



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KUTANÖZ LEİSHMANİASİS ŞÜPHELİ OLGULARDAN
LEİSHMANİA PARAZİTİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYA ALSHEKISSA

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

MERSİN
MAYIS-2021

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

KUTANÖZ LEİSHMANİASİS ŞÜPHELİ OLGULARDAN LEİSHMANİA PARAZİTİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

AYA ALSHEKISSA
ORCID ID: 0000-0002-3545-2483

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÖNÜL ASLAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MERSİN
MAYIS- 2021

ONAY

Aya ALSHEKISSA tarafından Prof. Dr. Gönül ASLAN danışmanlığında hazırlanan "KUTANÖZ LEİSHMANİASİS ŞÜPHELİ OLGULARDAN LEİSHMANİA PARAZİTİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 21/ 05/ 2021 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği ile Yüksek Lisans Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Gönül ASLAN	
Üye	Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER	
Üye	Prof. Dr. Gülnur TARHAN	
Üye		
Üye		

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 04/06/2021 tarih ve 22../158 Sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü



ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

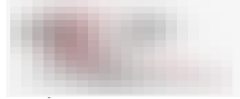
ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

24 /05/ 2021

İmza / Signature



Aya ALSHEKISSA

ÖZET

KUTANÖZ LEISHMANİASİS ŞÜPHELİ OLGULARDAN LEISHMANİA PARAZİTİNİN ARAŞTIRILMASI

Leishmania zorunlu hücre içi protozoondur. Leishmania türleri üç farklı hastalık formuna neden olabilmektedir. Bunlar, visseral leishmaniasis, kutanöz leishmaniasis ve mukozal leishmaniasistir. Kutanöz leishmaniasis hastalığın en sık görülen formudur. Bölgemizde genellikle kutanöz leishmaniasis görülmektedir. Hastalık, enfekte dişi kum sineğinin ısırmasıyla bulaşmaktadır. Kum sineğin ısırmasından bir kaç hafta ya da bir kaç ay sonra ısırma yerinde lezyon oluşmaktadır. Bu lezyon tedavi olmazsa bile iz bırakarak bir yıl içinde iyileşebilmektedir. Klinik olarak kutanöz leishmaniasis birçok hastalıkları taklit eder bu yüzden tanıyı doğrulamak için laboratuvar tanısı gerekmektedir. Laboratuvar tanısında Giemsa boyama yöntemi, NNN besiyerinde kültür ve Parazit DNA'sını araştırmak üzere PCR yöntemi kullanılmaktadır. Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran kutanöz leishmaniasis şüpheli olgularda KL tanısında laboratuvarında kullanılan üç tanı yöntemleri uygulanarak leishmania'nın paraziti araştırılması, elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırılması ve vakaları epidemiyolojik yönünden değerlendirmesi amaçlandı. Kutanöz leishmaniasis şüpheli 16 hastanın, mikroskopik inceleme yapılmak üzere lezyonlarından kazıntı alındı. Giemsa boyama yöntemi ile hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek parazitin amastigot formları araştırıldı. Yara bölgesinden aspirat alındı ve PCR yöntemi kullanarak parazitin DNA'sı araştırıldı. Elde edilen veriler incelenerek; çalışmaya katılan hastaların (8/16) %50'si erkek, (8/16) %50'si kadındır. Türk kökenli hastaların sayısı 6 (% 37,5) Suriye kökenli hastaların sayısı 10 (% 62,5) olarak bulunmuştur. Çalışmaya katılan KL şüpheli hastaların ortalama yaşı $28,31 \pm 24,73$. Minimum hasta yaşı 1 ve maksimum yaşı ise 74'tür. Mikroskopik inceleme yönteminin kullanarak pozitif vakalarının sayısı 4/16 (%25), PCR yönteminin kullanarak pozitif vakaların sayısı ise 6/16 (%37,5) olarak tespit edilmiştir. PCR yönteminde pozitif sonucuna sahip olan 6 hastanın 5'i (%83,33) Suriye ve 1'i (%16,66) Türkiye vatandaşıdır.

Anahtar Kelimeler: Kutanöz Leishmaniasis; Leishmania spp; Amastigot; Giemsa boyama; Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

Danışman: Prof. Dr. Gönül ASLAN, Mersin Üniversitesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF LEISHMANIA PARASITY IN SUSPECTED CASES OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Leishmania is an obligate intracellular protozoon that can cause three different disease forms; visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis and mucosal leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis is the most common form of the disease and it is usually seen in our region. The disease is transmitted by the bite of an infected female sand fly, after the bite a lesion occurs at the bite site few weeks or months later. Even if this lesion is not treated, it can heal within a year with leaving a scar. Clinically, cutaneous leishmaniasis imitates many diseases, hence, laboratory diagnosis is required to confirm the diagnosis. For laboratory diagnosis, Giemsa staining method, culture in NNN medium and PCR method are used to investigate Parasite DNA. In this study, it was aimed to investigate the parasite of leishmania by applying three diagnostic methods used in the laboratory, and compare the results we obtained using these methods in addition to evaluate the cases in terms of epidemiology. In the suspected cases of cutaneous leishmaniasis who visited the Dermatology Policlinic of Mersin University Medical Faculty Health Research Practice Hospital. Samples were taken by scraping the lesions of 16 patients with suspected cutaneous leishmaniasis and the slides were prepared using Giemsa staining method. The slides were examined under the microscope light and the amastigote forms of the parasite were investigated. For PCR, aspirates were taken from the wound areas and DNA of the parasite was investigated using PCR method. By analysing the obtained data; 50% (8/16) Of the patients participated in the study were men and 50% (8/16) were women. Out of the 16 patients, 6 (37.5%) were Turkish and 10(62.5%) were Syrian. The minimum age of patients participated in this study is 1 and the maximum age is 74 years, while the average age of patients with suspected CL was 28.31 ± 24.73 . The number of positive cases using the microscopic examination method is 4/16 (25%), and the number of positive cases using the PCR method is 6/16 (37.5%). Out of the 6 patients who had positive results using the PCR method 5/6 (83.33%) were Syrian and 1/6 (16.66%) was Turkish.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Leishmania spp.;Amastigotes; Giemsa staining; Polymerase Chain Reaction.

Advisor: Prof. Dr. Gönül ASLAN, Department of Medical Microbiology, University of Mersin, Mersin.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Prof. Dr. Gönül ASLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım, eleştiri ve rehberlikleriyle her zaman yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Doç. Dr. Seda TEZCAN ÜLGER'e,

Tez çalışmamda bilgi ve desteklerini esirgemeyen arkadaşım Dr. Hamide KAYA ve Uzm. Bio. Leyla ERSOY'a,

Ayrıca Tez çalışmasını 2020-1-TP2-4023 no'lu proje ile destekleyen Me Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimin'e

sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2020-1-TP2-4023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Leishmania'nın Sınıflandırması	3
2.2. Leishmania'nın Tarihçesi	5
2.3. Leishmania'nın Morfolojisi	5
2.3.1. Amastigot	5
2.3.2. Promastigot	6
2.4. Leishmania'nın Yaşam Döngüsü	7
2.5. Leishmania'nın Vektörü	8
2.6. Leishmaniasis	8
2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis	9
2.6.1.1. Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis	10
2.6.1.2. Yeni Dünya Kutanöz Leishmaniasis	10
2.6.2. Mukokutanöz leishmaniasis (MKL)	11
2.6.3. Visseral leishmaniasis (VL)	11
2.6.4. Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis	11
2.7. Leishmaniasis Epidemiyolojisi	12
2.7.1. Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi	12
2.7.2. Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisi	13
2.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi	13
2.8. Türkiye'de Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi	13
2.9. Suriye'de Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi	14
2.10. Türkiye'de Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisi	15
2.11. Leishmaniasis'te İmmünoloji	15

	Sayfa
2.12. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisi	16
2.12.1. Kutanöz Leishmaniasis Tedavi Yöntemleri	16
2.12.1.1. İntralezyon Tedavisi	16
2.12.1.2. Sistemik İlaç Tedavisi	16
2.12.1.3. Topikal Tedavisi	17
2.12.1.4. Fiziksel Tedavisi	17
2.13. Kutanöz Leishmaniasis Olgularda Klinik Tanısı	17
2.14. Kutanöz Leishmaniasis Laboratuvar Tanısı	17
2.14.1. Mikroskopik İncelemesi	17
2.14.2. Kültür Yöntemi	17
2.14.3. Serolojik Yöntemler	18
2.14.4. Moleküler Yöntemler	18
2.15.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonda Kullanılan Bileşenler	20
2.15.1.1. Deiyonize Su	20
2.15.1.2. Pcr Buffer	21
2.15.1.3. Mgcl2	21
2.15.1.4. dNTP	21
2.15.1.5. Primer	21
2.15.1.6. Taq Polimeraz	21
2.15.1.7. Hedef DNA	21
2.15.2. PCR'ın Prosedürü	22
2.15.2.1. Denatürasyon	22
2.15.2.2. Annealing	22
2.15.2.3. Uzatma / uzama	22
2.15.2.4. Son Uzama	23
2.15.2.5. Son Bekletme	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Kullanılan Gereçler	24
3.1.1. Kullanılan cihazlar	24
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	24
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	25
3.1.3.1. Elektroforez aşamada Kullanılan Solüsyonlar	25
3.2. Örneklerin Toplanması	26
3.3. Örneklerin Alınması	26
3.3.1. Smear örneklerinin alınması	26

	Sayfa
3.3.2. Aspirasyon sıvısı alınması	26
3.4. Yöntemler	27
3.4.1. Mikroskop İncelenmesi	27
3.4.2. Kültür Yöntemi	27
3.4.2.1. NNN. Besiyerinin Hazırlanması	27
3.4.2.2. N.N.N Besiyerine Ekim	28
3.4.3. Moleküler Tanı	28
3.4.3.1. DNA Ekstraksiyonu	28
3.4.3.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.4.3.1.2. Ekstraksiyon Aşamaları	29
3.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması	30
3.4.3.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi	32
3.4.3.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	32
4. BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41
EK 1 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (ERİŞKİN SAĞLIKLI/HASTA GÖNÜLLÜLER İÇİN)	46
EK 2 BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (PEDİATRİK SAĞLIKLI/HASTA GÖNÜLLÜLER İÇİN)	49
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Leishmania sınıflandırması	3
Tablo2. 2. Farklı leishmaniasis hastalık formlarına neden olduğunu leishmania'nın türü	9
Tablo 2. 3. Leishmaniasis'in farklı klinik formlarına neden olan leishmania türleri ve dünyada dağılımı	12
Tablo 2. 4. Kutanöz Leishmaniasis laboratuvar tanısında uygulanan metodlar arasındaki karşılaştırma	19
Tablo 3. 5. çalışmada kullanılan primerler	30
Tablo 3. 6. Reaksiyon Karışımı	31
Tablo 3. 7. çalışmada uygulanan PCR koşulları	31
Tablo 4. 8. çalışmaya katılan hastaların bilgileri ve elde edilen sonuçları.	33
Tablo 4. 9. mikrosobik incelemede ve PCR yöntemi kullanarak bulunan sonuçlarının karşılaştırılması.	34

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. Leishmania parazitlerinin sınıflandırılması	4
Şekil 2. 2. Leishmania forumları	6
Şekil 2. 3. Leishmania'nın amastigotları mikroskopik görünümü	7
Şekil 2. 4. Leishmania'nın promastigotları mikroskopik görünümü	7
Şekil 2. 5. Leishmania'nın yaşam döngüsü	8
Şekil 2. 6. Dünyada KL epidemiyolojisi	13
Şekil 2. 7. 2010 yılında Suriye'de KL epidemiyolojisi	14
Şekil 2. 8. 2018 yılında Suriye'de KL epidemiyolojisi	15
Şekil 2.9. PCR aşamaları	20
Şekil 3.10. Çalışmaya dahil edilen bazı KL şüpheli lezyonlar	27
Şekil 3.11. N.N.N besiyeri	28
Şekil 4.12. Mikroskopik incelemede amastigotların görünümü	34
Şekil 4.13. PCR sonuçları	35

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simg	Tanım
KL	Kutanöz leishmaniasis
VL	Visseral leishmaniasis
MKL	Mukokutanöz leishmaniasis
WHO	Dünya Sağlık Örgütüsü (World Health Organization)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle (besiyeri)
Th	T helper
IL	İnterlökin
IFN- γ	İnterferon gama
BAB	Beş Değerli Antimon Bileşikleri
TNF	Tümör nekroz faktörü
ELİSA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
kDNA	kinetoplastid mini-daire DNA
SMLE	Splice lider mini-ekson
HSP70	Heat-shock protein 70 geni
RFLP	Restriksiyon fragment length polimorfizm
dNTP	Dört deoksiribonükleosit trifosfat
gr	Gram
μ l	Mikrolitre
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
rpm	Revolutions per minute
UV	Ultraviyole
PK	Pozitif kontrol
NK	Negatif kontrol

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen vektör kaynaklı bir hastalıktır [1]. Leishmaniasis hastalığına neden olan *Leishmania* parazitidir. *Leishmania*, Trypanosomatidae ailesinin Mastigophora alt şubesinde yer alan kan ve dokuya yerleşen bir protozondur [2]. *Leishmania*, kum sineğindeki promastigot morfolojisi ve memeli konakçıdaki amastigot morfolojisi ile örneklenen iki ana farklı hücre morfolojisine sahiptir [3]. *Leishmania* enfeksiyonu, enfekte bir kum sineği vektörünün ısırmasıyla insanlara ve diğer memelilere bulaşmaktadır [1]. Leishmaniasis klinik olarak üç farklı hastalıkla ortaya çıkabilir. Bu hastalıklar; kutanöz leishmaniasis (KL), visseral leishmaniasis (VL), mukokutanöz leishmaniasistir (MKL). Leishmaniasis, birlikte Dünya Sağlık Örgütü / Tropikal Hastalık Araştırmaları en önemli hastalıklar listesindeki altı hastalık grubundan birini oluşturan tropikal hastalıklar içinde kabul edilmiştir. Hastalık beş kıtada 88 ülkede endemiktir ve toplam 350 milyon kişi risk altındadır ve yılda 12 milyon vaka bildirilmektedir. 88 endemik ülkeden 22'si Yeni Dünya ve 66'sı Eski Dünya'dadır, tahmini yıllık vaka sayısı yaklaşık 1,5 milyon KL iken 500.000 kişi VL vakasıdır. KL vakalarının % 90'ından fazlası İran, Afganistan, Suriye, Suudi Arabistan, Brezilya ve Peru'da meydana gelmektedir, 500.000 yeni VL vakasının %90'ından fazlası Hindistan, Nepal, Bangladeş, Güney Sudan ve kuzeydoğu Brezilya'dan bildirilmektedir [2].

Türkiye'de ise, KL olguları VL'e göre daha çok rastlanmaktadır. KL yüzyıllardır bilinen bir hastalık olmakta olup; Halep çıbanı, Antep çıbanı, Urfa çıbanı, şark çıbanı, yıl yarası gibi farklı adlarla tanınmaktadır. Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Akdeniz bölgesinin Çukurova yöresi KL ile endemiktir. Son yıllarda Suriyeli mültecilerinin akımına uğrayan Türkiye, KL vakasına artış gözlemlendi, 2013 yılında Türkiye'de 2268 Türk ve 2000'den fazla Suriyeli KL vakası rapor edilmiştir [4].

Enfekte dişi kum sineğinin ısırma yerinde KL lezyonu ortaya çıkar, vücudun kıyafetle örtülmeyen alanlarda; boyun, yüz, ekstremiteler gibi eritmeli bir papül şeklinde başlar. Haftalar veya aylar içinde yavaşça büyüyen papül plağa veya nodüle dönüşür, plağın ortasında sıkça yapışkan kabuk ile kaplanan ülser görülmektedir. Bu kabuğu kaldırıncaya kabuğun alt tarafında çıkıntılar görülür, bu çıkıntılara Hulusi Behçet tarafından tanımlandığı için "Hulusi Behçet çivi belirtisi" adı verilir [4]. Bu lezyonlar genelde ağrısızdır ama sekonder enfeksiyon olduğu takdirde ağırlı hale gelmektedir. Klinik özellikleri ve etken olan *Leishmania*'nin türüne göre KL; kuru tipi ve yaş tipi olmak üzere iki farklı tipe ayrılır. Kuru tipi; kırsal olmayan bölgelerde görülür, inkübasyon süresi genellikle 2 ila 8 ay arasındadır. Lezyonlar kuru ve yavaş seyirlidir. Bir yıl sonra skar bırakarak iyileşir. *L. tropica* kuru tip leishmaniasisine neden olmaktadır. Yaş tipi ise; kırsal alanlarda görülmekte olup daha hızlı seyir gösterir ve 2 ila 8 ay sonra iyileşir. Etkeni *L. major*'dür [4].

KL ön tanısı klinik olarak konabilir fakat bulguları pek çok hastalığı taklit eder. Klinik olarak KL ayırıcı tanısında bakteriyel deri enfeksiyonları, malign ülserler, deri tüberkülozları, enfekte böcek ısırığı, mikotik enfeksiyonlar, granülomlar, tropikal ülser, sarkoidoz, şarbon, travmatik ülserler, psödolenfoma ve sporotrikoz gibi çok sayıda hastalık yer alır [5]. Bu yüzden KL'den şüphelenilen durumlarda laboratuvar tanı yöntemleri kullanarak kesin tanı konulabilmektedir. Laburatuvar da KL tanısında kullanılan yöntemler; direkt mikroskopik inceleme, kültür yöntemleri, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemlerdir. Direkt mikroskopik incelemede basit ve maliyeti düşük olmasına rağmen deneyimli personel tarafından yapılması gerekmektedir. Parazitin sayısının az olduğu durumlarda düşük duyarlılık göstermektedir. Kültür yöntemi; yavaş, pahalı ve düşük duyarlılığına sahip bir yöntem olduğu için rutinde nadir kullanılmaktadır. Serolojik yöntemleri özgüllüğünün düşük olması nedeniyle tercih edilmemektedir [6].

Son zamanlarda KL tanısında moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Parazit canlı ya da cansız, titresi düşük olsa bile yüksek duyarlılığa sahiptir. Diğer yandan ise; çeşitli moleküler yöntemleri kullanarak hastalığına neden olan parazitin türü tayini edilebilmektedir [6]. Leishmania'nın tür tespiti tedavi açısından önemlidir. *L. major*'un neden olduğunu lezyonlar daha hızlı seyir gösterirken *L. tropica* lezyonları daha yavaştır; fakat bu türlerin etken olduğu hastalıklar tedavisiz kendiliğinden iyileşebilir. Diğer yandan *L. braziliensis* ve *L. mexicana*'ın neden olduğu KL olgularında daha uzun sürer ve daha ciddi hastalığa neden olur. Bu yüzden hastalara mutlaka ilaç tedavisi başlanmalıdır [4,5,7].

Leishmania kontrolü için hastalık dağılımı, özellikleri ve KL etkeni olan leishmania'nın türü oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı KL şüpheli hastalarda farklı laboratuvar tanı yöntemleri kullanarak leishmania paraziti varlığı araştırılması ve pozitif çıkan vakaların epidemiyolojik yönünden değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

Leishmaniasis, vektör kaynaklı bir hastalıktır. Leishmania'nın kamçılı protozoon leishmaniasis hastalığına neden olmaktadır. Hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygındır. Leishmania üç ana klinik hastalık formuna neden olabilmektedir. Bu klinik formlar; kutanöz leishmaniasis, visseral leishmaniasis ve mukokutanöz leishmaniasistir [8]. Antartika dışında tüm dünyada yayılım gösteren leishmaniasis, her yıl 0,9 ila 1,7 milyon insanın yeni bulaştığı düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre; dünyada 98 ülkede 12 milyon insan leishmaniasis ile enfektedir. 350 milyon insan bulaşma riski altındadır. Her yıl 2 milyon insanın yeni enfekte olduğunu düşünülmektedir [2].

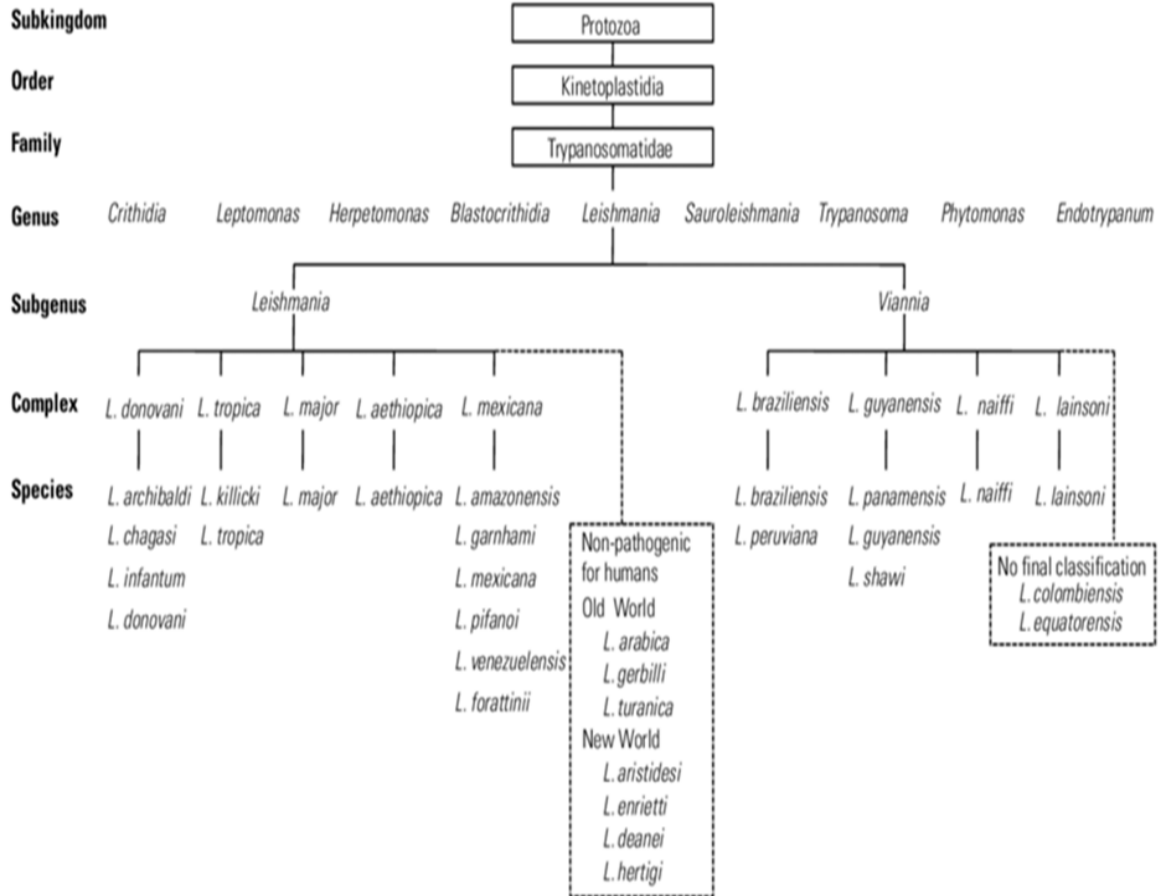
2.1 Leishmania'nın Sınıflandırması

Leishmania, Trypanosomatidae ailesinin Mastigophora alt şubesinde yer alan kan ve dokuya yerleşen bir protozoondur.

Tablo 2.1 : Leishmania sınıflandırması [9, 10]

Alem	Protista	Haeckel, 1866
Class	Kinetoplastea	Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976
Subclass	Metakinetoplastina	Vickerman, 2004
Order	Trypanosomatida	Kent, 1880
Family (Aile)	Trypanosomatidae	Döfle, 1901
Subfamily	Leishmaniinae	Maslov and Lukeš 2012
Genus (Cins)	Leishmania	Ross, 1903
Subgenus	Leishmania	
Tanımlanmış türler	<i>L. archibaldi</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. killicki</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. garnhami</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. venezuelensis</i> , <i>L. forattinii</i>	
İnsanlar için patojen olmayanlar:		
Eski dünyada yaygın olanlar:	<i>L. arabica</i> , <i>L. gerbilli</i> ,	

Yeni dünyada yaygın olanlar:	<i>L. turanica</i> <i>L. aristidesi, L. enrietti, L. deanei, L. hertigi</i>	
Alt türler	Viannia	
Türler	<i>L. braziliensis, L. peruviana, L. panamensis, L. guyanensis, L. shawi, L. naiffi L. lainsoni</i>	
Sınıflandıralamayanlar	<i>L. colombiensis L. equatorensis</i>	



Şekil2.1. Leishmania parazitlerinin sınıflandırılması [9]

2.2. Leishmania'nın Tarihçesi

Leishmaniasis çok eski bir hastalık olduğunu düşünülmektedir. M.Ö. 2500 yıllarına ait antiklerde hastalığın tanımlandığı ilkel yazılar bulunmuştur [10]. M.S. birinci yüzyıla ait Ekvador ve Peru'da bulunan çanak çömleklerde çizilmiş resimlerdeki yüzlerde kutanöz ve mukokutanöz leishmaniasise benzer lezyonların varlığı dikkat çekmiştir. 16. ve 17. yüzyıllardan kalan arkeolojik yazıtlara göre İspanya'da tarım ile çalışan işçilerin yüzlerinde lezyonlar bulunmuş, bu lezyonların lepraya benzemesi sebebiyle "beyaz lepra" veya "vadi hastalığı" olarak adlandırmışlardır [11]. Afrika ve Hindistan'da, 18. yüzyılın ortalarında yayınlanan raporlar, günümüzde visseral leishmaniasis olarak bilinen hastalığı "kala-azar" veya "siyah humması" olarak tanımlanmaktadır. 1756'da Alexander Russell, bir Türk hastasını muayene ettikten sonra Leishmaniasis'in keşfedilmesinde önemli bir ilerleme kaydetmiştir. Russell'in yazdıklarına göre, hastada bulunan lezyon iyileştikten sonra, yaşamı boyunca süren çirkin bir iz bıraktığı ve aylarca koyu mor bir renge sahip olduğu belirtilmiştir [11]. Bu hastalık Leishmaniasis olarak kabul edilmiştir. 1901 yılında Hindistan'ın "Dum Dum" şehrinde, William Leishman tarafından ateş, anemi, kas atrofisi ve dalak büyümesi bulgularıyla gelen İngiliz askerinin dalağında oval cisimleri keşfetmiştir. Leishman bu hastalığı "dum dum ateşi" olarak adlandırmıştır ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Charles Donovan, bu semptomları diğer kala-azar hastalarında da tanımıştır ve Leishman'dan birkaç hafta sonra keşiflerini yayınlamıştır. Bu oval cisimleri Leishman-Donovan cisimleri olarak tanımlanmıştır. Bu tür *L. donovani* olarak bilinmektedir. Bu protozoon kala-azar ile ilişkilendirilerek, Leishman ve Donovan, Leishmania cinsini keşfetmişlerdir [11]. Türkiye'de ise, ilk kez leishmaniasisin varlığı Kristamonas tarafından saptanmış. 1918 yılında İzmir'de ilk leishmaniasis vakası Dr. Hofer Kaller tarafından bildirilmiştir [12,13]. 1916'de Hulusi Behçet tarafından "stub sign" tanımlanmış ve leishmaniasisin tanısında önemli olduğunu göstermiştir. Kala azar tanımlı vakalar İbrahim Osman ve Dr. Akil Muhtar Özden tarafından 1931 ve 1936 yayınlamıştır. 1950'li yıllardan önce Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi endemiktir, 1950'den sonra hastalık azalma eğilimi göstermiştir. Azalmanın nedeni, sıtma savunmasında insektisitlerin kullanılmasıdır. Ancak sıtma kontrolü yetersizliğinden dolayı 1960'dan sonra vaka sayısı artış göstermiştir. 1988-1999 yıllar arasında Türkiye'de bildirilmiş Leishmaniasis vaka sayısı 27.960'dır [14,15,16,17,18].

2.3. Leishmania'nın Morfolojisi

Leishmania parazitinin iki şekle sahip olduğunu bilinmektedir. Kum sineği bağırsağında kamçı form promastigotdur ve memelilerde kamçısız bulunan formu amastigot formudur [19]. Bir amastigot veya promastigot morfolojisine sahip hücreler, belirgin şekilde farklılık göstermesine rağmen aynı temel hücre düzenini, çekirdeğe önden kinetoplast ve bazal gövdeden uzanan bir flagellum ile korurlar [3].

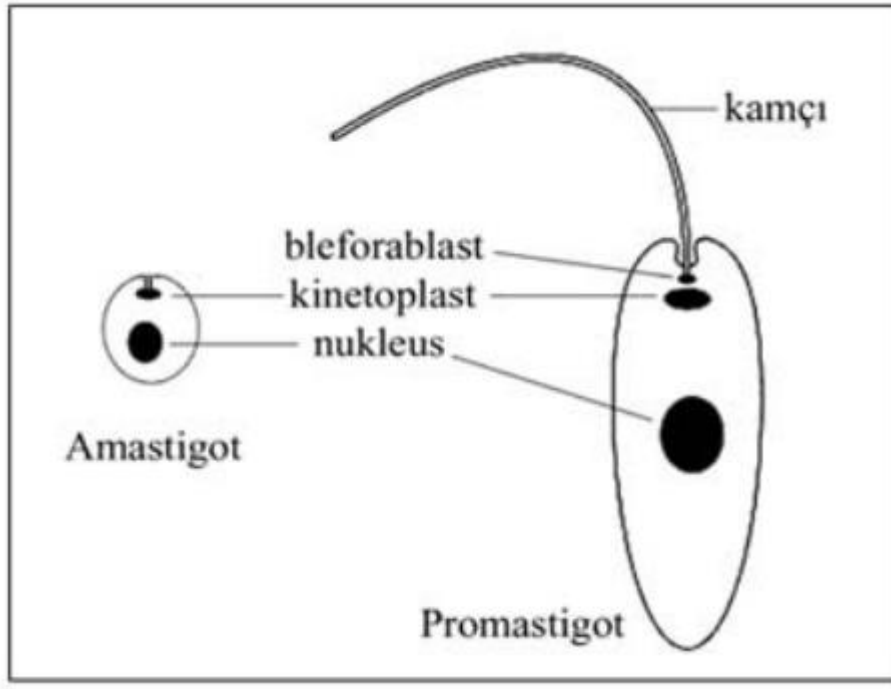
2.3.1. Amastigot

Amastigotlar omurgalı konakta bulunan hareketsiz formudur. Leishmania amastigotları makrofajlar içinde yaşar ve ikiye bölünerek çoğalır. Bunlar yaklaşık 2 ile 3 µm eninde ve 2-5 µm boyunda yuvarlak veya oval şeklindedir. Makrofajların içinde çoğalan amastigotlar, makrofajların patlamasına neden olmaktadır. Serbest halinde kalan amastigotlar yeni makrofajlara girerek onlara enfekte etmektedirler. Amastigotun sitoplazmasında büyük bir nukleus ve kinetoplast bulunur [3,20]. Çubuğa benzeyen kinetoplast, 0,4-0,8 µm arasında boyutundadır, mitokondrial bir yapıya sahiptir. İçerisinde mRNA'nın kodlamada rol oynayan

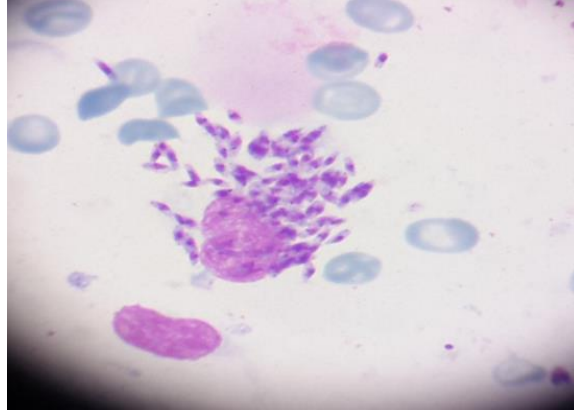
mini DNA halkaları ve mitokondrial ribozomal RNA'yı kodlanan büyük DNA halkaları bulunmaktadır. Amastigotlar Giemza boyamada sitoplazması açık mavi renkte olup, çekirdeği koyu renkte ve onun yanında parlak kırmızı veya mor renkte kinetoplast görülmektedir. Kinetoplastta parabazal cisim görülür ve onun yanında nokta şeklinde kamçı kökünden çıkan aksonom vardır [21].

2.3.2.Promastigot

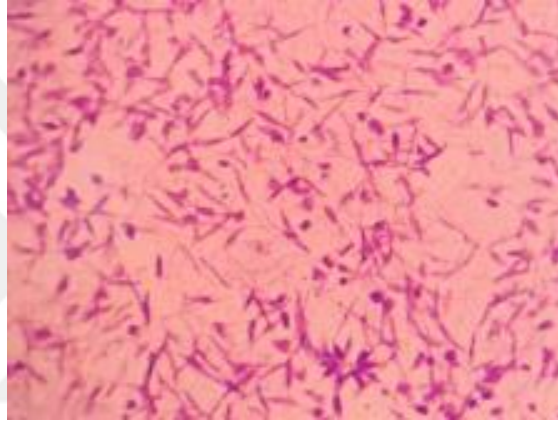
Promastigot formu in vitro kültür ortamında ve vektörün bağırsağında bulunur. Promastigot büyük, uzun 15 ila 20 μm uzunluğunda ve 0,5 ila 3,5 μm genişliğindedir. Promastigotun ön uçtan 20 μm 'ye ulaşabilen serbest ve oldukça hareketli kamçı çıkmaktadır. Kamçının kökünde bulunan bir aksonem dokuz çift periferik ve bir çift merkez fibrilden oluşmaktadır. Nukleus, nukleolus merkezde bulunur ve nukleus membranında porlar vardır. Kinetoplast, ön uçta olup yuvarlak veya at nalı şeklindedir. Blefaroblast ise, kinetoplastın ön ve kamçının dip kısmında bulunur. Ayrıca sitoplazma içinde endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı bulunmaktadır. Giemsa boyamada veya diğer Romanowsky boyalarında, büyük bir çekirdek ve daha küçük, farklı çubuk benzeri kinetoplastlar gözlenebilir [20,21].



Şekil 2.2. Leishmania formları [22]



Şekil 2.3. leishmania'nın amastigotları mikroskopik görünümü

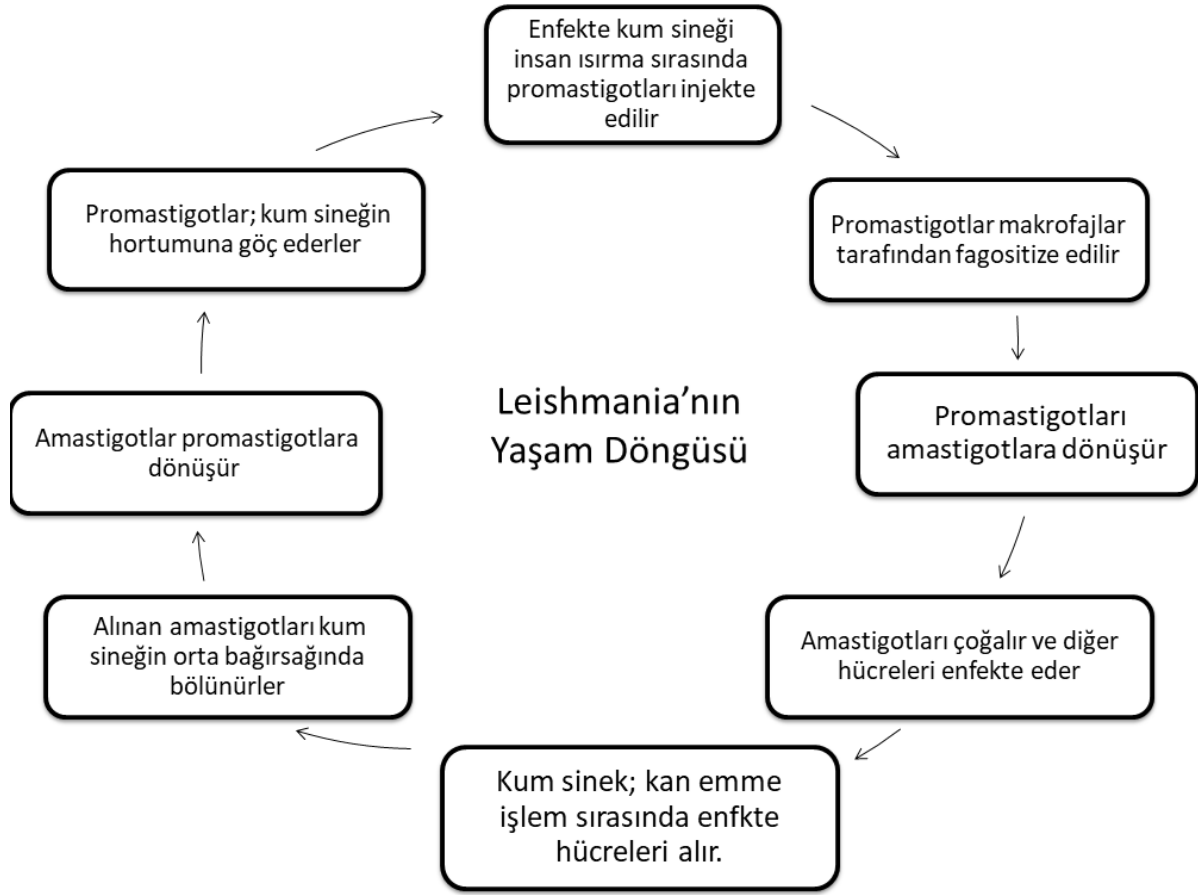


Şekil 2.4. leishmania'nın promastigotları mikroskopik görünümü

2.4. Leishmania'nın Yaşam Döngüsü

Leishmaniasis, enfekte dişi kum sineğin ısırmasıyla bulaşmaktadır. Kum sinekleri memelilerden kan emme işlem sırasında enfektif aşamasını (yani promastigotları) hortumlarından enjekte eder. Delinme yarasına ulaşan promastigotlar bir kısmı konak tarafından öldürülüp, kalan kısmı ise, makrofajlar ve diğer mononükleer fagositik hücreler tarafından fagositize edilir. Promastigotlar, 12-24 saat içinde bu hücrelerde parazitin memelerde bulunan formuna dönüşür (yani amastigotlar). Amastigotlar ikiye bölünerek çoğalırlar ve hücreyi patlatarak serbest kalırlar. Serbest halde bulunan amastigotlar diğer mononükleer fagositik hücrelere bulaşmaya devam ederler. Enfekte makrofajlar konağın dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi organlara kan yoluyla geçebilir. Ancak bu hareket konağın bağışıklık sistemine ve parazitin türüne bağlıdır. Örnek olarak; *L. tropica* enfeksiyonunun deride sınırlı olduğunu belirlenirken *L. infantum* iç organlara göç edebilmektedir. Parazit, konak ve diğer faktörler enfeksiyonun semptomatik hale gelip gelmediğini ve deri veya visseral leishmaniasis sonuçlanıp sonuçlanmadığını etkiler. Kum sinekleri, mikroorganizmayı alan memelilerden kan emme işlemi sırasında enfekte hücrelerin alınması ile enfekte olurlar. Kum sineklerinde kan ile alınan amastigotların, bir kısmı sindirilir, diğer kısmı ise kum sineğin orta bağırsağında bölünerek bir kaç farklı morfolojik forma uğrayarak 5-7 gün içinde enfektif

metasiklik promastigotlara dönüşür ve hortumlara göç eder. Enfekte kum sinek yeni konak ısırma sırasında promastigotları duyarlı konağa enjekte eder. Bu döngü 4 ila 25 gün arasında sürmektedir [2,23].



Şekil 2.5. Leishmania'nın yaşam döngüsü

2.5. Leishmania'nın Vektörü

Leishmaniasis, enfekte dişi kum sineklerinin (2-3mm) ısırmasıyla bulaşmaktadır. Beş cinse ayrılan 600'den fazla kum sineği türü vardır. Eski Dünya'da Flebotomus ve Sergentomyia ve Yeni Dünya'da Lutzomyia, Brumptomyia ve Warileya türleri mevcuttur. İnsan ısırması kum sinekleri çeşitli cinsleri ile ortaya çıksa da insan leishmaniasisin kanıtlanmış tek vektörleri, Phlebotomus ve Lutzomyia cinsinin türleri ve alt türleridir. Phlebotomus cinsindeki çeşitli türler, Eski Dünya'daki leishmaniasis ve Yeni Dünyadaki Lutzomyia türlerinin bulaşmasından sorumludur. Her kum sineği türü tipik olarak sadece bir parazit türü iletir ve her parazit belirli bir hastalığa yol açar [1,2].

2.6. Leishmaniasis

Leishmaniasis, leishmania paraziti ile enfekte olma nedeniyle gelişen bir hastalıktır. Leishmaniasis tüm dünyada yayılım gösteren bir hastalık olmakta birlikte hem epidemiyolojik hem klinik olarak önemli bir halk sağlığı problemdir. Leishmania parazitleri yaşam döngüsü sürdürmek için omurgalı ve omurgasız konaklara ihtiyacı vardır. İnsan, kedi, köpek, sırtlan,

kobay, kemirgen gibi omurgalı canlılarda leishmanianın amastigot formu bulunurken, omurgasız konaklarda kum sinekte ve in vitro kültürde parzitin promastigot formu bulunmaktadır. Leishmanianın farklı türleri kendiliğinden sertleşen deri lezyonlarından yaşamı tehdit edici visseral hastalığa kadar şiddetli derecelerde farklı klinik tablolara neden olmaktadır. Hastalığın klinik formu parazit özellikleri, vektör biyolojisi, konakçı faktörler ve parazit konakçı arasında immün yanıtlara bağlıdır. Klinik olarak leishmaniasis üç farklı formda ortaya çıkmaktadır.

1. Visseral leişmanyoz (VL, Kala azar)
2. Kutanöz leişmanyoz (KL) deri leishmaniasis, kutanöz leishmaniasis, güzellik çıbanı, şark çıbanı, Halep çıbanı,
3. Mukokutanöz leişmanyoz (MKL) [24,25].

Tablo2.2. Farklı leishmaniasis hastalık formlarına neden olduğunu leishmania'nın türü [26]

Hastalık klinik formu	Leishmania türü
Visseral leishmaniasis	<i>L. donovani</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. infantum</i>
Kutanöz leishmaniasis	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. b. panamensis</i>
Mukokutanöz Leishmaniasis	<i>L. b. brasiliensis</i> <i>L. mexicana</i>

2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis

Hastalığın en basit ve en çok rastlanan şeklidir. Antep çıbanı, şark çıbanı, Delphi çıbanı, Halep çıbanı, güzellik çıbanı, Yıl çıbanı gibi farklı isimler ile bilinmektedir. Hastalık dişi kum sineğinin ısırmasıyla bulaşmaktadır. Genelde bu lezyonlar vücudun kıyafetle örtülmeyen bölgelerde görülmektedir. Yüz, boyun, üst ve alt ekstremiteler, sineğin ısırıldığı bölgede eritemli bir papül görülmesiyle hastalık başlamaktadır. Papül yavaşça büyür ve kırılır, iyi ayrılmış bir

kenara sahiptir. Ağrısız bir ülser oluşur ve 0,5 ila 10 cm çapında olabilmektedir. Papülün üzerinde sıkça yapışkan bir kabukla kapatarak nodüle ve plaka dönüşmektedir. Bu kabuğu kaldırıncı kabuğun alt tarafta çıkıntılar görülmektedir. Görülen çıkıntılara Hulusi Behçet'in "çivi belirtisi" adı verilmiştir. Bu lezyonlar sekonder bakteriyel enfeksiyon gelişmediği durumlarda ağrısızdır. Sinek ısırma yerinde aynı özelliklere sahip olan multi lezyonlar ortaya çıkabilir. Hastalık iz bırakarak iyileşmektedir. Bu skar iyileşen hastalarda ömür boyunca kalmaktadır. Bu skar hastalığının ana sorunudur [4,27].

2.6.1.1. Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis

Eski Dünya'nın kutanöz leishmaniasisi Orta Doğu, Akdeniz bölgesinde, Arap Yarımadası, Afrika, Yakın Asya, Hindistan Yarımadası ve diğer alanlarda yaygındır. Eski Dünya'da, kutanöz leishmaniasis *L. major* (zoonotik kutanöz leishmaniasis), *L. tropica* (antroponotik kutanöz leishmaniasis), *L. aethiopica* ve bazı *L. infantum* zimodemlerinden kaynaklanmaktadır. *Leishmania tropica* enfeksiyonu, kentlerde yaşayan insanlarda görülür. Kuru tip KL olarak adlandırılır. İnkübasyon süresi uzundur ve genellikle 2-8 aydır. *L. tropica* ile enfektif kum sineğinin ısırma yerinde küçük, kırmızı ağrısız bir papül şeklinde başlar. Papülün dibinde kanlama görünür. Papüller çoğunlukla yaşaşa büyüyerek çevresine yayılır, nodül veya tüberkül şekline geçer. Bazı ülserler çıplak halde kalırlar ve sekonder enfeksiyonlara tutunabilirler. Lezyonların boyutları genellikle 1 cm çapında bazen daha büyük veya küçük olabilirler. Genellikle lezyonlar bir yıl içinde iz bırakarak iyileşirler [4,5,27]. *L. major* enfeksiyonu; daha fazla kırsal bölgelerde görülmektedir. Yaş tip KL olarak bilinir. Kuluçka süresi genellikle 1-4 haftadır ve nadiren 2 ayı geçmektedir. Isırma yerinde papül ortaya çıkar, enfeksiyon akut seyirlidir ve hızlıca papüllün 1-3 hafta içinde kenarı iltihaplı bir ülserle dönüşülür. Genelde lezyonlar 3 ay ila 2 yıl arasında değişen bir süre sonunda iyileşmektedir [4,27].

2.6.1.2.Yeni Dünya Kutanöz Leishmaniasis

Leishmania mexicana, *Leishmania braziliensis*, *Leishmani amazoensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis* ve *Leishmania peruviana* Latin Amerika'da rastlanan Yeni Dünya KL'ye neden olmaktadır [28,29]. *Leishmania mexicana* ile oluşan lezyonlar ağrısızdır ve birkaç ay içinde iyileşmektedir. Vakaların %60'ı kulakta yerleşmektedir ve genelde tek bir lezyondur. Kulak kepçesinde bulunan lezyonlar olarak "Chiclero's Ulcer" adlandırılır ve kulak kepçesinin kıkırdığındaki damarlar az olduğundan gösterdiği bağışık yanıt zayıf oluğu için lezyonlar kronik seyir gösterir. Bazı olgularda kulak kepçesinin kaybına neden olabilmektedir [14]. *Leishmania braziliensis* enfeksiyonu ise "Espundia" olarak adlandırılmıştır. Hastalık burun ve ağız mukozasında bulunduğu takdirde yumuşak dokularda ve kıkırdaklarda harabiyeti yol açarak şekilsel değişmelerde neden olabilmektedir [30]. *Leishmania amazonensis* neden olduğunu hastalıklar insandan daha çok orman kemirgenlerde görülür. Lezyonlar tek veya birden fazla olabilir ve kendiliğinden iyileşmesi nadirdir [28]. *Leishmania panamensis*'in rezervuarı maymunlar ve köpeklerdir ve neden olduğunu ülserli lezyonlar kendiliğinden iyileşmemektedir. *Leishmania venezuelensis* neden oluğunu lezyonlar genelde tektir ve nodül lezyon şeklindedir [14]. *Leishmania guyanensis* enfeksiyonu; tüm vücutta ülserli plaklar şeklinde yayılım gösterir. Bu lezyonlarda sekonder mantar enfeksiyonları olabilir [28]. *Leishmania peruviana* enfeksiyonunda 4-5 ay içerisinde kendiliğinden iyileşen tek veya birden çok lezyona rastlanmaktadır. "Uta" olarak bilinmektedir [14,30].

2.6.2. Mukokutanöz leishmaniasis (MKL)

Nazal septum, burun, ağız, farinks, larinks, dudaklar ve damağın oronazal mukozayı tutan destrüktif lezyonlar olarak ortaya çıkar. MKL vakalarının %90 daha önce bir KL yara izi gösterir, *L. braziliensis* ile enfekte hastaların %5'inden azı ve *L. panamensis* ve *L. guyanensis* ile enfekte olanların küçük bir yüzdesi, kutanöz hastalık iyileştikten aylar ila yıllar sonra mukozal tutulum geliştirebilir. Hastalık genellikle kroniktir ve ilerleyici olup yıkıcı, şekli bozan ve kapsamlı sakatlığa yol açar. İkincil enfeksiyon ve solunum yolu istilası hastanın ölümüne yol açabilir. Sıklıkla bağışıklığı baskılanmış kişilerde görülür ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir hastalık olması acil tanı ve tedavi gerektirir [31,32].

2.6.3. Visseral leishmaniasis (VL)

VL'nin etkeni Hidistan ve Afrika'da *L. donovani*, Akdeniz bölgesinde *L. infantum* ve yeni dünyada *L. chagasi*'dir. Bazı durumlarda hastalık asemptomatiktir. Hastalığın semptomları ortaya çıkması parazit virölansı, insan genetik yatkınlığı, beslenme durumu ve diğer faktörlere bağlıdır. Hastalığın en ciddi formu Kala-azar olarak adlandırılmaktadır. Kuluçka süresi genellikle iki ila altı aydır; ancak birkaç hafta ile birkaç yıl arasında değişebilmektedir. Hastalık genellikle sinsi veya subakut bir şekilde başlanmaktadır. Ateş, kilo kaybı ve splenomegali gelişmektedir. Nadir durumlarda, hızla ilerleyen semptomlarla akut ateşli hastalık ortaya çıkabilmektedir. Hastaların karınlarında sol üst tarafta lokalize olabilen abdominal rahatsızlık ve dolgunluktan şikayet edebilirler. Dalak genellikle sert ve minimal derecede hassas, ancak bazı hastalarda palpasyon, muhtemelen hızlı genişlemeden kaynaklanan kapsüler basınç nedeniyle oldukça acı vericidir. Hepatomegali genellikle splenomegaliden daha az görülmektedir [33].

2.6.4. Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis

L. donovani'nin nedensel parazit olduğu bölgelerle sınırlıdır. Sudan ve Hindistan'da görülmekte olup, VL komplikasyonudur. VL'den iyileşmiş ve genel durumu iyi olan bir hastada maküler, makülopapüler ve nodüler döküntü ile karakterizedir. Döküntü genellikle ağzın etrafında başlar, sonra vücudun diğer bölgelerine yayılma gösteririr [34,35].

Tablo 2.3. Leishmaniasis'in farklı klinik formlarına neden olan leishmania türleri ve dünyada dağılımı [36]

Altıncı	L. (leishmania)	L. (Leishmania)	L. (Viannia)	L. (Viannia)
Eski dünya	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Yeni dünya	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Hastalık formu	Visseral leishmaniasis	Kutanöz leishmaniasis	Kutanöz leishmaniasis	Mukokutanöz leishmaniasis

2.7. Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Leishmaniasis ekolojisi ve epidemiyolojisi konakçı, rezervuar, vektör (insan, hayvan ve tatarcık) ve çevreden etkilenmektedir. Leishmaniasisin ortaya çıkması ve yayılması için önemli etkenler arasında sıcaklık ve su depolamadaki değişiklikler, sulama alışkanlıkları, ormansızlaşma, iklim değişiklikleri, HIV enfeksiyonu veya organ nakli sonrası immunsupresif tedavi ile bağışıklık baskılanması, ilaç direncinin gelişimi, endemik bölgelere seyahat artışı ve köpek ithalatı gibi çevresel faktörler yer almaktadır. Savaş, zayıf sosyo-ekonomik durum ve düşük seviyeli halkı da bu hastalığın yayılmasında en önemli etkenlerdir [37].

2.7.1. Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi

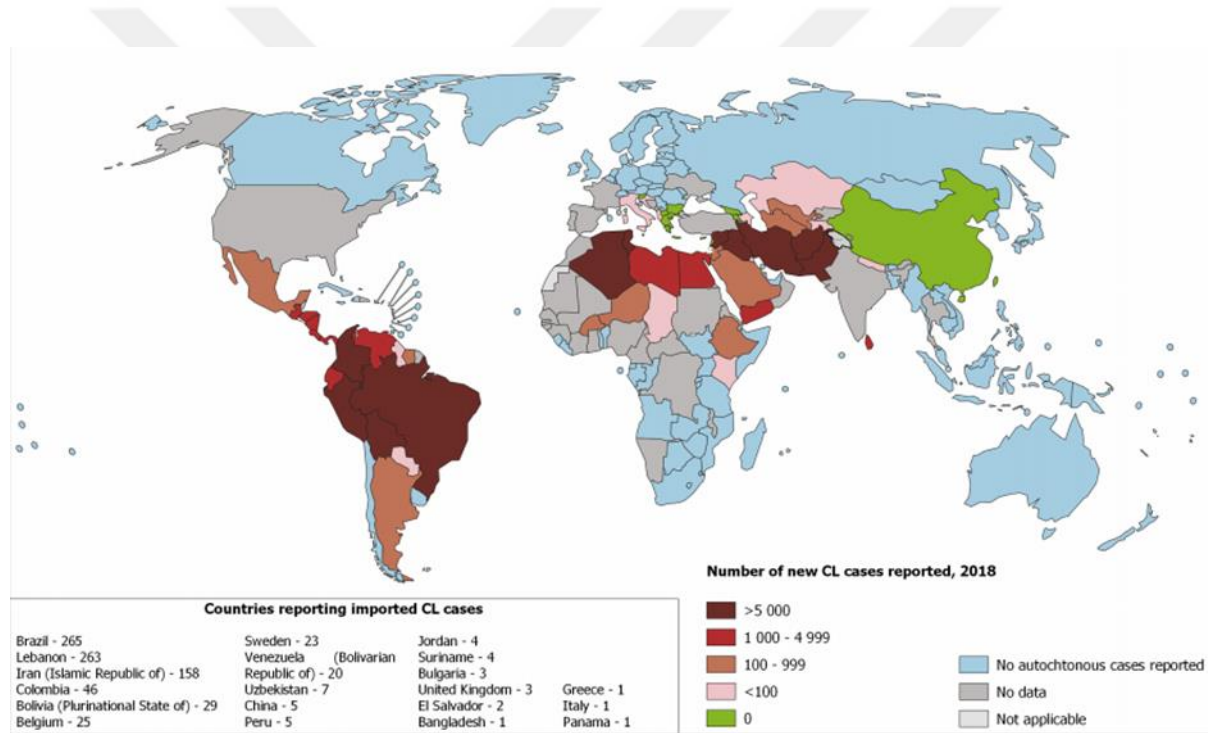
Dünya Sağlık Örgütü'nün raporlarına göre, KL vakalarının yaklaşık % 95'i Amerika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu ve Orta Asya'da meydana gelmektedir. 2017 yılında yeni KL vakasının %95'inden fazlası Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran (İslam Cumhuriyeti), Irak ve Suriye Arap Cumhuriyeti'nde rapor edilmiştir. Dünyada her yıl 600.000 ile 1 milyon arasında yeni vaka meydana geldiği tahmin edilmektedir [38].

2.7.2. Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Vakaların çoğu Brezilya, Doğu Afrika ve Güney Doğu Asya'da ortaya çıkmaktadır. Dünyada her yıl tahminen 50.000 ila 90.000 yeni VL vakası tanımlanmaktadır; bunun sadece % 25-45'i WHO'ya bildirilmektedir. 2017'de, WHO'ya bildirilen yeni vakaların %95'inden fazlası şu 10 ülkede meydana gelmiştir: Bangladeş, Brezilya, Çin, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Nepal, Somali, Güney Sudan ve Sudan [38]. Ancak hastalık 60'tan fazla ülkede endemik olmaya devam etmektedir. Hindistan alt kıtası, dünyadaki antroponotik iç organ leishmaniasis vakalarının neredeyse %70'ini oluşturmaktadır ve en yüksek insidansa sahip olan Hindistan'ı Nepal ve Bangladeş izlemektedir.

2.7.3. Mukokutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Vakalarının % 90'ından fazlası Bolivya'da, Brezilya, Etiyopya ve Peru'da görülmektedir [38].



Şekil 2.6. Dünyada KL epidemiyolojisi [38]

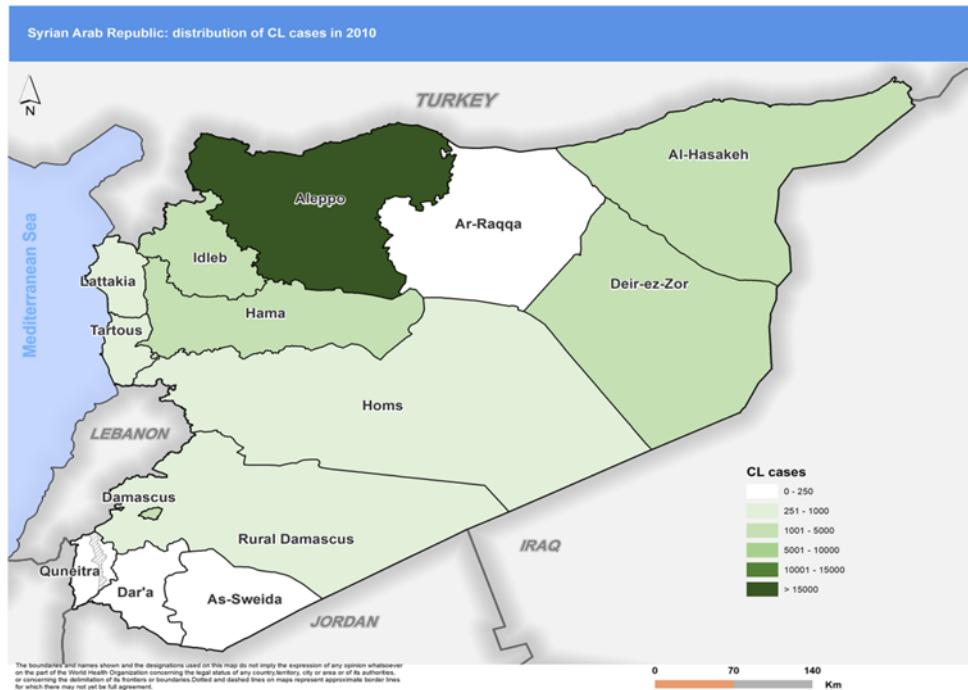
2.8. Türkiye'de Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Subtropikal bir iklim bölgesinde, Avrupa, Afrika ve Asya arasında bulunan Türkiye için, KL önemli bir halk sağlığı sorunu olmuştur ve Türkiye'de bildirilen en önemli vektör kaynaklı hastalıklardandır. Türkiye'nin KL ile endemik bölgeleri; Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgesidir. İç Anadolu ve Ege Bölgelerinden KL vakaları varlığı rapor edilmiştir [39]. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı raporlarına göre, on yıllık (1990-2010) dönemde 46.000 leishmaniasis vakası bildirilmiştir. Neredeyse her yıl yeni 2000 vaka bildirilmektedir ve bunların % 90'ı Türkiye'nin güneydoğu kesiminde görülmektedir. Türkiye'de KL'nin ana nedeni

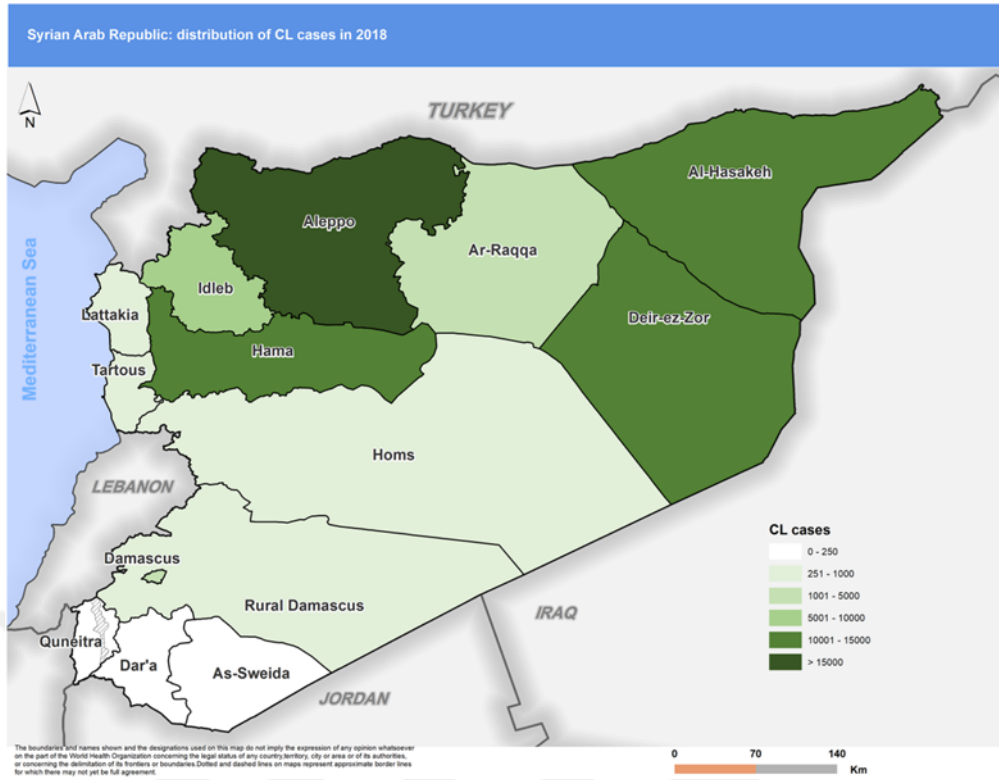
L. tropica'dır ve o *Phlebotomus sergenti* tarafından aktarılmaktadır. Türkiye'de KL'nin bulaşmasında ikinci önemli ajan *L. infantum* ve kanıtlanmış vektör türleri *P. tobbi*'dir [40]. Ancak son yıllarda, *L. major* ve *L. donovani*'nin neden olduğu bazı KL vakaları, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden de rapor edilmiştir [41]. İran, Irak ve Suriye KL ile endemik üç ülkedir. Bu ülkeler ile sınırlar sahip olan Türkiye KL riskiyle karşı karşıya kalmıştır. Suriye'deki savaş nedeniyle yaklaşık 6,2 milyon Suriyeli ülke içinde yerlerinden edilmiştir. 5,4 milyondan fazla Suriyeli gibi komşu ülkelere sığınmıştır. Mülteciler KL dahil bir çok bulaşıcı hastaları gittiği ülkelere taşıma riskini ortaya çıkarmıştır. Türkiye birçok ülke arasında en fazla sayıda Suriyeli'ye ev sahipliği yapmıştır. 29 Mart 2018 itibarıyla toplam 3.567.130 Suriyeli mültecilerin akınına uğrayan Türkiye hem KL vakalarında artış görülmüştür. Ayrıca KL ile endemik olmayan bölgelerde KL vakaları görülmeye başlamıştır. 2013 yılında Türkiye'de 2,268 Türk ve 2000'den fazla Suriyeli KL vakası rapor edilmiştir [4].

2.9. Suriye'de Kutanöz Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Leishmaniasis 1745'ten beri Suriye'de bilinmekte olan bir hastalıktır. Halep çibanı olarak adlandırılmaktadır. Halep ve Şam ana KL endemik iller olarak rapor edilmektedir. 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Raporuna göre Suriye KL ile en çok etkilenen ülkelerden biridir ve yılda 25.000'den fazla vakası bildirilmiştir [42]. 2011 yılından itibaren savaş yaşayan Suriye, sağlık hizmetleri olumsuz etkilendiğinden KL vakalarının artmasını gözlenmiştir ve hastalık salgın bir haline gelmiştir. Suriye'deki Sağlık Bakanlığı rutin sürveyans sistemi, sendromik Erken Uyarı ve Yanıt Sistemi ve uluslararası sivil toplum örgütü tarafından elde edilen verilere göre 2015 yılında vaka sayısı zirveye doğru kademli olarak artmış, 2016'da azalma göstermiş, 2017'de sabit kalmış ve 2018'de tekrar artmıştır. Savaş nedeniyle hem vaka sayılarında arttı olmuş hem de edemik olmayan şehirlerde KL vakası rastlanmaya başlanmıştır [43].



Şekil 2.7. 2010 yılında Suriye'de KL epidemiyolojisi [43]



Şekil 2.8. 2018 yılında Suriye’de KL epidemiyolojisi [43]

2.10. Türkiye’de Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisi

Türkiye'nin Ege ve Akdeniz Bölgelerinde görülmektedir. 2005-2014 yıllar arasında 207 visseral leishmaniasis olgusu rapor edilmiştir. Türkiye’de ana etken ajan diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi *L. infantum* MON-1’dir. Asya ve Afrika endemik ülkelerinde VL’nin bir başka nedensel ajanı olan *L. donovani*, Türkiye’de 2014 yılına kadar VL’nin nedensel ajanı olarak belgelenmemiştir. Ancak *L. donovani* ilk olarak Türkiye’nin güneydoğu ve doğu Akdeniz bölgelerinde yaşayan 19 Türk VL hastasından izole edilmiştir [44].

2.11. Leishmaniasis’te İmmün Yanıtı

KL ile enfekte bir kum sineği bir memeliden kan emme işlem sırasında, Leishmania’nın promastigotları cilde enjekte edilmektedir. Daha sonra promastigotlar, makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler gibi fagositik hücreler tarafından fagositozlanır. Promastigotlar, karmaşık savunma mekanizmaları nedeniyle makrofajlarda (son konakçı hücreler) hayatta kalabilir ve amastigot formlarına dönüşebilmektedir. Leishmaniasise karşı bağışıklık konusunda birçok karmaşıklık vardır. Leishmaniasis direncinin T helper 1 (Th1) gelişimi ve pro-enflamatuar sitokinlerin (örn. İnterlökin (IL) -12, IL-1, interferon gama (IFN- γ) , tümör nekroz faktörü (TNF a ve / veya IL-2) üretimi ile ilgili olduğu belgelenmiştir. Makrofajların aktivasyonu ve parazit öldürmeye yol açmaktadır. Tersine, enfeksiyona duyarlılık, T-helper 2 (Th2) gelişimi ve IL-4, IL-5 ve / veya IL-13 gibi Th 2 sitokinlerinin üretimi ve üretimi ile parazitin replikasyonuna ve kalıcı durumuna gelmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte, KL’nin immüno proteksiyonunda ve immüno patolojisinde immün yanıtların rolü hakkında birkaç paradoks devam etmektedir. Örneğin, Th1 cevabı ve pro-enflamatuar sitokinlerin üretimi, KL’ye karşı immüno-koruma için

çok önemli rollere sahip olmasına rağmen, aşırı üretimi, birlikte hastalıkta ciddi immünopatolojiye yol açabilir. Aksine, Th2 gelişimi, enfeksiyon bölgesinde parazit kalıcılığı ile ilişkilidir, ancak düşük seviyelerde anti-enflamatuar sitokinlerin üretimi, enflamatuar reaksiyonları hafifletecek ve yara iyileşme sürecini hızlandıracaktır. Ayrıca, enflamatuar sitokinlerin üretilmesiyle Th17 hücreleri (örneğin, IL-22, IL-17 ve / veya IFN- γ) ve diğer düzenleyici sitokinlerin (örneğin IL-10 ve / veya (TGF) - β) *Leishmania* spp ve aynı zamanda konağın genetik geçmişine bağlı olarak hastalığın ilerlemesine veya iyileşmesine katkıda bulunmaktadır [45].

2.12. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisi

KL hayatı tehdit eden ve ciddi sağlık problemlerine neden olan bir hastalık değildir. KL genellikle skar bırakarak kendiliğinden iyileşebilen bir hastalıktır. Ancak iyileşme süresi hastalığa neden olan parazitin türüne göre değişir. Örneğin *L. major*'un neden olduğu KL olgularında 2-4 ay içinde iyileşme olurken, *L. tropica*'nın neden oluşunu KL olgularda iyileşme süresi daha uzundur ve 6-15 aya kadar uzayabilir. *L. braziliensis* ve *L. mexicana*'nın neden olduğu KL olgularında hastalık daha uzun sürer ve daha ciddi semptomlara neden olur. KL tedavi amaçları, yaraların iyileşmesi hızlandırmak, relaps veya yayılma riskini önlemek, skar oluşum riskini azaltmak ya da önlemektir. Tüm hastalarda kabuk oluşumunu önlemek için ve iyileşmeyi hızlandırmak için lezyonlar su ve sabun ile yıkanmalıdır, steril gazlı bez ile kapatılmalıdır. Bakteriyel süperenfeksiyon oluşan durumlarda, KL ilacına ek olarak antibakteriyel ve antifungal tedavi uygulanmalıdır.

KL tedavisinde Beş Değerli Antimon Bileşikleri (BAB) altın standart olarak kabul edilmektedir. Sodyum stiboglukonat (Pentostam®) ve meglumin antimonat (Glucantim) KL tedavisinde kullanılan (BAB)'lerdendir. İkinci ilaç seçeneği Lipozomal Amfoterisin B'dir BAB'a dirençli olgularda kullanılmaktadır. Yeni dünya KL ve mukokutanöz leishmaniasis tedavisinde Pentamidin kullanılmaktadır. Miltefosine *L. major* KL olgularda BAB'a benzer bir etki göstermektedir.

KL'de tedavi intralezyon, topikal, sistemik ve fiziksel gibi çeşitli şekillerde uygulanabilir. Hastanın klinik belirtilere ve parazitin türüne göre uygun tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Lezyonun çapı 1 cm'den az olursa veya lezyon baş boyun bölgesinde değilse tedavi uygulanamayabilmektedir [4,5,7].

2.12.1. Kutanöz Leishmaniasis Tedavi Yöntemleri

2.12.1.1. İntralezyon Tedavisi

Eski Dünya KL ile endemik bölgelerde lezyonlar, küçük, az sayıda,(burun, kulak, dudak, göz kirpikleri, eklemde) bulunan durumlarda kullanılır. Lezyonun kenarından içine iğne girilir ve yüksek konsantrasyon BAB verilir, lezyon beyazlayana kadar ilaç verilir [4,5,7].

2.12.1.2. Sistemik İlaç Tedavisi

Kronik, büyük veya çok sayıda lezyonlu olan, intralezyon ilacı kullanarak iyileşmeyen, burun, kulak, göz kirpiği, eklem üzerinde fonksiyon bozulacak yerlerde bulunan veya immün yetmezlikli hastalarda sistemik ilaç kullanımı tercih edilir [4,5,7].

2.12.1.3. Topikal Tedavi

Paromomisin merhem *L. major* ile oluşan KL lezyonlarda etki gösterebilir. İlaç 10-30 gün kullanılmalıdır [4].

2.12.1.4. Fiziksel Tedavi

Kriyoterapi, lezyon ve lezyon etrafında 1-2 mm normal deriye 10-25 saniye süren çift donma-erime döngü uygulanması esasına dayanmaktadır. *L. major* ve *L. tropica* etkenleri ile gelişen KL olgularında intralezyon tedavi ile kombine olarak başarılı tedavi edilebilmektedir. Kriyoterapinin yan etkileri bül oluşumu, ödem, eritem, kalıcı pigment değişiklikleri ve sikatris oluşumudur. Kontrollü ısı uygulanması kriyoterapiye alternatif olarak kullanılabilir. Lezyon ve etrafındaki normal deriye 1-2 mm 50°C'de uygulanır. Bu yöntem *Leishmania*'nın amastigotlarının 39°C'de ölmesi esasına dayanmaktadır [5].

2.13. Kutanöz Leishmaniasis Olgularında Klinik Tanı

Endemik bölgede yaşayan ya da endemik bölgeye özellikle yaz aylarında seyahat eden kişilerde nodül, ülser, nodül, plak, ülser, plak, eritematöz papül, giysiyle örtülmeyen vücut bölgesinde kronik seyirli bir lezyon orataya çıkması gibi klinik durumlarda tanı testleri uygulanmalıdır. Bu lezyonlar ikinci enfeksiyon olmadığı durumda ağsız olması, ailenin başka kişilerde benzer lezyon olması, KL tanısı düşündürmektedir. Fakat klinik olarak KL pek çok hastalığı taklit eder. Klinik olarak KL ayırıcı tanısında bakteriyel deri enfeksiyonları, malign ülserler, mikotik enfeksiyonlar, deri tüberkülozları, travmatik ülserler, enfekte böcek ısırığı, granülomlar, miyazis, tropikal ülser, sarkoidoz, şarbon, psödolenfoma ve sporotrikoz gibi çok sayıda hastalık yer alır [5].

2.14. Kutanöz Leishmaniasis Laboratuvar Tanısı

Klinik olarak KL şüpheli vakaların tanısı doğrulamak amacıyla mikroskopik inceleme, kültür, PCR gibi testlerle laboratuvar tanısı yapılmalıdır.

2.14.1. Mikroskopik İnceleme

Hastanın en yeni, sekonder enfekte olmayan lezyonunun kenarındaki ve sağlam deri sınırında bulunan bölgeden smear (yayma) alınır, Giemza boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda immersiyon yağı ile 100'lük büyütmede inceleyerek, plazma membranı ile çevrili büyük koyu renkli nukleus ve nukleusun yanında küçük koyu renkli çubuk şeklinde kinetoplast ihtiva eden oval, serbest halde ya da makrofajların içinde bulunan *leishmania* amastigotları varlığı araştırılır. Amastigotların araştırılmasında doğrudan mikroskopi düşük bir duyarlılığa (% 50-70) sahiptir [5,46].

2.14.2. Kültür Yöntemi

Hastanın lezyonundan alınan materyalin Nicolle-Novy-MacNeal (NNN) veya modifiye NNN besiyerlerine ekimi yapılarak amastigotların promastigotlara dönüşü araştırılır. Ekim yapıldıktan sonra üreme bir hafta içerisinde gerçekleşir. Ancak pozitif olgularda bile üreme oranı %70 tir. Bakteri veya fungus ile kontamine lezyonundan alınan örneklerde üreme gerçekleşmez. Kronik vakaların yanı sıra cilt dokusunda parazit yükü düşük olanların da tanısız duyarlılığın azalmasına neden olduğu bilinmektedir [4].

2.14.3. Serolojik Yöntemler

Kutanöz leishmaniasis tanısında serolojik tanı yöntemlerinden floresan antikor, enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA), western blot, lateral akış testi ve doğrudan aglütinasyon testi gibidir. Bununla birlikte, enfeksiyonun neden olduğu zayıf humoral yanıt ve sonuç olarak düşük duyarlılık nedeniyle bu formatlar KL tanısı için yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ayrıca, şu anda mevcut serolojik testlerin çoğu, spesifik olmayan reaksiyonlarda sonuç veren bir toplam parazit lizati veya tam promastigota dayalı bir ön hazırlık niteliğindedir. Son gelişmeler, serolojik tanı için spesifik saflaştırılmış antijen preparatlarının veya rekombinant *Leishmania* antijenlerinin dahil edilmesinin bu testlerin operasyonel özelliklerini artıracığını göstermektedir. Bu, VL'nin serolojik tanısı için rK39 antijeninin başarısından dolayıdır.

Isı şoku proteinleri (HSP'ler) ve özellikle HSP83 potansiyel adaylar olarak ortaya çıkmıştır. Rekombinant HSP83'e dayalı bir ELISA, duyarlılık ve özgüllük açısından ELISA bazlı bir ham *L. major* antijenine kıyasla, MKL ve VL'nin yanında KL'nin tanısında iyi performans göstermiştir. Ayrıca, insan serumundaki anti- α -galaktozil antikorlarının seviyelerini ölçmek için kimyasal ışıldayan bir ELISA kullanılarak, *L. tropica* veya *L. major* ile enfekte olan bireylerin anti- α -Gal IgG düzeyleri sağlıklı kontrol bireyleri ile karşılaştırılarak önemli ölçüde yüksek (9 kata kadar daha yüksek) olduğu bulunmuştur.

Ek olarak, deney, mikroskopi analizinden daha yüksek hassasiyete sahiptir. İlginç bir şekilde, doğrulanmış KL tedavisinin ardından 2 yıla kadar, bireyler sağlıklı gönüllülere kıyasla 28 kat daha yüksek anti- α -Gal IgG seviyelerine sahiptir. Anti- α -Gal antikorlarının seviyelerinin izlenmesi hem bir tanı aracı hem de Eski Dünya KL'nin bir tedavisinin biyobelirteci olarak önerilmektedir [47,48].

2.14.4. Moleküler Yöntemler

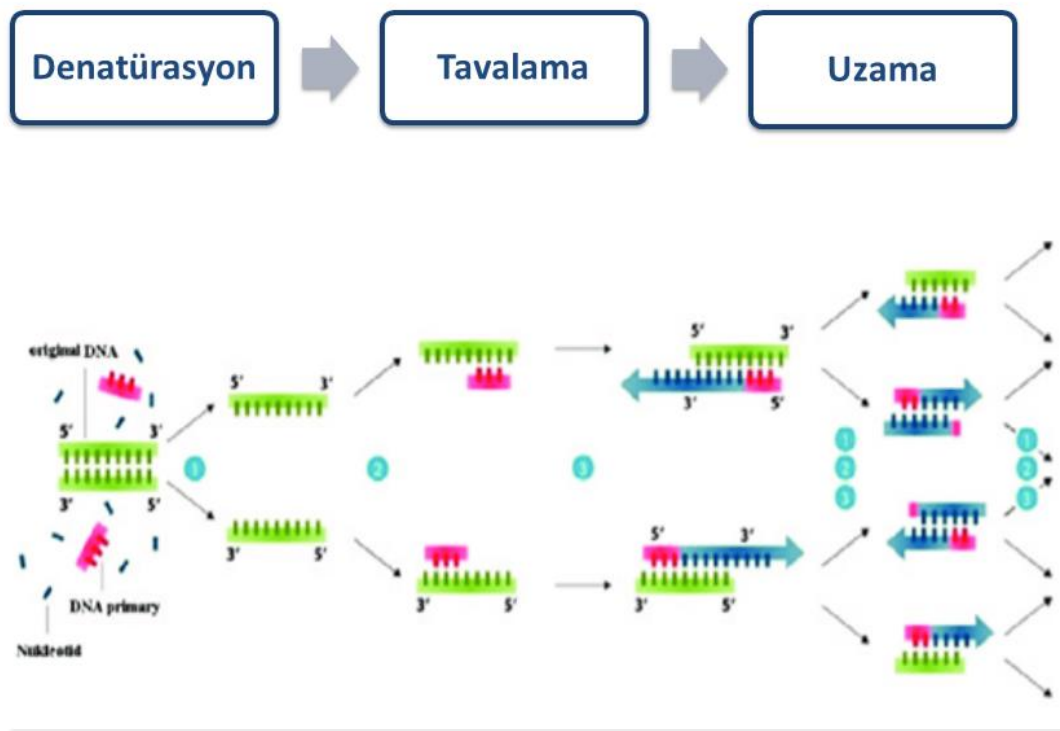
Son yıllarda çeşitli moleküler yöntemler KL tanısında kullanılmaya başlanmıştır, moleküler yöntemler hem leishmania paraziti saptanmak için uygulanır hem de tür tanımlanması için hedeflenmektedir. Moleküler yöntemlerde *Leishmania* türleri için birkaç farklı genomik hedef kullanılmaktadır. rDNA (ITS-1 ve SSU rDNA), kinetoplastid mini-daire DNA (kDNA), splice lider mini-ekson (SMLE), triparedoksin peroksidaz geni ve heat-shock protein 70 geni (HSP70) gibi bölgelerin tespiti hedeflenmektedir. *Leishmania* türlerini tiplendirmek amacıyla kullanılan yöntemler rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), multiplex PCR, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP), single-strand konformasyon polimorfizimi ve DNA dizi analizidir[4,5,49].

Tablo 2.4. Kutanöz Leishmaniasis laboratuvar tanısında uygulanan metodlar arasındaki karşılaştırma [6]

YÖNTEM	AVANTAJ	DEZAVATAJ
MİKROSKOBİK İNCELENMESİ	- Basit - Maliyeti düşük - Morfolojik olarak parazidin direkt tanılması	- parazidin sayısı az olduğunu durumlarda duyarlılığı düşük olması. - Benzer yapısına sahip organizmaları ayırt edilmemesi - Deniyimli personel tarafından incelenme yapılması gerekmesi.
KÜLTÜR YÖNTEMİ	- Saptanan parazitlerin canlı olması. - Eftivite ve virölansı ölçülebilmesi.	- Türler arasında varyasyonların saptanmaması - Yavaş ve pahalı olması.
SEROLOJİK YÖNTEMLERİ	- Hızlı ve basit olması. - Aynı anda çok sayıda örneğin incelenmesine elverişli	- Özgüllüğü düşük olması. - Standardize ayıracıların gerekliliğı. - Geçirilmiş, aktif, ya da latent enfeksiyonlar arasında ayırım yapamaması.
MOLEKÜLER YÖNTEMLERİ	- Canlı ve cansız parazitleri saptanabilmesi. - Parazit yükü düşük olsabile yüksek duyarlılık gösteremesi. - Hastalığa neden olan parazit türü tayini yapabilmesi.	- Çok aşamalı ve pahalı olması. - Konteminasyon olduğunda yalancı pozitiflik gösterilebilmesi. - Yalancı negatiflik görülmesi. - Ölü parazitlerin ayırt edilememesi.

2.15. KI Tanısında PCR Yönteminin Kullanımı

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) belirli bir DNA örneğinin enzimatik olarak milyonlarca ila milyarlarca kopyasını in vitro ve hızlı bir şekilde tespit etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. PCR kullanılarak, çok küçük miktarlarda DNA sekanslarının kopyaları, bir dizi sıcaklık değişimi döngüsünde üssel olarak amplifiye edilir. Tanıda uygulanan yöntemler arasında en hassas ve spesifik yöntem olduğu düşünülmektedir. Testin etkiliği, amplifikasyon için seçilen hedef (korunan veya değişken hedef bölge), hedef kopya sayısı, kullanılan ekstraksiyon tekniği, test edilen biyolojik örnek ve uyarlanan veya geliştirilen PCR protokolü ile etkilenebilir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), reaksiyon karışımı içinde gerçekleştirilir. Bu karışım, DNA ekstraktı (şablon DNA), Taq polimeraz, primerler, dört deoksiribonükleosit trifosfat (dNTP'ler) ve tampon solüsyonundan oluşmaktadır. Karışım reaksiyonunu içeren tüpler, genellikle bir termal döngüde gerçekleştirilir. Her reaksiyon adımında gereken sıcaklığı kontrol etmek için reaksiyonların otomatik olarak ısıtılmasına ve soğutulmasına izin veren bir makinede gerçekleşir. PCR genellikle yaklaşık 30 ila 35 döngüden oluşan bir seriden oluşur [47,48,49,50,51,52,53].



Şekil 2.9. PCR aşamaları [54]

2.15.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonda Kullanılan Bileşenler

PCR'da kullanılan bileşenler ve amplifikasyon koşulları en uygun hale ayarlanarak sonuçlar en verimli şekilde elde edilmektedir. Temel bir PCR kurulumu, aşağıdakileri içeren birkaç bileşen ve reaktif gerektirmektedir:

- Deiyonize su.
- Buffer.
- MgCl₂.
- Primer.
- dNTP.
- taq polymerase.
- Hedef DNA.

2.15.1.1. Deiyonize Su

Çift damlatılmış su karışıma eklenerek fizyokimyasal ortam sağlanır. Deiyonize su kimyasal reaksiyonları gerçekleştirmeye yardımcı olur.

2.15.1.2. PCR Buffer

Taq polimerazın verimli çalışmak için tuz, uygun pH gibi koşulları optimize edilmelidir. Buffer'ın amacı pH'yı dengede tutmak, fizyokimyasal çevre sağlamak ve primerin özgülüğü artırmaktır. Genelde kullanılan buffer (NH₄)₂SO₄dır.

2.15.1.3. MgCl₂

DNA polimerazın optimum aktivitesi ve stabilitesi için uygun bir kimyasal ortam sağlayan iki değerlikli katyonlardan oluşan bir tampon çözelti kullanılır. Tampon çözelti için tipik olarak magnezyum (Mg) veya mangan (Mn) iyonları en yaygın olanlarıdır. Yani Magnezyum iyonları taq polimerazın polimeraz aktivitesini artırır ve Taq DNA polimerazın kofaktörü olarak işlevi görülür.

2.15.1.4. dNTP

Deoksinükleosit trifosfatlar veya dNTP'ler (bazen "deoksinükleotid trifosfatlar" olarak adlandırılır; trifosfat grupları içeren nükleotidler), DNA polimerazın yeni bir DNA zinciri sentezlediği yapı blokudur, zincir polimerizasyonu sırasında DNA sentezi için ihtiyaç duyulan hem enerjiyi hem de nükleotitleri sağlar.

2.15.1.5. Primerler

PCR primerleri, genellikle yaklaşık 10 ila 30 nükleotit arasında uzunluğu sahiptir, kısa tek sarmallı DNA parçalarıdır. Her PCR reaksiyonunda iki primer kullanılır ve bunlar hedef bölgeyi (kopyalanacak bölge DNA hedefinin sens ve anti-sens zincirlerinin her birinin 3' (üç üssü) ucunu tamamlar) çevreleyecek şekilde tasarlanır. Yani, kopyalanacak bölgenin kenarlarında, şablon DNA'nın zıt ipliklerine bağlanmalarını sağlayacak diziler verilir. Primerler, tamamlayıcı baz çiftlemesi ile şablona bağlanır. Primerler şablona bağlandığında, polimeraz tarafından uzatılabilirler ve aralarında kalan bölge kopyalanırlar.

2.15.1.6. Taq Polimeraz

Kaplıcalarda yaşayan ve 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklara direnç gösteren ekstreofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan saflaştırılmış veya klonlanmış bir DNA polimerazdır. Amplifiye edilecek DNA hedef bölgesini içeren bir DNA şablonu bir DNA polimeraz; yeni DNA ipliklerini polimerleştiren bir enzim olan ısıya dayanıklı Taq polimeraz, yüksek sıcaklıktaki DNA denatürasyon işlemi sırasında bozulmadan kalma olasılığı daha yüksek olduğundan yaygın

olarak kullanılmaktadır. DNA polimeraz replikasyona izin verir. Bu polimeraz (Taq polimeraz), çoğu proteini denatüre etmek için genellikle yeterli olan yaklaşık 100°C'lik sıcaklıklara dayanma özelliğine sahiptir. *Thermus aquaticus*, konfor sıcaklığını 72°C'de bulur. Bu değer polimeraz aktivitesi için optimum sıcaklıktır.

2.15.1.7. Hedef DNA Dizisi

Alınan klinik örneklerin DNA'sı kapalı dairesel şekildedir. Bu şekilde bulunan DNA amplifiye etmesi etkinliği düşüktür. Çeşitli DNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak DNA doğrusal hale getirilerek amplifiye etmek etkinliğini daha iyi olmaktadır [48,49,50,51,52,53,54].

2.15.2. PCR'ın Prosedürü

Bir DNA örneğinden büyük miktarlarda spesifik bir DNA dizisi elde etmek için, çift sarmallı bir DNA şablonunun kopyalanmasına dayanan PCR tekniği üç aşamada uygulanır. Bir denatürasyon aşamasını takiben primerlerle bir hibridizasyon aşaması ve bir uzama aşaması olur. Her sentez adımının ürünü, sonraki adımlar için bir şablon görevi görür, böylece üstel amplifikasyon elde edilir. Tipik olarak PCR'da, her döngü genellikle iki veya üç ayrı sıcaklık adımından oluşan, termal döngü adı verilen bir dizi 20-40 kez tekrarlanan sıcaklık değişikliğinden oluşur. Döngüde önce genellikle çok yüksek bir sıcaklıkta (>90°C) tek bir sıcaklık adımı ve ardından son ürün uzatması veya kısa süreli saklama için sonda bir bekletme gelir. Her döngüde kullanılan sıcaklıklar ve bunların uygulanma süreleri, DNA sentezi için kullanılan enzim, reaksiyondaki iki değerlikli iyonların ve dNTP'lerin konsantrasyonu ve primerlerin erime sıcaklığı (T_m) dahil olmak üzere çeşitli parametrelere bağlıdır. Çoğu PCR yönteminde ortak olan adımlar; denatürasyon, bağlanma ve uzamadır.

2.15.2.1. Denatürasyon

Bu adım, ilk düzenli döngüsel olaydır ve reaksiyon odasının 20-30 saniye 94-98 ° C'ye ısıtılmasını içerir. Bu, çift sarmallı DNA şablonunun DNA erimesine veya denatürasyonuna, tamamlayıcı bazlar arasındaki hidrojen bağlarını kırarak iki tek sarmallı DNA molekülü oluşturmasına neden olur.

2.15.2.2. Primer eşleşmesi (annealing)

Bir sonraki adımda, reaksiyon sıcaklığı 20-40 saniye süreyle 50-65°C'ye düşürülür ve primerlerin tek sarmallı DNA şablonlarının her birine bağlanmasına izin verilir. Reaksiyon karışımına tipik olarak iki farklı primer dahil edilir. Hedef bölgeyi içeren iki tek sarmallı her biri için birer tane primer kullanılır. Sıcaklık çok yüksekse hiç bağlanmayabilir. Tipik bir bağlama sıcaklığı, kullanılan primerlerin T_m'sinin yaklaşık 3-5°C altındadır. Tamamlayıcı bazlar arasındaki kararlı hidrojen bağları, yalnızca primer dizisi şablon dizisiyle çok yakından eşleştiğinde oluşturulur. Bu adım sırasında polimeraz primer şablon hibritine bağlanır ve DNA oluşumuna başlar.

2.15.2.3. Uzatma / uzama

Bu aşamada genellikle 72°C sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bu adımda, invitro koşullarda çift iplikçikli DNA'nın sentezlenmesidir. Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primerler ve kalıp olarak tek iplikçikli DNA'nın kullanılır. Enzim 5' 3' yönünde aktivite göstererek primerlerin 3' uçlarından başlayarak ortamdaki nükleotidleri kullanarak hedef DNA diziliminin kopyasını

yapar. Reaksiyon ısısı tekrar 94°C'ye çıkarılarak bir siklus tamamlanmış olur. Denatürasyon, tavlama ve uzama süreçleri tek bir döngü oluşturur. DNA hedefini milyonlarca kopyaya yükseltmek için birden fazla döngü gerekir.

2.15.2.4. Son Uzama

70–74°C sıcaklıkta işlemiden 5–15 dakika sonra gerçekleştirilir. Kalan tek sarmallı DNA'nın tamamen uzamasını sağlamak için son PCR döngüsü.

2.15.2.5. Son Bekletme

Son adım, reaksiyon odasını belirsiz bir süre için 4–15°C'ye soğutur ve PCR ürünlerinin kısa süreli depolanması için kullanılabilir [48,49,50,51,52,53,54].

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran kutanöz leishmaniasis şüpheli hastalardan farklı tanı yöntemleri kullanarak Leishmania parazitinin araştırılması, elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırılması ve vakaları epidemiyolojik yönden değerlendirilmesi amaçlandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'nın 04/12/2019 tarihli ve 2019/539 sayılı kararı ile "etik kurul onayı" ve Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimin'den 2020-1-TP2-4023 numarılı proje desteğini almıştır.

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Biyogüvenlik kabini (Thermo Scientific)
- PCR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Vorteks (Nüve NM-110, Türkiye)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra, P30)
- Elektroforez Tankı (Thermo Scientific, Owl E. Sycast™ B2)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur, R134a)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Vortex (Heidolph, REAX top)
- Santrifüj (Sigma, 1-15)
- -20°C'lik Derin Dondurucu (Indesit)
- Distile su cihazı (Thermo Scientific, micropure)
- Mikropipet Seti (Thermo Scientific, GJ16637-GJ16827-GJ17112)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Primer Dizaynı, 200 nmol
- EaeI, 200 U
- TaqI (10 U/μL) 3,000 units

- Taq DNA Polymerase, 500 U (Fermentas, #EP0402)
- 100 mM dNTP (Fermentas, Deoxynucleotide set-dNTP set, 4x25 µmol, #R0181)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, 5x50 µg
- Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), 100ml
- RPMI 1640 Medium, HEPES, 500 ml
- Proteinaz K, 100 mg
- Dimethyl sulfoxide Hybri-Max
- Agaroz (Prona, 0945002PR)
- 25 mM MgCl₂ (Fermentas, #EP0402)
- High Pure Viral Nukleic Acid Kit (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), sodium salt (Lachema, 302430300, cat no: 30354)
- Tris-base (Amresco, 1639B291)
- Etanol absolut (Riedel- deHaän, 32221)
- Borik asit (Merck, K29935665 204)
- Sükroz (Merck, 1.07651)
- Brom fenol mavisi (SCP Science, B7722)
- Etidyum Bromid (Sigma-Aldrich, E8751)
- Giemsa boyama
- Bacto agar
- NaCl

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1. Elektroforez aşamada Kullanılan Solüsyonlar

➤ 10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok Solüsyonu pH 8.8

- Borik Asit.....55 gr
- Tris Base.....108 gr
- EDTA.....8,3 gr

Bu maddeler distile su kullanark ertildi ve PH'sı 8,8 olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan solüsyonuna 1 litre hacim olacak üzere distile su ilave edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

➤ **Yükleme Tamponu (20 ml için)**

- Brom fenol mavisi.....0,05 gr.
- Sükroz.....4 gr.

Bu maddeler 20 ml 1XTBE tamponuna eklendi. Oda sıcaklığında mühafaza edildi.

➤ **Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)**

- Hazırladığımız 10X TBE Buffer stok solüsyonunundan daha hafif konsantrasyonu elde etmek amacıyla distile su ilave edildi.
- 1X TBE tamponu elektroforez tankına konuldu ve elektroforez yürütme tamponu olarak kullanıldı.

3.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada 04.12.2019 ve 01.03.2021 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran KL şüphesi olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastalara KL hastalığı hakkında anlatarak bilgi verildi, hastalardan örnek alınmadan önce gönüllü onay formuna hasta tarafından imzalandı ve hastanın onayı alındı (EK 1, EK 2). Çalışmaya katılan hastaların şüpheli lezyonlarından kazıntı ve aspirat alındı.

3.3. Örneklerin Alınması

3.3.1. Smear örneklerinin alınması

KL şüpheli lezyonlar %70'lik alkol ile temizlendikten sonra bistüri kullanarak lezyonun kenarındaki sağlam deriye yakın olan bölgeden kazıntı alındı ve temiz bir lamın üzerine yayma yapıldı. Hazırlanan yayma mikroskopik incelemek üzere Giemsa boya ile boyandı.

3.3.2. Aspirasyon sıvısı alınması

İnsülin enjektörüne %0.9'luk sodyum klorürden (NaCl) 0.5 ml alındı. KL şüpheli lezyonu %70'lik alkol ile temizlendikten sonra lezyonun kenarındaki sağlam deriye yakın olan bölgede, insülin enjektörü girildi ve steril sodyum klorür çözeltisi lezyonun içerisine bırakılıp sonra lezyon içindeki sıvı enjektöre geri alındı. Alınan aspirasyon örnekleri iki ayrı temiz ependorf tüplerine paylaştırıldı. Bu tüplerin birisi N.N.N besiyerine ekim için kullanıldı, diğeri ise PCR için kullanıldı.



Şekil 3.10. Çalışmaya dahil edilen bazı KL şüpheli lezyonlar

3.4. Tanımlamada kullanılan yöntemler

3.4.1. Mikroskop İncelenmesi

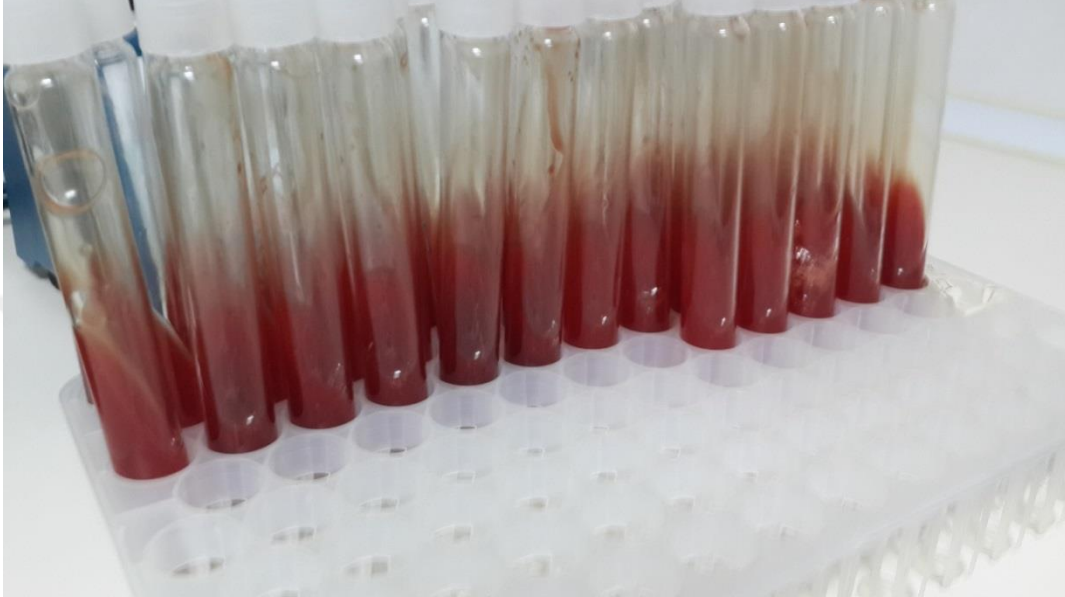
Hazırlanan yayma preparat Giemsa boya ile boyandıktan sonra, mikroskobta 100'lük objektifte incelendi. Leishmania'nın amastigot formunu araştırıldı.

3.4.2. Kültür Yöntemi

3.4.2.1. NNN. Besiyerinin Hazırlanması

- 90 ml distile suya 1,4 gr Bacto agar ve 0,6 gr NaCl karıştırıldı ve agarın tam olarak erimesi sağlanmak için ısıtıldı.
- Besiyeri, sterilize edilmesi için otoklavda (121°C'de 15 dakika) bekletildi, ve 50-55°C'ye soğuttuktan sonra içine 10 ml defibrine tavşan kanı eklendi.
- 4°C'ye alınan besiyerlerine, bakteri kontaminasyonunun engellenmesi amacıyla 0,2 ml penisilin G ve streptomisin sülfat eklendi.

- Pastör fırınında steril edilmiş vidalı kapaklı cam tüplere hazırlanan besiyerinden 4'er ml dökülerek 10° eğimde agarın donması sağlandı.
- Besiyerleri, buzdolabına 2°C-8°C sıcaklıkta muhafaza edildi.
- Kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi.



Şekil 3.11. N.N.N besiyeri

3.4.2.2. N.N.N Besiyerine Ekim

Buzdolabından çıkarılan besiyeri oda sıcaklığına getirildi. Aspirat sıvısı alınıp alınmaz steril koşullarda besiyeri üzerine bırakıldı. Etüvde 24°C derecede dik şekilde 5 gün bekletildi. 5 gün sonra besiyerinde bulunan sıvıdan pastör pipet kullanılarak alındı ve lam-lamel arasında mikroskopta 40'lık objektif ile Leishmania'nın promastigotlarına araştırıldı. Promastigot görülmediği durumlarda ekim yapılan besiyeri 20 gün 24°C etüvde bekletildi ve her 4 günde bir promastigotlar araştırıldı.

3.4.3. Moleküler Tanı Yöntemi

3.4.3.1. DNA Ekstraksiyonu

High Pure Viral Nucleic Acid (lot:13554700 Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Germany) kiti DNA ekstraksiyonu için kullanıldı. Üretici firmanın talimatlarına göre çözeltilerin hazırlanması ve ekstraksiyon aşamaları yapıldı.

3.4.3.1.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

➤ Proteinaz K (20 mg/ml)

- Liyofilize halde bulunan 100 mg proteinaz K, 5 ml elution buffer içinde karıştırılarak çözüldü.
- Bu karışım, 250 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.

➤ Poly (A) (4mg/ml)

- Liyofilize halde bulunan 2 mg poly (A) taşıyıcı RNA 0.5 ml elution buffer ile çözüldü.
- 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'de saklandı.
- Çalışma sırasında bu 50 µl'lik karışıma, 5 ml binding buffer [6M guanidine-HCl, 10mM Tris-HCl, %20 Triton X-100 (w/v), pH 4,4 (25°C)] eklendi.
- Binding buffer ve poly (A) karışımı her çalışma sırasında yeniden hazırlandı.

➤ Inhibitor Removal Buffer

- 33 ml inhibitor removal buffer'a (5M guanidine-HCl, 20mM Tris-HCl pH 6,6 (25°C) etanol eklendikten sonraki çözeltisi) 20 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

➤ Wash Buffer

- Wash buffer'a (2X10 ml, 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25 °C) etanol eklendikten sonraki konsantrasyonu) 40 ml saf etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.

3.4.3.1.2. Ekstraksiyon Aşamaları

5 ml binding buffere 50 µl Poly (A) ekleyerek karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım dan 200 µl alınıp aspirat örneklerin bulunduğu ependorf tüplerine eklendi.

1. 50 µl proteinaz K (20 mg/ml) eklendikten sonra vortekslenip ve 72°C'de 1 saat inkübe edildi.
2. İnkübasyon süresi dolduktan sonra ependorfların üzerine 100 µl binding buffer eklenip vortekslendi.
3. Kitte bulunan toplama kapları ve filtreli tüpler iç içe yerleştirildi.
4. Ependorf tüpündeki hazırlanan karışım, toplama kapları içerisine aktarıldı ve 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası, toplama kabı atılıp filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
6. Tüplerin üzerine 500 µl inhibitor removal buffer eklendi ve 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj edildi.

7. Santrifüj sonrası, toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi.
8. Tüplerin üzerine 450 µl Wash Buffer eklendip ve 10 saniye 12000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı. Filtre tüpleri yeni toplama kapları üzerine yerleştirildi. Bu basamak iki kez tekrarlandı.
9. Bu işlem yapıldıktan sonar tüpler 10 saniye 12000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası toplama kabı atılıp Filtre tüpleri 1,5 ml’lik ependorf tüpler içe geçirildi.
10. Tüplerin üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi, bu süre bittikten sonra 5 dakika 12000 rpm’de santrifüj edildi.
11. Ependorf tüp içindeki filtre tüpü atıldı ve bu tüpler -20°C’de saklandı.

3.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Uygulaması

Çalışmamızda;

- Kontamine olması engellemek için aspirat örneklerinden DNA ekstraksiyon, PCR’da kullanılacak ana karışımının hazırlandı ve ekstrakte edilen DNA’nın PCR’ın ana karışımına eklenmesi 3 ayrı izole edilmiş odalarda yapıldı.
- Yüzeylerin dekontaminasyonu için sodyum hipoklorid ve UV ışık kullanıldı.

Leishmania türlerine ait DNA’nın saptanabilmesi için parazitin miniexon gen bölgesi hedeflenmiştir. Bu bölgenin PCR amplifikasyonu için Tablo 3.5.’de belirtilen primerler kullanıldı.

Tablo 3.5. çalışmada kullanılan primerler [55]

Primerler (sequence)	PCR ürünleri
Forward Fme(5’-TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG-3’)	378-435 bp
Reverse Rme(5’-ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG-3’)	

Miniexon gen bölgesinin amplifikasyonunda her bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 3.6.’daki gibi yapıldı.

Tablo 3.6. Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon bileşenleri	Kullanılacak miktar (µL)
NADS	26.7
dNTP Mix (10 mM)	1
10XNH ₄ Tampon	5
MgCl ₂ (25 mM)	5
DMSO	6
Primer 1 (Rme) (100 pmol/µL)	0.5
Primer 2 (Fme) (100 pmol/µL)	0.5
Taq DNA Polimeraz	0.5
DNA örneği	5

PCR amplifikasyonu Tablo 3.7.'de belirlenen PCR koşullarına uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.7.çalışmada uygulanan PCR koşulları [55]

	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç)	94	10 dk	1
Denatürasyon	94	60 sn	25
Primer bağlanması (Annealing)	54	60 sn	
Zincir uzaması (Elongasyon)	72	90 sn	
Son uzama (Post elongasyon)	72	10 dk	1
Muhafaza	4	∞	∞

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak için %2 agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı.

3.4.3.3. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PCR'de amplifiye edilen Leishmania DNA'sının miniexon gen bölgesini tespit etmek için agaroz jel elektroforez tekniği kullanıldı. Hazırlanan jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, büyüklükleri belli (100-1000 bp) DNA fragmentleri ihtiva eden moleküler ağırlık standardı ile kıyaslanarak saptandı. Elektroforez tamponu olarak TBE (Tris-Borik asit-EDTA), 10X konsantre stok solüsyon şeklinde hazırlandı. Daha sonra distile su ile sulandırılarak 1X olacak şekilde hazırlandı ve hem tankta hem de agaroz jelin hazırlanmasında kullanıldı.

3.4.3.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

%2'lik agaroz jel hazırlama için bir erlenmayerde, 2 gr agaroz ve 100 ml 1X TBE solüsyonu şeklinde ve mikrodalga fırında şeffaf homojen hale gelinceye kadar ısıtıldı. Sonra 10 µl Etidyum-bromid eklendi. Jel tepsisine tarafları yerleştirildi ve erimiş haldeki karıştırılmış jel ve etidyum-bromid yavaşça jel tepsisine döküldü. Dökme işlemi sırasında jel içinde hava kabarcıklarının kalmamasına dikkat edildi. Jel katılaşıncaya kadar yaklaşık 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve PCR örneklerinin yüklenmesine hazır hale getirildi. Daha önceden PCR amplifiye edilmiş olan örneklerden 7 µl alındı ve parafilm üzerinde 2 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 süzkroz veya gliserol, % 0,25 brom fenol mavisini) ile iyice karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve kuyucuklarına hazırlanan PCR ürün yükleme tamponu karışımı sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldı ve güç kaynağı çalıştırıldı. örnekler 30-40 dakika boyunca yürütüldü. 130 mA elektrik akımı ayarında işlem yapıldı. Yükleme tamponun içerisinde bulunan brom fenol mavisinin hareketi takip ederek jelin 1/2'lük kısmına varlığında elektroforez cihazı durduruldu. Tanktan jeli çıkarıldı ve UV-transilüminatöründe (312 nm dalga boyu) incelenip jel görüntüleme sisteminde kayıt edildi.

4. BULGULAR

KL şüpheli hastalarda leishmania parazitin saptanması için ve alınan sonuçları epidemiyolojik yönünden değerlendirmek amacıyla; (04.12.2019 ve 01.03.2021) tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran 16 şüpheli hastadan yayma örneği ve aspirat sıvısı alındı. Leishmania paraziti araştırılması amacıyla mikroskopik inceleme ve PCR yöntemi uygulandı. Çalışmaya dahil edilen hasta bilgileri ve KL tanısında kullanılan yöntemlerinin sonuçları tablo 4.7.'deki gibidir.

Tablo 4.8. Çalışmaya katılan hastaların bilgileri ve elde edilen sonuçlar

Hast no:	yaş	cinsiyet	uyruklu	Lezyon sayısı	Lezyon bölgesi	Mikroskopik inceleme	kültür	PCR
1.	56	K	Türk	3	yüz	-		-
2.	5	K	Suriyeli	1	Üst ekstremité	+		+
3.	5	K	Suriyeli	3	Yüz, alt ekstremité	-		-
4.	74	K	Türk	1	Yüz	-		-
5.	2	E	Suriyeli	4	Yüz, alt ekstremité	-		-
6.	40	K	Suriyeli	1	Üst ekstremité	+		+
7.	5	K	Suriyeli	3	Yüz, alt ekstremité	-		-
8.	25	E	Türk	2	Alt ekstremité	-		-
9.	47	K	Türk	1	Yüz	-		-
10.	30	E	Suriyeli	1	Üst ekstremité	+		+
11.	6	E	Suriyeli	1	Yüz	+		+
12.	1 yıl 2 ay	E	Suriyeli	2	Yüz	-	-	-
13.	6	E	Suriyeli	1	Kulak	-	-	-
14.	47	E	Türk	1	Yüz	-	-	-
15.	64	K	Suriyeli	8	Üst ve alt ekstremité	-	-	+
16.	40	E	Türk	1	Üst ekstremité	-	-	+

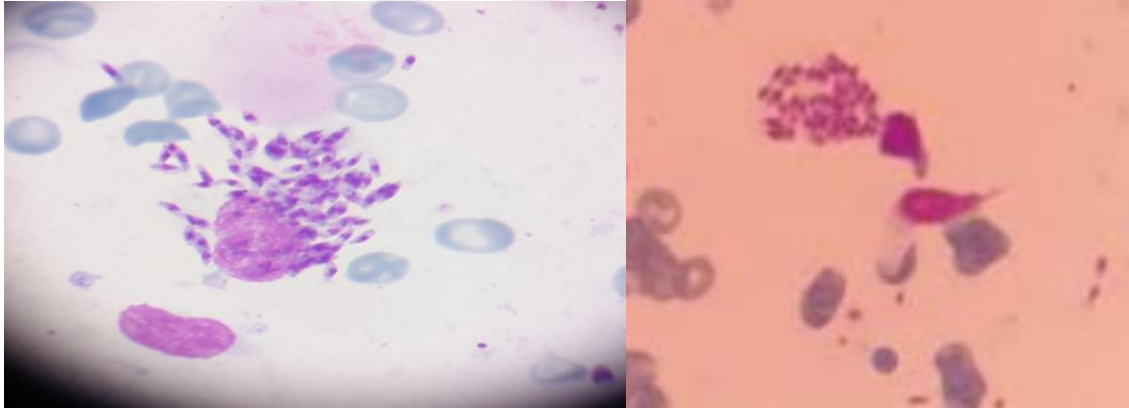
Çalışmaya katılan hastaların (8/16) %50 erkek, (8/16) %50 kadındır. Türk hastaların sayısı 6 (% 37,5) iken Suriyeli hastaların sayısı 10 (% 62,5) olarak tespit edildi. Çalışmaya katılan KL şüpheli hastaların ortalama yaşı $28,31 \pm 24,73$ idi. Minimum hasta yaşı 1 ve maksimum yaşı ise 74 olarak belirlendi. 16 hastanın 9'u (%56,3) tek bir lezyon şikayeti ile başvururken, 2/16 (% 12,5) vaka iki lezyon ile kliniğe geldi. Üç lezyona sahip olan hastaların sayısı 3 olarak belirlendi (% 18,8). Bir hastanın (% 6,3) dört lezyonu vardı ve sadece 1 (% 6,3) kişinin 8 lezyonu mevcuttu. 16 vakanın 10'unda (%62,5) yüzde lokalize lezyonu vardır. 5

vakada (%31.25) üst ekstremitede lezyon vardı. Alt ekstremitedeki lezyon ile başvuran hasta sayısı ise 5'tir (%31.25).

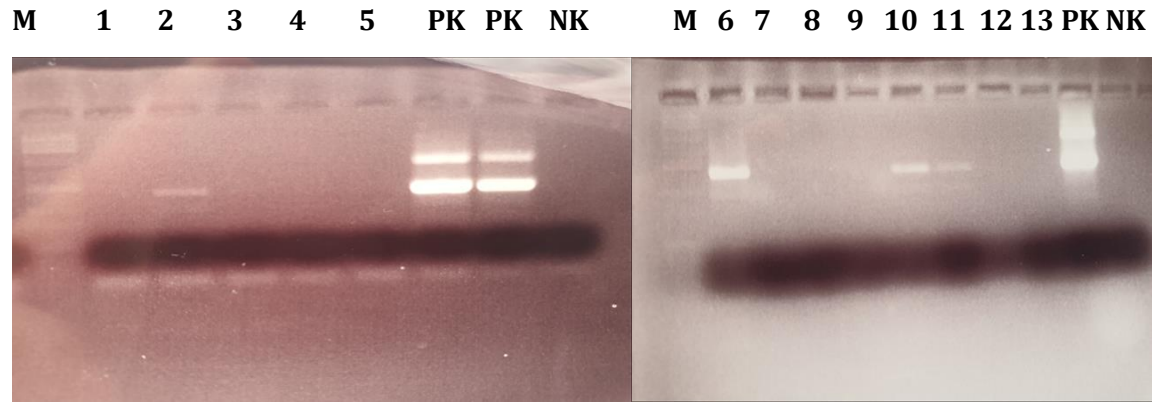
Mikroskopik inceleme yöntemi kullanılarak pozitif vakalarının sayısı 4/16 (%25), çalışmaya katılan hastalardan 5'inde N.N.N besiyerine ekim yapıldı ama hiç birinde promastigot görülmedi ve üreme rastlanmadı. PCR yönteminin kullanarak pozitif vakaların sayısı ise 6/16 (%37.5) olarak bulunmuştur. PCR yönteminde pozitif sonucuna sahip olan 6 hasta 5/6(%83.33) Suriyeli ve 1/6 (%16.66) Türk'tür.

Tablo 4.9. Mikrosobik incelemede ve PCR yöntemi kullanarak bulunan sonuçlarının karşılaştırılması

	Mikroskopik (+)	Mikroskopik (-)	Toplam
PCR (+)	4	2	6
PCR (-)	0	10	10
Toplam	4	12	16



Şekil 4.12. Mikroskopik incelemede amastigotların görünümü



Şekil4.13. :PCR sonuçları

M: marker

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 hasta numaralarıdır.

PK: Pozitif kontrol

NK : Negatif kontrol

5. TARTIŞMA

KL dünyanın 98 ülkesinde yayılım gösteren bir hastalık olduğunu bilinmektedir. Endemik ülkeler arasında yer alan Türkiye’de KL hastalığı önemli bir halk sağlığı sorunudur [4]. 1933 yılından Türkiye’nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi KL ile endemik bir bölgedir. 1950’li yıllarda vektörlerle savaş nedeniyle KL vaka sayılarında azalma görülmüştür. Ancak 1985 ve sonrasında özellikle Şanlıurfa ilinde ve Çukurova bölgesinde KL vaka sayılarında tekrar artış gözlenmiştir. Bu artışın sebebi vektör kontrolünün yetersiz olmasıdır. Türkiye’nin genelinde 1990-2010 yılları arasında 46.003 yeni KL vakası raporlanmış ve bu vakaların %96’sı sırasıyla Kahramanmaraş, Şanlıurfa, Hatay, Osmaniye, Diyarbakır ve Mersin’den bildirilmiştir [56,57]. Türkiye’de KL etkeni olan türler; *L. tropica* ve *L. infantum*’dur. Ama son yıllarda *L. major* ve *L. donovani* KL’ye neden olarak rastlanmaya başlanmıştır [40,41]. Klinik olarak KL şüpheli olguların kesin tanı koymak için en sık kullanılan yöntemlerden biri mikroskopik inceleme yöntemidir. Bu yöntem en basit ve hızlı tekniktir, ancak özellikle kronik lezyonlarda duyarlılığı düşüktür. Bir diğer geleneksel yöntem lezyonlardan parazitlerin kültürlenmesidir, ancak bu uzun bir kuluçka dönemi gerektirir ve her zaman olumlu bir sonuç vermeyebilir [58]. Son yıllarda KL tanısında moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek duyarlılık gösteren moleküler yöntemler (PCR gibi) ile kesin tanı konabilir. Aynı zamanda bu yöntemler kullanılarak lezyona neden olan Leishmania’nın türü tespit edilebilir [49].

Cömert ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 2010-2015 yılları arasında Mersin ilinde üniversite hastaneleri, devlet hastaneleri ve toplum sağlığı merkezlerinde başvuran ve KL tanısı saptanarak Halk Sağlığı Müdürlüğü’ne bildirilen toplam olarak 376 olgu incelenmiştir. Vakaların çoğunu oluşturan 222 olgu (%59.0) Mu’ta rastlanmıştır. Olgulardan 92’si (%24.5) Tarsus’tan bildirilmiştir. Bildirimde tanı aldığı merkezlere göre olguların dağılımı incelendiğinde; 213 olgu (%56.6) devlet hastanelerindeyken, 154 olguya (%41) TSM’lerde ve 9 olgu (%2.4)’ya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesinde tanı konulmuştur [57]. Cömert ve arkadaşlarının çalışması ve bizim çalışmamızın sonuçları karşılaştırıldığında; 5 yıl içinde Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde 9 hastaya KL tanısı konulmuş iken, bizim bir yıl süren çalışmamızda 6 hastaya KL tanısı konulmuştur. Bizim çalışmamız boyunca elde edilen verilere göre geçen yıllara oranla Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi’nde KL tanısı alan vaka sayılarında artış kaydedilmiştir.

KL olgu sayılarında artma sadece Mersin’de değil, tüm Türkiye’de fark edilmiştir. Bu artışın nedeni Türkiye’nin komşusu olan ülke Suriye’deki savaş nedeniyle 3.5 milyon mültecinin savaştan kaçarak Türkiye’ye sığınmasıdır. Bazı mülteciler KL ile birlikte başka hastalıkları da Türkiye’ye taşımışlardır. 2013 yılında Türkiye’de 2268 Türk ve 2000’den fazla Suriyeli KL vakası rapor edilmiştir [4]. İnci ve arkadaşları Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı’na Ocak 2011-Haziran 2014 tarihleri arasında başvuran KL tanısı almış 110 hastayı değerlendirmiştir. Çalışmada hastaların 76’sını (% 69) çadır kamplarında yaşayan Suriyeli mülteciler oluştururken, 34’ünü (% 31) Türkiye vatandaşı olarak tespit etmişlerdir [58]. Çalışmamızda toplam 16 KL şüpheli hastalarda 6’sı KL olarak saptanmıştır, KL saptanan 6 vakasının 5’i (%83.33) ise Suriye kökenli olarak belirlenmiştir. Bu sonuç mülteci göçünün vaka sayısını arttırmasına olan etkisini göstermektedir.

Özkeklikçi ve arkadaşları Ocak 2009 ile Temmuz 2015 tarihleri arasında Gaziantep Devlet Hastanesi’ne başvuran 567 KL şüpheli hastaların lezyonundan aspirat sıvısı alınmış, Giemsa boyası ile boyanarak mikroskopik inceleme yapılmıştır. Mikroskopik inceleme yöntemi

ile pozitiflik oranı %46.4 olarak saptanmıştır. Mikroskopik incelemede saptanan KL tanılı hastaların %66.15'i Türk kökenli iken %33.46'sı Suriye vatandaşı ve %0.38'si Afganistan kökenli olduğu tespit edilmiştir. 34 KL şüpheli hastadan alınan slayt örnekleri PCR ile incelenmiş ve bunların 20'si pozitif bulunmuştur. Pozitif örneklerin 18'i (13 Türk ve 13 Suriyeli) *L. tropica*, ikisi (1 Türk ve 1 Suriyeli) *L. infantum* olarak belirlenmiştir [59]. Çalışmamızın mikroskopik incelemede pozitiflik oranı literatüre göre daha düşüktür. Çalışmamızda KL saptanan Suriyeli hastalarının oranı (%83.33) literatüre göre daha fazla bulunmuştur.

Gaziantep'de Leishmaniasis tanı ve tedavi merkezine 01.04.2013 ve 01.04.2014 tarihleri arasında başvuran 635 hasta retrospektif olarak değerlendirmiş ve hastaların %89,4'i Suriye, %10,6'sı Türkiye uyruklu olduğu belirlenmiştir [56]. Bu çalışmada KL tanısı alan vaka sayılarının Suriyeli/ Türk oranı çalışmamızla uyumludur.

Salman ve arkadaşları 01.01.2010-19.03.2013 tarihleri arasında Nizip Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen 416 KL şüpheli hastadan alınmış örnekler, mikroskopik inceleme yöntemi kullanılarak taranmıştır. Pozitiflik oranı %18.5'tir. KL saptanan hastaların %80.5'i Suriyeli iken ve %19.5'inin Türk olduğunu gözlenmiştir [60]. Suriye'nin komşusu olan Lübnan ülkesinde savaş başladıktan sonra KL vakalarında artış gözlenmiştir. Alawieh A ve arkadaşları 2001 ile 2014'ün ilk çeyreği arasında Lübnan Halk Sağlığı Bakanlığı Epidemiyolojik Gözetim Departmanına bildirilen tüm leishmaniasis vakalarını incelemiştir. Toplamda, 0-6 vaka aralığındaki önceki bir yıllık sayıya kıyasla 2013 yılında 1033 yeni leishmaniasis vakası rapor edilmiştir. İnsidans artış sebebi araştırıldığında 2013 yılında bildirilen vakaların çoğu Suriyeli mülteciler ve onların bulunduğu yoğunlaşma alanlarıyla ilgili olarak bulunmuştur [61]. Bu literatür sonuçları çalışmamızın sonuçları ile uyumludur. KL saptanan hastaların çoğunun Suriyeli kökenli olduğunu saptanmıştır.

Suriye'nin çok eskiden bu yana KL ile endemik ülkeler arasında olduğu bilinmektedir ve WHO raporlarına göre Suriye KL ile en çok etkilenen ülkelerden biridir ve yılda 25.000'den fazla vaka bildirilmiştir. Suriye'de KL etkeni türler *L. infantum* ve *L. major*'dur [42]. 2011 yılından sonra ve Suriye'deki savaş nedeniyle sağlık sektörü önemli derecede olumsuz etkilenmiştir ve günümüzde hastalıkla mücadele için önlem alınmaması nedeniyle bir salgın haline gelmiştir [42,43]. Suriye'deki Sağlık Bakanlığı'nın yeni yayınları yüksek sayıda olgunun olduğu istatistikler ortaya koymuştur. 2012'de 53.000 yeni vaka varken 2013'ün ilk 2 çeyreğinde 41.000 vaka bildirilmiştir [42]. Muhjazi ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada 2010 yılında Sağlık Bakanlığına bağlı olarak KL tanı ve tedavi merkezlerinin sayısı Suriye'nin genelinde 267 iken savaşın olumsuz etkisi olarak 2014 yılında bu merkezlerin sayısı 183'e düşmüştür. Ancak son zamanlarda bu merkezlerin sayısı tekrar 285'e yükselmiştir. KL olgu sayısı olarak Muhjazi ve arkadaşları tarafından Suriye'deki Sağlık Bakanlığı rutin surveyans sistemi, nöbetçi sendromik Erken Uyarı ve Yanıt Sistemi ve uluslararası sivil toplum örgütünden elde edilen verilere göre, 2015 yılında vaka sayısı zirveye doğru kademeli olarak artmış, 2016'da azalma göstermiş, 2017'de sabit kalmış ve 2018'de tekrar arttığını gözlenmiştir. Suriye Savaşı nedeniyle hem vaka sayılarında artış olmuş, hem de endemik olmayan şehirlerde KL vakası rastlanmaya başlanmıştır. 2010 yılında savaş başlamadan önce 42,221 vaka rapor edilmiş iken, 2018 yılında 82,275 vaka rapor edilmiştir [43]. Göç hareketi ile Suriye'de yaygın bir şekilde bulunan ve KL etkeni olan *L. major* Türkiye'ye taşınmıştır ve KL nedeni olan *L. major* Türkiye'de rastlanmaya başlanmıştır. Koltas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Temmuz 2003 ve Temmuz 2013 yılları arasında KL ve VL şüpheli vakalardan sırasıyla toplam 167 yayma ve 113 kemik iliği örneği alınmıştır. Örnekler, gerçek zamanlı PCR ve ITS1 DNA dizileme yoluyla

analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı PCR'ye göre %64'ü (107/167) yayma ve %56'sı (63/113) kemik iliği numunesi leishmaniasis için pozitifdir. Gerçek zamanlı PCR ile 107 KL vakasında üç farklı *Leishmania* türü bulunmuştur. %42'si (45/107) *L. tropica*, %36.5'i (39/107) *L. infantum* ve %21.5'i (23/107) *L. major* olarak belirlenmiştir. *L. major* ile 23 KL vakasından 14'ü (% 61, 14/23) Suriyeli ve 9'u (% 39, 9/23) Türk'tür. Ek olarak, 63 VL vakasında üç farklı *Leishmania* türü tanımlanmıştır. Gerçek zamanlı PCR kullanılarak %60,3'ü (38/63) *L. infantum*, %30,2'si (19/63) *L. donovani* ve %9,5'i (6/63) *L. tropica* türleri tespit edilmiştir. Türkiye'nin güneyinde *L. major* ve *L. donovani*'nin sırasıyla KL ve VL'nin etyolojik ajanları olduğunu ortaya koymuştur. *L. major* ve *L. donovani*'nin ortaya çıkışının, Suriyeli mülteci akını ve küresel ısınmanın etkilerinden kaynaklandığı varsayılmıştır [62].

Çalışmamızda KL tanısında mikroskopik inceleme ve PCR yöntemi kullanılmıştır, mikroskopik incelemede pozitiflik oranı %25 bulunurken, PCR yöntemi kullanılarak pozitiflik oranı %37.5'tir. 16 örneğimizden 5 örneğinin NNN besiyerine ekim yapıldı, ama üreme rastlanmadı ve promastigotlar görülmedi. Kültür yaptığımız 5 örneğin 2'si PCR pozitif olmasına rağmen üreme olmadı. Üreme olmama nedeni iki hastamızın lezyonları sekonder enfeksiyon ile bulaşmış olduğunu düşünürüz. Dünyanın her tarafında KL tanısında kullanılan laboratuvar tanı yöntemleri karşılaştırma amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. N. Chargui ve arkadaşları 2005 yılında Tunus Sağlık Merkezi'ne başvuran 430 KL şüpheli hastadan örnek alınmıştır ve PCR yönteminin etkinliğini değerlendirmek için mikroskopik inceleme, NNN besiyerine ekim ve PCR yöntemi uygulamışlardır. Çalışmada PCR'ın duyarlılığının mikroskopik incelemeye (%80.8) göre ve kültür yöntemine (%29) göre daha yüksek olduğunu (%99.3) bulmuşlardır [63]. Aviles ve arkadaşları 1999 yılında 24 KL şüpheli hastadan alınan örneklerle, kültür yöntemini referans yöntem olarak almışlar, PCR tanı yönteminin duyarlılığını %92, mikroskopi % 42, histolojik boyama %33 ve IgG enzim bağlantılı immünosorbent %20 duyarlılıkta bulunmuştur. PCR yönteminin klasik tanı tekniklerinden daha duyarlı bulmuşlardır [64]. Wortmann ve arkadaşları 2004 yılında PCR yönteminin ve geleneksel tanı yöntemleri karşılaşmak amacıyla KL şüpheli 49 hastadan aspirasyon sıvısı ve smear örnekleri almışlardır. Altın standart olarak klinik tanı ile PCR yönteminin duyarlılığını %83, mikroskopik inceleme ise %61 ve kültür yöntemi %44 olarak saptamışlardır [65]. Faber W.R ve arkadaşları 46 KL şüpheli hastalardan örnek alarak yayma, kültür ve PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. Faber W.R ve arkadaşları; mikroskopinin duyarlılığını %65, kültür %84, histopatoloji %82 olarak tespit ederken, PCR'ın duyarlılığının en yüksek olduğunu %100 bulmuşlardır [66]. Al-Jawabreh ve arkadaşları Temmuz 2002- Aralık 2003 yılları arasında 60 hastadan örnek alınarak mikroskop inceleme ve PCR yöntemini karşılaştırmak üzere incelenmişlerdir. PCR'ın duyarlılığı %87 ve mikroskop incelemenin duyarlılığını %49 olduğunu saptanmışlardır [67]. Çalışmamızda dünya çapında yapılan çalışmaların sonuçlarına uyumludur ve PCR yöntemini kullanarak tanı koymadaki duyarlılık mikroskopik incelemeye göre daha yüksektir.

Yıldız Zeyrek ve arkadaşları Şanlıurfa Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezine 62 KL şüpheli başvuran hastalardan örnek alınarak mikroskop bakısı, kültür yöntemi ve PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda elde ettikleri sonuçlara göre PCR ile 35 örnekte KL tanısı konulmuş ve %100 duyarlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Mikroskopik inceleme ise 25 örnekte tanı konulmuş ve %71.4 duyarlılıkla, kültür yöntemi ile 19 örnekte %54.3 duyarlılıkta tanı konulmuştur [68]. Ertabaklar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma, 2012-2014 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarı'na 55 KL şüpheli hastadan alınan örneklerde *Leishmaniaspp.* varlığı

saptamak için direkt mikroskop, kültür yöntemi ve PCR yöntemi kullanarak elde edilmiş sonuçları karşılaştırılmışlar. 55 örneğin 29'unda mikroskop incelemede amastigotları görülmüş, 34'ünde kültürde promastigotları saptanmış 30'unda PCR ile parazite ait özgül bant oluşumu gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, kültür yönteminin esas alınması durumunda, direkt mikroskop duyarlılığı %76.4 olduğunu ve PCR'nın duyarlılığı %85.3 olduğunu tespit etmişlerdir [69]. Çalışmamızda Türkiye'deki yapılan çalışmaların sonuçlarına uyumludur ve PCR yönteminin kullanarak mikroskopik incelemeye göre pozitiflik oranı daha yüksektir.

Akkafa F ve arkadaşları 2008 yılında, Türkiye'nin KL ile endemik illerden Şanlıurfa'da 51 KL şüpheli hastalardan yayma alarak, örneklerden hem mikroskopik inceleme hem de PCR yöntemi uygulamışlardır. Akkafa F ve arkadaşları KL tanısında PCR ile pozitiflik oranının mikroskopik incelemeye (% 64) göre %96 oranıyla daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir [70]. Culha G ve arkadaşları dermatoloji kliniğinde klinik olarak KL tanısı konulan 25 hastadan örnek alınarak geleneksel tanı yöntemleri ve PCR yöntemi kullanmışlardır. Elde edilmiş sonuçlara göre; 25 örnekten pozitif oranlar kültür, mikroskopi ve PCR için sırasıyla %44, %68 ve %100 olarak belirlenmiştir [71]. Çalışmamızda PCR yönteminde pozitiflik oranı mikroskopik incelemede kıyasıyla daha yüksek olduğunu saptandı, Akkaf ve arkadaşları, Culha ve arkadaşları elde edilen sonuçlarına uyumludur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'nin bazı bölgelerinde KL halen bir halk sağlığı sorunudur. KL hastalığının doğru tanısını koyabilmek için klinik tanı yanında laboratuvar yöntemleri kullanılmalıdır. Laboratuvardaki kullanılan KL tanı yöntemlerinin en fazla duyarlılık gösteren PCR yöntemidir. Mikroskopik inceleme daha az duyarlılık göstermektedir. Çalışmamızda bazı olgularda amastigotlar gözlenmemiştir. Taze hazırlanan NNN besiyerine ekim yapılmasına rağmen üreme gözlenmemiştir. Kültür yönteminin duyarlılığını çok düşük olması yanında çok zaman alıcı bir yöntemdir.

Suriye'de yaşanan savaştan dolayı KL vaka sayısı artışı Türkiye'ye yansımıştır. Mersin'de yapılan çalışmamızda KL tanısı alan vakaların çoğunun Suriyeli hastalar olduğu bulunmuştur. Ama çalışmamızda dahil edilen Suriyeli KL tanılı hastalar Türkiye genelindeki Suriyeli KL hastaların tamamını yansıtmamaktadır. Çünkü çok sayıda tanı konulmayan ve tedavi almayan olgu vardır. Bazı hastalar Türkçe dilini bilmediği ve iletişim kuramadığı için bazıları ise sosyal güvence ve maddi kaynak olmadığı için tedavi olamamaktadırlar. Bu sebeple Türkiye yönetimi tarafından kurulan Göçmen Sağlığı Merkezleri'nde KL şüpheli hastaların laboratuvar tanısı yapılması ve KL saptanan hastalarda düşük maliyetle tedavi sağlanmasını önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1]- Alemayehu, B., & Alemayehu, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, Vol.11 No.4:519.
- [2]- Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45,pp. 255–272.
- [3]- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and Leishmaniopathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*, 7: 170165.
- [4]- Harman, M. (2015). Kutanöz Leishmaniasis. *Türk J Dermatol*, 9:168-76.
- [5]- Uzun, S., Gürel, M. S., & Harman, M. (2017). Kutanöz Leishmaniasis Tanı Ve Tedavi Rehberi. *Türk Dermatoloji Dergisi*, İstanbul.
- [6]- Yılmazlı, Ö. (2013). Zingiber Officinale Ve Nigella Sativa'nın Leishmania Spp. Üzerine Anti-Leishmanial Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [7]- Aytekin, S. (2009). Kutanöz Leishmaniasiste Tedavi Yaklaşımları. *Türkderm*, 43: 44-7.
- [8]- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10.1186/s13071-017-2028-5.
- [9]- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015). Leishmaniosis (Leishmania infantum infection) in dogs. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34 (2), 613-626.
- [10]- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, DOI:10.1371/journal.pntd.0004349.
- [11]- <https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2006/Leishmaniasis/history.htm> (erişim tarihi 04/01/2021).
- [12]- Çakan, H. (2006). Visceral Leishmaniasis Tanısında Karşılaşılan Sorunlar. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- [13]- Atasoy, A. (2005). Ege Bölgesinde Köpeklerde Visceral Leishmaniasis'in Seroprevalansı. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- [14]- Özbel, Y., Töz, S. (2017). Leishmaniosis. In Tıbbi Parazit Hastalıkları 1 , META Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 198-230.
- [15]- Unat, E. K. (1981). "Leishmaniasislerin tarihçesi. In Leishmaniasis", Ş. Yaşarol, ed. (Ankara: Ulusal Parazitoloji Kongresi).
- [16]- Kuman, H. A., Altıntaş, N. (1996). "Protozoon Hastalıkları", (İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi).
- [17]- Eroğlu, F. (2008). Kutanöz Leishmaniasisli Hastalarda Etken Türlerin PCR-RFLP Yöntemi ile Tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [18]- Güneş, K. (2006). Klinik örneklerde PZR – RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Bölümünün Uzunluk Değişkenliği) Yöntemi kullanılarak Leishmania Parazitlerinin TÜR Tayini. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- [19]- Kima, P. E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol*, 37(10): 1087–1096.
- [20]- Roberts, D. J. (2018) In Hematology (Seventh Edition). Elsevier. Chapter 158 - Hematologic Aspects of Parasitic Diseases.
- [21]- Ateş, s. c. (2012). İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, *Leishmania* Parazitlerinin Yeni Mikrokültür Yöntemi Ve Diğer Yöntemler İle Karşılaştırmalı İncelenmesi. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [22]- Azizi, N. R. (2008). Bodrum Yarımadasında Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Araştırılması. Doktora Tezi, EGE Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [23]- <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (erişim tarihi: 05/01/2021).
- [24]- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* 392: 951–70.
- [25]- Cattand, P., Desjeux, P., Guzman, M. G., Jannin, J., Kroeger, A., Medici, A., Musgrove, P. Nathan, M. B., Shaw, A., & Schofield, C. J. (2016) Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition. Washington . Chapter 23 ,Tropical DiseasesLacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis.
- [26]- Haldar, A. K., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis:Current Status and Future Directions. *Molecular Biology International*, 571242, doi:10.4061/2011/571242.
- [27]- Masmoudi, A., Hariz, W., Marrekchi, S., Amouri, M., & Turki, H. (2013). Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep*, 2, pp 31-41.
- [28]- Romero, G. A. S., Guerra, M. V. F., Paes, M. G.,Cupolillo, E., Toaldo, C. B., Mace^do, V. O., & Fernandes, O. (2001). Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*. *Acta Tropica*, 225–229.
- [29]- Schwartz, E., Hatz, C., & Blum, J.(2006). New world cutaneous leishmaniasis in travellers. *Lancet Infect Dis*, 6:342–49.
- [30]- Unat, E. K., Yücel, A., Atlas, K., Samastı, M. (1995). Unat'ın Tıp Parazitolojisi 5. Baskı, İstanbul: Doyuran Matbası, 564-586.
- [31]- Cincur, 'a. C., Lima, C. M. F., Machado, P. R. L., Filho, J. O., Glesby, M. J.,Lessa, M. M., & Carvalho, E. M. (2017). Mucosal leishmaniasis: A Retrospective Study of 327 Cases from an EndemicArea of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 97(3),pp. 761–766.
- [32]- Zijlstra, E. E. (2014). PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infectedPatients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, e3258.
- [33]- Filho, E. A. F., Duarte, G., El-Beitune, P., Quintana, S. M., & Maia, T. L. (2004). Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 12:31 – 40.
- [34]- Hasker, E., Malaviya, P., Scholar, V. K., Koning, P., Singh, O. P., Kansal, S., Cloots, K., Boelaert, M., & Sunda, S. (2019). Post kala azar dermal leishmaniasis and leprosy prevalence and distribution in the Muzaffarpur health and demographic surveillance site. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(10): e0007798.
- [35]- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El-Hassan, İ. M., & El-Hassan, A. M. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis, *THE LANCET Infectious Diseases*, Vol 3 February.

- [36]- Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
- [37]- Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10): 925–932.
- [38]- <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (erişim tarihi: 05/01/2021).
- [39]- Özbilgin, A., Çulha, G., Uzun, S., Harman, M., Topal, S. G., Okudan, F., Zeyrek, F., Gündüz, C., Östap, İ., Karkuş, M., Töz, S., Kurt, Ö., Akyar, I., Erat, A., Güngör, D., Kaybaşı, Ç., Çavuş, I., Bastien, P., Pratlong, F., Kocagöz, T., & Özbek, Y. (2016). Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Tropical Medicine and International Health*, volume 21 no 6 pp 783–791.
- [40]- Çizmeci, Z., Karakuş, M., Karabela, Ş. N., Erdoğan, B., & Güleç, N. (2019). Leishmaniasis in Istanbul; A new epidemiological data about refugee leishmaniasis. *Acta Tropica*, 23–27.
- [41]- Özbilgin, A., Töz, S., Harman, M., Topal, S. G., Uzun, S., Okudan, F., Güngör, D., Erat, A., Ertabaklar, H., Ertug, S., Gündüz, C., Çavuş, İ., Karakuş, M., Ural, İ. Ö., Ölgün, M. K., Kaybaşı, Ç., Kurt, Ö., & Özbek, Y. (2019). The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. *Acta Tropica*, 59–67.
- [42]- Hayani, K., Dandashli, A., & Weis, E. (2015). Cutaneous Leishmaniasis in Syria: Clinical Features, Current Status and the Effects of War. *Acta Derm Venereol*, 95: 62–66.
- [43]- Muhjazi, G., Gabrielli, A. F., Ruiz-Postigo, J. A., Atta, H., Osman, M., Bashour, H., Tawil, A., Husseiny, H., Allahham, R., & Allan, R. (2019). Cutaneous leishmaniasis in Syria: A review of available data during the war years: 2011–2018. *PLoS Negl Trop Dis* 13(12): e0007827.
- [44]- Özbilgin, A., Harman, M., Karakuş, M., Bart, A., Töz, S., Kurt, Ö., Çavuş, İ., Polar, E., Gündüz, C., Gool, T. V., & Özbek, Y. (2017). Leishmaniasis in Turkey: Visceral and cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in Turkey. *Acta Tropica*, 90–96.
- [45]- Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2003). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*, vol 110 no 6.
- [46]- Vega-Lopez, F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 16:97–101.
- [47]- Zeyrek F. Y., Erdogan, D. D., Uluca, N., Tumer, S., & Korkmaz, M. (2012). Kutanöz Leishmaniasis Tanısında Serolojinin Yeri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, DOI:10.9775/kvfd.2011.6083.
- [48]- Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*, 16:99–109.
- [49]- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 11:273.
- [50]- Tsokana, C. N., Athanasiou, L. V., Valiakos, G., Spyrou, V., Manolakou, K., & Billinis, C. (2014). Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment. Chapter 8. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis; DOI: 10.5772/57448.
- [51]- Kahya, S., Buyukcangaz, E., & Carlı, K. T. (2013). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med*, 1: 31-38.
- [52]- Kadri, K. (2019). Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science, Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. DOI: 10.5772/intechopen.86491.

- [53]- Clarke, A. M. T., Mapstone, N. P., & Qurke, P. (1992). Molecular biology made easy the polymerase chain reaction. *Histochemical Journal*, 913-926.
- [54]- Health Technology Assessment Department, Health Technology Assessment Report on the Rapid Molecular Diagnostic Tests Used for Identifying the Causing Agent in the Blood Sample in Sepsis; 2019.
- [55]- Serin, M. S., Dalioglu, K., Bagirova, M., Allahverdiyev, A., Uzun, S., Vural, Z., Kayar, B., Tezcan, S., Yetkin, M., Aslan, G., Emekdas, G., & Koksall, 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*, 209 – 214.
- [56]- Korkmaz, S., Özgöztaşı, O., & Kayıran, N. (2015). Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Leishmaniasis Tanı ve Tedavi Merkezine Başvuran Kutanöz Leishmaniasis Olgularının Değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 39: 13-6.
- [57]- Cömert-Aksu, M., Deniz, S., Togay, A., & Güneş, F. (2020). Mersin ilinde 2010-2015 yılları arasında tanı konulan kutanöz leishmaniasis olgularının epidemiyolojik olarak değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 77(2): 139-148.
- [58]- Inci, R., Ozturk, P., Mulayim, M. K., Ozyurt, K., Alatas, E. T., & Inci, M. F. (2015). Effect of the Syrian Civil War on Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Anatolia, Turkey. *Med Sci Monit*, 21: 2100-2104.
- [59]- Özkeklikçi, A., Karakuş, M., Özbel, Y., Töz, S. (2017). The new situation of cutaneous leishmaniasis after Syrian civil war in Gaziantep city, Southeastern region of Turkey. *Acta Tropica*, 35–38.
- [60]- Salman, İ. S., Vural, A., Ünver, A., Saçar, S. (2014). Suriye İç Savaşı Sonrası Nizip'te Kutanöz Leishmaniasis Olguları. *Mikrobiyol Bul*, 48(1): 106-113.
- [61]- Alawieh, A., Musharrafieh, U., Jaber, A., Berry, A., Ghosn, N., & Bizri, A. R. (2014). Revisiting leishmaniasis in the time of war: the Syrian conflict and the Lebanese outbreak. *International Journal of Infectious Diseases*, 115–119.
- [62]- Koltasa, I. S., Eroglu, F., Alabaz, D., & Uzun, S. (2014). The emergence of Leishmania major and Leishmania in southern Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 108: 154–158.
- [63]- Charguia, N., Bastien, N., Kallel, K., Haouasa, N., Akroute, M., Masmoudif, A., Zili, J., Chakerd, E., Othman, A. D. B., Azaieza, R., Crobuc, L., Mezhouda, H., & Babbaa, H. (2005). Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (99) 762—768.
- [64]- Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F., & Harris, E. (1999). PCR detection and identification of Leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods. *Journal of Parasitology*, 85(2):181-187.
- [65]- Wortmann, G., Romero, L., Roz, H. M., Ortega, E., Bayard, V., Hochberg, L. P., & Ryan, J. R. (2004). Real time polymerase chain reaction diagnosis of Leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (98):148-151.
- [66]- Faber, W. R., Oskam, L., Gool, T. V., Kroon, N. C. M., Knecht-Junk, K. J., Hofwegen, H., Wal, A. C., & Kager, P. A. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *American Academy of Dermatology*, 0190-9622.

- [67]- Al-Jawabreh, A., Schoenian, G., Hamarsheh, O., & Presber, W. (2006). Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Tropica*, (99) 55–61.
- [68]- Zeyrek, F. Y., Töz, S., Yüksel, F., Turgay, N., & Özbel, Y. (2017). Comparison of polymerase chain reaction using kinetoplast DNA specific primers and other parasitological methods in the diagnosis of clinical samples of suspected patients with cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa. *Mikrobiyol Bul*, 51(4):340-349. doi: 10.5578/mb.61840.
- [69]- Ertabaklar, H., Çalışkan, S. Ö., Boduç, E., & Ertuğ, S. (2015). Comparison of direct microscopy, culture and polymerase chain reaction methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Mikrobiyol Bul*, 49(1):77-84.
- [70]- Akkafa, F., Dilmec, F., & Alpua, Z. (2008). Identification of Leishmania parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitol Res*, 103:583–586.
- [71]- Culha, G., Uzun, S., Ozcan, K., Memisoglu, R. H., & Chang, P. K. (2006). Tropical medicine rounds Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey. *International Journal of Dermatology*, 45, 569–572.

EK.1: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (ERİŞKİN SAĞLIKLI/HASTA GÖNÜLLÜLER İÇİN)

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran kutanöz leishmaniasis şüpheli olgulardan Leishmania parazitinin araştırılması ve epidemiyolojik yönden değerlendirilmesi amacıyla bir araştırma yapacağız. Bu araştırma toplam 12 ay sürecektir. Ayrıca, bu çalışmaya sizden başka 7 erişkin hasta kişi daha katılacaktır.

Bu çalışmaya sizin de katılmanı istiyoruz, ancak katılmaya karar vermeden önce bazı şeyleri bilmeniz ve anlamanız gerekiyor. Size öncelikle çalışma sırasında neler olacağı açıklanacaktır. Size söylenen herşeyi anladıktan sonra bu çalışmaya katılıp katılmayacağınıza karar vermelisiniz.

Sorumlu araştırmacı Yüksek Lisans öğrencisi size bilgileri dikkatli bir şekilde okuyacaktır. Eğer anlamadığınız bir şey olursa sorumlu araştırmacıya istediğiniz kadar soru sorabilirsiniz.

Çalışmaya katılmaya "evet" dersanız ve isterseniz bu formu imzalayabilirsiniz. Çalışmaya katılmayı ya da katılmamayı seçebilirsiniz. İstemediğiniz zaman çalışmadan ayrılabilirsiniz.

Çalışmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak sizin açınızdan hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında, ayrıca eğer çalışma sırasında farklı bir durum gelişirse size hemen haber verilecektir. O zaman da istediğinizde sorumlu araştırmacıya çalışmadan ayrılmak istediğinizi söyleyebilirsiniz. Kimse sizi zorlayamaz.

Bu çalışmaya neden ben seçildim?

Sizde kutanöz leishmaniasis şüpheli olduğu için bu çalışmaya katılmanız istenmektedir.

Bu çalışmaya katılmamın yararları nelerdir?

Bu çalışmaya katılmanız durumunda kutanöz leishmaniasis hastalığı olan diğer kişilerin hastalıklarının tedavisine yardımcı olacak bilgiler edinmeyi umuyoruz.

Bu çalışmada bana ne olacak?

Eğer bu çalışmaya katılmayı kabul ederseniz, size şüpheli lezyonunuzdan kazıntı ve aspirat alanacaktır. Ayrıca, sizden en fazla 1 ml (yaklaşık 1/8 çorba kaşığı kadar) aspirat sıvısı vermeniz istenecektir. Alınan aspirat sıvısı ölçümü için kullanılacaktır. Sizden alınan aspirat sıvısı ilerde yapılan çalışmalarda kullanılabilir. Bu çalışmada uygulanacak işlemlerin istenmeyen riskleri kontaminasyondur. Bu istenmeyen riskleri önlemek için aspirat steril koşullarda yapılacaktır.

Bu çalışmaya katılmak zorunda mıyım?

Bu çalışmaya katılıp katılmamak isteğinize bağlıdır. Kararınızı vermeden önce, bu araştırmaya katıldığınız için size para veya hediye verilmeyeceğini bilmeniz gerekir. Şimdi "evet" deseniz de, istediğiniz zaman "istemiyorum" diyerek bu araştırmadan çıkabilirsiniz. Bunu yalnızca sorumlu araştırmacıya söylemeniz yeterlidir.

Bu çalışmaya katıldığımı başkaları da bilecek mi?

Sizin kimliğinizi ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak ve kamuoyuna açıklanmayacaktır. Sizin dışınızda yalnızca tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilecek olan kişiler (araştırma ekibindeki kişiler dışında araştırmanın yapılmasına onay ve izin verecek olan Etik Kurul ve Sağlık Bakanlığı gibi) bu çalışmaya katıldığınızı bilecektir. Ancak, çalışmanın her aşamasında olduğu gibi çalışmanın sonuçları yayınlanırken bile bütün bilgileriniz gizli tutulacaktır. Bu form sizin tarafınızdan imzaladığında sizinle ilgili bütün bilgilere ulaşabileceksiniz. Bu çalışmadan sorumlu araştırmacıya sorduktan sonra, eğer o izin verirse, bu araştırmaya katıldığınızı kendi özel doktorunuza söyleyebilirsiniz.

Ne yapmak zorundayım?

Size yapılacak herşeyi anladıysanız, şimdi sizden bu araştırmaya katılmak istediğinize ilişkin imza atmanız istenecektir. Bu size açıklandığı haliyle çalışmaya özgürce katıldığınızı gösterecektir. İmzaladığınız bu formun bir kopyası da sizde kalacaktır.

Canınızı sıkan veya merak ettiğiniz bir şey olursa mesai saatleri içinde 0000 000000 numaralı telefondan Yüksek Lisans öğrencisi , 'yı arayabilir ve istediklerinizi sorabilirsiniz.

Olur verme beyanı

Toplam 3 sayfa olan bu formdaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen Yüksek lisans öğrencisi Aya ALSHEKISSA adlı araştırmacı tarafından yapıldı. Bu araştırmanın amacını ve ne yapılacağını anladım. Bu çalışmada bana ne olacağını, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi, kimlik bilgilerimin gizli tutulacağını ve imzaladığım bu formun bir kopyasının bana verileceğini biliyorum. Bu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katıldığımı kabul ediyorum.

Gönüllünün

Adı Soyadı :

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Bağımsız tanığın [gönüllü okur-yazar olmadığı için imzalı onay veremiyorsa vb. durumlarda]

Adı Soyadı :

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Bu çalışmada benden alınan biyolojik materyalin/verinin:

☐ Yalnızca yukarıda adı geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

☒ İleride yapılması planlanan araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

☐ İleride yapılması planlanan araştırmalarda hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Formdaki bilgileri vererek gerekli açıklamaları yapan ve olur alan araştırmacının

Adı Soyadı : AYLA ALSHEKISSA

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Adresi :

Yeni Mersin Kampüsü

Telefon numarası :

Acil tıbbi durumlarda iletişime geçilecek kişinin

Adı Soyadı : AYLA ALSHEKISSA

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Adresi : Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin

Araştırmaya onay veren Etik Kurulun

.....
.....
.....
.....
.....

EK 2: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (PEDIATRİK SAĞLIKLI/HASTA GÖNÜLLÜLER İÇİN)

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma Uygulama Hastanesi Dermatoloji Polikliniği'ne başvuran kutanöz leishmaniasis şüpheli olgulardan Leishmania parazitinin araştırılması ve epidemiyolojik yönden değerlendirilmesi amacıyla bir araştırma yapacağız. Bu araştırma toplam 12 ay sürecektir. Ayrıca, bu çalışmaya senden başka 9 çocuk daha katılacaktır.

Bu çalışmaya senin de katılmanı istiyoruz, ancak katılmaya karar vermeden önce bazı şeyleri bilmen ve anlamın gerekiyor. Sana öncelikle çalışma sırasında neler olacağı açıklanacaktır. Sana söylenen herşeyi anladıktan sonra bu çalışmaya katılıp katılmayacağına karar vermelisin.

Annen/baban/yasal temsilcin sana bilgileri dikkatli bir şekilde okuyacaktır. Eğer anlamadığın bir şey olursa annene/babana/yasal temsilcine veya sorumlu araştırmacı Yüksek Lisans öğrencisi . . . istediğin kadar soru sorabilirsin.

Çalışmaya katılmaya "evet" dersen ve istersen bu formu imzalayabilirsin. Çalışmaya katılabilmen için annenin/babanın/yasal temsilcinin de kabul etmesi ve bu formu imzalaması istenecektir. Çalışmaya katılmayı ya da katılmamayı seçebilirsin. İstemediğin zaman çalışmadan ayrılabilirsin.

Çalışmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak senin açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında, ayrıca eğer çalışma sırasında farklı bir durum gelişirse sana ve annene/babana/yasal temsilcine hemen haber verilecektir. O zaman da istediğinde sorumlu araştırmacıya veya annene/babana/yasal temsilcine "ben bunları istemiyorum" diyebilirsin. Kimse seni zorlayamaz.

Bu çalışmaya neden ben seçildim?

Sende kutanöz leishmaniasis şüpheli olduğu için bu çalışmaya katılman istenmektedir.

Bu çalışmaya katılmamın yararları nelerdir?

Bu çalışmaya katılman durumunda kutanöz leishmaniasis hastalığı olan diğer çocukların hastalıklarının tedavisine yardımcı olacak bilgiler edinmeyi umuyoruz.

Bu çalışmada bana ne olacak?

Eğer bu çalışmaya katılmayı kabul edersen, sana şüpheli lezyonunuzdan kazıntı ve aspirat uygulanacaktır. Ayrıca, senden en fazla 1 ml (yaklaşık 1/8 çorba kaşığı kadar) aspirat vermek istenecektir. Alınan aspirat sıvısı ölçümü için kullanılacaktır. Senden alınan aspirat sıvısı ileride yapılan çalışmalarda kullanılabilir. Bu çalışmada uygulanacak işlemlerin istenmeyen riskleri kontaminasyondur. Bu istenmeyen riskleri önlemek için aspirat steril koşullarda yapılacaktır.

Bu çalışmaya katılmak zorunda mıyım?

Bu çalışmaya katılıp katılmamak senin ve annenin/babanın/yasal temsilcinin isteğine bağlıdır. Çalışmaya katılmak istemezsen sana hiç kimse kızmayacaktır. Ayrıca, kararını vermeden önce, bu araştırmaya katıldığın için sana para veya hediye verilmeyeceğini bilmen gerekir. Şimdi "evet" desen de, istediğin zaman "istemiyorum" diyerek bu araştırmadan

çıkabilirsin. Bunu yalnızca sorumlu araştırmacıya veya annene/babana/yasal temsilcine söylemen yeterlidir.

Bu çalışmaya katıldığımı başkaları da bilecek mi?

Senin kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar gizli tutulacak ve kamuoyuna açıklanmayacaktır. Senin annen/baban/yasal temsilcin dışında yalnızca tıbbi kayıtlarına doğrudan erişebilecek olan kişiler (araştırma ekibindeki kişiler dışında araştırmanın yapılmasına onay ve izin verecek olan Etik Kurul ve Sağlık Bakanlığı gibi) bu çalışmaya katıldığını bilecek. Ancak, çalışmanın her aşamasında olduğu gibi çalışmanın sonuçları yayınlanırken bile bütün bilgilerin gizli tutulacak. Bu form sen ve annen/baban/yasal temsilcin tarafından işaretlendiğinde/imzaladığında, seninle ilgili bütün bilgilere ulaşabileceksiniz. Bu çalışmadan sorumlu araştırmacıya sorduktan sonra, eğer o izin verirse, bu araştırmaya katıldığını kendi özel doktoruna sen veya annen/baban/yasal temsilcin söyleyebilir.

Ne yapmak zorundayım?

Sana yapılacak herşeyi anladıysan şimdi senden bu araştırmaya katılmak istiyorsan aşağıya bir işaret koyman veya imza atman istenecektir. Bu sana açıklandığı haliyle çalışmaya özgürce katıldığını gösterecektir. Bu işaret koyduğun veya imzaladığın bu formun bir kopyası da sende kalacaktır.

Canını sıkan veya merak ettiğin bir şey olursa mesai saatleri içinde numaralı telefondan veya günün 24 saatinde ulaşabileceğin numaranı telefonun
Yüksek lisans öğrencisi ya da annen/baban/yasal temsilcin arayabilir ve istediklerini sorabilirsin

Olur verme beyanı

Toplam 3 sayfa olan bu formdaki tüm açıklamaları annem/babam/yasal temsilcim bana okudu. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırmayla ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtile Yüksek lisans öğrencisi [Adı Soyadı] adlı araştırmacı tarafından yapıldı. Bu araştırmanın amacını ve ne yapılacağını anladım. Bu çalışmada bana ne olacağını, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi, kimlik bilgilerimin gizli tutulacağını ve işaretlediğim/imzaladığım bu formun bir kopyasının bana verileceğini biliyorum. Bu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katıldığımı kabul ediyorum.

Çocuğun

Adı Soyadı :
İmzası :
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Annenin ve babanın veya yasal temsilcinin

Adı Soyadı :
İmzası :
Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Bağımsız tanığın [gönüllü okur-yazar olmadığı için imzalı onay veremiyorsa vb. durumlarda]

Adı Soyadı :

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

Bu çalışmada benden alınan biyolojik materyalin/verinin:

- ☐ Yalnızca yukarıda adı geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.
- ☒ İleride yapılması planlanan araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- ☐ İleride yapılması planlanan araştırmalarda hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Formdaki bilgileri vererek gerekli açıklamaları yapan ve olur alan araştırmacının

Adı Soyadı : Aya ALSHEKISSA

İmzası :

Tarih (Gün/Ay/Yıl) :

.....

Araştırmaya onay veren Etik Kurulun

..

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı :

Doğum Tarihi :

E-mail :

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans			
Yüksek Lisans			
Doktora			

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayınız)

Görevi	Kurum	Yıl
-		

YAYINLAR (Makaleler/Bildiriler/Ödüller)

1.-