdat çıbanı', 'Delhi çıbanı', 'Delhi Ülseri', 'Doğu Yarası', 'Aleppo'; ülkemizde ise 'Şark çıbanı', 'Yıl çıbanı', 'Antep Çıbanı' gibi farklı isimlerle anılmaktadır (3). Visseral leishmaniasis 'Kala-Azar', 'Kara Hastalık', 'Dumdum Ateşi' olarak, mukokutanöz leishmaniasis ise 'Espundia', 'Uta', 'Chiclero Ülseri' olarak adlandırılır (3-5).

Eski dünya Leishmaniasis'i daha çok endemik karakterlidir. Hindistan ve Afrika ülkelerinde epidemilere yol açmıştır. Ülkemizde *L. infantum*'un etken olduğu VL, Ege ve Akdeniz bölgelerinde; *L. tropica*'nın etken olduğu KL, Doğu Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde gözlenmektedir (6).

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Leishmania ilk kez 1900 yılında Leishman tarafından Hindistan'da Dumdun'da dizanteriye yakalanarak İngiltere'ye giden bir askerin dalak preparatında görülmüştür. Aynı yıl Donovan, Madras'ta Kala-Azar vakalarında dalaktan elde edilmiş örnekten hazırlanan preparatlarda paraziti görmüş ve 1903 yılında bulgularını yayınlamıştır. Yine aynı yıl Ross tarafından parazit *L. donovani* olarak isimlendirilmiş ve kala azara neden olduğunun gösterilmesiyle ilk kez tanımlanmıştır (7,8).

1904 yılında Catoire, 1905 yılında Pianese Akdeniz bölgesinde dalak büyüklüğü ile birlikte anemisi olan çocuklarda etkeni bulmuşlardır. 1908 yılında Nicolle, E.G. Novy ve W.J. Mac Neal'in tarif ettikleri besiyerine benzer bir besiyerinde paraziti üretmiş ve Akdeniz bölgesinde VL'in rezervuarının memeliler, özellikle köpek olabileceğini ileri sürmüştür. Yine 1908 yılında Nicolle ve Compte köpekte Leishmania parazitini bulmuşlar ve bu parazite Nicole tarafından *L. infantum* adı verilmiştir (1).

Uzun yıllar ciddi bir halk sağlığı meselesi olarak önemi anlaşılamayan ve yeterli ilgiyi göremeyen leishmaniasis, 1976 yılından itibaren Dünya Bankası ve Dünya Sağlık Örgütü'nün ortak programları olan Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Özel programı kapsamına alınmıştır. Bundan 60 yıl önce yalnız belirli bölgelere ait olduğu düşünülürken, günümüzde Avustralya ve Antarktika hariç bütün kıtalarda bilinen bir hastalıktır (9, 10).

Türkiye'den VL'li ilk hasta Karadeniz Bölgesi'nde Trabzon'dan rapor edilmiştir. 20. yüzyılın başında 1916'da Leishmania amastigot formları Bağdat'taki 11 Osmanlı askerinin karaciğer ve dalak biyopsilerinden tanımlanmıştır (1, 7, 8, 11).

Kutanöz Leishmaniasis ise Akdeniz havzası ve Ortadoğu'da yüzyıllardır bilinen bir hastalıktır. KL ile ilgili ilk bilgiye 1050 yılında Ebu Bekir Muhammed bin Zekeriya El Razi'nin bir eserinde rastlanmış olup o tarihten itibaren hastalığın özellikle kliniği konusunda önemli bir bilgi birikimi oluşmuştur.

Bununla birlikte KL'nin epidemiyolojisi, etkeni ve bulaşma şekli hakkındaki ilk bilgiler 18. yüzyıldan sonraki araştırmalarla elde edilebilmiştir. Celal Muhtar ve Hulusi Behçet başta olmak üzere çok sayıda araştırmacı KL ile ilgilenerek hastalığın her

yönü ile tanınmasına katkılarda bulunmuşlardır. Ülkemizin önemli bir kısmında epidemilerle seyreden hastalığın insidansı 1950'li yıllardan itibaren uygulanan sıtma eradikasyonu çalışmaları ile birlikte azalma göstermiştir. Fakat özellikle 1980'li yıllardan itibaren başta Güneydoğu Anadolu ve Çukurova bölgesi olmak üzere ülkemizin belirli bölgelerinde ciddi bir halk sağlığı problemi olarak tekrar gündeme gelmiştir (1,7, 8).

2.2. Morfoloji

Leishmania türleri omurgalı konak vücudunda hücre içi paraziti olarak amastigot şeklinde; omurgasız konakta ve in-vitro kültürde ise promastigot şeklinde bulunurlar. Bu protozoonlar bütün hayat dönemlerinde parazittirler, yani konak vücudu dışında özgür bir hayat dönemleri yoktur (12).

2.2.1. Amastigot

Büyüklüğü 2–5 μm olan amastigot formlar, yuvarlak veya oval görünümündedir. Bu formlar omurgalı konakta Retikuloendotelial Sistem (RES) makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalmaktadır. Kamçısız ve hareketsizdir. Giemsa ile sitoplazma soluk mavi, çekirdeği ise pembe veya koyu kırmızı renge boyanır. Çekirdeğin yakınında bulunan parlak kırmızı–menekşe renkte boyanan yapı ise bir sonraki dönemde, kamçının çıkacağı yer olan kinetoplasttır (7, 8, 12).

Leishmania amastigot dönemde hareketsizdir ve besinlerini içinde bulunduğu hücreden alır; aeroportur; büyük makrofajlar içinde boyuna ikiye bölünerek çoğalır.

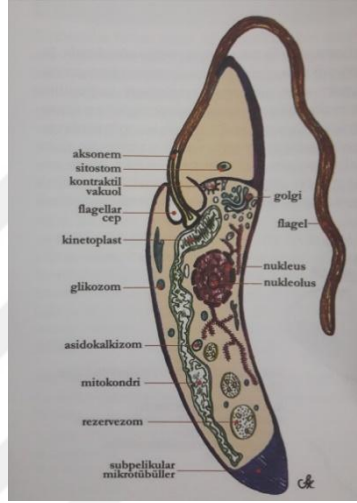
2.2.2. Promastigot

Phlebotomus'ların bağırsaklarında ve besiyerinde bulunan tipik formlardır, 12–20 μm uzunlukta 1.5–2.5 μm genişliktedirler. Mekik şeklinde vücudu ve aynı uzunlukta ön uçtan çıkan serbest bir kamçısı bulunmaktadır.

Kamçı karakteristik axonemal yapıdadır. Axonem 2 merkezi, 9 periferel fibril çifti içermektedir. Kamçının bağlantı noktasında kamçı paketi ismi verilen ve sitostoma benzeyen bir invaginasyon vardır. Blefaroblast kinetoplastın önünde kamçının dip kısmındadır. Membranla izole edilmiştir. Kamçıdan ayrı olarak 3 periferel fibrilin 9

grubundan oluşmaktadır. Ön uçtan yaklaşık 2 µm içerde yuvarlak veya at nalı şeklinde bir kinetoplast vardır.

Nükleus parazit gövdesinin ortasında bulunur. Nükleusun 7 nm kalınlığındaki nükleer membranında 60–80 nm çapında porlar vardır. Merkezde 0.6–1 µm çapında bir nükleolus vardır. Sitoplazma içinde endoplazmik retikulum ve golgi cihazı bulunur (1, 7,8,13) Şekil(1).



Şekil2.1. Leishmania spp. promastigot form

2.3. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütüncü Leishmaniatürleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır(4).

Alem: Protista

Altalem: Protozoa

Şube: Sarcomastigophora

Altşube: Mastigophora

Sınıf: Zoomastigophora

Ordu: Kinetoplastida

Aile: Trypanosomatidae

Cins: Crithidia, Endotrypanum, Blastocrithidia, Herpetomonas, Leptomonas, Phytomonas

Cins: *Leishmania*

Altcins: *Leishmania*

Tür: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*,
Leishmania tropica, *Leishmania major*, *Leishmania aetropica*,
Leishmania mexicana(*L.mexicana*, *L.amazoensis*, *L.venezuelensis*, *L.pifanoi*,
L.enriettii)

Altcins: *Viannia*

Tür: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L.braziliensis*, *L.colombiensis*,
L.equatorensis, *L.peruviana*)*Leishmania guyanensis* (*L.guyanensis*, *L.panamensis*,
L.shawi), *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi* (3)

2.4. Klinik

2.4.1. Visserel Leishmaniasis (Kala Azar)

Etken, *L. donovani*'dir. Hastalığın kuluçka süresi genelde 2–4 ay arasındadır. Bu süre bir yıla kadar uzayabilir. İnfekte tatarcığın konağı soktuğu yerde 2–3 mm ebatında bir nodül oluşur. Pembe renkteki bu nodülün ortası daha sonra kabuklanmaktadır.

Hastalık genelde sinsi başlar, bazen aniden de ortaya çıkabilir. Başlangıçta kırıklık, baş ağrısı, zayıflama ve hafif ateş görülür. Daha sonra ateşin artması ile birlikte dalak da büyür. Hastalığın ilerlemesi ile ateş Kala-Azar'a özgü bir eğri çizer. Bu, günde iki kez yükselen aralıklı bir ateştir. Genelde 39–40°C olmakla beraber bazen 40–40.5°C'ye çıkabilir (7, 14-16).

İç Organlar Leishmaniasisi'nin çeşitli coğrafi tipleri vardır:

*L. donovani**donovani*: Hindistan, Burma, Pakistan, Tayland, Çin ve bazı Afrika ülkelerinde görülür. Vektörü tatarcıklardır.

*L. donovani**infantum*: Akdenize kıyısı olan ülkelerde, Avrupa'da, yakın doğu Afrika'da görülür. Vektör tatarcık türleridir.

*L. donovani**chagasi*: Bu tür orta ve Güney Amerika'da kala azar etkenidir. Vektörü *Lutzomyia* türleridir (12).

2.4.2. Kala Azar Sonrası Deri Leishmaniasisi (Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis)

Kala-azarı atlatmış, iyileşmiş kişilerde bir veya birkaç yıl sonra ortaya çıkan durumdur. Hindistan ve bazı Doğu Afrika ülkelerinde görülür. Derideki lezyonlar eritematöz veya depigmente makuller şeklindedir; bütün vücuda yayılır veya fokal lezyonlar halindedir. Burun üzerinde kelebek benzeri bir dağılım görülür. Sonraki dönemde lezyonlar nodülleşir ve bu dönemde olgular nodüler lepra olguları ile karışabilir. İçlerinde bol parazit bulunan nodüller, vektör için önemli bir enfeksiyon kaynağıdır (12).

2.4.3. Kutanöz Leishmaniasis (Şark Çıbanı)

Kutanöz leishmaniasis'in Türkiye'deki başlıca etkeni *L. tropica*'dır. Son yıllarda yapılan çalışmalar Güneydoğu Anadolu bölgesi Şanlıurfa'da *L. major*'ün de etken olduğu bildirilmiştir (17). Hastalığın bulaşmasından Phlebotomuscinsi tatarcıklar sorumludur. Kuluçka süresi ortalama 3–6 aydır. Bu formlar tatarcık tarafından sokulan yerden derinin retikuloendotelial hücrelerine girer ve amastigot şekline dönüşürler. Vektör tarafından ısırılan yerde küçük kırmızı bir papül gelişir, sonra nodül haline döner. Daha sonra bu ülserleşerek kabuklanır. Lezyonlar siğilimsi, karnabahar veya sert ve lipoid görünümünde, değişik yapıda olabilir (1, 7, 8, 11, 14, 18, 19).

Sağlık bakanlığı'nın organizasyonunda Parazitoloji ve Dermatoloji uzmanları tarafından hazırlanan "Kutanöz Leishmaniasis (KL) Olgularında Tanısal Yaklaşım"ın aşamaları aşağıdaki şekildedir(20).

1-Genellikle vücudun giysi ile kapanmayan açık olan kısımlarındaki deriyelokalize,

2-Uzun süre (en az 1 ay)iyileşmeyen,

3-Sekonder olarak bakterilerle enfekte olmadıkça ağrısız,

4-Eritemli papül, nodül, nodülo-ülseratif, plak, ülsere plak şeklindelezyon

5-Ülserleşmiş lezyonların üzerinde alta sıkıca yapışık krutlu, kenarları lastik silgi kıvamında endürasyon gösteren (merkezi krateri olan volkan biçiminde)lezyonlardır.

Lezyonlar yaz aylarında ve geceleri aktif olan tatarcık sineğinin beslenmek için kan emdiği deri bölgesinde, 4-8 aylık inkübasyon döneminden sonra ortaya çıkan, ağrısız, eritemli bir papül şeklinde başlar. Lezyon, 1–2 ay içerisinde giderek büyür ve 1-2 cm çaplı nodüle dönüşür. Nodüler lezyon zaman içerisinde merkezden ülserleşerek krutla kaplanır. Tedavi alamayan olgularda lezyon doğal seyri genellikle 1–1.5 yıllık süreç içerisinde ömür boyu süren depresif skar bırakarak iyileşir. İyileşmeden sonra kişiyi ömür boyu reenfeksiyonlara karşı koruyan doğal bir bağışıklıkgelişir.

Endemik olmayan bölgelerde de yukarıdaki klinik tanımlamaya uyan lezyona sahip olgularda, özellikle yaz aylarında endemik bölgelere (Örneğin, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesine) seyahat öyküsü açısından ayrıntılı anamnez alınmalıdır(20).

Kutanöz Leishmaniasis klinik olarak iki tipte tanımlanır;

Kuru Tip Deri Leishmaniasisi: Bu tipten sorumlu *L. tropica minör*'dür. Kuru tipte çıbanın büyümesi yavaştır. Yılın herhangi bir ayında görülebilir. Kuluçka süresi uzundur; kronik seyredir. Genelde şehirlerde görülür.

Yaş Tip Deri Leishmaniasisi: Etken *L. tropica majör*'dür. Bu tip leishmaniasisde yara izi kuru tipe göre daha derindir. Kuluçka süresi kısadır. Daha çok yaz ve sonbaharda görülür. Köylerde görülen tiptir (12).

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yakın zamanda yapılan çalışmalar sonucu yakalanan tatarcıkların *L. major*'ün kanıtlanmış vektörü olan *Phlebotomus sergenti* veya *Phlebotomus papatasi* olduğu görülmüş, bu bölgede Kutanöz Leishmaniasis'in primer vektörünün *Phlebotomus sergenti* olduğu düşünülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda hiçbir tatarcıkta Leishmania promastigotları izole edilememiştir (6,18).

2.4.4. Mukokutanöz Leishmaniasis

Chiclero ülser, Uta, Espundia adı verilen deri hastalığının etkeni *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ve *L. Pifanoi*'dir. Lezyon daha çok ağızda veya burun mukozasındadır. Lezyon sayısı çoktur ve geniştir. 3-12 cm'lik büyüklük arzeden bu lezyonların infiltrasyon sebebiyle sınırlarının kalkık olması karakteristiktir. Bunun yanında mukozaların lize olması da hastalığın esaslı bir komplikasyonu olup şark çıbanından ayrıştırılır. Hastalığın kıkırdak dokusuna geçme eğilimi olduğundan nazofarinks enfekte ederek deve burnu denilen görüntüyü oluşturur. Vakaların %2-

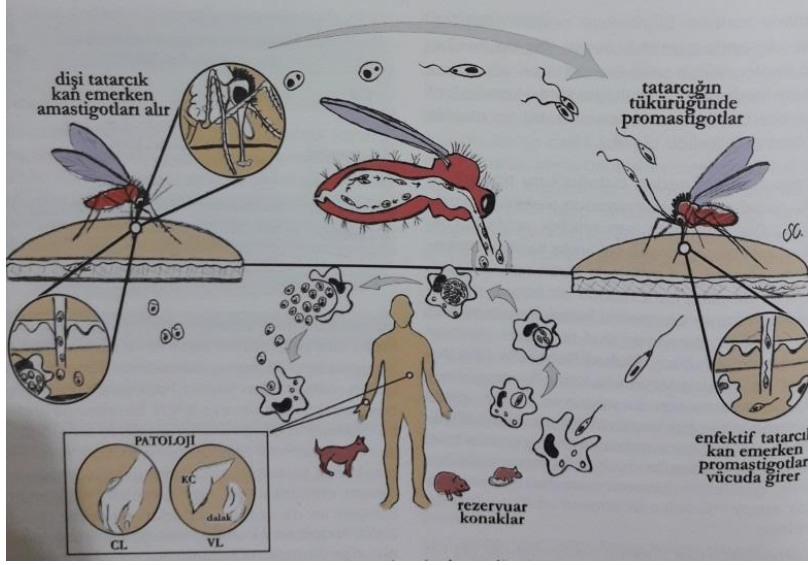
5'inin bu forma dönüştüğü bildirilmiştir. Nazal septum eriyebilir, bu durumda nazal çöküntü oluşur (sivri burun). Damakta perforasyon oluşur (3, 4, 21, 22).

2.4.5. Yaşam Döngüleri

Leishmania parazitinin insan ve başka memelilerin vücudunda kamçısız (amastigot) ve tatarcık vücudunda kamçılı (promastigot) olmak üzere iki evrim şekli vardır. Leishmania türleri dimorfik yaşam siklusuna sahiptir. Seksüel döngü henüz identifiye edilememiştir (5).

Leishmania'ların vektörü olan Phlebotomus veya Lutzomyia cinsi kum sinekleri leishmaniasis'li omurgalı konaktan kan emerken içinde amastigot bulunan makrofajları da alırlar. Vektör tarafından alınan bu amastigotların bir kısmı sindirilirken diğer bir kısmı bölünerek çoğalır. Bu şekil bir -iki defa orta bağırsakta bölündükten sonra boyları uzar, flagella oluşur ve metasiklik promastigot haline gelirler. Bundan sonra ikiye bölünerek çoğalırlar ve sayıları arttıkça öne doğru gelirler.

Enfekte kanın alınmasından 3 - 7 gün sonra yutağa varırlar ve burada farinksı tıkarlar. Promastigotlar vektör tarafından yine kan emerken yeni omurgalı konağın kanına geçerler ve burada konağın çeşitli savunma mekanizmalarına karşı koyarlar. Özellikle komplemanın sitotoksik ve eritici etkisine karşı koymaktan da öte bu etkileri kendi lehine kullanarak konağın makrofajlarına girerler ve makrofaj içinde amastigot forma dönüşerek ikiye bölünme ile çoğalırlar ve makrofajları patlatırlar. Kan yoluyla organizmaya yayılırlar ve yeni makrofajlar içine girerler (5,18,23) Şekil (2).



Şekil 2.2: Leishmania spp. yaşam döngüsü

2.5. Tanı Yöntemleri

2.5.1. Visseral Leishmania'da Tanı

Endemik alanlarda tanı klinik bulgulara dayanılarak yapılır; kesin tanı klinik örneklerde amastigotların ve kültürde promastigotların görülmesiyle konur. Tanı için dalak, karaciğer, lenf nodu aspiratı; karaciğer biyopsisi, kemik iliği materyali hatta venöz kandan yapılan buffy-coat kullanılır (12).

a) Direk İnceleme ve Kültür

Örnekten yayma veya değdirme preparat hazırlanır. Giemsa boyası ile boyanır; sonra direkt olarak incelenir. Alınan materyalin bir kısmı steril koşullarda NNN besiyerine ekilir ve 24°C de parazit üretilmeye çalışılır. Üreme sonuçları çok geç alınır (en erken 1 hafta-ortalama 3 hafta). NNN besiyerinden başka, Schneider'in Drosophila besiyeride kullanılmaktadır (12).

b) Chopra'nın antimon testi

Beş değerli antimon bileşiğinin %4'lük eriyiği 10 kez sulandırılmış 2 ml hasta serumu üzerine birkaç damla damlatılır, tüp iki el arasında yuvarlanarak karıştırıldığında çökelek oluşur. Bu test erken pozitifleşir, fakat splenomegali olan başka durumlarda da pozitif olabilir (11)

c) Cilt (Leishmanin=Montenegro) Testi

Aktif hastalıkta negatiftir. Bu nedenle, tanıda yardımcı olmaktan çok epidemiyolojik değeri vardır (12).

d) Formol-Gel Deneyi

Formal-gel serolojik bir deney olmadığı gibi, özgül de değildir. Sadece gammaglobülin seviyesinin yüksekliğine işaret eder. Pozitif sonuçlar ülkemizde, kala-azarın lehine bir bulgu olarak değerlendirilebilir (12).

1 ml kadar hasta serumu üzerine birkaç damla formalin damlatılarak, serumda bulanıklaşmanın görülmesi esasına dayanır. Oluşan bulanıklığın meydana geliş süresinin kısalığı, testin tanı değerini yükseltir (11).

e) IHA, IFA, ELISA

Tanıda spesifik antikorları araştıran testler de kullanılmaktadır. Ancak duyarlılığın düşük olması ve çapraz pozitiflik gibi dezavantajları vardır.

Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile elde edilen sonuçlar; kullanılacak olan antijenin iyi şekilde hazırlanıp hazırlanmadığına bağlıdır. Promastigot ve amastigotlardan elde edilen eriyik antijenlerden başka son yıllarda daha spesifik olan rekombinant leishmanial antijenler kullanılmaktadır (1, 7, 8, 11, 14, 24-26).

Rekombinant Leishmanial Antijenler;

Antijengp63

AntijenrK39

Antijengp70–2

Antijendp72

2.5.2. Kutanöz Leishmaniasis’de Tanı

Kutanöz Leishmaniasis, akne, kan çıbanı, ekzama, lupus eritromatozus, lupus vulgaris, tuberculosis verrucosus, çeşitli frengi belirtilerine, lepramatöz lepraya, yumuşak yara, psoriasis, deri tümörleri gibi birçok deri hastalığını taklit edebilir. Kutanöz Leishmaniasis deri tüberkülozu lezyonu üzerine gelişebilir veya deri leishmaniasisi üzerinde lupus vulgaris oluşabilir. Kesin tanı laboratuvar yardımı ile

konur. Lezyon bölgesinden, lezyonu mümkünse kanatmadan alınan materyalden hazırlanan yaymalar Giemsa ile boyanarak incelenir veya NNN besiyerinde üretilir. Yaymaların boyalı incelemelerinde amastigotların, besiyerinde promastigotların görülmesiyle tanı konur (1,14).

a) Direk Tanı

Kutanöz leishmaniasis şüpheli lezyonun kenarından, sağlam deriyle birleştiği sınır çizgisinden alınan örneğin giemsa ile boyama sonrası, mikroskopta 100'lük imersiyon objektifte incelenmesinde hücre dışında veya içinde parazitin görülmesi mümkün olmaktadır.

Leishmaniasisin tüm klinik formlarında olduğu gibi Kutanöz leishmaniasis enfeksiyonunda da mononükleer fagositik hücrelerin içinde 2–5 µm boyutundaki amastigotların varlığını saptamak oldukça güç olmaktadır. Amastigotların etrafını çeviren plazma membranı, koyu boyanan ve daha büyükçe bir çekirdek ile nisbeten küçük yine koyu boyanan ve DNA içeren çubuk şekilli kinetoplast ile ayırt edilebilmektedir(27).

b) Kültür Yöntemi

Lezyonun bulunduğu bölgeden, lezyonu kanatmadan alınan materyal N.N.N ve Schneider'in besiyeri başta olmak üzere çeşitli besiyerlerine ekim yapılarak amastigotların promastigotlara dönüşüp dönüşmediği kontrol edilir (5,14,28). Kültürler 26 derecede etüve bırakılarak, haftada 2 kez üreme yönünden kontrolleri yapılır, üçüncü hafta sonunda kültürler üreme yoksa etüvden çıkarılır. Genellikle N.N.N besiyerinde 21 gün içinde, RPMI ve Schneider'in besiyerinde 4–5 günde üreme gerçekleşmektedir(5, 14).

c) Serolojik Yöntemler

Kutanöz Leishmaniasis tanısında Floresan antikor (FA), doğrudan aglütinasyon (DA), kompleman birleşmesi ve western blot analizi gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır (1, 28).

Kutanöz Leishmaniasis'de serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar olduğundan tanıda serolojik test pek tercih

edilmemektedir. Leishmania'nın deri testi (LDL) hücre sel bağışıklığı göstermekte ve lezyon kabuklanmaya başlar başlamaz pozitif olmakta ve süresiz olarak öyle kalmaktadır. Ancak bu testler eski ve yeni enfeksiyonu ayırt edememektedir(1).

2.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri

Son yıllarda hastalığın teşhisinde kinetoplast DNA'sının yapısı, antijen incelemeleriyle türlerinin tanımlanması hedefine gidilmiştir. Birçok moleküler yöntemler ile enfeksiyon tanımı için Leishmania DNA'sını bulma ve türlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından Leishmania'ya özgü olarak belirtilen primerler ile PCR amplifikasyonu yapılarak tür tayini tespit edilmektedir. Leishmaniatürlerini tiplendirmek için kullanılan metodlar multiplex PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), single-strand konformasyon polimorfizimi, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) ve DNA dizi analizi kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu genotipik moleküler yöntemler diğer tanı yöntemlerine oranla daha güvenilir ve spesifiktir (5,29,30).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Cihazlar ve Materyaller

3.1.1. Parazit Kültürü ve Mikroskopi

Etüv 25° C

RPMI-1640

Fetal Bovine Serum (FBS)

Vida kapaklı cam tüpler

Hücre kültür flaskı

Enjektör

Lanset

Lam

Etil Alkol (%70)

Alev Bek

Serum Fizyolojik

Penisilin/ Streptomycin Solüsyonu

Mikroskop

Giemsa boya

Metil alkol

NNN Besiyeri:5 gr Agar

2gr Pepton

1gr NaCl

225 ml Distile su

30-40 ml Tavşan kanı

30 µl Penisilin solüsyonu

3.1.2. IFA Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler

PBS Hazırlama:

KH_2PO_4 (Sigma Aldrich, Lot: 10790) (MW: 136,09g/mol)

Na_2HPO_4 (Mallinckrodt Baker, Holland Lot:0404010011)

KCl (Antibioticos S.p.A-Rodano)

NaCl (Appli Chem GmbH, Germany, Lot: A4256, 1000)

Distile su

Otoklavlanmış iki adet 1000 ml cam şişe

Otoklavlanmış bir adet 2000 ml cam şişe

Manyetik karıştırıcı

Karıştırıcı manyetik balık

pH metre

Hassas terazi

Santrifüj

Falkon tüp

Pipet

Pipet ucu(100 µl)

Teflon kaplı lam

Etüv (37 °C)

FITC işaretli anti-human IgG

3.1.3. ELISA Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler

TMB hazırlama:

Sodyumhidrojenfosfat (Na_2HPO_4) anhidre

Sitrik asit ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) anhidre

Dimetilasetamid (DMA) [$\text{CH}_3\text{CON}(\text{CH}_3)_2$]

Hidrojenperoksit (H_2O_2)

Distile su

1 adet 500 ml'lik dereceli steril cam şişe

1 adet 50 ml'lik dereceli steril beher

Hassas terazi

Manyetik karıştırıcı

Hızı ayarlanabilir rotor

1 ml ölçebilen ayarlanabilir pipet

200 µl ölçebilen ayarlanabilir pipet

Pipetlere uygun pipet uçları

Tartım yaparken kullanılacak tartı kapları

PBS
SDS
96'lık NUNC pleyti
Yıkama cihazı
Okuma cihazı

3.2. Yöntem

3.2.1. Lezyon Sıvısı Örneklerinin Eldesi

Bu çalışmaya 2011-2017 yılları arasında Şanlıurfa ili Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezi ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na başvuran 1 ile 4 kür arasında 5 değerlikli antimon (Glucantime, Pentostam) aldığı halde tedaviye cevap vermeyen 60 şark çıbanı hastası (TD-KL) ile Şark çıbanı tanısı konulan ve hiç tedavi olmayan akut 40 şark çıbanı hastası (A-KL) ve aynı yaş gruplarında 40 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu dahil edilmiştir. Hastalardan lezyon sürüntü örnekleri ve kan örnekleri, kontrol grubundan sadece kan örneği alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen bazı hasta lezyonları Resim 1'de gösterilmiştir.



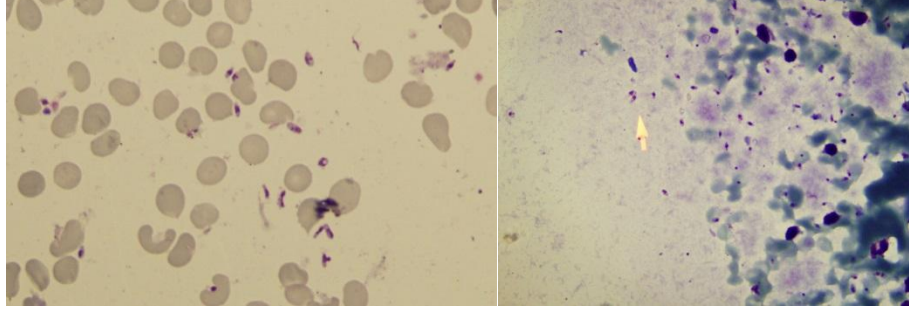
Resim3.1. Çalışmaya dahil edilen Şark çıbanı hastalarının lezyon görünümleri

Hasta ve kontrol grubundan alınan 5 ml'lik venöz kan örnekleri 5000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırılmış ve -20°C de saklanarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarına soğuk zincirle transfer edilmiştir. Aynı zamanda hastalardan yara örnekleri alınmıştır.

Deri lezyonunun sağlam dokuya yakın kısmı % 70'lik alkolle silindikten sonra, bu bölge iki parmakla sıkıştırılarak lansetle delinmiş ve gelen kansız seröz sıvı lam üzerinde yayılmış, oda ısısında kuruması beklendikten sonra üzerine metanol ilave edilerek tesbit işlemi yapılmıştır. Stok Giemsa boya solüsyonunun her bir mililitresi için 9 mililitre distile su konularak sulandırma yapılarak hazırlanan Giemsa boyası ile yaymalar 15 dk bekletilerek boyanmış ve ışık mikroskopunda (100X objektif)incelenmiştir.

Hazırlanan preparatlarda, yuvarlak veya oval şekilli, bir köşede koyu mor renkli nükleusu ve bunun hemen yanında kinetoplastı bulunan, sitoplazması soluk mavi

renkte yapılar şeklinde görülen amastigot bulunduranlar Leishmania spp. pozitif olarak kabul edilmiştir Şekil (3).



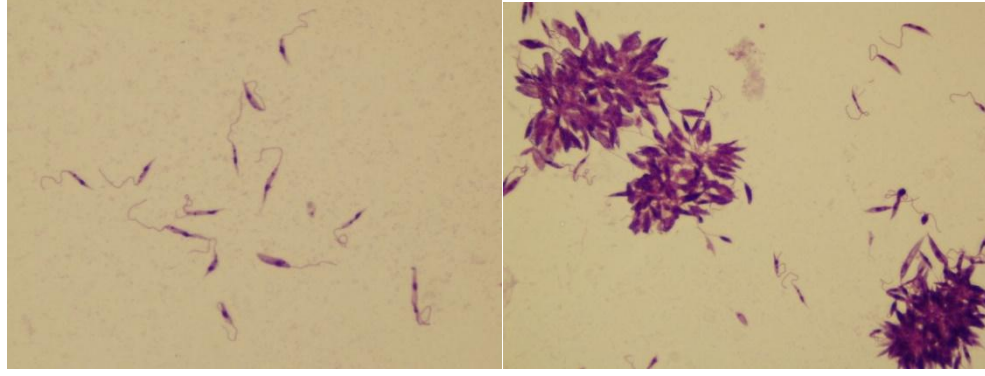
Şekil3.1. Hastalardan alınan klinik örneklerde Leishmania amastigot formları

3.2.2. N.N.N. Besiyerinin Hazırlanması

225 ml distile su ile 5 gr agar, 2 gr pepton, 1 gr NaCl karıştırıldı ve otoklavda steril edildi. Karışım steril olduktan sonra 50°C'ye kadar soğuması beklenip 30-40 ml tavşan kanı ilave edildi. Daha sonra 30 µl penisilin solusyonu eklenip karıştırıldı ve steril vida kapaklı cam tüplere dökülüp eğik şekilde donması sağlandı. Besiyerleri donduktan sonra -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.3. Kültür

Lezyon %70'lik alkolle silindikten sonra lezyonunun sağlam dokuya yakın kısmı iki parmak arasında sıkıştırılarak lansetle delindi. Gazlı bez yardımı ile insizyon üzerindeki kan damlası alınmış, bu süre içerisinde lezyon kenarına iki parmak ile yapılan basıya devam edilerek kanama önlenmiştir. Gelen kansız seröz sıvı insülin enjektörüyle alınarak NNN besiyerine ateş başında ekimi yapılmıştır. Ekim sonrası 26⁰ C ye bırakılan besiyerleri haftada iki kez üreme yönünden kontrol edilmiş ve 3 hafta sonunda üreme olmayanlar çıkarılmıştır. Mikroskobik muayenede bir ucu sivri öteki ucu daha küt olan, bazen armuda benzeyen ve ön ucunda kamçı görülen promastigotların kültürleri pozitif olarak kabul edilmiştir Şekil (4).



Şekil3.2. NNN besiyerinde üreyen Leishmania promastigot formu

NNN besiyerinde üreyen leishmanialar çoğaltma amacıyla % 10 FBS içeren RPMI 1640 içeren flasklara 3×10^5 parazit/ml olacak şekilde alınmış ve 25°C 'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters (invert) mikroskopta günlük olarak incelenmiş ve çoğaltılmış parazitler serolojik yöntemler için antijen hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.2.4. Antijen Hazırlama

Hem IFA hemde ELISA testinde kullanılan antijenler Şanlıurfa ilinde yaşayan şark çıbanı tanısı alan ama henüz tedavi almamış 4 farklı hastadan elde edilen Leishmania izolatlarından hazırlanmıştır.

a) IFA Yöntemi İçin Antijen Hazırlama

Leishmania parazitleri pH7.6 olan Phosphate Buffer Saline (PBS) solüsyonu ile 6 kez 3000 devirde 10 dakikanın üzerinde santrifüje edilerek yıkılmıştır. Sonuçta dipte kalan pelletin üzerine 200 μl PBS eklenmiştir. Hazırlanan solüsyondan teflon kaplı lam üzerindeki çukurlara 17 μl 'er halinde konularak ışık mikroskopunda x200 büyütmede her sahada 20-30 parazit olacak şekilde yayılmıştır. Parazitlerle kaplanan lamlar oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kuruyan lamlar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

b) ELISA Yöntemi için Antijen Hazırlama

Leishmania parazitleri 4 kez PBS ile 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı ve sonikasyon (ses dalgalarıyla parçalama) işlemi yapıldı. 14000 rpm'de 10 dk

santrifüj edildikten sonra SDS eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrası antijenler 96 kuyucuklu NUNC mikroplaklara her kuyucuğa 100 µl eklenerek kaplandı ve 1 gece +4°C’de bekletildi.

3.2.5. IFA

Hasta serumları, sulandırma plaklarında PBS ile 1/16, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 ve 1/1024 oranlarında sulandırılmış ve her bir sulandırmadan bir damla antijen kaplı lamlardaki yerlerine aktarılmıştır. Test sırasında pozitif ve negatif olduğu bilinen hasta serumları da kontrol serumu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Lamlar 37 °C’lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dk tutulmuş ve bu süre sonunda PBS ile 2 kez 5’er dk yıkanıp oda ısısında kurutulmuştur. FITC işaretli anti-human IgG 1:200 oranında sulandırılarak kullanılmış ve her çukura bir damla konulmuştur. Lamlar 37 °C’lik etüvde nemli kapalı kutular içinde 30 dk tutulmuş ve süre sonunda PBS ile iki kez 5’er dk yıkanmıştır. Lamlar kurumadan kapatma solusyonu damlatılmış ve lamel kapatılmıştır. Lamlar, fluoresan mikroskopunda (Olympus BHS50) X20 objektifte değerlendirilmiştir.

3.2.6. ELISA

1-Hasta serumları 96’lık mikro pleytte 1/200 oranında dilüsyon yapıldı.
2-+4°C de beklettiğimiz antijen kaplı nunc plaklarına 100 µl olacak şekilde eklendi.

3-30 dk. oda sıcaklığında inkübasyona alındı.

4- 3 kez PBS ile yıkandı.

5-her kuyucuğa 100’er µl conjugate dağıtıldı.

6-30 dk. oda sıcaklığında inkübasyona alındı.

7-3 kez PBS ile yıkandı.

8- her kuyucuğa 100 µl TMB tampon eklendi.

4.BULGULAR

Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezi ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen 60 TD-KL ile, 40 A-KL hastadan yara sıvısı ve kan örneği alınmıştır. 1 ile 4 kür arasında şark çıbanı tedavisi görüp iyileşmeyen 60 dirençli hastanın 38'i (%63,3) kadın, 22'si erkek (%36,7) olarak bulunmuştur. İlk kür tedavisini tamamlamamış tedavi altındaki 40 hastanın ise 26'sı (%65) kadın 14'ü (%35) erkek olarak bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen grupların yaş ve cinsiyet dağılımları Tablo 1'de gösterilmiştir. Dirençli ve tedavi altındaki hastaların aldıkları tedavi sayılarının yaş ve cinsiyetlerine göre dağılımı ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo4.1. Hasta gruplarının Yaş Dağılımı

Cinsiyet	TD-KL (%)	A-KL (%)	Kontrol (%)	Toplam (%)
Kadın	38 (63,3)	26 (65)	14(35)	78 (55,7)
Erkek	22 (36,7)	14 (35)	26(65)	62 (44,3)
Toplam	60 (100)	40 (100)	40(100)	140 (100)

Tablo 4.2.Hasta Gruplarının Aldıkları Kür Sayılarının Yaş ve Cinsiyetlerine Göre Dağılımı

	Cinsiyet (%)		Yaş Ortalama	Kaç kür tedavi aldığı sayı
	Kadın	Erkek		
TD-KL	63.3	36.7	17.92	60
1 kür	65	35	19.75	20
2 kür	65.4	34.6	17.12	26
3 kür	63.6	36.4	17.55	11
4 kür	33.3	66.7	14.00	3
A-KL	65	35	17.65	0

Hastaların yaşları 1 ile 59 yaş arasında olduğu, yaş ortalamalarının $15,07 \pm 1,43$ olduğu görülmüştür. Hastaların %32'si 1-9 yaş grubunda, %34'ü 10-18 yaş grubunda, %10'u 19-27 yaş grubunda, %24'ü ise 28 ve üstü yaş grubunda bulunmaktadır.

Yaş grubunu 1-18 yaş ve 19 yaş ve üzeri gruplandırarak olursak %66'sının 1-18 yaş grubunda olduğu görülmektedir.

Hastalardaki lezyon sayısı 1 ile 16 arasında değişmektedir. Ortalama lezyon sayısı $2,19 \pm 0,23$ 'tür. Lezyon çaplarına bakıldığında, %26'sının 1-9 mm, %59'unun 10-20 mm, %15'inin de 21-40 mm çapında olduğu saptanmıştır. Lezyonların %54'ü ülsere, %29'u nodüler, %10'u rezidiv, %7'si papüldür. Hasta grubunda rezidiv tipi daha fazla görülmüştür. Lezyonların yerleşim yerlerine göre dağılımları, %56'sı yüz bölgesinde, %31'i el-kol bölgesinde, %13'ü vücudun 3 ve daha fazla bölgesinde olduğu bulunmuştur. 60 TD-KL hastanın lezyon süresi 1-6 ay arasında olanların oranı %41,7; 7-12 ay olanların oranı %38,3; 13-36 ay olanların oranı %13,3; 37 ay ve üzeri olanların oranı ise %6,7 olarak bulunmuştur. A-KL grubunun 38'i (%95) 1-6 ay; 2'si (%5) 7-12 ay süreli lezyonlara sahip oldukları bulunmuştur. TD-KL hastalarının sadece 6'sında (%10) mikroskopi pozitif bulunurken, A-KL hastalarının tamamında (%100) pozitif bulunmuştur. Tablo 3' de çalışmaya dahil edilen hasta grupları için lezyon sayısı, lezyon yerleri, lezyon büyüklüğü ve lezyon süreleri ile ilgili istatistiksel çalışmalar gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Hastaların lezyon özellikleri

	TD-KL (%)	A-KL (%)
Lezyon sayısı		
1-5	93,3	92,5
6-10	5	5
11-16	1,7	2,5
Lezyon yeri		
Yüz bölgesi	68,30	37,50
El kol bölgesi	21,70	45,00
3 veya daha fazla bölge	10,00	17,50
Lezyon büyüklüğü		
1-9 arası	23,30	30,00
10-20 arası	55,00	65,00
21-40 arası	21,70	5,00
Lezyon süresi		
1-6 ay arası	41,70	95,00
7-12 ay arası	38,30	5,00
13-36 ay arası	13,30	0,00
37 ve üzeri	6,70	0,00

TD-KLve A-KL hastaları arasında lezyon tipi ve sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($P>0.005$)($x^2=7,85$; $P=0,25$). Ancak lezyon tipi ve büyüklüğü arasında ileri düzeyde anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($P<0,001$) ($x^2=40,43$; $P=0,00$) . Ülsere tipi lezyona sahip 54 hastanın 39'unun (%72,2) lezyon büyüklüğü 10-20 mm arasında bulunmuştur (Tablo 4).

Tablo4.4: Lezyon tipi ve büyüklüğü arasındaki ilişki

Lezyon tipi	Lezyon Büyüklüğü			TOPLAM
	1-9 mm (%)	10-20 mm (%)	21-40 mm (%)	
PAPÜL	6(85,7)	1(14,3)	0(0)	7
NODÜLER	14(51,7)	15(48,3)	0(0)	29
ÜLSERE	4(7,4)	39(72,2)	11(20,4)	54
REZİDİV	1(10)	5(50)	4(40)	10
TOPLAM	26(26)	59(59)	15(15)	100(100)

Elisa Sonuçları

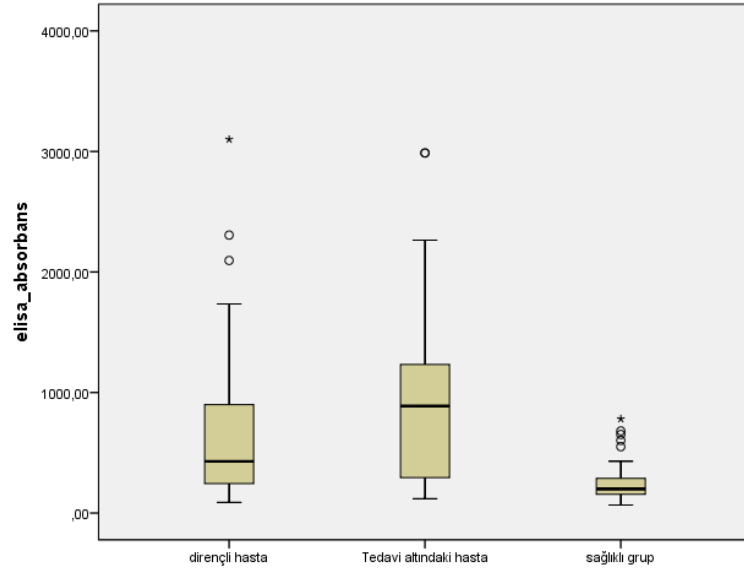
Toplam 60 TD-KL hastasının 37'si (%61,7) ile 40 A-KL hastasının 17'si (%42,5) ELISA yöntemi ile pozitif bulunmuştur. ELISA pozitif olan toplam 54 hastanın 46'sı (%82) direk mikroskopik inceleme ile de pozitif bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo4.5. Mikroskopi ve ELISA değerlerinin karşılaştırılması

ELISA	MİKROSKOBİ		TOPLAM
	POZİTİF	NEGATİF	
POZİTİF	22	32	54
NEGATİF	24	22	46
TOPLAM	46	54	100

ELISA seropozitifliği ve lezyon süresi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($x^2 =4,69$ $P=0,25$) ($P>0.005$). Ayrıca lezyon ve kür sayıları ile ELISA pozitifliği arasında da herhangi bir anlam bulunmamıştır ($P>0.005$).

ELISA absorbans değeri TD-KL hastalarında A-KL hastalarına göre düşük bulunurken kontrol grubunda en düşük olarak bulunmuştur Grafik (1). İstatiksel olarak bir anlam bulunamamıştır ($P>0.05$) ($\chi^2=7,85$; $P=0,25$).



Grafik 4.1: Hasta grupları arasındaki ELISA absorbans değeri

IFA Sonuçları

IFA yönteminde 60 TD-KL hastasının 44'ü (%73,3) pozitif; 16'sı (%26,7) ise negatif; 40 A-KL hasta grubunun 37'si (%92,5) pozitif, 3'ü (%7,5) negatif; 40 sağlıklı kontrol grubunun 3'ü (%7,5) pozitif 37'si (%92,5) ise negatif bulunmuştur Tablo(6).

Tablo4.6. IFA sonuçlarının hasta gruplarına göre dağılımı

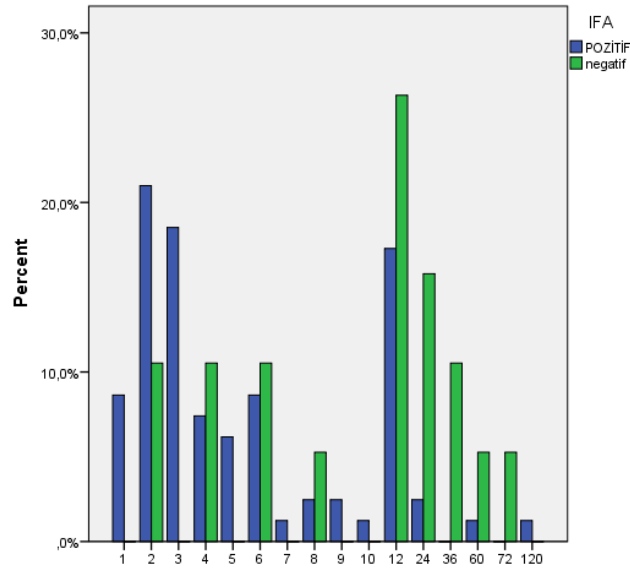
IFA	Gruplar			TOPLAM
	TD-KL (%)	A-KL (%)	Kontrol (%)	
POZİTİF	44(73,3)	37(92,5)	3(7,5)	84(60)
NEGATİF	16(26,7)	3(7,5)	37(92,5)	56(40)
TOPLAM	60(100)	40(100)	40(100)	140(100)

100 hastadan mikroskopisi negatif olan 40 hastanın 5'i IFA yönteminde pozitif çıkmıştır Tablo (7).

Tablo4.7. Mikroskopi ve IFA değerlerinin karşılaştırılması

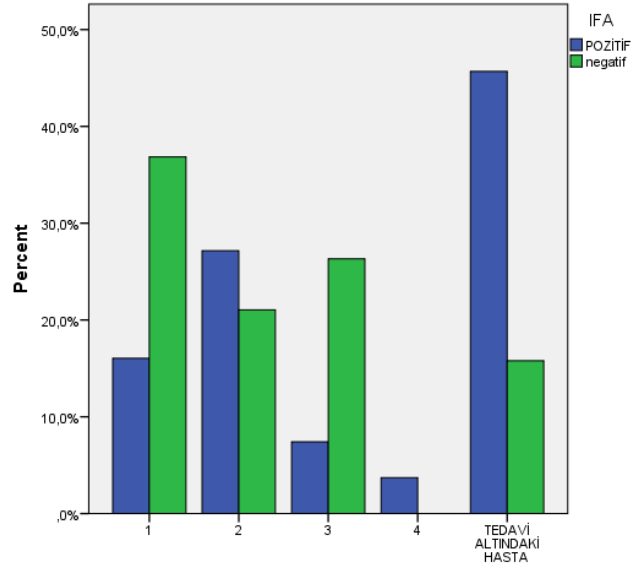
IFA	MİKROSKOBİ		TOPLAM
	POZİTİF	NEGATİF	
POZİTİF	41	40	81
NEGATİF	5	14	19
TOPLAM	46	54	100

1 ile 16 arasında değişen lezyon sayıları ile IFA arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. ($\chi^2=19,74$ $P=0,072$) ($P>0,05$). Ancak lezyon süresi ve IFA arasında ileri düzeyde anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Lezyon süresi 1 ile 6 ay arasında değişen vakalarda pozitiflik daha çok görülmüştür. ($\chi^2=16,41$, $P=0,01$) ($P<0,001$) Grafik (2).



Grafik 4.2. Lezyon süresi ve IFA pozitifliği arasındaki anlam

1 kür tedavi alan 20 dirençli hastanın 13'ü (%65), 2 kür tedavi alan 26 hastanın 22'si (%84,6), 3 kür tedavi alan 11 hastanın 6'sı (%54,5), 4 kür tedavi alan 3 hastanın da 3'ü (%100), tedavi altındaki 40 hastadan 37'si (%92,5) IFA'da pozitif bulunmuştur Grafik(3).



Grafik 4.3. KÜR sayısı ve IFA pozitifliği arasındaki anlam

Tablo4.8. Dirençli ve tedavi altındaki KL hastaları için iki serolojik yöntemin sonuçlarının değerlendirilmesi

	Sensitivite (%)	Spesifite(%)	PPV(%)	NPV(%)	Agreement(%)
ELISA	54	82,5	88,5	41,7	71,3
IFA	81	92,5	96,4	66,7	75,6

5.TARTIŞMA

Bu çalışma, tedaviye cevap vermeyen dirençli olduğu düşünülen Şark çıbanı olgularında anti-leishmania antikorlarının IFA ve ELISA yöntemleriyle araştırılması amacı ile yapılmıştır.

Vücutta antikorla oluşan koruma antijenin tanımlanması için önemli rol oynar (31). KL enfeksiyonuna karşı oluşan immün yanıt sadece enfeksiyonun aktif döneminde oluşan ve tedavi bitiminden 6-9 ay sonra kaybolan ve genellikle düşük titrede ve geçici bir antikor üretimiyle sınırlıdır (32-34). Bu nedenle KL tanısında serolojik yöntemlerin öncelikli olarak tercih edilmediği, ancak parazit yükü ve enfeksiyonun kronikliğine bağlı olarak yüksek titrede bir antikor cevabının da oluşabileceği bildirilmiştir (35).

Mikroskopi ve kültür incelemeleri negatif olan KL şüpheli 11 hastadan alınan serum örnekleriyle IFA yöntemiyle anti-leishmania antikorları araştırılmış 9'u (%82) pozitif bulunmuştur (36).

Kutanöz leishmaniasisin tanısı için kültür veya direk mikroskopi altın standarttır. Fakat kronik vakalarda direk mikroskopi basit olmasına rağmen duyarlılığı düşüktür. Kültür ise zaman alıcıdır ve kontaminasyon ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır (37-39). Bu nedenle KL tanısı için ELISA, IFA, DAT, Western Blot gibi farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur (40, 41). Fakat bu serolojik testlerle ilgili KL tanısında çok az çalışma yapılmıştır (42, 43). Bizim çalışmamızda leishmaniasis tanısı için hem IFA hemde ELISA olmak üzere 2 serolojik test çalışılmıştır. ELISA ile TD-KL hastaların 37'sinde (%61,7), A-KL hastaların 17'sinde (%42,5) pozitiflik bulunurken, IFA yöntemiyle TD-KL ve A-KL hastalarının sırasıyla 44'ünde (%73,3), 37'sinde (%92.5) pozitiflik bulunmuştur. Her iki testi karşılaştırdığımızda IFA testinin daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

KL tanısında serolojik yöntemlerin etkinliğini belirleyen daha önce yapılan çalışmalarda IFA yönteminin duyarlılığı %23 ile %95 arasında değiştiği rapor edilmiştir (44, 45). Mosleh %81, Monroy-Ostria %85,4 olarak bulmuştur (46,47).

Bu çalışmada TD-KL ve A-KL hastalarında ELISA'nın duyarlılığı %54 olarak bulunurken gene aynı bölgeden Zeyrek ve arkadaşlarının sadece A-KL hastaları üzerinde yapmış oldukları çalışmada %78,4 olarak bildirilmiştir (32).

Çalışmamızda, hastaların lezyon bölgesinin lokasyon sıklığı %56 yüzde, %31 eller ve kollarda, %13 ü vücudun 3 veya daha fazla bölgesinde bulunmuştur. Hastaların %87'sinde lezyon sayısının 1'den fazla olduğu görülmüştür. İlimizdeki bir önceki çalışmada en fazla lezyon görülen bölge %47'lik oranla yüzde, %37 eller ve kollarda, %16 ayak ve bacakta saptanmıştır. Hastaların %44'ünde lezyon sayısının 1'den fazla olduğu görülmüştür(48).

Çalışmamızda, hastaların %32'si 1-9, %34'ü 10-18 yaş grubunda olması KL'nin daha çok çocuklarda ve gençlerde görüldüğünü saptadı. Bunun sebebinin, gençler ve çocukların diğer insanlara göre sinek ısırıklarına daha çok maruz kalması olabileceği düşünüldü. İran'da ZKL'nin endemik olduğu bölgelerde yapılan çalışmalarda, en yüksek risk grubunun 15 yaş altı çocuklar olduğu saptanmıştır (49). Afganistan'da yapılan çalışmalarda, KL'in genç yaş gruplarında daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (50).

Çalışmamızda kadın hastaların sayısının erkeklerden daha fazla olduğu (%65) saptanmıştır. Bölgemizde kadınlar genellikle Mayıs – Ekim ayları arasında mevsimlik tarım işçisi olarak çalışmakta ve hijyenik olmayan koşullarda yaşamaktadırlar. Ayrıca kırsal bölgelerde geceleri açık havada yatma alışkanlıkları da kadınlarda daha fazla KL görülme oranını açıklayabiliriz.

KL hastalarında, antikör seviyeleri büyük ölçüde çok düşük olarak kabul edilir. Romero ve arkadaşları elisa yönteminde *L.mexicana* antijeni için %89, *L. braziliensis* için ise %71 duyarlılık olduğunu rapor etmişlerdir (51).

Jensen, 33 *L. major* enfeksiyonlu KL hastalarından ELISA yönteminin duyarlılığını %67 olarak bildirmiştir (52).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Direk tanı ve kültür yöntemleri KL tanısı için altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat bazı durumlarda parazitlerin varlığını göstermenin çok zor olduğu ve moleküler tanı tekniklerinin uygulanmasının mümkün olmadığı durumlarda immunodiagnosis, kliniğin tanısı için önemli bir alternatif haline gelir. KL tanısında, serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar olduğu için seroloji tercih edilmemektedir. Ancak KL'nın endemik olduğu Şanlıurfa'da tedavi aldığı halde iyileşmeyen hastaların serolojik yöntemle tanı konulup tedavi edilmeleri nedeniyle, serolojinin önemli bir alternatif olduğu ve şüpheli hastalarda mutlaka akılda tutulması gerektiği düşünülmüştür.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bu sonuçlar, ELISA'nın duyarlılığının %54 olduğunu düşünürsek IFA yönteminin KL tanısı için parazitolojik tanı yöntemleriyle birlikte kullanılabilceğini göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Özcel M. GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. İzmir Ege Üniversitesi Basımevi; 1995.s. 97-131.
2. World Health Organization. Leishmaniasis: background information. URL:http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology, 2007.
3. Gezen C. Deri Leishmaniasis'i. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi;1981.
4. World Health Organization. Control Of The Leishmaniasis Technical Report 100000Series793, Geneva 1990.
5. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. Unat'ın Tıp Parazitolojisi Beşinci Baskı. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları. No:15. İstanbul:1995.
6. Ok UZ, Balcioglu IC, Ozkan AT, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Tropica 2002;84:43-48.
7. Töre O, Kılıçturgay K. Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji, 2. Baskı: İstanbul; 1996.s. 251-267.
8. Özçelik S. Kamçılı Protozoonlar ve Yaptıkları Hastalıklar, Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: 1999.s.1191-1207.
9. Oğur R. Leishmania Enfeksiyonları. Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekimlik Bülteni 2002.
10. Uzun S. Kutanöz Leishmaniasis. URL:<http://www.lokman.cu.edu.tr/dermatology/egitimintern/leishmaniasis.htm> 2003.
11. Özcel MA. Parazit Hastalıklarında Tanı 1. Baskı. İzmir Ege Üniversitesi Basımevi 1997.
12. Mimam Ö, Gülandame S. Temel Tıbbi Parazitoloji 1. baskı 2018.s.66-77.
13. Frederic L, James J. Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates. Clinical Microbiology Reviews 2002; 15(3):374-389.
14. URL:www.saglik.gov.tr, 2007.
15. Saygı G. Temel Tıbbi Parazitoloji 1. Baskı Esnaf Ofset Matbaacılık. Sivas:1998.s.58-67.

16. Kose S, Ozensoy S, Korkmaz M, Ozbel Y. Visceral Leishmaniasis: A Rarely Diagnosed Adult Case in Turkey. *Acta Parasitologica Turcica*2005;29(1):1–2.
17. Zeyrek F, Gürses G. Is the agent of Cutaneous Leishmaniasis in Şanlıurfa changing? First cases of *Leishmania major*. *Türkiye Parazitoloji Derneği* 2014.
18. Özbel Y, Oksam L, Ozensoy S. A Survey on Canine Leishmaniasis in Western Turkey by Parasite, DNA and Antibody Detection Assay.*Acta Tropica*2000; 74:1-6.
19. Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M. A Sensitive New Microculture Method for Diagnosis of CL.*Am J Trop Med Hyg*2004;70(3):294–297.
20. *Microbiology reviews*2002;15(3):374-389.
21. Markele W, Makhoul K. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. *American Family Physician*2004; 69(6):1455–1460.
22. Marsden PD, Nonata RR. Mucocutaneous Leishmaniasis-a review of clinical aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 1975; 9: 309-26.
23. Merdivenci A. *Medikal Protozooloji, Temel Matbaası, İstanbul; 1981.s.137- 67.*
24. Pupo JA. Estudo Leishmaniose tegumentar Americans-(*L.braziliensis-viannia*,1911). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo* 1946;1:113-164.
25. Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N. Serodiagnosis and Epidemiology of Visceral Leishmaniasis in Turkey, *Am J Trop Med Hyg*1998;59:363–369.
26. Rosario EY, Genaro O, Silva J, Costa R. Evolation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Crude *Leishmania* and Recombinant Antigens as a Diagnostic Marker for Canine Visceral Leishmaniasis, *Mem Inst Oswaldo Cruz*2005; 100(2):197–203.
27. Costa S, D’Olivera A, Bacellar O, Carvalho EM. T Cell Response of Asymptomatic *L. chagasi*Infected Subjects to Recombinant *Leishmania* Antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(3):367–370.
28. Gerlind A. PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies, The Kuvim Center fort the study of Infectious and Tropical Disesaes. The HebrewUniversity 1999.
29. Özbel Y, Töz ÖS, Özcel MA. *Tıbbi Parazit Hastalıkları. 1.Baskı, İzmir: Meta Basım Matbacılık Hizmetleri 2007.s.198-230.*

30. Piarroux R, Gambarelli F, Duman H, Fontes M, Dunan S, Mary C, et al. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 746-749.
31. Aksoy N, Ozbilge H, Keles S, Iriadam M, Vural H, Akçay FA. Preliminary approach to the separation of Leishmania cell surface antigens. *J Sep Sci* 2004; p.1011-1016.
32. Zeyrek F, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropika* in Sanliurfa province, Turkey, Where ACL is Highly Endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(11):1409-1415.
33. Romero GAS, Orge MGO, Guerra MVF, Paes MG, Mac^edo VO, Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Tropica* 2005;(93):49-56.
34. Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006;(123):311-330.
35. Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Mikrobiol* 1997; 12(35):3043-3047.
36. Zeyrek F, Erdoğan D. Kutanöz Leishmaniasis Tanısında Serolojinin Yeri. *Kafkas Univ Vet Fak Dergisi* 2012; 18 (Suppl-A):A121-A124.
37. GotoandH, LindosoJAL. Currentdiagnosisand treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2010;8(4):419–433.
38. AmeenM. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and the rapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology* 2010; 35(7):699–705.
39. KarK. Serodiagnosis of leishmaniasis *Critical Reviews in Microbiology* 1995;21(2):123–152.

40. ElHarithA, KolkAHJ, Leeuwenburgetal J.Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;26(7):1321– 1325.
41. HatamGR,GhateeMA, HossiniSMH, Sarkari B. Improvement of the newly developed latex agglutination test (Katex) for diagnosis of visceral liehmaniasis.*Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2009;23(4):202–205.
42. MoslehIM, SalibaEK, Al-KhateebMS, BisharatZ, OumeishOY, BitarW.Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasisin Jordan using in direct fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Tropica*,1995;52(2):163–172.
43. JensenATR, Gaafar A, Ismail A. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme- linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996;55(5):490–495.
44. CastellanoLR,GaveTC,LiraetalMAF. Evaluationof electro-eluted anti gens in the serological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2010; 100(4):347–350.
45. RibeiroFC, SchubachADO, Mouta-Confort E, SchubachTMP, MadeiraMDF, Marzochi MCA. Use of ELISA employing *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Veterinary Parasitology* 2007; 148(3-4):200–206.
46. MoslehM, SalibaEK, Al-KhateebMS, Bisharat Z,OumeishOY, BitarW.Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasisin Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Tropica* 1995; 59(2):163–172.
47. Monroy-OstriaA,Sosa-CabreraT, Rivas-Sanchez B, Ruiz-TuyuR, Mendoza-GonzalezAR, Favila-Castillo L.Sero epidemiological studies of cutaneous leishmaniasis in the Campeche state of M´exico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1997; 92(1):21–26.

48. Gürses G. Multilocus Mikrosatellit Tiplendirme Yöntemi İle *Leishmania tropica* Tür İçi Genetik Farklılıkların Belirlenmesi. G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Gaziantep 2018; 58-59.
49. Rostami M, Saghafipour A, Vesali E. A newly emerged cutaneous leishmaniasis focus in central Iran. *International Journal of Infectious Diseases* 2013; 17(12):1198-1206.
50. Reithinger R, Mohsen M, Leslie T. Risk factors for antroponotik cutaneous leishmaniasis at the household level in Kabul, Afganistan. *Plos neglected tropical diseases* 2010; 4(3):639.
51. RomeroLI,PazHM,Ortega-Barr'iaetalE. Evaluation of serologica lassays based on a novelex creted antigen preparation for the diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Panama.*Journal of Microbiological Methods* 2004; 57(3):391-397.
52. JensenATR, Gaafar A, IsmailA. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme- linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1996; 55(5):490–495.

8. EKLER

EK.1. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Kararı

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 09.02.2017
OTURUM	: 02
SAAT	: 15:00

17/02/12	<p>Karar: Üniversitemiz Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK'in yürütlüclüsü olduğu "Tedaviye Cevap Vermeyen Sark Çıbanı Olgularında ELİZA ve İFA Yöntemlerinin Tanısal Önemi" başlıklı çalışmaya Etik Kurul onayı verilmesine,</p> <p>Oybirliğiyle karar verilmiştir.</p> <p style="text-align: right;"> ASLI GIBİDİR Yrd. Doç. Dr. Hakım ÇELİK Etik Kurul Raportörü</p>
----------	--

EK.2. Tez Çalışması Orjinallik Raporu ve Beyan Belgesi



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU VE BEYAN BELGESİ

Öğrencinin	
Numarası	:115310002
Adı, Soyadı	:Nermin ULUCA
Anabilim Dalı (Bölümü)	:TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
Tezin Adı	: “Tedaviye Cevap Vermeyen Şark Çıbanı Olgularında ELISA ve IFA Yöntemlerinin Tanısal Önemi”

SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yukarıda başlığı belirtilen “Tedaviye Cevap Vermeyen Şark Çıbanı Olgularında ELISA ve IFA Yöntemlerinin Tanısal Önemi” adlı çalışmamın; *kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç* kısımlarından oluşan toplam 48 sayfalık kısmına ilişkin, 20/05/2019 tarihinde şahsım/ danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, benzerlik oranı

%15

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kabul/Onay ve Bildirim sayfaları hariç,
- 2- Kaynakça hariç
- 3- Alıntılar hariç
- 4- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Yukarıda bilgileri verilen tezin, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından kabul edilen lisansüstü orjinallik raporu alınması uygulama esasları ile belirlenen azami benzerlik oranlarını aşmadığını ve bütün bilgilerin, akademik kurallara uygun olarak toplanıp sunulduğunu, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçları andığımı, blok şeklinde alıntılar yapmadığımı ve tüm alıntuların bilimsel atıf kuralları çerçevesinde kaynağını gösterdiğimi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ile Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesinin 8. maddesinde yer alan etik ihlallerden her hangi birisinin yer almadığını, etik ihlal tespiti halinde, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca, diplomamın iptal edilmesini kabul ediyorum.

Gereğini saygılarımla arz ederim. 20/05/2019

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Nermin ULUCA

İmzası:

Yukarıda yer alan raporun ve beyanın doğruluğunu onaylarım. 22/05/2019

Danışmanın

Prof. Dr. Fadile YILDIZ ZEYREK

İmzası:

EK.3. İntihal Raporu

15.05.2019

Turnitin

Doküman Görüntüleyici

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme konu: 15-May-2019 11:33 +03

NUMARA: 1130798407

Kelime Sayısı: 7629

Gönderildi: 1

tez Nermin Uluca tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik
%15	Internet Sources: N/A Yayınlar: N/A Öğrenci Ödevleri: %15

alintıları çıkar bibliyografyayı çıkar küçük eşleşmeleri çıkar indir yenile yazdır mod: rapor hızlı görüntüle (klasik) Change mode

2% match (08-Nis-2016 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Mersin Üniversitesi on 2016-04-08	✖
2% match (22-Mar-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Istanbul University on 2017-03-22	✖
1% match (08-Ağu-2016 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Celal Bayar Üniversitesi on 2016-08-08	✖
1% match (05-Haz-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Istanbul University on 2017-06-05	✖
<1% match (10-Mar-2018 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Harran Üniversitesi on 2018-03-10	✖
<1% match (26-Şub-2016 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia on 2016-02-26	✖
<1% match (04-May-2009 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to University of Leeds on 2009-05-04	✖
<1% match (29-Ağu-2013 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Birla Institute of Technology on 2013-08-29	✖
<1% match (16-Şub-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2017-02-16	✖
<1% match (12-Nis-2017 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Cumhuriyet University on 2017-04-12	✖
<1% match (25-May-2014 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Tikrit University on 2014-05-25	✖
<1% match (11-Oca-2016 tarihli öğrenci ödevleri) Submitted to Bishop Burton College on 2016-01-11	✖

https://www.turnitin.com/newreport_classic.asp?lang=tr&oid=1130798407&ft=1&bypass_cv=1

4/47

EK.4. Tez Veri Giriş Formu

30.09.2019

Ulusal Tez Merkezi | Tez Form Yazdır

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10299117
Yazar Adı / Soyadı	NERMİN ULUCA
T.C.Kimlik No	45898884172
Telefon	5448784445
E-Posta	nermin_uluca@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	Tedaviye Cevap Vermeyen Şark Çıbanı Olgularında ELISA Ve İFA Yöntemlerinin Tanısal Önemi
Tezin Tercümesi	Diagnostical Importance Of The Methods Of Elisa And Ifa In The Cases Of Cutaneous Leishmaniasis That Did Not Response To Leishmaniasis Treatment
Konu	Mikrobiyoloji = Microbiology
Üniversite	Harran Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	37
Tez Danışmanları	PROF. DR. FADİLE YILDIZ ZEYREK
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	

30.09.2019

İmza: 