



T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Leishmania spp. Plasmodium spp. ve Toxoplasma gondii*'NİN
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİRLEME
TEPKİMESİ İLE TANISI: LİMİT SAPTAMA**

TUBA OYUR KURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN**

MANİSA - 2016



**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Leishmania* spp. *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii*'NİN
GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİRLEME
TEPKİMESİ İLE TANISI: LİMİT SAPTAMA**

TUBA OYUR KURT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN**

**JÜRİ ÜYELERİ
Prof. Dr. Nogay GİRGİNKARDEŞLER
Prof. Dr. Mucide AK
MANİSA - 2016**

Tuba OYUR	CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.	YÜKSEK LİSANS TEZİ	MANİSA - 2016
------------------	---	---------------------------	----------------------

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar hiçbir safhada etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

TUBA OYUR

TEŞEKKÜR

Bu tezin en başından itibaren fikir ve tavsiyeleriyle bana destek olan, yol gösteren yüksek lisans tez danışmanım sayın Prof. Dr. Ahmet Özbilgin'e; Parazitoloji anabilim dalının olanaklarından yararlanmamı sağlayan Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Nogay Girginkardeşler'e; laboratuvar uygulamaları ve hücre sayım işlemleri sırasında bana destek ve yardımcı olan sayın İbrahim Çavuş'a; sadece tez değil tüm çalışmalarımda beni destekleyip motive eden, gerektiğinde de her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan eşim Özgür Kurt, annem Selda Oyur, babam Hüseyin Nail Oyur ve kardeşim Buğra Oyur'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

TUBA OYUR
Manisa, 2016

TABLO DİZİNİ

Tablo 1.	Parazit türlerine göre GZ-PRZ saptanan en düşük parazit sayısı	51
-----------------	--	-----------



ŞEKİL VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1.	<i>Leishmania infantum</i> amastigot formu	7
Şekil 2.	<i>Leishmania</i> promastigot formu	8
Şekil 3.	<i>Leishmania</i> 'nın kum sineğindeki hayat döngüsü	10
Şekil 4.	<i>Leishmania</i> 'nın omurgalıdaki hayat döngüsü	10
Şekil 5.	<i>Plasmodium</i> 'ların şizogonik ve sporogonik evrimi	25
Şekil 6.	<i>Toxoplasma gondii</i> 'nin evrimi	36
Şekil 7.	Gerçek zamanlı PZR testinin çalışma prensibinin şematik gösterimi	46
Şekil 8.	Örneklerin dilüsyonu yapılarak GZ-PZR'ye hazırlanması	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CBÜ	: Celal Bayar Üniversitesi
VL	: Visseral leishmaniasis
KL	: Kutanöz leishmaniasis
MKL	: Mukokutanöz leishmaniasis
PKDL	: Post kala azar dermal leishmaniasis
ZKL, ZCL	: Zoonotik kutanöz leishmaniasis
<i>L.tropica</i>	: <i>Leishmania tropica</i>
<i>L.major</i>	: <i>Leishmania major</i>
<i>L.infantum</i>	: <i>Leishmania infantum</i>
<i>L.donovani</i>	: <i>Leishmania donovani</i>
GZ-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi
ITS	: İnternal transcribed spacer
DAT	: Direkt aglütinasyon testi
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor testi
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
Spp	: Species
ELİSA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
LAT	: Lateks Aglutinasyon Testi
ISAGA IgM	: Immunosorbent Agglutination Testi

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. <i>Leishmania</i> 'ların Taksonomisi	6
4.2. Morfoloji	7
4.3. Evrim	8
4.4. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi	11
4.4.1. Dünya'daki Dağılımı	11
4.4.2. Türkiye'deki Dağılımı	12
4.5. Leishmaniasis'te Klinik ve Patoloji	13
4.5.1. Visseral Leishmaniasis	14
4.5.2. Kutanöz Leishmaniasis	15
4.5.2.1. Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasisi	15
4.5.2.2. Yeni Dünya Kutanöz Leishmaniasisi	16
4.6. Tanı	16
4.6.1. Klinik ve Ayırıcı Tanı	16
4.6.2. Etkensel Tanı	17
4.6.2.1. Boyama Yöntemleri	17
4.6.2.2. Besiyerleri	18
4.6.2.3. Deney Hayvanları	19
4.6.2.4. Moleküler Yöntemler	20
4.6.2.5. Seroloji	21
4.6.2.6. Diğer Yöntemler	22
4.7. <i>Plasmodium</i> 'ların Tarihçesi ve Sınıflandırması	22
4.8. <i>Plasmodium</i> 'ların Evrimi	23
4.9. Sıtmanın Epidemiyolojisi	26
4.9.1. Dünyada Sıtmanın Durumu	26
4.10. Sıtmada Patogenez ve Klinik Belirtiler	26
4.11. Tanı	31
4.11.1. Ayırıcı Tanı	31
4.11.2. Laboratuvar Tanısı	31
4.12. <i>Toxoplasma gondii</i> 'nin Sınıflandırması	32
4.13. <i>Toxoplasma gondii</i> Morfolojisi	32

4.14.	<i>Toxoplasma gondii</i> Evrimi	34
4.15.	<i>Toxoplasma gondii</i> 'nin Epidemiyolojisi	36
4.16.	Toksoplasmosis'de Klinik ve Patoloji	37
4.17.	Toksoplasmosis'de Tanı	37
4.17.1.	Etyolojik Tanı	37
4.17.2.	Serolojik Yöntemler	39
4.17.2.1.	Sabin Feldman Boya Testi	40
4.17.2.2.	İndirekt Fluoresan Antikor Yöntemi (IFAT)	41
4.17.2.3.	Direkt Aglutinasyon Yöntemi (DA)	42
4.17.2.4.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	42
4.17.2.5.	Lateks Aglutinasyon Testi (LAT)	43
4.17.2.6.	Immunosorbent Aglutinasyon Testi (ISAGA IgM)	44
4.17.3.	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PZR) yöntemi	44
4.18.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (GZ-PZR) Yöntemi	45
5.	GEREÇLER VE YÖNTEMLER	47
5.1.	Örneklerin Eldesi	47
5.2.	Parazitlerin DNA İzolasyonu	48
5.3.	Parazitlerin PZR Yöntemi	49
6.	BULGULAR	51
7.	TARTIŞMA	52
8.	SONUÇ VE ÖNERİLER	59
9.	KAYNAKLAR	61
10.	ÖZGEÇMİŞ	73
11.	EKLER	77
11.1.	Etik Kurul İzni	78
11.2.	Yüksek Lisans Tez Çalışması Orjinallik Raporu	79
11.3.	C.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı	81

Başlık: *Leishmania* spp. *Plasmodium* spp. ve *Toxoplasma gondii*'nin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Tepkimesi ile Tanısı: Limit Saptama

Öğrencinin Adı: Tuba OYUR

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN

Anabilim Dalı: Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı

1. ÖZET

AMAÇ: Kan ve dokularda yerleşen paraziter hastalıklar insan sağlığı için dünya çapında büyük tehlike oluşturmaktadır. Bu gibi durumlarda tanı genellikle duyarlılık ve özgünlüğü yüksek polimeraz zincirleme tepkimesi (PZR) ile konulabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, Türkiye için önemli üç parazitin (*Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. ve *T. gondii*) GZ-PZR ile tanısında örneğin mikrolitresinde en az kaç parazit bulunduğunda sonuç alınabildiğinin belirlenebilmesi, test koşullarının belirlenip protokolün oluşturulması suretiyle GZ-PZR testinin rutin sağlık hizmetlerine dahil edilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışma için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda sıvı azot içinde -196°C'de saklanmakta olan *Leishmania tropica* ve *L. infantum*, *P. falciparum* ve *P. vivax* ile *T. gondii* parazitleri canlandırılmış ve her biri mililitrede 10^7 parazit olacak şekilde PBS solüsyonu ile süspanse edilmişlerdir. Bu karışımdan parazitlerin PBS solüsyonu mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyon yapılmıştır. Daha sonra bu tüpler tek tek kullanılarak farklı GZ-PZR ile reaksiyonun pozitif sonuç verdiği en ileri dilüsyon tespit edilmiştir.

BULGULAR: Yapılan GZ-PZR testinde *P. falciparum*, *L. tropica* (promastigot), *L. infantum* (promastigot), *L. tropica* (amastigot), *L. infantum* (amastigot) parazitlerinde en düşük parazit sayısı 10 olarak bulunurken, *P. vivax*, *T. gondii* parazitlerinde parazit sayısı 12 olarak bulunmuştur.

SONUÇLAR: *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. ve *T. gondii*'nin GZ-PZR ile tanısında örneklerdeki düşük sayıdaki parazitleri bile başarı ile saptaması bu testin her üç parazitin moleküler tanısında güvenle kullanılabilineceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler : *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, PZR, Tanı, Türkiye

Title of thesis: Diagnosis of *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. and *Toxoplasma gondii* with Polymerase Chain Reaction: Limit Determination

Student's name: Tuba OYUR KURT

Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN

Department: Medical Parasitology

2. ABSTRACT

AIM: Parasitic diseases that involve blood and tissues may pose a significant threat to human health. Among these, malaria, leishmaniasis and toxoplasmosis kill thousands of people worldwide. The aim of the present study is to determine the lowest number of parasites at when the RT-PCR for each *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. and *T. gondii* turn from negative to positive results, and thus allocate the standards of these RT-PCR applications to routine health services after the conditions are settled.

MATERIALS AND METHODS: Isolates of *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Toxoplasma gondii* kept in liquid nitrogen at -196°C in Celal Bayar University Faculty of Medicine Department of Parasitology were revived and suspensions of each were prepared with PBS having 10⁷ parasites in a mililitre. Serial dilutions were then prepared from each isolate having 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 and 10.000 parasites in a mililitre. Real Time PCR (RT-PCR) tests were conducted with each dilution with an aim to determine the highest dilution with the positive outcome.

RESULTS: Our assessments showed that the lowest number of parasites necessary for positive RT-PCR were 10 for *Plasmodium falciparum*, *Leishmania tropica* (promastigotes), *Leishmania infantum* (promastigotes), *Leishmania tropica* (amastigotes), *Leishmania infantum* (amastigotes), while 12 for *Plasmodium vivax* and *Toxoplasma gondii*.

CONCLUSIONS: These results show that, RT-PCR is a reliable diagnostic option for the detection of *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp. and *Toxoplasma gondii*, even for infections with low parasitemia.

Key Words : *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii*, PCR, Diagnosis, Turkey

3. GİRİŞ

Paraziter hastalıkların tanısında mikroskopik incelemeden, serolojiye, kültürden, PZR'ye çok sayıda farklı yöntem kullanılmaktadır. Çalışılan hasta örneğinin nitelikleri, enfeksiyonun tuttuğu bölge, örnek alımı ve kurumun bütçesi gibi çok sayıda değişken tanı yöntemlerinin seçiminden uygulamaya büyük etki göstermektedir. Son yıllarda mikrobiyolojinin çoğu alanında olduğu gibi parazitolojide de PZR gibi moleküler tanı yöntemleri yaygın olarak tercih edilmeye başlanmıştır. Bunun başlıca nedenleri arasında PZR'nin yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, hastalara hızlı sonuç verilebilmesi ve az miktarda örnekle dahi iyi sonuç alınabilmesi sayılabilir. Günümüzde Hollanda gibi bazı gelişmiş Batı ülkelerinde, PZR intestinal parazitlerin rutin tanısında, maliyet olarak mikroskobiden daha ekonomik olduğundan ilk sırada kullanılmaya başlanmıştır. Bununla birlikte, gelişmekte olan ülkeler için PZR halen diğer yöntemlerden daha pahalıdır. Ayrıca PZR'nin özel bir laboratuvar, cihazlar ve özel eğitilmiş personel gerektirmesi ve mikroskopi gibi tek bir incelemede yüzlerce paraziter etkeni saptayamaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda PZR'nin tanısız duyarlılığının hafif enfeksiyonlu olguların tanısı için dahi yeterli olduğu, diğer yöntemlerle saptanamayan birçok etkenin PZR ile saptandığı bilinmektedir. Buna en iyi örneklerden biri *Dientamoeba fragilis* isimli bağırsak protozoonudur. Trikrom boyalı preparatlar ile kültür yönteminin kullanıldığı özel bir çalışmada bile insidansı %5'in altında saptanan bu protozoonun PZR ile üstelik Danimarka gibi genel olarak intestinal parazitlerin insidansının düşük olduğu bir ülkede dahi %43 olarak saptanması dikkat çekici bulunmuştur (Röser ve arkadaşları, 2013).

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü tarafından altı önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen ve dünyada her yıl tahminen 1,3 milyon yeni vaka ve 200 – 300 bin kişinin ölümüne yol açtığı sanılan önemli bir enfeksiyondur. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olup enfekte *Phlebotomus* veya

Lutzomyia cinsi tatarcıklar (yakarca) tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadırlar (Unat ve ark, 1995).

Sıtma, leishmaniasis ve toksoplazmoz tüm dünyada insan sağlığını etkileyen önde gelen paraziter hastalıklar arasındadır. Yapılan araştırmalar, dünyada her yıl yaklaşık 2 milyon kişinin ve her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle hayatını kaybettiğini; dünya nüfusunun %40'ının sıtma riski altında olduğunu ve her yıl 300-350 milyon insanın enfeksiyonu aldığını göstermektedir. Bunun yanında, özellikle immünsüpresif hastalar ile gebeler için ciddi bir sağlık tehdidi olan toksoplazmoza dünya nüfusunun %13'ünde rastlanılmaktadır. Nitekim 1976 yılı itibariyle toksoplazmosis seroprevalansının 500 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Unat ve ark, 1995).

Bu üç parazitin neden olduğu enfeksiyonun tanı yöntemleri incelendiğinde, deri leishmaniasis'inde altın standart olarak sağlam deri ile lezyonun birleştiği bölgeden iğne aspirasyonu ile alınan materyalin, VL hastalarında ise dalak veya kemik iliği aspirasyon materyalinden yapılan yayma preparatların Wright veya Giemsa boyama yöntemi ile boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin NNN besiyerine ekilerek promastigotların üretilmesiyle tanı konulması altın standarttır. Sıtmada ise altın standart parmak ucundan alınan kandan ince yayma ve kalın damla preperat hazırlayıp Giemsa ile boyayıp mikroskopta incelenmesidir. Toksoplazmosis için seroloji en çok tercih edilen tanı yöntemidir; bununla birlikte, özellikle serolojik sonuçların şüpheli bulunduğu gebelerde amniyon sıvısından yapılan PCR güvenle kullanılmaktadır.

Moleküler biyolojik yöntemler mikrobiyolojik hastalıkların tanısına büyük katkı sağlamış, enfeksiyon ajanlarının saptanması polimeraz zincirleme tepkimesi (PZR) ile çok daha özgün ve duyarlı olmuştur.

Bu çalışmanın amacı, Türkiye için önemli üç kan ve doku parazitin (*Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.* ve *Toxoplasma gondii*) gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) ile tanısında örnekte en az kaç parazit bulunduğu sonuc alınabildiğinin belirlenebilmesi, test koşullarının belirlenip protokolün oluşturulması suretiyle testin

rutin sağlık hizmetlerine dahil edilmesidir. Bu amaçla, çalışmamızda insan sağlığını tehdit eden önemli enfeksiyonların etkenlerinden *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* ve *Toxoplasma gondii*'nin PZR ile tanısındaki duyarlılık düzeyi, örneklerde en az kaç parazit bulunduğunda testin pozitif sonuç verdiğinin saptanması suretiyle belirlenmiş ve bu üç parazite PZR ile tanı konulmasındaki standartlar saptanmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Leishmania*'ların Taksonomisi

Leishmaniasis'de insan enfeksiyonu 30 *Leishmania* türünün 21'i tarafından oluşturulmaktadır. Bu farklı türler morfolojik olarak ayırt edilememekte ancak izoenzim analizleri, moleküler metodlar ve monoklonal antikorlar kullanılarak ayırımları gerçekleştirilmektedir.

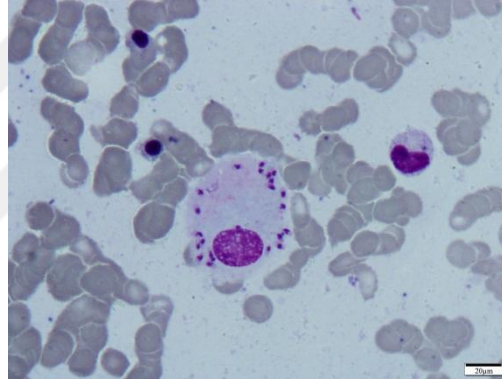
Soğukkanlı hayvanlarda görülen ve vektör kum sineklerinin *Sergentomyia* cinsine ait olan sinekleri bulaştıran *Leishmania* türleri de bulunmaktadır (Unat ve ark, 1995).

Regnum	: Protista
Phylum	: Mastigophora
Subphylum	: Oligomastigophora
Classis	: Kinetoplastidea
Ordo	: Kinetoplastida
Subordo	: Trypanosomatin
Familia	: Trypanosomatidae
Genus	: <i>Leishmania</i>
Subgenus	: <i>Leishmania</i>
Tür	: <i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. mexicana</i> , (<i>L. amazonensis</i> , <i>L. venezuelensis</i> , <i>L. pifanoi</i> , <i>L. enrieti</i>)

4.2. Morfoloji

Leishmania cinsine ait türlerin yaşam devrelerinde memeli konakta görülen “amastigot” ve vektörde görülen “promastigot” form olmak üzere morfolojik olarak farklı iki form bulunmaktadır.

Amastigot: Bu form; 2,5-6,8 μm büyüklüğünde, yuvarlak veya oval şekilli, hareketsiz ve 37°C’de uzunlamasına bölünerek çoğalan yapıdadır. Eski kitaplarda “Leishman-Donovan Cismi” olarak da anılmaktadır. Parçalı çekirdekli lökositler, monositler ve endotel hücreleri içinde tek ya da gruplar halinde veya hücre dışında görülebilmektedirler. Sitoplazmada arka uca yakın büyük bir nukleus ve nukleusa bitişik kinetoplast bulunmaktadır. (Şekil 1)



Şekil 1. *Leishmania infantum* amastigot formu (1000 X).

Promastigot: Bu form ise, 15-20 μm boyun-da, 1,5-5 μm genişlikte mekik şeklinde olup bir kamçısı bulunmakta, vektörde 27 °C’de uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır. Vektörü olan kum sineklerinin (sand flies) bağırsaklarında ve amastigot formlarının uygun besiyerlerinde şekil değiştirmesinden sonra görülen formdur. Kamçının bağlantı noktasında yer alan çukurluğa “kamçı paketi” adı verilmektedir. Kinetoplastın ön kısmında ve kamçının dip kısmında bleforablast bulunmaktadır. Ön uçta yuvarlak veya at nalı şeklinde bir kinetoplast, merkezi bir nukleus ve nukleolus ve nukleus membranında da porlar bulunmaktadır (Şekil 2) (Scholtyseck, 1979; Özbel ve arkadaşları, 2007).



Şekil 2. *Leishmania* promastigot formu (1000 X).

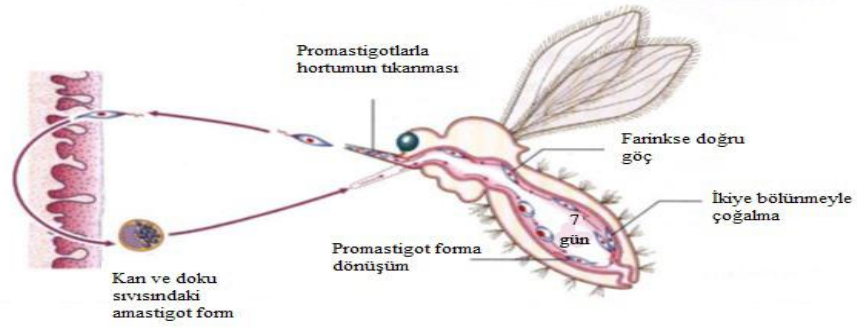
Nükleer DNA’da ITS (Internal transcribed spacer) adı verilen özel gen bölgeleri bulunmaktadır. ITS gen bölgesinin ITS1 ve ITS2 olarak iki ayrı bölümü mevcuttur. ITS1 bölgesi daha kısa olması nedeniyle tanıda daha hassas sonuçlar vermekte ve bu bölgenin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (RFLP) ya da sekans analizi sonucunda *Leishmania* parazitinin tür tayini de mümkün olmaktadır. ITS1 ve ITS2 gen bölgeleri, SSU (small sub-unit) rRNA ve LSU (large sub-unit) rRNA genleri arasında bulunmaktadır. Bu iki gen bölgesini de 5.8S rRNA geni ayırmaktadır (Markell ve ark, 1999).

4.3. Evrim

Leishmania türlerinin vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri, Leishmaniasis’li bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan paraziti de amastigot formunda almaktadırlar. Emilen kan orta midede “peritrofik membran” adı verilen bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri bu membran içinde salgılanmaktadır. *Leishmania*’ların bir kısmı, makrofajların lizis olması esnasında sindirilirken, kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot formuna dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlamaktadırlar. Bu forma “prosiklik” promastigot denmektedir. Bu formlar *Leishmania*’nın türüne göre *Phlebotomus*’un sindirim kanalının farklı kısımlarına yerleşmekte ve gelişme sürecinde burada birkaç farklı morfolojik şekil görülmektedir. Çoğalmalarını sürdüren parazitler salgıladıkları enzimlerle peritrofik membranın ön kısmını eriterek torasik mideye geçmektedirler. Daha uzun ve ince olan bu promastigotlara “nektomonad” adı verilmektedir. Torasik midenin ön ucunda

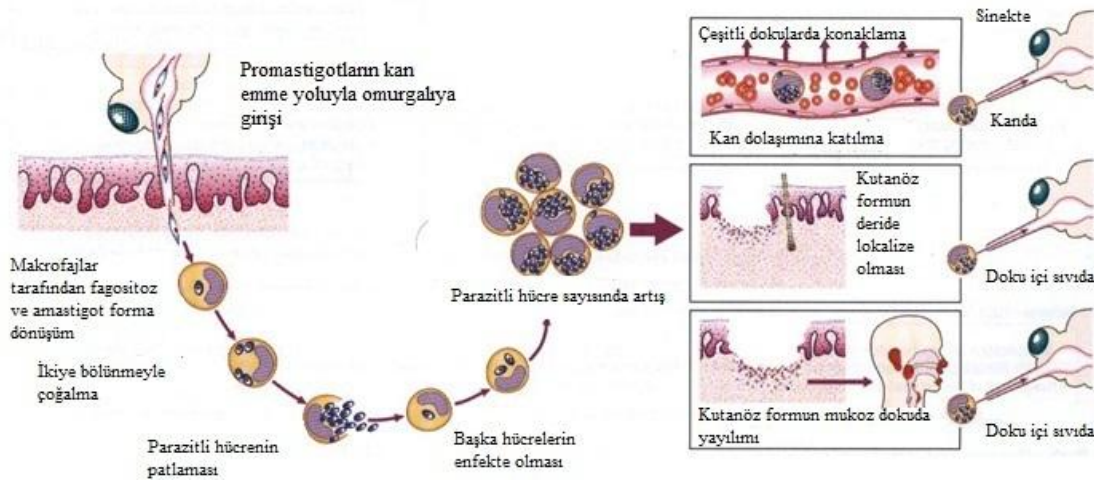
yer alan kan veya besin emilimi sırasında açılan kapağa geldikleri zaman kamçıları ile bağırsak epitel hücrelerinin mikrovilluslarına tutunmaktadırlar. Burada gelişen şekillere “hektomonad” adı verilmektedir. İleriki aşamalarda bu promastigotlar midenin ön tarafına doğru göç ederek özafagus ve farinksdeki kıvrım ve yarıklara kamçıları aracılığı ile tutunmakta ve lümeni tıkamaktadırlar. Promastigotlar zaman zaman bu bağlandıkları yerden ayrılarak daha uzun ve küçük formlar halinde ağız parçalarına girmekte ancak burada artık bölünememektedir. Enfeksiyonu oluşturan bu promastigotlara ise “metasiklik” promastigotlar denmektedir. Parazitler sıtmada olduğu gibi tükürük bezlerinde bulunmamaktadırlar.

Enfektif metasiklik promastigotları barındıran vektör kum sineği, kan emmek için bir omurgalı konağı soktuğu zaman, belli bir miktardaki (500-1000) promastigotu kan akımının ters yönünde inoküle etmektedir. Bu kan emme sırasında salgılanan tükürük salgısının pıhtılaşmayı önleyici etkisinin yanı sıra omurgalı konakta enfeksiyonun yerleşmesinde, hatta inoküle edilen parazit sayısının az olması durumunda bile enfeksiyonun başlayabilmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerde serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosit edilmektedir. Fagosit edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedir. Fagositözu yapan hücreler, omurgalının makrofaj, monosit veya langerhans hücreleri olup derideki mononükleer fagositik hücrelerdir. Amastigot, fagositik vakuol (fagolizozom) içinde kalmakta ve orada ikiye bölünerek çoğalmaktadır. Enfekte hücre, parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar dağılmaktadır. Bu amastigotlar tekrar diğer makrofajları enfekte edebilmektedir (Şekil 3).



Şekil 3. *Leishmania*'nın kum sineğindeki hayat döngüsü (Killick-Kendrick, 1979).

Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabilmekte veya iç organlara göç edebilmektedir. Enfekte makrofajlar kan yoluyla deriden öncelikle dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere sebep olmaktadır. Ancak bu hareket parazitle karşılaşan konağın immun sisteminin durumuna göre değişiklikler gösterebilmekte ve parazitler türüne uygun olmayan yerlere de göç edebilmektedir. Bu durum türlerin visserotropizm/dermatropizm karakterlerine bağlı olarak meydana gelmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. *Leishmania*'nın omurgalıdaki hayat döngüsü (El Tai ve ark., 2000).

Leishmania promastigotlarının inoküle edildiği her omurgalı konakta enfeksiyonun başlaması ve gelişmesi beklenmemelidir. Yeterli sayıdan çok az

miktarda promastigotun verilmesi, konağın immun sisteminin sağlam olması durumlarında parazite karşı konakta antikor oluşabilmekte ancak enfeksiyon gelişmemektedir (Jeffrey ve Leach, 1966; Killick-Kendrick, 1979).

4.4. Leishmaniasis'in Epidemiyolojisi

Leishmaniasis, kırsal alanlarda kentsel alanlara göre daha fazla görülmektedir. Toplam olarak 20'den fazla *Leishmania* tür veya alt türünün sebep olduğu leishmaniasis, çoğu tropik veya subtropik bölgelerde olmak üzere Yeni Dünya ve Eski Dünya'da 98 ülke ve bölgede görülürken, Güneydoğu Asya'da bulunmamaktadır. Avrupa'da insan enfeksiyonlarının çoğunluğu Akdeniz'e kıyısı olan 16 ülkede görülmektedir. Kutanöz leishmaniasis olgularının %90'ından fazlası İran, Afganistan, Suriye, Suudi Arabistan, Brezilya ve Peru'da; visseral leishmaniasis olgularının ise %90'ından fazlası Bangladeş, Brezilya, Hindistan ve Sudan'da meydana gelmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü kayıtlarında; dünya çapında tahminen yılda 1,3 milyon yeni vaka meydana gelmekte ve leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısının 200 – 300 bin olduğu bildirilmektedir (Meinecke ve ark., 1999).

4.4.1. Dünyadaki dağılımı

Kutanöz leishmaniasis ilk bildirimleri 9. yüzyıla kadar gitmekte olduğu halde 21. yüzyılda hala bir dünya sağlık sorunu olarak karşımızda durmaktadır. Her yıl 1,5 milyon yeni olgu olduğu tahmin edilmekte, bunların 300 bini resmi olarak rapor edilmektedir. Yeni olguların %90'ı Afganistan, Cezayir, Irak, Suriye, İran, Sudi Arabistan, Brezilya ve Peru'dan rapor edilmektedir (WHO Report on Leishmaniasis, 2015; Ashford ve ark., 1991). Dünyadaki coğrafik dağılımı ise vektör olan kum sineği türlerinin (*Phlebotomus* ve *Lutzomyia*) dağılımı ile paralellik göstermektedir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde bulunan bütün ülkelerde (Yeni Zelanda, Avustralya ve Pasifik adaları dışında) görülmektedir.

Global ısınmanın kutanöz leishmaniasisin yayılımında önemli bir faktör olacağı ve hava sıcaklığında olabilecek 1-2 °C'lik artışın hastalığın yayılmasında çok önemli rol oynayacağı, bu kadar bir artışın bile şu anda Güney Fransa'da sınırlı kalan vektör yayılımının İngiltere'ye kadar uzanabileceği belirtilmektedir (Desjeux, 2001).

Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da kutanöz leishmaniasis, endemik bölgelerden dönen turist, asker ve işçilerde görülmektedir. Bu kişiler genelde bu infeksiyon konusunda bilgisiz oldukları için koruyucu önlemler almamakta ve genellikle uygun olmayan bazı tedaviler aldıktan sonra tanı geç olarak konulmaktadır (Klaus ve ark., 1999).

4.4.2. Türkiye'deki dağılımı

Türkiye'de *L. tropica*'nın etken olduğu antroponotik KL zaman zaman epidemilerle karakterize olacak şekilde 1833 yılından beri bildirilmektedir. 1950'li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olmak üzere Türkiye'nin endemik bir bölge olduğu, 1950'den sonra sıtma kontrolünde kullanılan DDT nedeniyle azaldığı, ancak 1960'dan sonra sıtma kontrol çalışmalarındaki yetersizliğe bağlı olarak tekrar olgu sayısının arttığı bildirilmektedir. Türkiye'de 1988-1999 yılları arasında bildirilen toplam vaka sayısı 27.960'dır. Önceleri oldukça etkili uygulanan bu kontrol çalışmalarının daha sonraları aksaması, kullanılan insektisitlere direnç gelişmesi, hastaların tedavisinde zorluklar yaşanması, bu bölgeden diğer bölgelere başta çalışma amaçlı olmak üzere toplu haldeki mevsimsel göçlerin artması, ulaşım ve seyahat imkânlarının kolaylaşması gibi nedenlerle hem bölgede hastalığın insidansının artması hem de başka bölgelere yayılması söz konusu olmuştur. Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde Şanlıurfa ilimiz bu hastalığın görüldüğü başlıca bölgedir ve günümüzde bile önemini korumaktadır. Şanlıurfa'da Ocak 1991-Temmuz 2001 yılları arasında toplam 14.467 olgu saptanmıştır. Olguların 2001 yılına kadar yerleşim birimlerinde farklılık bulunmazken, 2001 yılında Suruç ve Halfeti ilçelerinde de ortaya çıktığı saptanmıştır. Bunun nedenlerinin çevre değişikliği, nüfus hareketleri ve iklimin değişmesi olduğu düşünülmektedir (Unat ve ark., 1995).

Güney Doğu Anadolu dışında kutanöz leishmaniasis 1980'lerden sonra daha önceleri sporadik olguların görüldüğü Çukurova gibi yerlerde endemik bir durum gösterirken, daha önceleri son derece nadir olguların bildirildiği Ege, Marmara, Orta Anadolu, Batı Akdeniz gibi bölgelerimiz de düzenli olarak olguların görüldüğü yerler haline gelmiştir. Kutanöz leishmaniasis ülkemizde ihbarı zorunlu bir hastalıktır. Bu bildirimin yapılması durumunda, tedavisi için gerekli ve birinci seçenek olan beş değerli antimon (Glukantim) preparatları da Sağlık Bakanlığı tarafından ücretsiz olarak sağlanmaktadır (Unat ve ark, 1995).

4.5. Leishmaniasiste Klinik ve Patoloji

Leishmaniasis temel olarak iki ana klinik form ile karşımıza çıkmaktadır. Daha yaygın olan deri formunda; lezyonlar genelde lokalize kalmakta, deri ülseri gelişmekte, kalıcı bir iz (skar) ile birlikte kendiliğinden iyileşebilmekte ve ömür boyu süren bir bağışıklık bırakmaktadır. İç organlarda yerleşen formu ise; düzensiz ateş, kilo kaybı, dalak, karaciğer, lenf yumruları büyümesi ve anemi gibi önemli semptomlarla ortaya çıkmakta ve tedavi edilmezse %100 ölümle sonuçlanmakta, bağışıklık bırakmamaktadır.

Leishmaniasis'de bulunan çok sayıda ve bazıları da eş anlamlı olan terimler farklı kitap ve/veya kaynaklarda farklı şekilde veya birbirinin yerine kullanılmaktadır. Bu nedenle, hepsinin bir arada verilmesi önem taşımaktadır.

Leishmaniasis'de klinik olarak üç farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır:

1. Visseral leishmaniasis [VL, Kala Azar, iç organlar leishmaniasisi, kara hastalık, dum dum fever (kara humma), öldüren ateş (death fever), tropikal splenomegali].
2. Kutanöz leishmaniasis [CL, KL, LCL, lokal kutanöz leishmaniasis, deri leishmaniasisi, cutaneous leishmaniasis, şark çıbanı (oriental sore, button of east), güzellik çıbanı, Halep çıbanı (Aleppo button)].
3. Mukokutanöz leishmaniasis (MCL, mucocutaneous leishmaniasis).

Daha sonra, dört diffüz (yaygın) kutanöz leishmaniasis (DKL) ve beş Post Kala Azar dermal leishmaniasis (PKDL) de bu gruplara eklenmiştir (Unat ve ark, 1995).

4.5.1. Visseral Leishmaniasis

Visseral leishmaniasis’de, sadece insanın rol aldığı “insan-vektör-insan” döngüsü Hindistan gibi bazı bölgelerde meydana gelmekte diğer bölgelerde ise küçük kemirgenler veya köpekgiller rezervuar olarak davranmaktadır.

Visseral leishmaniasis farklı coğrafi bölgelerde biyolojik farklılıkları olan *Leishmania* parazitleri tarafından oluşturulmaktadır. VL, Afrika, Asya, Güney Avrupa ve Güney Amerika’da 88 ülkede görülmektedir. Her yıl görülen 500 bin yeni olgunun yaklaşık %90’ı Bangladeş, Hindistan, Sudan, Nepal ve Brezilya olmak üzere beş ülkede saptanmaktadır (Ashford ve ark., 1991).

Ülkemizde visseral leishmaniasis, daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmekle birlikte hemen hemen bütün bölgelerimizden bildirilmiş olgular bulunmaktadır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* parazitleri hem insandan hem de köpeklerden izole edilmiş, izoenzim analizi, EF (excreted factor) analizi, monoklonal antikorlar ve PCR ile diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi türünün *L.infantum* olduğu ve doğadaki rezervuarlığını da köpeklerin yaptığı epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ülkemizde visseral leishmaniasisi bulaştıran olası vektörler *P.neglectus* ve *P. syriacus*, kesin vektör ise *P. tobbi* olarak bildirilmiştir (Herwald ve ark., 1993).

Parazitin yirmiden fazla enfektif türü insanlarda bir dizi semptomlara sebep olmaktadır. Ateş, kilo kaybı, anemi, halsizlik gibi bazı semptomlar genel, dalak, karaciğer ve lenf nodlarının büyümesi gibi bazı semptomlar da iç organlar leishmaniasisine özgü olarak görülmektedir.

Visseral leishmaniasise neden olan değişik türler tüm vücutta retikülo endotiyal (RE) sistem hücrelerini enfekte etmektedir. Hastalık ilerleyici olup öldürücülük oranı

tedavi edilmeyen olgularda %75-95 arasında bulunmaktadır (Svobovoda ve ark., 2009).

4.5.2. Kutanöz Leishmaniasis

Kutanöz leishmaniasis, (KL, Şark çıbanı, Antep çıbanı, Halep çıbanı, Delhi çıbanı, Yıl çıbanı, Güzellik çıbanı) genellikle deriyi ve bazen de deri ve mukozalarını tutan, iz (skar) bırakarak iyileşen lezyonlara neden olur. Bu lezyonlar tedavi ile veya kendiliğinden düzeldikten sonra kişiyi ömür boyu yeni enfeksiyonlardan koruyan kalıcı bir bağışıklık bırakmaktadır (Unat ve ark., 1995).

4.5.2.1. Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasisi

Leishmania tropica, ülserleşmeden önce aylarca kalabilen kuru bir lezyona sebep olmakta ve genellikle şehirlerde görülmektedir. Parazit insandan insana *P. sergenti* türü vektör kum sinekleri ile bulaştığı ve başka rezervuarı olmadığı için “Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis” (AKL, ACL) olarak adlandırılmaktadır.

Leishmania tropica’nın hayvan rezervuar konaklarını saptamak, enfeksiyon oranı çok düşük olduğu için oldukça güçtür. Namibya’da kaya *Hyrax*’ı olan *Procavia capensis* ve Kenya’da *Procavia johnsoni* infekte bulunmuştur. Son zamanlarda *L.tropica*’ya bağlı bazı zoonotik kaynaklı sporadik olgular da Yunanistan, Kenya, Suudi Arabistan ve Ürdün’de rapor edilmiştir. Suriye ve Fas’da ise köpeklerin *L.tropica* ile infekte olarak bulunduğu ancak bunların rastlantısal konak olabileceği, doğal rezervuar olmadığı bildirilmiştir. Birçok sıçanda (*Rattus rattus*) incelenmesine karşın sadece Irak ve Kenya’da birer sıçandan izole edilen *Leishmania* suşu *L.tropica* olarak tanımlanmıştır (Dedet, 2002).

Leishmania major, ısırma yerinde ıslak, ülser benzeri bir deri lezyonuna sebep olmakta, papülle başlayan enfeksiyon hızlı akut bir seyirle 1-3 hafta içinde etrafi iltihaplı olan bir ülsera dönüşmektedir. Parazit, *Psammomys obesus* (İsrail), *Meriones crassus* (İsrail), *Meriones libycus* (İran), *Meriones sacramenti* (Mısır),

Rhombomys opimus (İran) türü küçük kemirgenler, köpekler ve insanlardan, diğer konaklara *P. papatasi* türü vektör kum sinekleri ile bulaştığı için “Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis” (ZKL, ZCL) olarak adlandırılmaktadır (Jacobson, 2003).

Leishmania infantum, Eski dünya ülkelerinde sporadik CL etkeni olarak bildirilmektedir. Genelde 0,5-1 cm çapında küçük ve tek bir ülser lezyon oluşturmakta ve sıklıkla yüzde yerleşmektedir. Olgularda anlamlı bir yaş ve cins dağılımı saptanmamıştır (Klaus ve ark, 1999).

Leishmania aethiopica, hastalığın yaygın deri formuna sebep olmaktadır. Bazen mukozaları da tutabilmektedir. Lezyonlar çok yavaş gelişmekte, ülserasyon çok geç olmakta veya hiç olmamaktadır. İyileşme 1-3 yıl veya daha fazla sürebilmektedir. Doğadaki rezervuarı *Hyrax*’dır (Unat ve ark, 1995).

4.5.2.2. Yeni Dünya kutanöz leishmaniasisi

Promastigotların vektör kum sineği tarafından verilmesinden sonra küçük, kırmızı, kaşıntılı bir papül oluşmakta ve 1-4 haftada deri leishmaniasisine sebep olmaktadır. Bu ülser genelde 6-15 ayda kendiliğinden iyileşmektedir. Ancak promastigotların ısırma yerinden lenf damarları yoluyla metastatik bir yayılımı söz konusu olabilmekte ve yalnızca Yeni Dünya’da mukokutanöz leishmaniasis meydana gelmektedir. Yeni Dünya’da kutanöz leishmaniasis hastalığına *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*, *L. venezuelensis* ve *L. garnhami* neden olmaktadır (Unat ve ark, 1995).

4.6. TANI

4.6.1. Klinik ve Ayırıcı Tanı

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmakta ve önemli bir yer tutmaktadır. Endemik bölgelerde sürekli düzensiz ateş, splenomegali, hepatomegali, kilo kaybı, zayıflık, pansitopeni ve hipergamaglobulinemi bulguları ile hekime başvuran

olgularda öncelikle hekimlerin VL'yi akıllarına getirmeleri gerekir. Endemik bölgede yaşayan ve bu bölgelere yolculuk eden insanların VL açısından daha fazla risk altında olduğu unutulmamalıdır. VL, bir çok enfeksiyon hastalığı ile karışabilir. Akut VL, sıtma, tifoid ateş, tifo, akut Chagas hastalığı, schistosomiasis, biliyer tüberküloz, dizanteri ve amibik karaciğer absesi ile subakut veya kronik VL ise enfeksiyöz mononükleoz, bruselloz, histoplasmoz, hepatosplenik schistosomiasis, uzamış salmonella bakteriyemisi, histioplazmosis, hepatosplenik schistosomiasis ve kronik sıtma splenomegalisi ile karıştırılabilir. Ayırıcı tanıda ayrıca hepatosplenomegali ve pansitopeni ile karakterize lenfoma, lösemi, agnojenik myeloid metaplazi gibi neoplastik hastalıklar da yer alır. KL'nin ayırıcı tanısında blastomycosis, sporotrichosis, chromomycosis, lobomycosis gibi fungal enfeksiyonlar, fronkül, sifiliz, lepra, kutanöz tüberkülozis, derinin atipik mikobakteri enfeksiyonları, lupus vulgaris, sarkoidoz ve neoplazmalar göz önünde tutulmalıdır (Bensaid ve ark, 2006).

4.6.2. Etkensel Tanı

İğne aspirasyonu ile alınan materyallerde amastigotların görülmesi veya parazitin kültürde üretilmesi kesin tanı konulması açısından önem taşır. VL olgularında örnek alınacak dokular enfeksiyonun yerleştiği RES organlarından dalak, karaciğer, kemik iliği, lenf nodülü gibi organlar, KL'de ise lezyondan alınan sürüntü ve lezyonun kenarından enjekte edilen fizyolojik suyun geri aspire edilmesi ile elde edilen doku sıvısıdır. (Unat ve ark, 1995).

4.6.2.1. Boyama yöntemleri

Dalak aspirasyonu ile olguların %95-99'unda tanı konabildiği, ancak özellikle pıhtılaşma bozukluğu olan hastalarda şiddetli kanamalar meydana gelebileceğinin göz önünde bulundurulmasının gereği vurgulanmıştır. Protrombin zamanı normalden 5 saniyeden daha fazla, trombosit sayısı $40000/\text{mm}^3$ 'den az olmamalıdır. Hematolojik muayene normal ise komplikasyon %1'den daha azdır.

Kemik iliği aspirasyonu ile parazitin saptanması parazitolojik tanı açısından oldukça değerlidir. Kemik iliği aspirasyonu ile olguların %54-86'sının yakalanabildiği bildirilmiştir. Materyal sternumdan veya spina iliaca anterior superiordan alınır.

Karaciğer aspirasyonu ise dalak aspirasyonuna göre daha düşük oranda (%76) tanı koydurucudur, daha az olmakla birlikte hayati tehlike taşıyan kanama riski de bulunmaktadır. Hastalığın erken safhalarında parazitin karaciğer aspirasyonunda saptanma oranı daha fazla iken ileri dönemlerde dalak aspirasyonunda fazlalaşır. Ultrason eşliğinde aspirasyon daha güvenlidir.

Lenf nodülü aspirasyonu veya biyopsisi özellikle çok sayıda nodülün tutulduğu bazı olgularda kullanılabilir. Güvenli ve basit bir yöntemdir. Genellikle inguinal, aksiller ve servikal nodüller tercih edilmekte olup %60 oranında tanı koydurucudur. Kutanöz leishmaniasis düşünülen lezyonun kazınması ve özellikle sağlam doku ile birleşme yerine küçük bir insizyon uygulanarak, epidermis-dermis bileşkesinden materyal alınması ile amastigot elde etme şansının arttığı belirtilmiştir.

Direkt mikroskopik bakı amacıyla kazıntı, aspirasyon veya biyopsi ile alınan materyallerden hazırlanan yayma preparatlar metanol ile fiks edildikten sonra Giemsa veya Wright boyası ile boyanarak mikroskopta immersiyon objektifi altında amastigotlar açısından incelenir. Özellikle dalak ve kemik iliğinden alınan örneklerde hücre içindeki amastigotları saptama daha kolaydır. (Bensaid ve ark, 2006; Pearson ve ark, 2000; Gilles, 1999; Navin, 1988).

4.6.2.2. Besiyerleri

Tanıda besiyerinde promastigotlar ilk olarak 1904 yılında Novy, MacNeal, Nicolle tarafından agar, pepton ve defibrine tavşan kanının kullanıldığı NNN besiyerinde gösterilmiştir (Daldal ve ark, 1999). 1944 yılında sitratlı insan plasmasının kullanıldığı Weinman besiyeri (Novy ve ark, 1904), 1950 yılında difazik besiyeri olan Tobi besiyeri yayınlanmıştır (Weinman, 1944). Özellikle 1970'lerden

bu yana sıvı besiyerlerinin kullanılmaya başlanmasıyla, besiyerleri boyama yöntemleri ile birlikte altın standart olarak kabul edilmiştir.

Kültür yöntemleri düşük oranda parazitemi durumunda boyama yöntemleri ile gözden kaçabilen parazitlerin çoğaltılması ile tanının daha rahat yapılmasını sağlamaktadır. Bunun yanısıra kültürde çoğaltılan parazitler tiplendirilebilir, izoenzim analizleri ve ilaç çalışmaları yapılabilir (Tobie ve ark, 1950).

Kültürlerin duyarlılığı, aspirasyon materyallerinin boyanarak mikroskopik incelenmesinden genellikle daha yüksektir. Lightner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yaymaların mikroskopik incelemesinde duyarlılık %72 iken, kültürde bu oran %91 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada kemik iliği aspirasyonlarında mikroskopik incelemede duyarlılık %60 iken, kültürde %98 gibi oldukça yüksek bir oranda bulunmuştur (Evans, 1989; Lightner, 1983).

Tanı amacıyla hem boyama, hem de kültür yapılmasının daha uygun olduğu, çünkü kültürde üreme olmayan bazı olgularda boyama ile amastigotların görülebileceği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda mukozal leishmaniasis için kültürün çok başarılı olmadığı tespit edilirken, VL'de özellikle dalak aspirasyon materyalinin boyama ve kültürde verdiği pozitif sonuçların, kemik iliği ve karaciğerden elde edilen materyallerden daha başarılı olduğu gözlenmiştir. Ancak alınan dokulardaki amastigotların tanınma zorluğu nedeniyle indirekt tanı yöntemlerine de gereksinme olduğu belirtilmiştir (Sinha ve ark, 1993).

4.6.2.3. Deney hayvanları

Alınan aspirasyon materyalinin boyama ve kültür yöntemleri dışında deney hayvanlarından daha duyarlı olan hamsterlere VL'de intraperitoneal olarak, KL'de ise burun mukozası, ayak tabanı veya traşlanan deriden subkutan olarak verilmesi iyi bir alternatiftir, ancak hızlı tanı için pratik değildir. Sonuç dört hafta gibi bir süre aldığından tanıda pek tercih edilmez (Seaman ve ark, 1996).

4.6.2.4. Moleküler yöntemler

Leishmania kinetoplastik DNA'sının tüm türlerde sabit olan bölgesinin, 120 bazlık bir bölümünün çoğaltıldığı 13A-13B primerlerinin kullanıldığı PZR yöntemi, leishmaniasisli insan ve köpeklerden elde edilen çeşitli klinik örneklerle yapılan çalışmalarda özgül ve hassas bulunmuştur (Pearson ve DeQuiroz, 1996; Çulha ve ark, 2006).

Epidemiyolojik durumun çeşitliliğinden dolayı bütün leishmaniasis olguları için kullanılabilecek tek bir tanı, tek bir tedavi ve kontrol yöntemi bulunmamaktadır. Sahada tanı, iyi duyarlılık ve özgüllüğe sahip az invaziv olan basit testlerin olmamasından dolayı çok zordur. Kemik iliği veya dalak örneği kullanılarak yapılan ve halen kullanılan parazitolojik testler invaziv olup bütün hastalar için uygun değildir. Serolojik testlerde çapraz reaksiyon sorunu bulunmaktadır. Son zamanlarda geliştirilen nükleik asit tabanlı metodlar avantajlı olmasına rağmen karmaşık ekipman gerektirmektedir (Ergin ve ark, 2005).

Leishmaniasis tanısında bilinen moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. 2005 yılında *L.major* Friedlin suşunun tüm genomik analizi tamamlanmış ve araştırmacıların hizmetine sunulmuştur. PZR, az miktarda örnekle çalışılabilmesi, parazitin hızlı olarak tanımlanabilmesi ve en önemlisi tedavinin başarılı olup olmadığının izlenebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Visseral ve kutanöz leishmaniasis enfeksiyonlarının tanısı ve araştırılmasında moleküler yöntemlerin kullanılması, PZR'nun bulunmasından sonra, öncelikle araştırma düzeyinde hız kazanmıştır.

Leishmaniasis tanısında farklı klinik örneklerden total DNA izole edilerek PZR uygulanmaktadır. Kan örnekleri santrifüje edilerek pellet tampon solüsyonu ile tekrar sulandırılmaktadır. Lenf bezi aspirasyonları tampon solüsyonu ile sulandırılmaktadır. Deri örneği tampon solüsyonda homojenize edilmektedir. Tüm bu örneklerden kit ile DNA izolasyonu yapılmaktadır. Gerçek zamanlı PZR ile daha önce üretilmiş belirli

sayıdaki parazitlerden DNA izole edilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur. Böylece örneklerdeki parazit miktarı tahmin edilebilmektedir (Jhingan ve ark, 2008).

Kutanöz leishmaniasisde PZR ile mikroskopik bakıdan daha hassas sonuçlar alınmaktadır. Visseral leishmaniasisde ise mikroskopik bakı negatif de olsa serolojik yöntemler bağışıklığı sağlam kişilerde %100'e yakın hassasiyette olup PZR doğrulayıcı test olarak önem taşımaktadır. Bağışıklığı baskılanmış kişilerde ise (AIDS/HIV+, transplant hastası vb.) spesifik antikor yanıtının azalması nedeniyle PZR tanıda mikroskopi ile birlikte önem kazanmaktadır (Desjeux, 2000; Sundar ve Rai, 2002; Vitale ve ark, 2004).

2.6.2.5. Seroloji

Visseral leishmaniasis, özgül olmayan gamaglobulinler, yüksek seviyede leishmania antikorları ve hipergamaglobulinemi sonucu poliklonal B hücre uyarılması ile karakterizedir. Çeşitli serolojik testler VL tanısı için geliştirilmektedir. Ancak pratikte bazı sorunlar vardır:

- Subklinik diğer visseral enfeksiyonlarda testler pozitif olabileceğinden pozitiflik aktif enfeksiyonu göstermez
- Serolojik testler tedaviden sonra çok uzun süre pozitif kalır ve yanıltıcı olabilir
- Diğer bazı hastalıklarla çapraz reaksiyon verebilir

Bağışıklık sistemi sağlam olan VL olgularının %90'ında anti-Leishmania antikor titresi oldukça yüksektir; bu antikorlar ELISA, Direkt Aglütinasyon Testi (DAT), İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) gibi testlerle saptanabilir.

Serolojik testlerin pozitif olması VL'de çok değerlidir, ancak seronegatif olgularda diğer parazitolojik yöntemlere gereksinim vardır HIV ile enfekte olgularda ise serolojik testler olguların ancak yaklaşık yarısında pozitifdir. KL enfeksiyonlarında ise anti-Leishmania antikor titresi, düşük de olsa pozitif olarak tespit edilebilir.

Montenegro (Leishmanin) deri testi ise akut VL olgularında negatif, buna karşın başarılı tedavi sonrası veya kendiliğinden iyileşen olgularda, bir şekilde promastigotlarla karşılaşmış, ancak enfeksiyon gelişmemiş kişilerde pozitifdir. Bu deri testinin, özellikle KL ve MKL tanısında oldukça duyarlı ve özgül olduğu, ancak yararlı bir antijen için oluşturulan kombinasyonunun çapraz reaksiyon veren antijenlerden oluşmaması gerektiği, böylece hatalı negatif sonuçların önlenmiş olabileceği bildirilmiştir (Schonian ve ark., 2003; Le Fichoux ve ark., 1999; Reithinger ve ark., 2007; WHO Report on HIV-Leishmania coinfections, 2007).

4.6.2.6. Diğer yöntemler

Diğer bir tanı yöntemi de xenodiagnosis'tir. VL şüpheli hastadan alınan kanla kolonize Phlebotomus'ların beslenmesi sonucunda Phlebotomus'larda promastigotların gelişiminin izlenmesi esasına dayanan bu yöntem, zor olguların tanısını koymada çok hassas bir teknik olmasına karşın, sadece AIDS olgularında VL tanısında kullanmak için uygun olabileceği vurgulanmaktadır (Reithinger ve ark., 2007; Alvar, 1994; Bouree ve Belec, 1993).

4.7. *Plasmodium*'ların tarihçesi ve sınıflandırması

Tarih öncesi çağlardan bu yana eski dünyada sıtma var olmuştur. Afrika'da 30 milyon yıl yaşında fosil sivrisineklerin bulunması, sıtmanın buradan dünyanın ılıman bölgelerine tarih öncesi zamanlarda taşındığını göstermiştir. Sıtma, insan göçlerine bağlı olarak, Akdeniz kıyılarına, Mezopotamya'ya, Hindistan yarımadasına ve Güneydoğu Asya'ya yayılmıştır. Amerika kıtasına nasıl ulaştığı hakkında çeşitli spekülasyonlar bulunmaktadır. *P. vivax* ve *P. malariae*'nin Güneydoğu Asya'dan pasifik ticaret yoluyla Amerika kıtasına, *P. falciparum*'un ise İspanyol kolonilerin Orta Amerika'ya getirdiği Afrika'lı esirlerle taşınmış olması muhtemeldir.

İnsanlık tarihinin en eski yıllarından beri bilinen sıtmanın Mezopotamya, Eti ve Grek uygarlıklarını çöktüren en önemli etmen olduğu kabul edilir ve Anadolu'da da uzun yıllar yaygın halde görülmüştür. 1600 yılında Peru'da kınakınanın sıtma

sağaltımında etkili olduğuna ilişkin yazı bulunmaktadır. Kınakına kabuğu 1632’de Roma’ya getirilmiştir. 1872’de sıtmanın kanda kırmızı ufak boya parçacıklarının bulunmasıyla ilişkili olduğu ve 1880’de bunların sıtmaya özgü olduğu savunulmuştur. Yine 1880’de sıtma etkeni ilk kez kan preparatında görülmüş, 1898 yılında sıtmanın hasta kuştan sağlam kuşlara sivrisineklerle bulaştığı ispat edilmiştir. 1900 yılında *P. vivax* ve ardından *P. ovale*’nin *P. falciparum*’dan ayrılığı vurgulanmıştır.

Sıtma sağaltımında ise 1820 sonrası tek ilaç *Chincona* ağacından elde edilen kinin olmuştur. Almanya’da Bayer Laboratuvarlarında 1834 yılında sentetik 4-aminokinolin geliştirilerek Klorokin adıyla piyasaya çıkmıştır *Chincona ledgerina* ağacından kinin maddesini elde etme oranı, 1865 yılında %4 oranından %8-12’ye çıkarılmıştır. 1944’de kinin sentez edilmiş, 1945’de Primakin ve Proguanil, 1948’de Primetamin ve 1964’de ise Sülfadiazin geliştirilmiştir.

Türkiye’de 1910 yılından itibaren halka parasız kinin dağıtımına başlanmış, 1926’da “Sıtma Mücadelesi Kanunu” yayınlanmıştır. 1928’de Adana Sıtma Enstitüsü kurulmuş ve 1940’lara kadar sıtma savaşı yürütülmüştür. 1957 yılından itibaren WHO ve UNICEF ile yapılan işbirliğiyle sıtma eradikasyon programı uygulanmış, 1970 sonrası sıtma olguları tekrar artma eğilimine girmiştir. Başarılı sıtma savaş programları ile günümüz Türkiye’sinde artık sıtma kontrol altına alınmış ve eliminasyon fazına girilmeye hazırlanılmaktadır. İnsanda parazitlenen *Plasmodium* türlerinin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Unat ve ark, 1995; Unat, 1999)

Regnum	: <i>Animalia</i>
Superphylum	: <i>Protozoa</i>
Phylum	: <i>Apicomplexa</i>
Classis	: <i>Sporozoea</i>
Ordo	: <i>Eucoccidiida</i>
Familya	: <i>Plasmodiidae</i>
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Species	: <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i>

4.8. *Plasmodium*’ların Evrimi

Plasmodium’lar gelişmelerini tamamlamak için, biri insan (ara konak) diğeri

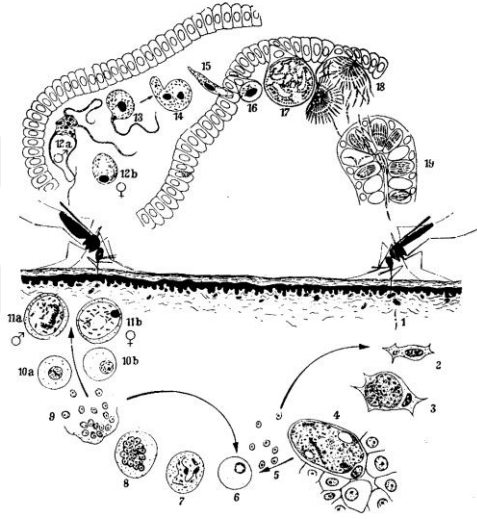
sivrisinek (kesin konak) olmak üzere iki ayrı konağa ihtiyaç duymakta ve insanda eşeysiz (şizogonik) sivrisinekte ise eşeyli (sporogonik) evrim dönemi geçirmektedirler.

Şizogonik evrim; Bu evrim karaciğer parankim hücrelerinde ekzoeritrositik (alyuvardışı) dönem ve eritrositlerde eritrositik (alyuvariçi) dönem olmak üzere birbirini takip eden iki aşamada tamamlanmaktadır. Anofel cinsi dişi sivrisineklerin insandan kan emerken verdikleri sporozoitler yarım saat içinde karaciğere ulaşırlar ve burada her *Plasmodium* türüne göre değişen bir süre içinde karaciğer parankim hücrelerinde şizont şeklini oluştururlar. Bu süre *P.vivax*'ta 8, *P.malariae*'da 15, *P.ovale*'de 9 ve *P.falciparum*'da 6 gün olarak bilinmektedir. Karaciğer parankim hücrelerinde oluşan şizontların içinde gelişen merozoit adetleri de türlere göre farklı sayıda bulunmaktadır. Bunların, *P.vivax*'ta 1.000, *P.malariae*'da 2.000, *P.ovale*'de 15.000, *P.falciparum*'da 40-1.000 olduğu bildirilmiştir. Ekzoeritrositik dönem sonucunda, şizontların içinde oluşan merozoitler, şizontları patlatarak kana dökülmekte ve alyuvarlara girerek eritrositik şizogoni dönemini başlatmaktadır. Bu dönemin ilk formu, bütün *Plasmodium* türlerinde aynı olan halka şeklindeki genç trofozoit şekli, ikinci formu ise genç trofozoitlerden değişerek oluşan, her türde farklı olan olgun trofozoit şeklidir. *Plasmodium* türüne göre değişen saatler içinde olgun trofozoitler önce genç, daha sonra olgun şizontlara dönüşmekte ve şizontlardaki nükleusun parçalanması ile her türe özel sayıda merozoitler gelişmektedir.

Bu sayılar; *P.vivax*'ta 8-24 (ortalama 12-18), *P.malariae*'da 6-12 (ortalama 8), *P.ovale*'de 6-16 (ortalama 8) ve *P.falciparum*'da 8-36 (ortalama 8-18) adettir. Merozoitlerin alyuvarlar içindeki gelişme süreleri de parazitin türüne göre değişmektedir; Bu süre *P. vivax* ve *P. ovale*'de 48 saat, *P. malariae*'da 72 saat ve *P. falciparum*'da 36-48 saattir. Alyuvarların patlaması ile kana dökülen bu merozoitlerin bir kısmı tekrar eritrositlere girerek ikinci eritrositik şizogoni dönemini başlatmakta, bir kısmı ise eritrosit içinde ana eşey hücreleri olan dişi ve erkek gametositleri (makrogametosit ve mikrogametositleri) oluşturmaktadır. İç organ kapillerlerinde olgunlaşan ve her türe özel şekilde olan gametositler insandaki şizogonik evrim

döneminin son şekilleridir ve bundan sonraki gelişimleri dişi anofel sivrisineklerde devam etmektedir.

Sporogonik evrim; Dişi *Anofel*'lerin hasta kişiden kan emerken gametositleri almasıyla sivrisinek vücudundaki sporogoni evrim dönemi başlamaktadır. Sivrisineğin midesinde serbest kalan dişi ve erkek gametositlerden gametogenezis olayı ile dişi ve erkek gametler (makrogamet, mikrogamet) gelişmekte, ortam ısısının 24 °C olduğu şartlarda 2-3 saat içinde mikrogamet döllemesi sonucunda makrogamet kabuğu kalınlaşarak yuvarlak yapıdaki zigot oluşmaktadır.



Şekil 5. *Plasmodium*'ların şizogonik ve sporogonik evrimi

Sporozoit; 2.5 Pre-eritrositler şizogoni; 5-9 Eritrositer şizogoni; 10-11 (a), Mikrogametosit; 10-11 (b). Makrogametosit 12 (a). mikrogamet; 12 (b). Makrogamet; 13. Birleşme; 14. Zigot; 15. Ookinet; 16. Ooksit; 17. Sporoksit; 18. Sporogonik evrimde sporokist içinde sporozoitlerin oluşumu; 19. Sivrisineğin tükürük bezlerine ve oradan hortumuna geçecek olan Sporozoitlerin tükürük bezlerindeki görünüşü (1-11) insan vücudunda; 12-19 (sivrisineklerde) (Özbilgin ve ark, 2010)

Bir süre sonra sivrisineğin mide çeperinin iç kısmında zigotun kabuğu incelerek hareketli ookinet formu oluşmakta; ookinet kendi hareketiyle midenin dış çeperine

geçmekte, burada ookinet formundan hareketi durmuş olan, kalın çeperli sayıları 5-25 olabilen ookist formları oluşmaktadır. Ookistlerin içinde çekirdeklerin parçalanması ve etraflarına sitoplazma toplanmasıyla sporozoit denilen formlar gelişmekte ve sayıları 10.000 kadar olabilen bu yapıları taşıyan kese şeklindeki ookist, sporokist olarak adlandırılmaktadır. Evrimin son aşamasında, sporokistleri patlatan sporozoitler anofelin vücut boşluğuna dökülerek, sineğin tüm organlarına dağılmakta ve tükrük bezlerine gelen sporozoitler tükrük bezi hücrelerine girmektedirler. Parazitin sivrisinekteki son evrim şekli olan sporozoitler, sineğin kan emme işlemi sırasında hortumları aracılığı ile insana verilirler. *Plasmodium*'ların sivrisinek vücudunda geçirdikleri sporogonik evrim dönemi, çevrenin uygun nem ve sıcaklığında, her *Plasmodium* türüne özgü çoğalma süresi içinde tamamlanmaktadır (Kuman, 1993; Özbilgin ve ark, 2010)

4.9. Sıtmanın Epidemiyolojisi

4.9.1. Dünyada Sıtmanın Durumu

Çeşitli araştırma sonuçları; dünyada her 30 saniyede bir çocuğun sıtma nedeniyle hayatını kaybettiğini, dünya nüfusunun %40' ının sıtma riski altında olduğunu, her yıl 300-350 milyon insanın enfeksiyonu aldığını ve yaklaşık 2 milyon kişinin bu enfeksiyon nedeniyle hayatını kaybettiğini göstermektedir. WHO'nun yayınlarına göre; 2008 yılında %85'i Afrika' da, %10'u Doğu Asya' da ve %4'ü Doğu Akdeniz Bölgesinde olmak üzere toplam 243.000.000 sıtma olgusu saptanmış, % 89'u Afrika Bölgesinde, %6'sı Doğu Akdeniz Bölgesinde ve %5'i Doğu Asya Ülkelerinde olmak üzere toplam 863.000 sıtma kaynaklı ölüm kaydedilmiştir. DSÖ sıtmayı önemli bulaşıcı hastalıklar kapsamında Tüberküloz ve AIDS ile birlikte ilk üçte değerlendirmektedir (WHO Report on Malaria, 2005; Özcel, 2007).

4.10. Sıtmada Patogeneze ve Klinik Belirtiler

Tüm türlerin yol açtığı sıtma enfeksiyonunun en önemli belirtisi olan ateş, 2000 yıldan uzun süredir dikkatleri üzerinde toplamış olmasına karşın, temeli hala tam

olarak aydınlatılamamıştır. Şizont rüptürü ile febril nöbet arasındaki direkt geçici bağlantı, parazitlerin pirojen bir madde salgıladıklarını düşündürmektedir. Ancak böyle bir madde gösterilememiştir. Endojen pirojen maddenin şizont rüptürü ile açığa çıkan eritrosit ve parazit artıklarını fagosite eden doku makrofajları tarafından salgılandığı iddia edilmiştir. Endojen pirojen bir madde olan tümör nekroz faktörü-cachectin (TNF) sıtmal hastaların serumlarında aranmış, ancak bu maddenin sıtmanın ateş patogenezindeki rolü açıklanamamıştır. Yüksek ateşin yol açtığı belirgin vazodilatasyon, efektif plazma hacminde ortostatik hipotansiyona neden olabilecek bir düşmeye yol açmaktadır. Sonuçta antidiüretik hormon ve aldosteron salgısı artmakta, daha sonraları nöbetlere eşlik eden belirgin diaforez, kusma ve su alınımlında azalma sonucu sıvı elektrolit dengesi bozulabilmektedir. Hiponatremi de sıklıkla görülen bir bulgu olmaktadır.

Anemi sıtmanın genel bir komplikasyonu olarak görülmekte, yüksek parazitemilere bağlı olarak yoğun hemoliz gelişebilmektedir. Hemoliz daha çok şizogoni sırasında enfekte eritrositlerin rüptürünün sonucu olarak oluşsa da, hemolizin boyutları tek başına bu sürece bağlanabilecek orandan daha geniş olabilmektedir. Dalağın büyümesine bağlı olarak eritrositlerin dalakta yıkıma uğraması da muhtemelen aneminin patogenezinde yardımcı olmaktadır. Diğer taraftan aneminin otoimmün temele de dayandığını destekleyen bulgular görülmektedir. Diseritropoesis görülebilir ve sağaltım sonrasında bile anemiye yanıt olarak görülen periferik retiküloz gecikebilir. Hemoliz yaygın olmadıkça hemoglobinemi ve hemoglobüri pek görülmez. Sıtmaya bağlı massif hemoliz ve hemoglobüri geliştiğinde tablo *Karasu Humması* adını almaktadır.

Plasmodium falciparum sıtma enfeksiyonunda akut böbrek yetmezliği, akciğer ödemi ve beyin fonksiyon bozuklukları gibi bazı diğer ciddi komplikasyonlar da gelişebilmektedir. Kesin mekanizmaları belli olmamakla birlikte, bu komplikasyonların ortak temellerini anemi ve mikrodolaşımdaki değişiklikler sonucunda gelişen doku hipoksisi oluşturmaktadır. *P.falciparum*'la enfekte eritrositlerde, şekil değiştirebilme yeteneğindeki azalma, “yumrular” olarak adlandırılan özel eritrosit zarı değişiklikleri yolu ile vasküler endotele yapışma

eğiliminde artma gibi önemli değişiklikler olmaktadır. Mikrovasküler yataklarda kan akımı yavaşlamakta ve sonuçta dokulara ulaşan oksijen azalmaktadır. Kılcal damar endotel bütünlüğü bozulup, permeabilite artabilmekte ve bu durum akciğer gibi bazı organlarda hücrelerarası boşluğa sıvı ve protein sızması ile sonuçlanabilmektedir. Komplike *P.falciparum* olgularında bu nedenle sıvı verilmesine özen gösterilmektedir. Patogeneizde mikrotrombusların ve varsayılan sıtma toksinlerinin etkili oldukları da öne sürülmüştür. Bu süreçlerin histopatolojik görüntüsü iskemiye bağlı böbrek korteksindeki değişiklikler ve akut tubuler nekroz şeklinde olmaktadır. Akciğer ödemi komplikasyonu gelişen hastaların akciğerlerinde; trombus oluşumu ile birlikte veya trombüsüz mikrovasküler konjesyon, interstisyel ödem ve hyalin zar oluşumu şeklinde patolojik değişiklikler görülmektedir. Ölümcül sıtma olgularında beyin korteksinin gri cevherinde parazit içeren eritrositlerle dolu konjesyone damarlar, perivasküler ödem, halka tarzı hemoraji ve nadiren glial reaksiyon (sıtma granülomu) oluşabilmektedir.

Sıtmaya yakalanmış kişilerde sıtma nöbeti adı verilen üşüme, titreme, ateş yükselmesi ve terleme, hastalığın karakteristik klinik belirtilerini oluşturmaktadır. *Plasmodium* türlerinin neden olduğu bütün sıtma çeşitlerinde bu klinik belirtiler, az veya çok şiddetli olarak görülmektedir. Akut sıtma nöbetlerinde bu klinik belirtilere anemi ve splenomegali eşlik etmektedir. Sıtma nöbetleri, hastalığa neden olan *Plasmodium* türüne göre 36–48–72 saatte bir görülen periyodik karakterde olabilmektedir. Nöbet sırasında görülen klinik belirtiler, sıtma parazitlerinin türüne ve suşuna göre, hastanın genel sağlık ve beslenme durumuna, genetik özelliklerine, bağışıklık gelişmesine, yaşına ve enfeksiyonun coğrafi orijinine bağlı olarak birçok değişiklik göstermektedir.

Sıtma parazitlerinin karaciğer şizogonik evrimi sonucunda merozoitlerin kan dolaşımına dağılmasıyla, karakteristik sıtma nöbetlerinin ortaya çıkmasına kadar geçen zamana, sıtmada prodrom dönemi adı verilmektedir. Sıtma nöbetleri başlamadan önce prodrom döneminde hastada sıtma için karakteristik olmayan halsizlik, baş ağrısı, kol ve bacaklarda ağrılar, kas ve eklem ağrıları, hafif ateş gibi belirtiler grip enfeksiyonunu hatırlatmaktadır. Ancak bazı sıtma olgularında,

prodrom dönemi oluşmadan, doğrudan sıtma nöbetleri görülebilmektedir. Eğer bir hasta, sıtma endemik olan bir bölgede yaşıyorsa veya böyle bir bölgeden geldiyse, daha önce hastaya kan transfüzyonu yapılmışsa, prodrom dönemi klinik bulgular bulunduğunda, bu bulgular sıtma için karakteristik olmamasına rağmen, bu hastalarda öncelikle sıtma düşünülmesi gerekmektedir.

A. Sıtmada Kuluçka Dönemi: Enfekte bir *Anophel* cinsi sivrisineğin, insandan kan emmesi sırasında, sporozoitleri kana vermesinden, ilk nöbetlerin görülmesine kadar geçen zamana, kuluçka dönemi adı verilmektedir. Bu süre *Plasmodium* türüne göre 14–30 gün arasında değişmektedir. *P.vivax* sıtmasında 12-18 gün, *P. falciparum* sıtmasında 7-12 gün, *P. ovale* sıtmasında 11-16 gün ve *P.malaria* sıtmasında 28-37 gün olduğu bildirilmektedir. Sıtma çeşitlerinde yukarıda bildirilen kuluçka süreleri daha kısa olabildiği gibi, çok daha uzun da olabilmektedir. *P.vivax*'ın bazı suşlarının oluşturduğu sıtmada kuluçka dönemi 18–26 ay olabilmekte, diğer bazı *P.vivax* suşlarında ise, *P. falciparum* sıtmasına benzer şekilde kuluçka dönemi 7-17 gün olabilmektedir. Kan transfüzyonuyla bulaşan sıtma olgularında, ekso-eritrositer dönem bulunmadığından kuluçka dönemi *P. vivax* ve *P. falciparum* sıtmasında 5-7 gün, *P. malaria* sıtmasında 4-8 gün olarak bildirilmektedir.

B. Sıtma Nöbeti: Hastalarda prodrom döneminde görülen atipik belirtilerden sonra üşüme-titrete, yüksek ateş ve terleme belirtileri sıtma nöbetinin karakteristik bulgularını oluşturmaktadır.

1. **Üşüme, Titreme:** Hastaya önce bir ürperme gelmekte ve arkasından şiddetli üşüme hissiyle çeneleri birbirine vurarak titrete göstermektedir. Üşüme yaz güneşi altında dahi, kat kat yorgan ve battaniye altında da devam edebilmektedir. Hasta soluk görünümde, baş ağrısı, mide bulantısı, kusma ile devam eden üşüme esnasında, hastanın dudakları ve parmakları siyanozlu görünümündedir. Hastanın derisi kuru ve soluk, nabız hızlı ve zayıf olup, üşümeye rağmen ateşi yükselmeye başlamaktadır. Üşüme titrete hali genellikle 0,5-2 saat devam edebilmektedir.

2. **Yüksek Ateş:** Üşüme, titremenin ardından hastada ateş yükselmekte, hastanın yüzü kızarık, gözleri parlak, derisi kuru görünümünde olup, hasta üzerindeki bütün örtüleri atmakta ve ateşi 40 °C'ye kadar çıkabilmektedir. Hastada şiddetli baş ağrısı görülürken ateşin daha da yükselmesiyle ajitasyon görülebilmektedir. Hastanın nabızı taşikardik ve dolgun olup solunum hızlı, bulantı, karın ağrısı ve kusma gibi belirtiler yanında deride ürtiker ve eritem tarzında döküntüler dikkati çekmektedir. İdrar miktarı normalden az, koyu renkte ve idrarda albumin ve ürobilinojen pozitif, kanda ise üre ve kolesterol yüksek bulunmaktadır. Sıtmal hastalarda ateş genellikle 2-6 saat devam edebilmektedir.

Terleme: Ateş, hastanın yüzünde ellerinde ve bacaklarında başlayan terleme ile düşmeye başlamakta, terlemenin bütün vücudu kaplamasıyla hızla düşerek normal düzeye inmektedir. Hasta bitkin bir halde uykuya dalarak rahatlamakta, bir dahaki nöbete kadar kendisini normal hissetmektedir. Sıtma nöbetleri toplam olarak 8-12 saat devam etmektedir. Hastalarda sıtma nöbetleri reenfeksiyonlar olmadığı takdirde, *P. vivax* ve *P. ovale* sıtmalarında 48 saatte bir, *P. falciparum*'un neden olduğu tropika sıtmasında 36-48 saatte bir ve *P. malaria* sıtmasında 72 saatte bir görülebilmektedir. Nöbetler, parazitin kandaki eritrositer şizogoni evriminin süresine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. İlk nöbetlerden sonra hasta tedavi edilemez ise, hastalıkta uzun veya kısa süre devam eden kronik dönem başlamaktadır. Organizmanın bağışıklık durumuna bağlı olarak, kandaki eritrositer şizogoni evrimi yavaşlayabilmekte, hatta bir süre durabilmektedir. Eritrositer şizogoni evriminin tekrarlamasıyla klinik sıtma nöbetleri tekrar başlamaktadır. Ayrıca *P.vivax* ve *P.ovale* sıtmalarında, nöbetlerin durmasından bir müddet sonra hastalık nüksedebilmekte, karaciğerde bulunan hipnozoitlerin herhangi bir nedenle aktive olmasıyla karaciğer şizogoni evrimi başlamakta ve eritrositer şizogoni evrimi sonrasında da tipik sıtma nöbetleri görülebilmektedir (Kuman, 1993; Özcel, 2007).

4.11. Tanı

4.11.1. Ayırıcı Tanı

Grip, tifo, brusella, hepatit, hodckin, k.c absesi, kala-azar, ansefalit, epilepsi, tetanus, tbc, sarı humma, döneke humma, kolera, siper humması, appendisit, akut pankreatit.

Kala-azar, tifo, hodckin, brusellanın seyri sırasında sıtma bu hastalıkların tabloları ile maskelenebilir ve tanı koymak güçleşir (Maskeli sıtma).

Anofellerin yaşadığı bölgelerde nedeni bulunamayan ateşli hastalarda mutlaka sıtma düşünülmelidir.

4.11.2. Laboratuvar Tanısı

En iyi tanı parmak ucundan alınan kandan ince yayma ve kalın damla praperat hazırlayıp Giemsa ile boyayıp mikroskopta incelenerek konur. Kan ateşli dönemde alınmalıdır.

Özellikle *P.falciparum*'da parazitler iç organ kapillerlerinde olacağından provokasyon yöntemleri uygulanabilir.

- a. %0,1 Adrenalin solüsyonundan deri altına 0,5-1 ml verilir, 20 dk. sonra kan alınır.
- b. Dalak üzerine buz konur, 1/2 saat sonra kan alınır.

Tek negatif sonuç yetersizdir, 3 gün arka arkaya kan alınmalıdır (3).

4.12. *Toxoplasma gondii*'nin Sınıflandırması (Ho-Yen, 1992)

Subfilum	: Apicomplexa
Sınıf	: Sporozoasida
Order	: Eucoccidiorida
Suborder	: Eimeriorina
Aile	: Eimeriidae
Genus	: <i>Toxoplasma</i>
Tür	: <i>Toxoplasma gondii</i>

Toxoplasma gondii belirgin patolojik bulgulara rastlanmayan ve pek çok canlıda yaşamını devam ettirebilen, insanda enfekte bebek doğumu, görme bozuklukları, ölü doğum, düşük, beyin intihabı ve öldürebilen bir hastalık oluşturmaktayken hayvanların yavru düşüklerinden başka patolojiye bulgulara yol açmamakta olan toksoplazmosis parazitinin tanısı için evriminin bilinmesi ve morfolojik özellikleri büyük bir önem taşımaktadır. Bu parazit önemli konağı olan kedilerin ince bağırsak hücrelerinde seksüel döngüsü gerçekleşirken, kuşlar, sıcakkanlı tüm hayvanlarda kedilerdeve insanlarda seksüel olmayan döngü görülmektedir. Üç morfolojik şekli bilinmektedir.

1. Aseksüel olarak çoğalabilen form, trofozoit (takizoit, endozoit)
2. Dokularda enfektif form, bradizoit şekli
3. Kedilerin enfekte dışkısında görülen Ookist şekli, parazit seksüel döngüsü ve çoğalmasını kedinin ince bağırsaklarında tamamlamakta ve sıcakkanlı hayvanlar, kuşlar ve insanı enfekte edebilmektedir (Remington ve ark., 1992).

4.13. *Toxoplasma gondii* Morfolojisi

Takizoit: Aseksüel döngüde görülen Trofozoit olarak adlandırılmakta ön ucu sivri, hafif hilal şeklinde, arka ucu yuvarlak yapıda, 2-4x 4-7 µm boyutundadır. Hücre içi yerleşimi çoğalmak ve yaşamak için tercih etmektedir. Endodyogeni ile ikiye bölünmesi konak hücrelerinde tekrarlamaktadır. İki yavru hücre endodyogeni ile

tamamlamadan Rozet görünümüne sebep olan 4-6 saat arası tekrar eden nükleer bölünmektedir. Takizoitlerden oluşan kümeye, pseudokist tanımı hem parazit kökenli hem konak, parazit kökenli olamayan kist duvarlarının gerçek kist olarak uygun görülmüştür. Takizoitin hücre zarı dıştan çevreleyen, üç katlı membrandan oluşan pelikül adı verilen bir zardan oluşmaktadır. Takizoitlerin sivri veya ön tarafında koni şeklindeki yapıya konoid olarak isimlendirilmiştir. Kabul edilen bu oluşum sekresyon salgılanması konak hücrelerine girişinde ve parazitin beslenmesinde rol almaktadır. “Rhoptiri” adı verilen uzun ince kesecikler konoidin altında ya da arkasındadır. Konak hücre membranında değişikliklere yol açan takizoitler vücuda giriş yaptıktan sonra kana karışıktıklarında yapısında penetrasyon kolaylaştırıcı faktör bulunan enzim salgılayarak hücre içine girebilmekte, yaşamını sürdürebilmesi için vakuol duvarına temas etmeden, konak hücrenin vakuolu içinde devam ettirebilmekte, hücreleri nonfagostik, hem fagostik olarak fagosite edebilmektedir. (52) (Remington ve ark., 1992).

Kist: Bradizoitler dönüşebilmek için takizoitlerin yavaş çoğalmaları için kistlerde metabolik ihtiyacını indirgemek ve konak immün sistemini müdahale etmesiyle birlikte immün sistemden kaçması gerekmektedir. Bradizoitler takizoitler gibi 200µm çapa ulaşabilen ve konağın hücre vakuolüne yerleşebilen, bazen binlerce bradizoit bazen birkaç tane bradizoit içeren doku kistlerinden oluştuğu görülmüştür. Kist etrafındaki çeperinin iç tarafında parazitin oluşturduğu bir çeper, konağın oluşturduğu dış tarafta bir çeper oluşturmakta ve iki katlı bir çeper bulunmaktadır.

Ookist: *T. gondii*nin ookist formu kedigillerin bağırsak hücrelerinde enteroepitelial döngü sonucunda oluşmaktadır. İki tabakalı çeperi bulunan ookistler 11-14x 9-11 mikron boyutunda ve oval şeklindedir. Kedi dışkılarıyla dışarı çıkan ookistler uygun şartlarda olgunlaşması ve enfekte edici gelmektedir. Uygun koşullar olarak belirtilen ortamın oksijen ve ısına göre sporulasyon zamanı değişmekte ve sporulasyon olgunlaşma olarak adlandırılmaktadır. 37 °C'nin üstünde ve +4 °C'nin altında sıcaklıklarda sporulasyon oluşmamaktadır. Ookistlerin her birinde 2 adet sprokistten oluşan 4 sprozoit bulunur bu olay sporulasyon sonucu oluşmaktadır. Alkali temizlik maddeleri, klorlamaya ve laboratuvar deterjanlarına karşı dirençli olan

olgun ookistler amonyum sülfat ve yüksek sıcaklıklardaki suda öldükleri, uygun ısı ve nemli topraklarda 1 ve birkaç yıldan fazla canlı kalabilmektedir (Ho-Yen, 1992).

Sporulasyon son bulması için ağız yoluyla mideye geçen ookistler mide asidi ile duvarı erimekte serbest kalan ookist içindeki sporokistler duodenumda parçalanmakta sporozoitler serbest kalmaktadır. İki sporoblast zigotun ookist haline dönüşümüyle oluşmakta, sporokist (8,5x6µm) sporoblastların çeper oluşturarak dönüşmekte, 8 tane sporozoitin (8x2 µm) meydana gelmesi 4 ookist oluşturan sporokistlerin ikiye bölünme geçirmektedir. Bu durumda enfektif ookist oluşturmaktadır. Sporulasyonun uygun oksijen ve ısı olduğunda 1-21 gün sürmekte, bu sürenin 14-21 gün sürmesi için +11 °C'de, 5-8 gün için +15 °C'de 3 gün için +24 °C'de olduğu bildirilmiş, sporulasyonun durması +37 °C'nin üstünde, +4 °C'nin altında olduğu, 18 ay nemli toprakta ookist canlı kalmaktadır (Ho-Yen, 1992).

4.14. *Toxoplasma gondii* Evrimi

Parazitin karmaşık gibi olan evriminin iyi saptanabilmesi için Toksoplazmosis etkeninin insanlarda sebep olduğu enfeksiyonu daha iyi anlayabilmektedir. Gametositlerin merozoitlerden oluştuğu ve eşeysiz ve eşeyli olarak üredikleri *T. gondii*'nin konağı kedinin ince bağırsak epitelyum hücrelerinde bilinmektedir. *T. gondii*'nin kedilerde enfektif şekillerinden birini alması için eşeyli gelişme başlamakta. Kedilerde kuluçka zamanı denilen prepatent süre ookist ya da takizoit ile enfekte olduklarında, et yemesiyle doku kistleri enfekte olması daha uzun olmaktadır. İnce bağırsak epitelyum hücre içersine sporozoit ya da takizoit alımından sonra parazit şizogoni ile eşeysiz olarak bölünmekte (Dubey ve Frenkel, 1972; Overdulse, 1978), birkaç kez tekrar eden bölünmeden sonra bradizoit şekilleri meydana gelmektedir. İnce bağırsak epitelyum hücrelerinde gametosit şeklinde dönüşen bradizoit şekilleri mikro ve makro gametler gametositlerden meydana gelmektedir. İki kamçısı olan mikrogametler ince uzun iğ şeklindedirler (Hutchinson ve ark., 1971; Remington ve ark., 1992).

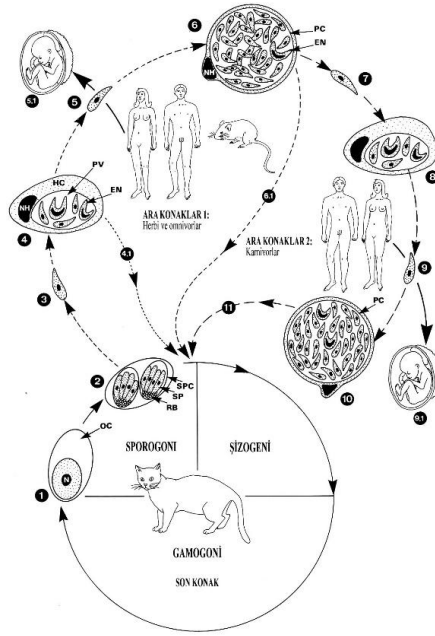
Kamçılarıyla hareket eden bir tane makrogamet epitelyum hücresinden ayrılan mikrogametlerde ayrılarak dölleme oluşturmak ve bulmaktadır. Kalın kabuklu zigot dölleme sonucu oluşmakta ve bir süre epitelhücresinde kaldıktan sonra bağırsak lümenine geçerek ookist adı almaktadır. Kedi dışkısından enfektif hale gelebilen ookistler dışarı atılarak sporulasyon gelişme evresini, nem ve ısı bakımından uygun olması, enfektif ya da olgun ookist içeren iki sporokistten oluşan dört adet sporzoit bulunmaktadır (Dubey ve Frenkel, 1972).

Ookistler 18 ay kadar uzun süre tatlı suda ve toprakta canlı kalabilmektedir. Ookistler kontamine suda veya herhangi bir yiyecekten sıcakkanlı hayvanlar dâhil kedilerin mide salgısını kolaylıkla geçmektedir. Ookistlerin sindirim enzimlerinin etkisiyle ince bağırsakların kalın duvarını eritmekte, merozoitleri oluşturan ve bağırsak epitelyum hücre içinde endiyogoni veya şizogoni ile çoğalmakta olan sporokistlerin parçalanmasıyla sprozoitler serbest kalmaktadır. Bu evre birkaç tekrar ettikten sonra trakozoitler bağırsak epitelyum hücreleri içinde eşeyli üremeyi başlatmaktadır.

Uzun süre canlılığını sürdürebilen ve hızlı çoğalabilen takizoitlere göre yavaş çoğalabilen bradizoitler bu gelişme şeklinde kuşlarda, sıcakkanlı hayvanlarda ve kedigillerde *T.gondii*'nin eşeyli olmayan olarak çoğalmaktadır. Isıya karşı konak dışında da duyarlı olabilmekte ancak *T. gondii*'nin konak içinde hızlı çoğalabilen takizoitler enfeksiyon oluşturan üç evresinden ikinci olarak bilinmektedir. Buzdolabında 10 güne kadar fare periton sıvısında takizoitler canlılığın sürdürebilmekte, meni sıvısında, gözyaşında, kanda, tükürükte, konak sıvısında, idrarda bulunabilmekte, takizoitlerin hastalığın bulaşmasında süte ve kanda önemli derecede görev aldıklarından dolayı pastörize süt içilmesi ve kan transfüzyonlarında edilmesi önerilmektedir (Ferguson ve ark., 1979).

Bradizoitlere dönüşen konak hücrelerinde çoğalan takizoitler bilinmeyen bir sebeple veya immün sistem baskısı ile doku kistlerini meydana getirmektedir. Yuvarlak veya oval şeklinde olan doku kistleri konak vücudunda kalp kası, beyin ve iskelet içinde bulunmaktadır. Uzun yıllar enfeksiyon olarak devam eden

bradiazitler doku kistleri içinde bulunarak hayvanlarda ve insanlarda kronik veya latent enfeksiyon haline geçmesini sağlamaktadır. Bağırsak epitelyum hücrelerine giren doku kistleri kana karışması, çoğalması ve vücuda dağılması için kuş ve sıcakkanlı hayvan etlerinin çiğ olarak tüketen hayvan ve insanların ince bağırsaklarında kist duvarlarının erimesiyle serbest kalan parazitler oluşturmaktadır (Siegel ve ark., 1971).



Şekil 6. *Toxoplasma gondii*'nin evrimi (58)

4.15. *Toxoplasma gondii*'nin Epidemiyolojisi

Dünya nüfusunun %13'ünün *T. gondii* ile enfekte olduğu, 1976 yılı itibarıyla toksoplazmosis seroprevalansının 500 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmekte, ABD' de bir yılda yaklaşık 3500 konjenital toksoplazmosisli bebeğin dünyaya geldiği, bunların yıllık bakım ve tedavi giderlerinin 300 milyon USD olduğu hesaplanmaktadır. Yine A.B.D.'de toksoplazmosisin hayvanlarda ne kadar yaygın olduğu konusunda yapılan çalışmalarda, domuzların %3 - %34 oranında enfekte oldukları, evcil kedilerde ve diğer hayvanlarda yüksek oranda toksoplazmosis antikoru bulun-duğu, bu sebeple toksoplazmosisin doğada çok yaygın olmasının anlaşılabilceği bildirilmektedir (Dubey, 1986).

4.16. Toksoplazmosis’de Klinik ve Patoloji

Parazit hastalığına yol açan *Toxoplasma gondii* vücutta tüm organlarda bulunabilen, meni tükürük gözyaşı, idrar beyin-omurilik sıvısı (BOS), akut dönemde kan gibi tüm vücut sıvılarında bulunabilen bu zoonoz transplasental bulaş sonucu düşüklere ve fetal yıkımlara neden olabilmektedir. Tüm dünyada son derece yaygın görülen bu hastalığın zoonotik karakteri iyi yıkanmamış, kontamine meyve ve sebze tüketilmesi, çiğ süt, kontamine su tüketilmesi, az pişmiş veya çiğ kontamine et, çiğ yumurta, organ nakli, transplasental geçiş ve organ nakli gibi yollarla bulaşmakta, parazitin kist içindeki Bradizoit formları konağın immün sisteminden korunması hastalığın kontrolünü sağlayamamakta ve hastalığı tekrarlamaktadır. Toplumların beslenme kültürleri ve gelenekleri bu parazit hastalığının etkilerini doğrudan doğruya etkileyen faktörler arasında yer almaktadır.

Normal seyirli olan toksoplazmosis immün sistemi (%90) sağlam olan kişilerde, hematolojik kanserler immünite bozukluğu olan T hücrelerine bağlı AIDS, soliter organ ve kemik iliği (Kİ) nakli gibi durumlarda kontrol altına alınmadığında çok ağır seyretmekte ve ölümle sonuçlanabilmektedir (Lindsay ve ark., 1991).

4.17. Toksoplazmosis’de Tanı

4.17.1. Etiyolojik Tanı

Parazitin etyolojik olarak görülmesi hastalığı kesin tanısı için önemlidir. Tanı koyacak uzmanların deneyimli olması laboratuvarın ekipman ve alet bakımından yeterli olması sonuçlara göre tedavinin planlanması ve hastayı yönlendirilmesi tanı yöntemleri için gerekmektedir. Konjenital toksoplazmosis tanısı koyulabilmesi için yenidoğan bebeklerin doku biyopsilerinde doku kistlerinin görülmesi, ya da plasentadan alınan örneklerle, hastanın vücut sıvılarından veya kanından takizoitleri izole etmekle toksoplazmosis olgularına rastlanabilmektedir (Ho-Yen, 1992).

Histopatolojik olarak biyopsi materyallerinin incelenmesi ya da vücut sıvısı ve kanın yayma preparatlarının giemsa ile boyanması *T. gondii* doku kistleri, bradizoit ya da takizoitlerine rastlanmadığında, deney farelerinin direkt beynine ya da periton içine 3-7 gün bekletilen inoküle edilen az miktarda şüpheli doku ile vücut sıvısı ve kandan alınan materyallerin süspanse edilerek beklenmesi önerilmektedir. Doku kültürüne hastadan alınan örneklerde eklenebilmektedir. Parazitin doku kültüründe kolaylıkla tanınması ve üredikleri bilinmektedir (Shepp ve ark, 1985; Unat ve ark., 1992).

Toxoplasma gondii takizoitleri mikroskopta fare periton sıvısından alınan örneklerde görülmektedir. Fare inokulasyonunun, doku kültürüne göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. Bu zaman sonunda etkene rastlanılamadığı takdirde, farenin karaciğer, beyin ve dalaktan hazırlanan homojenatlar, sağlıklı farelere inoküle edilir ve bu farelerde yaklaşık 6 hafta sonra *Toxoplasma* antikorları serolojik yöntemlerle aranmaktadır (Jacobs, 1953).

Yeni doğanda yapılacak izolasyon ile *T. gondii*'nin, görülmesi kesin tanı koymada yeterli olmaktadır. Fakat erken tanı maksadıyla otopsi materyalinden (beyin, kalp veya iskelet kasında) yapılacak araştırmalarda parazitin daha çabuk görülebilmesi ve de yeni doğanlarda iskelet kas biyopsisi ile de parazitin izolasyonu mümkündür. Yapılan araştırmalarda *T. gondii* izolasyonunun hem yeni doğanlarda hem de erişkin hastalardan, subretinal sıvıdan, kornea sıvısından (aqua humor), amniotik sıvıdan ve serebrospinal sıvıdan yapılabildiği belirtilmektedir (Wolf ve ark, 1942; Deutsch ve ark, 1957; Abbas, 1967).

Çocuklarda veya erişkinlerde iskelet kası, göz, akciğerler ve beyin gibi organlardan elde edilen biyopsi örneklerinden ya da otopsi esnasında alınan örneklerin histopatolojik incelemelerinde görülen *Toxoplasma* doku kistleri, akut toksoplazmosis de geçerli değildir. Fakat özellikle çocuklardaki lenfadenopati olgularından lenf yumrusu biyopsisiyle elde edilen örnekler histopatolojik yönden incelendiklerinde lenf yumrularında *Toxoplasma* doku kistleri oluşmayacağı ya da

çok nadir oluşacağı için, *Toxoplasma* takizoitlerinin görülmesi, akut enfeksiyon tanısı koymada yeterlidir.

Genel olarak vücut sıvılarından veya doku kesitlerinden hazırlanan yayma preparatlarda *Toxoplasma* takizoitleri görülerek akut toksoplazmosis tanısı konulmaktadır. Hastalık nedeniyle bir organda meydana gelen nekroz odakları, veya elde edilen biyopsi materyalinde gözlenen multiple doku kistleri ile de akut enfeksiyon tanısı konabilmektedir.

Histopatolojik inceleme maksadıyla boyanarak hazırlanan doku kesit preparatlarında *Toxoplasma* takizoitlerini gözlemlemek oldukça güçtür. Bu nedenle histolojik kesitler hazırlandığında, fikse işlemi öncesinde fluoresan antikor tekniği veya ELISA teknikleri kullanılarak parazitlerin daha kolay gözlemlenmeleri sağlanabilir. Bu yöntemler haricinde özellikle toksoplazmik ensefalit olgularında fluorescein ile işaretlenmiş monoklon antikorlar kullanılarak hazırlanan preparatların hemen elektron mikroskobu ile incelenmesi, tanıda başarılı sonuçlar vermiştir (Dos Santos, 1975; Van Knapen, 1982).

Kalp transplantasyonu gerçekleştirilen hastalarda, endomiyokardiyal biyopsi aracılığıyla toksoplazmosise yönelik tanıda başarı sağlandığı yayınlanmıştır (Cerezo ve ark, 1985).

4.17.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemler *T. gondii*'ye yönelik oluşan özgül antikorların bulunup tanıda kullanılmaları şeklinde özetlenebilir. Dünya geneli yapılan çalışmalarda birçok toplumdaki insanlarda *T. gondii*'ye karşı oluşan antikor seviyelerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu antikorların sağlıklı bireylerde de uzun zaman yüksek titrasyon seviyelerinde kalabildiği bilinmektedir. *Toxoplasma* antikorlarını saptayan çok sayıda serolojik yöntem vardır. Fakat enfeksiyonun lokalizasyonuna, yeni ve eski olmasına ve kişinin verdiği tepkiye göre antikor titreleri değişebildiğinden yorumlanması sorun yaratabilmektedir. Piyasada *Toxoplasma* antikorların aranması

ve tespitine yönelik çok sayıda ticari kit bulunmaktadır. Özellikle yurt dışından ithal edilen kitlerde kullanılan suşların, ülkemizdeki *Toxoplasma* suşlarından farklılık göstermeleri, hangi *Toxoplasma* suşu kullanılarak kitlerin hazırlandığının bilinmemesi ve bu kitler ile uygulanan testlerin yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuç verebilmeleri gibi nedenlerle durum daha karmaşık bir hal alabilmektedir.

Günümüzde de bir tek serolojik yöntem kullanılarak akut ve kronik toksoplazmosisin kesin olarak ayrımının yapılması mümkün olmadığından, klinik hekimlerinin *Toxoplasma* referans laboratuvarlarına başvurmaları önerilmektedir. Toksoplazmosis tanısında serolojik test profili; SFDT IgG + ELISA IgG, IgM, + IFAT serolojik yöntemlerinin birlikte kullanılması olup, ayrıca modifiye direk aglutinasyon testi de kullanılmaktadır (Schondermark ve ark, 1993; Walton ve ark, 1966; Walls ve ark, 1977; Balsari ve ark., 1980). Toksoplazmosis'e yönelik oluşan humoral antikorlardan en çok IgG aranmakta olup, bu antikor yanıtın bulaşmadan 1-2 hafta sonra oluşmaya başladığı, 1-2 ay sürede en yüksek seviyeye ulaştığı ve daha sonra IgG antikor düzeyinin bir miktar azaldığı, ancak hastada ömür boyu değişik düzeylerde kaldığı bilinmektedir. Hastalık geçirilmiş olsa dahi, hasta kanında değişik seviyelerde IgG bulunabileceğinden dolayı bir kişide hem ELISA hem de IFAT ile alınacak pozitif sonuç, kesinlikle aktif toksoplazmosis tanısında tek başına yeterli olmamaktadır (Gürüz ve ark, 1997; Özcel ve ark, 1997).

4.17.2.1.Sabin Feldman Boya Testi

Şüpheli hasta serumunda antikor ve kompleman tespit edildiğinde, *Toxoplasma* trofozoit veya takizoit şekillerinin erimesiyle pozitif sonuç elde edilen bir nötralizasyon yöntemi olarak kullanılmakta olup toksoplazmosis tanısına yönelik diğer yöntemlere göre, bu yöntem, referans tanı yöntemi olarak uygulanmaktadır. Diğer serolojik yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de bulaşmadan 1-2 hafta sonra oluşarak, 1-2 ay sürede pik noktasına ulaşan IgG antikorlarını aranması hedeflenmektedir. Testin sonunun pozitif olmasıyla hastalığın durumu bağlantılı olmamaktadır. Bu yöntemi uygulamada canlı *Toxoplasma* parazitler kullanıldığından, sadece bazı referans laboratuvarlarında uygulamakta olup, hastalık

laboratuvar çalışanlarına bulaşabileceğinden dolayı oldukça dikkatli çalışılması gerekmektedir.

Sabin Feldman boya yöntemi negatif sonuç verdiğinde, kişinin bundan öncesinde toksoplazmosis etkeniyle karşılaşmamış olduğu düşünülmekte olup; ayrıca bazı toxoplasmik ensefalitis ve korioretinitis vakalarında SF yönteminin negatif sonuç verebildiğini bildiren araştırmalarda bulunmaktadır. Testin uygulanışı; canlı trofozoitler, şüpheli serum ve kompleman (aktivatör serum) karıştırılması, bir saat 37°C’de inkübasyon sonrasında ortama boya maddesi olarak metilen mavisinin eklenmesi şeklinde özetlenebilir.

Karışım içerisinde spesifik antikor bulunması durumunda, kompleman ile aktive olarak parazit membranını eriteceğinden, *Toxoplasma* trofozoitleri boyanmamakta (pozitif sonuç), eğer ortamda spesifik antikor mevcut değilse, trofozoit membranı erimeyeceğinden, metilen mavisıyla boyanır ve mikroskopta gözlemlenmektedirler. (negatif sonuç) (Thulliez ve ark, 1986).

4.17.2.2.İndirek Fluoresan Antikor Yöntemi (IFAT)

Bu test; canlı *toxoplasma* parazitlerinin kullanımını gerektirmediğinden ve SF testi yöntemine göre daha ucuz bir yöntem olduğundan tercih edilmekte ve çoğu parazitoloji laboratuvarında uygulanmaktadır. SF test yöntemi gibi IFAT da IgG antikorları tespit etmek için uygulandığında, SF testiyle aynı titrelerde pozitif sonuç vermektedir. Fakat şüpheli hasta serumunda antinükleer antikorlar mevcut olduğunda yanlış pozitif sonuç verebileceği gibi, IgG antikorlarının düşük seviyede bulunması durumunda da yanlış negatif sonuç verebilmektedir.

İndirekt Fluoresan Antikor yöntemiyle IgM antikorları aranırken, bu antikorun hastalığın bulaşımından bir hafta sonra oluştuğunu ve sonrasında antikor titrasyonunun süratle arttığını ve ayrıca birkaç ay içerisinde benzer hızla azaldığını hatırlamak gerekmektedir. IgM antikorları, düşük titrasyonda bir yıl süreyle pozitif kalabilir. Romatoid faktör ve antinükleer antikorlar hatalı pozitif sonuç alınmasına

yol açabilmektedir. Ayrıca hatalı negatif sonuç alımını önlemek için IgG blok antikorlarının öncesinden serumdan ayrılması gerekmektedir (Gürüz ve ark, 1997; Filice ve ark, 1980).

4.17.2.3. Direkt Aglutinasyon Yöntemi (DA)

Ticari olarak da bulunabilen *Toxoplasma* takizoitleri, Formol içinde saklanabilir ve yalnızca IgG antikorlar taramasında kullanılmaktadır. Bu yöntem serumdaki özgün olmayan IgM antikorlarına karşı çok hassastır ve bu nedenle yanlış pozitif aglutinasyon ile hatalı sonuç alınabilmektedir. Şüpheli serumlar; IgM antikorunun etkisi giderilebilmesi maksadıyla yöntemin uygulanmasının öncesinde 2 merkaptotenol ile muamele edilerek kullanılabilirler. Bu testin uygulanışı oldukça basit olup sonucunun da güvenilirliğinin yüksek olduğu bildirilmekte ancak IgM taramasında kullanılması önerilmemektedir (Balsari ve ark, 1980).

Direkt aglutinasyon yönteminde *Toxoplasma* trofozoit formlarının daha öncesinde tripsin uygulanarak, sitoplazmik antijenik yapılarının aydınlatılarak yöntemin uygulanmasıyla, duyarlılık oranının çok daha artabileceği, SF testiyle karşılaştırılacak olursa DA yönteminin duyarlılığının %96, özgünlüğününse %98'e varabildiği gözlenmiştir (Özcel ve ark, 1997).

4.17.2.4 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Günümüzde Toksoplazmosisin tanısına yönelik özellikle IgG antikorlarının taranmasında en çok ELISA yöntemi kullanılmaktadır. *Toxoplasma* tanısında IgG antikorlarını taramaya yönelik tasarlanmış ticari olarak sunulan birçok kit var olup, bu kitlerin doğru sonuçlar verebilmeleri hazırlanış suşlarının antikorun meydana geldiği *toxoplasma* suşu ile uyumluluğu halinde mümkündür. Fakat pozitivite titresi ne seviyede olsa da yalnızca ELISA (IgM, IgG ve IgA) sonucuyla hastalığın değerlendirilmesinde tek başına yeterli görülmemelidir.

Toksoplazmosisten şüphelenilen AIDS hastalarında özellikle de toxoplazmik ensefalit vakalarında, sadece ELISA sonucuyla toksoplazmosisin sonradan edinilmiş veya konjenital olup olmadığına, kronik, akut veya latent olup olmadığına, karar verilebilmesi mümkün değildir. IFAT'daki gibi, ELISA yöntemiyle IgM aranmasında da, şüphelenilen serumda romatoid faktör ya da antinükleer antikorların bulunması durumunda, IgM ELISA testiyle veya ticari kitler ile hatalı pozitif sonuç alınmaktadır. Öbür yandan piyasadaki ticari olarak sunulan IgM tarayan tanı kitleri ile yüksek özgün sonuç alınamadığı ve bundan dolayı enfeksiyona dönük hatalı değerlendirmede bulunulabileceği, kit değişimi ile testin yinelenmesi ya da bir diğer yöntem ile IgM antikorunun titrasyon düzeyinin belirlenmesi gerektiği, hastalığa dair daha doğru yorumların elde edilecek sonuçlar ile yapılabileceği bildirilmektedir (Desmont ve ark, 1980; Ak, 1997).

Enfeksiyonun erken ya da geç evrede olduğunun tespitinde IgM, IgG ve IgA ELISA testleri yetersiz olduğundan dolayı primer enfeksiyon zamanının tespit edilmesinde spesifik IgG avidite testinden yararlanabilmektedir (Wilson ve ark, 1997; Gürüz ve ark, 2002; Montaya, 2002; Bahar ve ark, 2005).

4.17.2.5.Lateks Aglutinasyon Testi (LAT)

Toxoplasma trofozoit ya da takizoitlerinin sonikatör aracılığıyla parçalanması ile elde edilen, *toxoplasma* sitoplasma ve membran antijenleri karışımı kaplanmış lateks partikülleri, testin yapılacağı şüpheli kan serumu ile belli oranlarda dilüe edilerek oda sıcaklığında 12 saat süreyle inkübe edilir. İnkübasyonun neticesinde U şekline benzer test plakları dibinde aglutinasyon oluşursa pozitif sonuç olarak kabul edilir. Eğer plak çukuru dibinde büyük nokta halinde bir görüntü meydana gelirse negatif sonuç olarak kabul edilir. Bu yöntem SF testi yöntemiyle kıyaslanacak olduğunda, özgünlüğünün %99 ve duyarlılığının ise %81 olduğu, ortamda spesifik olmayan IgM antikorları bulunması halinde test ile %1-2 oranında yalancı pozitif sonuç alınabileceği bildirilmiştir (Thulliez, 1986).

2.17.2.6. Immunosorbent Agglutination Testi (ISAGA IgM)

Bu testin prensibi şüphelenilen serumda var olabilecek spesifik anti *toxoplasma* IgM antikorlarının, dip kısımları U şekline benzeyen aglutinasyon plakları içerisinde kaplanmış anti insan IgM Mka (monoklon antikorları) aracılığıyla immunolojik esasa dayalı yakalanması şeklinde açıklanabilir. ISAGA testinde, anti insan IgM, IgG antikorlu içeren karışım tavşandan izole edilir, tampon çözeltisiyle dilüe edilerek dip kısımları U şekline benzer aglutinasyon plakları çukurlarına 100 µl eklenerek bir gece süreyle buzdolabında tutulur. Bir sonraki gün plaklardaki çukurlar boşaltılır ve en az üç kez tekrarlar beşer dakika süreyle içeriğinde tween 20 olan PBS ile yıkanır. Sonrasında test yapılması planlanan kan serumu, amniyon sıvısı, ya da beyin omurilik sıvısı PBS ile hedeflenen dilüsyonlarda sulandırılır ve tekrardan her bir çukura 100 µl eklenerek oda sıcaklığında 1-2 saat süreyle bekletilir, daha sonra plak yıkanır ve her bir çukura, *Toxoplasma* trofozoit formları belirlenen miktarda dilüe edilerek konur. Plaklar 37 °C etüvde üstü kapalı halde bir gece boyunca inkübe edilir ve bir sonraki gün plaklar büyüteç vasıtasıyla bir ışık kaynağından yardım alınarak okunur. Plak çukurları içinde düğme benzeri tam anlamıyla bir sedimentasyon gözlenirse negatif sonuç yahut çukurlarda tabanı kaplayacak biçimde bulut benzeri bir görünüm meydana gelmişse, pozitif sonuç şeklinde yorumlanır. Pozitivitenin derecelendirilmesi kontrol çukurlarından anlaşılmaktadır. Bu testten hem IgM taramasında, hem de *toxoplasma*'ya yönelik oluşan IgE ve IgA antikorlarının taramasında yararlanılabilmektedir (Thulliez ve ark., 1986).

2.17.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi

Yaklaşık 30 yıldır laboratuvar uygulamalarında kullanılan polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) yöntemi, özgül bir DNA bölgesinin birkaç saat içerisinde milyarlarca kopya verecek şekilde çoğaltılmasına dayanan, devrim niteliğinde gelişmeler sağlamış etkin bir yöntemdir. PZR araştırılan enfeksiyon etkeninin tanısına yönelik ileri derecede özgül ve duyarlı olduğundan mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarında, özellikle mikroskopla inceleme veya kültür ile kolayca saptanamayan enfeksiyon etkenlerinin tanısına büyük katkıda bulunmuştur. Bununla

birlikte, PZR'nin de bazı dezavantajları vardır; bunların başında diğer tanı seçeneklerine göre daha pahalı olması, özel bir laboratuvar, ekipman ve eğitimli personel gerektirmesi sayılabilir. Aynı zamanda, araştırılan patojene uygun test koşullarının oluşturulma süreci olarak tanımlanan optimizasyonun bazen uzun zaman alması, test koşullarındaki ufak sapmalar ya da kontaminasyonların testin çalışmasını engellemesi de dezavantaj sayılmaktadır.

Özellikle 2000 yılından sonra klinik parazitolojide kullanımı yaygınlaşan ve birçok paraziter hastalığın rutin tanısında yüksek duyarlılık ve özgüllüğü ile başarıyla kullanılmakta olan PZR yöntemi, toksoplazmoz olgularının tanısına da büyük katkı sağlamıştır. Göz ve beyin toksoplazmosisi, konjenital toksoplazmosis ile tüm organlara yayılan toksoplazmosis olgularında dokulardan ve vücut sıvılarından izole edilen *T. gondii* DNA'sının, PZR ile amplifikasyon kullanılarak tanımlanması mümkün olmuştur (Luft ve Remington, 1983). PZR ile gebeliğin başında ilk kez enfekte olduğu saptanan kadınlarda, bu test son derece özgül olduğundan, acil tedavi uygulamasıyla bebeğin kurtarılmasına çalışılabilecektir. Dolayısıyla, toksoplazmosis şüphesi olan tüm gebelerde fetus üzerinde invaziv olmayan PZR önemli bir alternatif olarak dikkati çekmektedir.

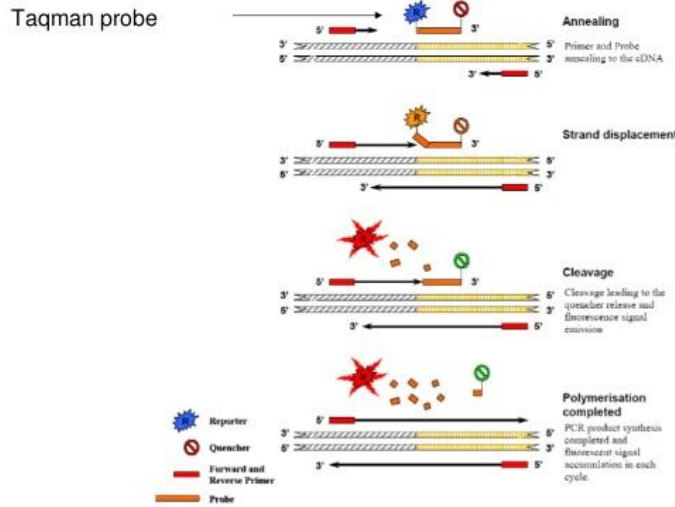
Bugüne değin duyarlılığı yaklaşık %77, özgüllüğü ise hemen hemen %100 bulunan çeşitli PZR yöntemleri tanımlanmıştır (Brezin ve ark, 1990; Roth ve ark, 1992; Dupony-Comet ve ark, 1993). Ayrıca saptama limiti ul'de 2 parazit olan ve 20 olgunun 18'ine tanı koyduran B1 genine özgü bir PZR protokolü de kullanılmaktadır (Jalal ve ark, 2004).

2.18. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (GZ-PZR) Yöntemi

Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu yöntemi, nükleik asitlerin çoğaltılmasına paralel artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesi sayesinde kantitatif sonuç alınabilen bir etkin bir PZR yöntemidir. GZ-PZR sırasında gerek sıcaklık döngüleri gerekse floresan hesaplaması aynı cihazın ve aynı tüpün içinde gerçekleştiğinden çoğaltılması hedeflenen bölge kısa sürede ve düşük kontaminasyon

riski sayesinde güvenle saptanabilmektedir. İşlem sonunda oluşan ürünün saptanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır; bunlar arasında başlıca çift zincirli DNA boyaları (örneğin, Syber Green boyası) sayılabilir. GZ-PZR sırasında primerlerin bağlanması sonrası polimerizasyon gerçekleşirken hedef DNA yeniden çift sarmala dönüşür ve dolayısıyla DNA'ya bağlanan boyanın arttığı gözlenir. Boya arttıkça yayılan floresans miktarında da artış dikkati çeker, ancak floresan artışı testin doğru çalıştığını göstermemektedir. Bir başka deyişle, artan floresansın hedeflenen gen bölgesinin çoğalmasıyla mı yoksa özgül olmayan başka bir üründen dolayı mı olduğunu anlayabilmek için özgül, işaretli probalar kullanılır ve erime eğrisi analizi “melting curve analysis” yapılır.

Quantitative real-time-PCR



Şekil 7. Gerçek zamanlı PZR testinin çalışma prensibinin şematik gösterimi

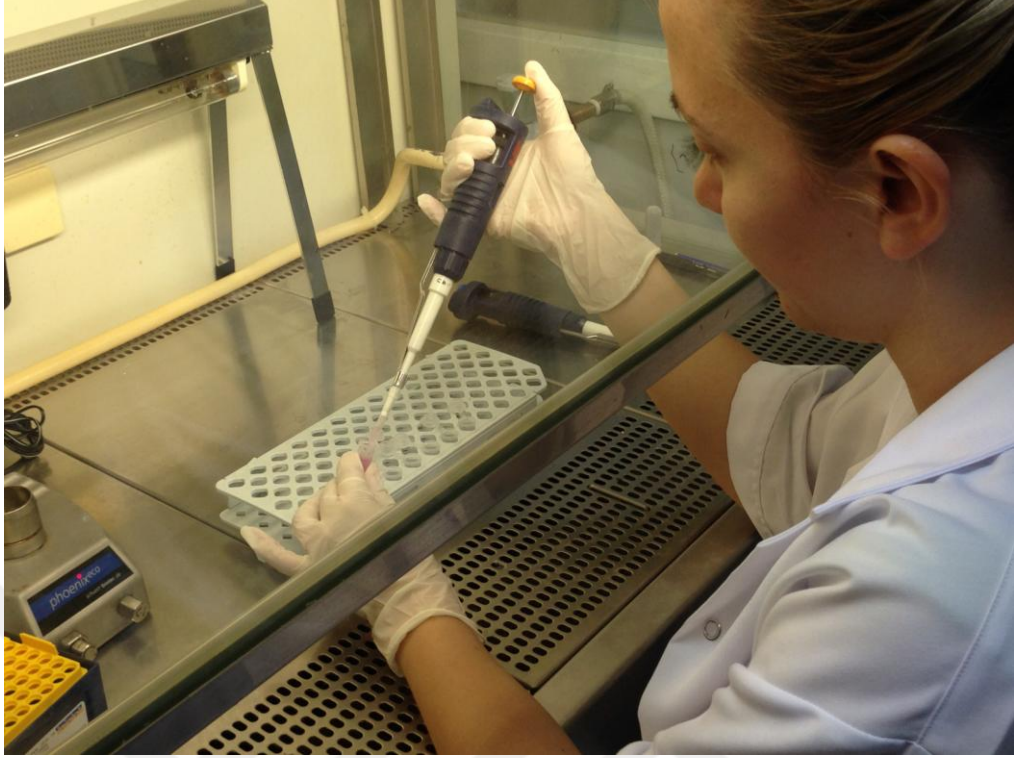
Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyonu yöntemi Leishmaniasis, sıtma ve Toxoplasmosis gibi birçok parazitolojik hastalık tanısında kullanılmaktadır. Daha sonra geliştirilen ve yaygın olarak kullanılmaya başlayan gerçek zamanlı PZR (GZ-PZR) yöntemi, daha pahalı bir yöntem olmakla birlikte düşük kontaminasyon riski, hızlı ve güvenilir sonuç vermesi ve kantitatif sonuçlarıyla yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Gürüz, 2007).

5. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

5.1. Örneklerin Eldesi

Çalışmada Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji A.D.'nda, sıvı azot içinde -196°C'de saklanmakta olan parazit suşları kullanılmıştır. Bu suşların (*L. tropica* (promastigot), *L. infantum* (promastigot), *L. tropica* (amastigot), *L. infantum* (amastigot), *P. falciparum*, *P. vivax* ve *T. gondii*) her biri canlandırılmış ve Thoma lamı aracılığıyla mikroskop altında sayılarak her bir mikrolitrede 10^7 parazit olacak şekilde parazit süspansiyonları oluşturulmuştur. Daha sonra bu parazitler PBS solüsyonu ile sulandırılmış ve mikrolitrede 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 2500, 5000 ve 10.000 parazit olacak şekilde dilüsyon yapılmıştır. Bu tüpler tek tek kullanılarak farklı GZ-PZR çalışmaları yürütülmüş ve reaksiyonun pozitif sonuç verdiği en ileri dilüsyon tespit edilmiştir. Saptanan pozitif dilüsyon ile negatif saptanan bir önceki dilüsyon arası tekrar dilüsyon yapılarak en düşük parazit sayısı saptanmaya çalışılmıştır.

Moleküler uygulamalar aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 8. Örneklerin dilüsyonu yapılarak GZ-PZR'ye hazırlanması

5.2. Parazitlerin DNA İzolasyonu

Hazırlanan parazit süspansiyonlarından filtreli pipet uçları yardımıyla 200 μ l alınarak ependorf tüplerine konulmuştur. Tüp ependorf tüpleri içerisindeki parazit süspansiyonlarına aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1. Üzerlerine 40 μ l Proteinase K ve 200 μ l Binding Buffer eklenip karıştırılmıştır.
2. Tüpler 70 °C' ye ayarlanmış ısıtıcı blok içerisinde 10 dk bekletilmiştir.
3. Bu işlemten sonra ependorf tüpler ısıtıcı bloktan alınarak içerisine 100 μ l isopropanol alkol eklenip karıştırılmıştır.
4. Collection tüplerin içerisine yerleştirdiğimiz filtreli tüpler içerisine ependorf tüplerinin içerisindeki sıvının tamamı aktarılmış ve 1 dk 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonunda collection tüpler yenileri ile değiştirilmiştir.

6. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl Removal Buffer eklenmiş ve 1 dk 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj sonunda collection tüpler yenileri ile değiştirilmiştir.
8. Filtreli tüplerin içerisine 500 µl Wash Buffer eklenmiş ve 1 dk 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonunda collection tüpler yenileri ile değiştirilmiştir.
10. Wash buffer işlemi tekrarlanmıştır.
11. Santrifüj sonunda collection tüpler yenileri ile değiştirilmiştir.
12. Filtreli tüpler boş olarak 1 dk santrifüjün en hızlı derecesinde 10 sn santrifüj edilmiştir.
13. Santrifüj sonunda collection tüpler ependorf tüpleri ile değiştirilmiştir.
14. Filtreli tüplerin içine 100 µl 70 °C' deki Elution Buffer konmuş ve 1 dk 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
15. Santrifüj sonunda filtreli tüp atılmış ve ependorf içerisinde DNA elde edilmiştir.
16. DNA örnekleri PZR çalışılana dek -20 °C'de saklanmıştır.

5.3. Parazitlerin PZR Yöntemi

Leishmania izolatları için ;

ITS1 problu gerçek zamanlı PZR testi uygulanmıştır. *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5,8S rRNA yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi primer ve probalar kullanılmıştır (Töz ve ark, 2013).

Forward primer 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'

Reverse primer 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' ve

Prob 1 - 5'-CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT-Fluo-3'

Prob 2 – 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'

Sıtma izolatları için ;

Plasmodium falciparum ve *P. vivax*'ın tanımı için 18S ribosomal RNA gen bölgesine özgü primer kullanılmıştır (Rougemont ve ark, 2004).

Forward primer 5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3'

Reverse primer 5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3' ve

Plasmodium falciparum prob

5'-6FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-TMR

Plasmodium vivax prob

5'-6FAM-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-TMR

***Toxoplasma* izolatları için ;**

Toxoplasma gondii'nin tanısı için özgün primerler ve prob, kullanılmıştır (Selseleh ve ark, 2012)

Forward primer 5'-CTCGCCTGTGCTTGGAGC-3'

Reverse primer 5'-CCTCGCCTTCATCTACAGTCCT-3'

Prob 5'-6FAM-TCTGTAGTCCCCTTCGACTTCTGTCCC-BHQ1

Gerçek zamanlı PZR analizi için hazırlanan toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımı; 1,5 µl H₂O (PCR grade water), 1 µl Forward Primer, 1 µl Reverse Primer, 0,5 µl Probe1, 0,5 µl Probe2, 12,5 µl QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5 µl genomik DNA içermektedir.

Örneklerin karışımları 0,2 ml' lik ependorf tüpleri içerisine hazırlandıktan sonra gerçek zamanlı PZR cihazına konulmuştur. Gerçek zamanlı kantitatif PZR' ye başlanmış ve yaklaşık bir saat sonra sonuçlar elde edilmiştir.

6. BULGULAR

Yapılan GZ-PRZ testinde *Plasmodium falciparum*, *Leishmania tropica* (promastigot), *Leishmania infantum* (promastigot), *Leishmania tropica* (amastigot), *Leishmania infantum* (amastigot) parazitlerinde en düşük parazit sayısı 10 olarak bulunurken, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii* parazitlerinde parazit sayısı mikrolitrede 12 olarak bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Parazit türlerine göre GZ-PRZ saptanan en düşük parazit sayısı

Parazit Türü	GZ-PRZ Saptanan En Düşük Parazit Sayısı (Adet)
<i>Plasmodium falciparum</i>	10
<i>Plasmodium vivax</i>	12
<i>Leishmania tropica</i> (promastigot)	10
<i>Leishmania infantum</i> (promastigot)	10
<i>Leishmania tropica</i> (amastigot)	10
<i>Leishmania infantum</i> (amastigot)	10
<i>Toxoplasma gondii</i>	12

7. TARTIŞMA

Paraziter hastalıkların tanısında farklı duyarlılığa ve özgüllüğe sahip birçok yöntem kullanılmakta, her biri için tanıda altın standart farklılık gösterebilmektedir. Çoğu bakteri ve virüs enfeksiyonunda PZR ile tanı, diğer yöntemlere göre çok daha duyarlı ve özgün bulunarak uzun yıllardır rutin tanıda kullanılmaktayken, paraziter hastalıklara yönelik PZR uygulamaları daha geç başlamıştır. Bugün, klinik önemi yüksek protozoonların çoğu için kabul edilmiş PZR protokolleri bulunsa da birçok helmint enfeksiyonu için PZR henüz deneysel düzeyde olup rutin kullanıma uygun protokollerin araştırması henüz tamamlanmamıştır. Protozoon enfeksiyonlarının tanısında PZR protokolleri çoğunlukla başarıyla kullanılsa da bu yöntemlerin hafif enfeksiyonlardaki duyarlılığı bazen tartışma konusu olup düşük bulunabilmektedir. Bu nedenle, geliştirilen ya da rutinde kullanılan PZR uygulamalarında, çalışılan parazitlere ait duyarlılık düzeyleri, bir başka deyişle en az kaç parazit kaldığında pozitifliğin korunuyor olduğunun bilinmesi gerekmektedir. Bu amaçla yapılan duyarlılık ölçütleri PZR protokolünün yaygın ve güvenle kullanımı için son derece önemlidir.

Bu çalışmada PZR ile tanı konulma limitleri araştırılan üç parazit olan *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* ve *T. gondii*, gerek ülkemizde gerekse dünyada önemli birer paraziter enfeksiyon etkeni olarak tanınmaktadır.

Bunlardan leishmaniasis, Antartika dışındaki bütün kıtalarda yayılım gösteren ve vektör aracılığıyla bulaşan zoonotik/antroponotik karakterli bir protozoon paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Göreceli olarak daha az öneme sahip öldürücü olmayan ve kendiliğinden iyileşebilen deri enfeksiyonlarından (kutanöz/mukokutanöz leishmaniasis), iç organları tutan ve epidemilerle binlerce kişinin ölümüne neden olabilen sistemik enfeksiyonlar (visseral leishmaniasis = Kala-Azar) gibi farklı hastalıklara neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün rakamlarına göre, bugün tüm dünyada toplam 98 ülke ve bölgede yaklaşık 12 milyon insan leishmaniasise yakalanmış durumda, 350 milyon kişi ise risk altındadır. Her yıl bu rakamlara 2

milyon yeni olgunun katıldığı, bu olguların yaklaşık bir buçuk milyonunun kutanöz leishmaniasis (KL), yarım milyonunun ise visseral leishmaniasis (VL) olduğu tahmin edilmektedir. Leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısının 50.000 olduğu belirtilmektedir (WHO Report; 2010).

Leishmaniasis olgularının artma nedenleri arasında kırsal bölgelerden kentlere göç, enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde iş sahalarının açılması, malnütrisyon, sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ve HIV/*Leishmania* koenfeksiyonunda artış sayılabilir. Leishmaniasisin gerçek prevalansının resmi rakamların üzerinde olduğu, zira sağlık hizmetlerine ulaşması zor bölgelerdeki olgulara tanı konulamadığı tahmin edilmektedir. Leishmaniasisin yol açtığı ekonomik kayıp tıbbi bakım ve tedaviler ile birlikte iş gücü bakımından değerlendirildiğinde oldukça büyüktür; bu nedenle gelişmekte olan ülkelerin ekonomileri için leishmaniasis ciddi bir sorundur. Gelişmiş ülkelerde ise HIV/*Leishmania* koenfeksiyonunda görülen artış nedeniyle leishmaniasise ilgi artmaktadır (Alvar ve ark, 1997; Desjeux, 2004; WHO, 2016).

Dünyada leishmaniasisin visseral, kutanöz ve mukokutanöz olmak üzere 3 ana klinik şekli bulunmaktadır. Visseral leishmaniasis, *Leishmania donovani*, *L. infantum* (Yeni Dünya’da *L. chagasi*); kutanöz leishmaniasis *L. major*, *L. tropica* ve *L. aethiopica* (daha az olarak *L. infantum* ve *L. donovani*); Yeni Dünya’da görülen mukokutanöz leishmaniasis ise *L. mexicana* ve *L. braziliensis* grubu parazitler tarafından oluşturulmaktadır (Desjeux, 2004; WHO Report; 2010).

Türkiye’de visseral leishmaniasis, daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmekle birlikte bütün bölgelerimizden bildirilmiş olgular bulunmaktadır. Ülkemizde VL etkeninin, diğer Akdeniz Bölgesi ülkelerinde olduğu gibi *Leishmania infantum* MON-1 olduğu izoenzim analizi ve moleküler yöntemlerle gösterilmiştir. Kutanöz leishmaniasis başta Güney Doğu Anadolu Bölgesi olmak üzere Akdeniz, Orta Anadolu ve Ege bölgelerinden bildirilmektedir. Şimdiye dek yapılan çalışmalarla hastalığın etkeninin *Leishmania tropica*’nın farklı zimodemleri olduğu aynı zamanda *Leishmania infantum*’un da KL’ye sebep olabildiği gösterilmiştir (Özbel, 2007).

Leishmania parazitini görerek tanı koymak için, kemik iliği (Kİ), dalak, karaciğer, lenf bezi aspirasyonu yapılabilen ve ya perifer kan örneğindeki çekirdekli hücreler incelenmektedir. Alınan bu örnekler NNN besiyerlerine ekimleri yapılabilir. Serolojik yöntemlerin yanı sıra antijen arayan testlerden de yararlanılmaktadır. Ayrıca, aspirasyonla elde edilen örnekler veya direkt kan kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) uygulanabilmektedir. Özellikle immun yetmezliği olan hastalarda da periferik kanda parazit sayısı çok miktarda olduğu için uygun türdeki tatarcıklar kullanılmak suretiyle hastadan kan emdirilmekte ve sinekte promastigotların gelişimi disseksiyon ile araştırılmaktadır (Xenodiagnosis) (Özbel, 2007).

Leishmaniasis olgularını tanımlamada uzun yıllardır kullanılan PZR protokolleri bulunmaktadır (Jauregui ve ark, 2001; Kompalic-Kristo ve ark, 2007). Bu protokoller arasında kinetoplast DNA'sı (kDNA), ribozomal RNA'nın küçük alt ünitesi (ssRNA) ve ITS-1 bölgesine yönelik olanlar en sık kullanılanlardır (Abbasi ve ark, 2013). Özellikle öldürücü olabilen iç organ tutulumu olgularında (VL), hızlı ve etkin tanı olanağı sunan, hatta semptomsuz olguların bile saptanmasına olanak sağlayan bu yöntemler ile düşük parazit sayısına sahip olgularda dahi tanı konulabildiği bildirilmektedir (Mary ve ark, 2006). VL'nin yaygın görüldüğü bir Afrika ülkesi olan Etiyopya'da yapılan bir çalışmada, VL'nin tanısı için en duyarlı yöntemin kinetoplast DNA'sına yönelik GZ-PZR protokolü olduğu ve testin saptama eşiğinin mililitrede 10 parazit civarı olduğu bildirilmiştir (Abbasi ve ark, 2013). Bu sonuçlarla karşılaştırıldığında, *Leishmania* parazitlerinin uyguladığımız PZR protokolü ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Sıtma, *Plasmodium* cinsi protozoonların etken olduğu, tüm dünyada her yıl 300 milyondan fazla kişinin enfekte olduğu ve bu kişilerden en az bir milyonunun ölümüne neden olan ciddi bir enfeksiyon hastalığıdır. Sıtma insandan insana anofel türü sivrisinekler ile bulaşır ve dünyada bu sivrisinekler ile insanlarda hastalık yapan *Plasmodium* türlerinin bulunduğu her bölgede görülebilir. Sıtmanın insanlara ayrıca kan transfüzyonu, organ transplantasyonu, ortak enjektör kullanımı ve anneden çocuğa konjenital yolla da bulaşabildiği gösterilmiştir. *P. falciparum* ağır ve ölümcül bir klinik tabloya yol açmakta, dünyada sıtmaya bağlı ölümlerin hemen hemen

tamamının sorumlusu olarak gösterilmektedir. Diğer türler olan *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ve son yıllarda Uzak Doğu Asya'daki bazı bölgelerden bildirilen *P. knowlesi* ise daha nadir rastlanan sıtma etkenleridir. Türkiye'nin coğrafik konum yönünden anofel cinsi sivrisineklerin yaşama ve üremesi için uygun bir iklim kuşağında yer alması sıtmanın ülkemiz için sürekli bir tehdit olmasına yol açmaktadır. Ülkemizde yerel olgulardan sorumlu sıtma etkeni *P. vivax* olup *P. falciparum* ve *P. ovale*'nin *P. vivax* ile birlikte etken olduğu seyahat kaynaklı az sayıda sıtma olgusunun bildirilmiş olduğu görülmektedir (Özbilgin ve ark, 2010).

Sıtmanın tanısında tüm dünyada en yaygın kullanılan yöntem mikroskobidir. Hastanın parmak ucundan alınan kan örneği alınarak hazırlanan ince yayma ve kalın damla adı verilen preparatların mikroskopta incelenmesi ile *Plasmodium*'lar tespit edilebilmektedir. Bunun dışında, özellikle saha çalışmalarında yaygın olarak kullanılan çeşitli hızlı tanı kitleri bulunmaktadır ve bunlardan bazılarının ileri derecede özgül ve duyarlı olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda moleküler yöntemlerin sıtma tanısında da yaygın olarak kullanıma girmesiyle sıtma tanısında daha etkili tanı yöntemleri uygulandığı görülmektedir. Nitekim yakın zamana kadar insanı enfekte eden dört *Plasmodium* türü olduğu bildirilirken *P. knowlesi*'nin de insanları enfekte ettiği son yıllarda gerçekleştirilen DNA dizi analizi çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Schussek ve ark, 2013).

Sıtmanın PZR ile tanısında, diğer enfeksiyonlarda olduğu gibi parazitin DNA'sı araştırıldığından canlı/ölü parazit ayrımı yapılamamaktadır ki bu durum, PZR'nin en önemli dezavantajlarından biri kabul edilir. Bununla birlikte, Jarra ve Snounou 1998 yılında yayınlanan çalışmalarında sadece canlı parazitleri saptayan bir PZR protokolü tanımlamışlardı (Jarra ve Snouou, 1998). Yine de PZR'nin klinik parazitolojideki tanısal önemi *Leishmania* ve *T. gondii*'ye göre daha geridedir, zira sıtmaya bağlı ölümlerin tamamına yakınından sorumlu *P. falciparum*, yoğun enfeksiyona yol açtığından mikroskobiyle büyük oranda saptanabilmektedir. Diğer etkenlere bağlı sıtmada ve özellikle en sık gözlenen *P. vivax*'a bağlı sıtmada PZR, kolayca tanı konulmasını sağlamakta, mikroskobiyle atlanabilen olguları saptayabilmektedir. Ayrıca, aynı anda tüm sıtma türlerinin birlikte araştırılabildiği bir GZ-PZR panelinde

birden fazla etkenin yol açtığı sıtma enfeksiyonları da belirlenebilmektedir. Nitekim, deneysel çalışmalarla sıtma tanısında PZR duyarlılığındaki alt limitin 5-10 yeni izole edilmiş sporozoit (50 kriyoprezervasyondan canlandırılmış sporozoite denktir) olduğu bildirilmektedir (Schussek ve ark, 2013).

Sıtma tanısında PZR'nin kullanımı çoğunlukla deneysel çalışmalar içindir; bununla birlikte türe özgü araştırmalar istendiğinde rutinde de kullanılmaktadır. *P. falciparum* dışında diğer sıtma türleriyle olan enfeksiyonlarda parazitemi en fazla %2 olduğundan mikroskopiyle en tecrübeli araştırmacılar tarafından dahi yanlış negatif tanımlar zaman zaman konulabilmektedir. Sıtmada PZR'nin limit tanımlamasının yapılması da gerekir ancak bazı hafif enfeksiyonların PZR ile bile atlanması teknik olarak mümkündür. Yeni yayınlanan bir makalede, sıtma tanısında kullanılan PZR'nin μ l'de en az 22 parazit olduğunda pozitifleştiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda saptadığımız alt limit olan en az 12 parazit bu bakımdan başarılı bir sonuç olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, deneysel modellerde 5 sporozoite kadar düşen duyarlılıklar olduğu (Schussek ve ark, 2013) göz önüne alınırsa çalışmalarımızın ilerletilip alt limitimiz olan 12'nin düşürülmesi hedeflenmelidir.

Dünya genelinde yaygın olarak görülen *Toxoplasma gondii*, insanların da içinde bulunduğu tüm memeli ve kuşları enfekte edebilen zorunlu hücre bir hücre içi parazittir. Hastalık, immün sistemi sağlam kişilerde sıklıkla asemptomatiktir ve genelde herhangi bir belirti vermeden kişi sağlığına kavuşmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış bireyler ile gebelerde ise ölümcül klinik tablolara neden olabilmektedir. Enfeksiyon kedi dışkılarıyla saçılan ookistlerin toprakta olgunlaştıktan sonra yiyecek ve içeceklerle ağızdan alınması; bradizoit ve doku kisti formlarını içeren etlerin çiğ veya az pişmiş olarak yenilmesi; organ nakli ve kan transfüzyonu gibi yollarla insanlara bulaşabilmektedir. Konjenital toksoplazmosis, hastalığı hamileliği süresince geçiren kadınların bebeklerinde korioretinit, hidrosefali, mikrosefali, zeka geriliği gibi belirtilere ve hatta bebek ölümlerine neden olurken; akkiz toksoplazmosis semptomatik olgularda hafif soğuk algınlığı, ateş, yorgunluk gibi belirtiler gösterir. Kedilerde toksoplazmosis görülme oranı dünyanın bazı bölgelerinde %100'lere ulaşmaktadır.

Toksoplazmosis çoğu zaman hem ara konaklarda hem de son konakta subklinik seyrettiğinden klinik tanısı güçlükle konulabilmektedir. Ancak hastalığın zoonotik karakteri nedeniyle parazitin tanısını koymak hem veteriner hekimlik hem de halk sağlığı açısından son derece önemlidir. Canlı antijenler kullanılarak uygulanan Sabin-Feldman testi (SFDT) halen günümüzde toksoplazmosis için referans bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

Toksoplazmosis için uygulanan diğer tanı seçeneklerine kıyasla çok daha etkin, hızlı ve kontaminasyon riski düşük bir yöntem olan GZ-PZR ile sadece kandan değil, her türlü vücut sıvısı ve doku örneğinde de *T. gondii* DNA'sı aranabilmektedir. Yapılan çalışmalarda, incelenen örnekte az sayıda *T. gondii* takizoiti bulunduğunda dahi sonuç alınabildiği gösterilmektedir Günümüzde özellikle gebelerde toksoplazmosisten şüphe duyulduğunda amniyon sıvı örneğinden yapılan GZ-PZR, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü ile güvenle kullanılmaktadır (Jauregui ve ark, 2001; Kompalic-Kristo ve ark, 2007).

Toksoplazmosis tanısında PZR kullanıma girdiğinden beri duyarlılık düzeyini ölçen çalışmalar yapılmaktadır. Parazit yükünün az olduğu olgularda erken dönemde tanı koymak özellikle gebelerde önemli olduğundan, geliştirilen testlerde mümkün olduğu kadar az sayıda parazitin varlığında pozitifle en protokoller değer kazanmıştır. Özellikle Fransa'da yapılan çok sayıda çalışma ile bugün amniyon sıvısından alınan örnekte tek bir *T. gondii* takizoiti olsa bile pozitifle en ve bu sayede doğru tanı koyduran PZR ve GZ-PZR protokolleri bulunmaktadır (Jauregui ve ark, 2001; Kompalic-Kristo ve ark, 2007). Ayrıca, deneysel olarak dokulardan alınan örneklerde *T. gondii* varlığını saptayan PZR protokolleri de geliştirilmiştir (Flori ve ark, 2002). Nadir görülse de ciddi sorunlar doğuran organ nakliyle bulaşan toksoplazmoz gibi olgularda bu tip testler büyük yarar sağlayacaktır.

Özellikle gebelerde amniyon sıvısı  rneğinde PZR ile *T. gondii* araştırılması, şüpheli gebelikler için güvenilir ve hızlı bir yöntem olarak yaygın kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yanlış negatif sonuçlara, diğer iki paraziter hastalıkta olduğu gibi, toksoplazmosis'de de rastlanılabilmektedir. Yanlış negatifliklerin çoğunlukla

paraziter yükün düşük olduğu enfeksiyonlarda ortaya çıktığı düşünölmektedir. Yine de diğör tanı yöntemlerine kıyasla PZR, toksoplazmosis'in tanısında çok daha güvenilir olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda 12 parazit PZR protokolümüzün alt sınırı olarak belirlendi. Yapılan az sayıdaki benzer çalışmalardan birinde, Japon araştırmacı Asai, Toksoplazma ensefaliti tanısında PZR'nin etkinliğini araştırmış ve 1×10^{-8} ng/ul olduğunu belirtmiştir (Asai, 2013). Kedi dışkıındaki ookistleri saptayabilmek için geliştirilmiş ticari tanı kitlerinin karşılaştırıldığı bir diğör çalışmada ise en duyarlı kitin 1 gram dışkıda 50 ookist olduğunda tanı koyabildiğı belirlenmiştir (Herrmann ve ark, 2011). Elde ettiğimiz sonuç bu açıdan bu bulgular ile paralel sonuç göstermekte olup bu sayıyı daha aşağıya çekecek çalışmalar yapılmalıdır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) gibi moleküler yöntemlerin mikrobiyal hastalıkların tanısındaki kullanımları, tanısal duyarlılığın artmasına ve daha önce tanı konulamayan birçok hastalık etkeninin saptanıp hastaların iyileştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu durum, insanlar için ölümcül enfeksiyonlara yol açabilen sıtma, leishmaniasis ve toksoplasmosis gibi paraziter hastalıklar için de geçerlidir. Anadolu’da eski yıllarda binlerce insanın ölümüne yol açmış ve günümüzde yerli olgu bildirilmese de ciddi bir tehdit olmaya devam eden sıtma; günümüzde, özellikle Suriyeli mültecilerin ülkemizde sayılarının artması sonrası daha da önemli hale gelen deri ve iç organ leishmaniasis’i ve özellikle fetüs ve immünsüpresif hastalar için ölümcül enfeksiyonlara yol açabilen toksoplasmosis’in tanısında PZR gibi duyarlı ve özgün testler önemlidir. Bununla birlikte, bu testlerin duyarlılık ve özgünlük sınırlarının bilinmesi, suşlar arasındaki farklılıklar da göz önüne alındığında büyük önem taşımaktadır. Gerek epidemiyolojik nedenler, gerek parazit suşları arasındaki yapısal farklılıklar, ülkeler arasında özellikle moleküler testlerin çalışmasında farklılıklara yol açabilmektedir. Mikroskopik incelemede morfolojik farklılık göstermediğinden kolayca saptanabilen bazı paraziter etkenlerin genetik olarak farklı suşlara ait oldukları özellikle bazı intestinal parazitler için iyi bilinen bir özelliktir (örn., *Entamoeba histolytica/dispar*; *Blastocystis spp.*). Bu nedenle, bir ülkede görülen parazit suşlarına göre belirlenen PZR test içeriği ve çalışma koşullarının ülkemiz için geçerli olmaması ve bu nedenle testin ülkemiz örnekleri için tanısal duyarlılığın düşük olması mümkün olabilir. Türkiye, coğrafi konumu gereği Asya, Afrika ve Avrupa arasında bir geçiş noktası olduğundan ülkemizdeki parazit suşlarının ileri derecede çeşitliliğe sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışma ile ülkemizden elde edilen parazit suşları ile PZR denemeleri yapıp uygun test koşulları ve adı geçen üç parazit için pozitiflik limitleri ortaya konulmuştur; içeriği ve sonuçları göz önüne alındığında bu çalışma özgündür ve ülkemizdeki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışmanın verileri ile yapılacak sonraki çalışmalar ülkemizde bu üç parazit hastalığının tanısı için uygulanacak PZR testlerinin duyarlılık ve özgünlüğünün geliştirilmesine katkı sağlayacak, hazırlanacak

Türkiye ve muhtemelen komşu ülkelere özgü tanı kitleriyle uzun vadede ülkenin tanı kitleri konusundaki dışa bağımlılığını da azaltabilecektir.



9. KAYNAKLAR

Abbas AMA. Comparative study of methods used for isolation of *Toxoplasma gondii*. Bull. W.H.O, 36: 344-346, 1967.

Abbasi, I., Aramin, S., Hailu, A., Shiferaw, W., Kassahun, A., Belay, S., Jaffe, C., Warburg, A. 2013. Evaluation of PCR procedures for detecting and quantifying *Leishmania donovani* DNA in large numbers of dried human blood samples from a visceral leishmaniasis focus in Northern Ethiopia. BMC Infect Dis., 27, 13:153. doi: 10.1186/1471-2334-13-153.

Ak M. Enzim Lynked Immunosorbant assay (ELİSA). Parazit Hastalıklarında Tanı. Ed. Özcel, Altıntaş. S. 241-252, T. Paraz. Dern. Yayın No: 15, İzmir. 1997.

Alvar J. et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10: 298–319.

Alvar J. Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol Today*; 1994;10: 160-3.

Asai T. The diagnosis of toxoplasmic encephalitis by polymerase chain reaction *Rinsho Shinkeigaku*. 2013;23(11):1194-5.

Ashford R.W., Desjeux, P. and Raadt, P. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis, *Immunol Today*, 1991;8: 104-5.

Bahar İH, Karaman M, Kırdar S, Yılmaz Ö, Celiloğlu M, Mutlu D. Gebelikte toksoplazmosis tanısında anti-*Toxoplasma gondii* IgM, IgG, IgA antikor ve IgG avidite testlerinin birlikteliği ve önemi. *T. Parz. Derg* 29(2): 76-79, 2005.

Balsari A, Poli G, Molina B. ELISA for *Toxoplasma* antibody, detection. A comparison with other serodiag-nostic tests. *J. Clin. Pathol.* 33: 640–643, 1980.

Bensaid, M., Guerbouj, S., Saghrouni, F., Fathallah-Mili, A., Guizani, I. 2006. Occurrence of *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis in central Tunisia, Trans R Soc Trop Med Hyg., 100 (6), 521-6.

Bouree P., Belec L. Leishmaniasis: a report of 33 cases and review of the literature. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1993;16(4): 251-65.

Brezin AP, Egwuagu CE, Burnier M. Identification of *Toxoplasma gondii* in parafin embedded sections by polymerase chain reaction. Ame. J. Ophthalmol. 110: 599–604, 1990.

Cerezo L, Alvarez M, Price G. Electron microscobic diagnosis of cerebral toksoplazmosis. Case report. J. Neurosurgery, 63: 470–472, 1985.

Çulha G., Uzun S., Özcan K., Memişoğlu HR., Chang KP: Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana, Turkey International Journal of Dermatology. 2006; 45: 569–572.

Daldal, N., Özensoy, S., Aksoy, Ü., Akısü, Ç. 1999. Besiyerleri ve Hayvan İnokülasyonları. Parazit Hastalıklarında Tanı, Ed. M.Ali, Özcel, Nazmiye Altıntaş, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın, No: 15, 149-82.

Dedet JP. Current status of epidemiology of leishmaniasis. In: Worl Class Parasites Leishmania. Farrell JP (Ed.). Kluwer Academic Publ. (2002), 2: 1-10.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide, Trans R Soc Trop Med Hyg; 2001; 95: 239–43; (2001).

Desjeux P., Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives, Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 27, 305-318, (2004).

Desmont SG, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection, a method for increasing sensitivity and specificity. J. Clin. Microbiol. 11: 562–568, 1980.

Deutsch AR, Horsle ME. Congenital toksoplazmosis. Ame. J. Ophthalmol. 43: 444–448, 1957.

Dos Santos NJG. Toksoplazmosis. A historical review direct diagnostic microscopy and report of a case. Am. J. Clin. Pathol. 63: 909–915, 1975.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst induced Toksoplazmosis in cat. J. Protozool. 19: 155–177, 1972.

Dubey JP. Toxoplasmosis in cattle. Vet. Parasitol. 22: 177–202, 1986.

Dupony-Comet J, Lavareda L, Masloc C. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patient by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 1866–1869, 1993.

El Tai, N.O., Osman, O.F., El Fari, M., Presber, W., Schönián, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing, Trans R Soc Trop Med Hyg, 94: 575–9.

Ergin M., Erdogan S., Gumurdulu D., Tuncer İ: Cutaneous leishmaniasis: evaluation by polymerase chain reaction in the Cukurova region of Turkey J. Parasitol., 2005; 91(5): 1208–11.

Evans D. (ed) Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania*. UNDP/ World Bank/ WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Genova: WHO, 1989;25-36.

Ferguson DJP, Birc-Anderson A, Siim JC, Hutchison WM. Ultrastructure studies on the sporulation oocysts of *Toxoplasma gondii*. II. Formation of the sporozoites within the sporocysts. Acta Pathol. Microb. Scand. Ser. B. 87: 253–260, 1979.

Filice GA, Yeager AŞ, Remington JS. Diagnostic significance of immnoglobuline M Antibodies to *Toxoplasma gondii* detected after seperation of IgM from IgG Antibodies. J. Clin. Microbiol. 12: 336–342, 1980.

Flori, P., Hafid, J., Bourlet, T., Raberin, H., Genin, C., Sung, R.T. 2002. Experimental model of congenital toxoplasmosisin guinea-pigs: use of quantitative and qualitative PCR for the study of maternofetal transmission. *J Med Microbiol.*, 51(10), 871-8.

Gilles, H.M. 1999. Protozoal Diseases, The Bath Press, London, 413-503.

Gürüz Y, Dayangaç N, Korkmaz M. Toksoplazmosis tanısında “yakalama” ELISA IgM yönteminin geliştirilmesi ve ticari kit ile karşılaştırılması. T. Parz. Derg, 26(4): 342-346. 2002.

Gürüz Y, Korkmaz M. Özellikli Tanı Yöntemleri. Parazit Hastalıklarında Tanı. Ed, Özcel MA ve Altıntaş N. Parz. Dern. Yayın No: 15, İzmir. s.293–318, 1997.

Gürüz Y. Özcel MA, Toxoplasmosis. Tıbbi Parazit Hastalıkları (Eds. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007; No: 22;137-189

Herrmann DC1, Maksimov A, Pantchev N, Vrhovec MG, Conraths FJ, Schares G. Comparison of different commercial DNA extraction kits to detect *Toxoplasma gondii* oocysts in cat faeces. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011 Nov-Dec;124(11-12):497-502.

Herwald BL., Stokes SL. and Juranek DD., American cutaneous leishmaniosis in U.S. travellers, Ann Intern Med., 1993;118: 779-84.

Ho-Yen DO, Joss AWL. Human Toksoplazmosis, Oxford Medical Publishing 1992.

Huchison VM, Dunachie JF, Work K, Siim JC. The life cycle of the coccidian parasite *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. Tran. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 65: 380–399, 1971.

Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto TJ, Lwin KM, Vihokhern B, Wongsan K, von Seidlein L, Dhorda M, Snounou G, Keereecharoen L, Singhasivanon P, Sirithiranont P, Chalk J, Nguon C, Day NP, Nosten F, Dondorp A, White NJ. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. *J Infect Dis.* 2016; 15;213(8):1322-9.

Jacobs L. The Biology of *Toxoplasma*. Ame. J. Trop. Med. Hyg. 2: 365–389, 1953.

Jacobson RL., Eisenberger CL., Svobodova M., Baneth G., Sztern J., Carvalho J., Nasereddin A., El-Fari M., Shalom U., Volf P., Votypka J., Dedet J. P., Pratlong F., Schonian G., Schnur LF., Jaffe CL. and Warburg A. Outbreak of Cutaneous Leishmaniosis in Northern Israel. *J Infect Dis*; 2003; 188: 1065-73.

Jalal, S., Nord, C.E., Lappalainen, M., Evengård, B. 2004. ESCMID Study Group on Toxoplasmosis Rapid and sensitive diagnosis of *Toxoplasma gondii* infections by PCR, *Clin Microbiol Infect.*, 10(10), 937-9.

Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun.* 1998;66(8):3783-7.

Jauregui, L.H., Higgins, J., Zarlenga, D., Dubey, J.P., Lunney, J.K. 2001. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues, *J Clin Microbiol.*, 39(6), 2065-71.

Jeffrey, H.C., Leach, M.R. 1966. Atlas of Medical Helminthology and Protozoology, Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 58-59.

Jhingaran A., Chatterjee M., Madhubala R., Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis. In: *Leishmania: After The Genome*, Myler PJ. & Fasel N. (Eds), Caister Academic Press, (2008).

Killick-Kendrick, R. 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *Biology of the Kinetoplastida*, (eds WHR Lumsden & DA Evans), 2 (407), 172-80.

Klaus SN., Frankenburg H., and Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*; 1999;17: 257-60.

Kompalic-Cristo, A., Frotta, C., Suárez-Mutis, M., Fernandes, O., Britto, C. 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood, *Parasitol Res.*, 101(3), 619-25.

Kuman, H.A. Sıtma (Malaria). Ed. Özcel, M. A. GAP'ı Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. s:31-55. T. Paraz. Dern. Yayın No:13, 1959, 1993

Le Fichoux Y., Quaranta JF., Aufeuvre JP., Lelievre A., Marty P., Suffia I., Rousseau D., Kubar J., Occurrence of *Leishmania infantum* Parasitemia in Asymptomatic Blood Donors Living in an Area of Endemicity in Southern France, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1953-1957, (1999).

Lightner LK., Chulay JD., Bryceson ADM. Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am J Trop Med Hyg.* 1983;32(2): 296-9.

Linday DS, Dubey JP, Blagborn BL. Examination of tissue cyst formation by *Toxoplasma gondii* in cell cultures using bradizoids, tachizoids and sporozoites. *J. Parasitol.* 77: 126-132, 1991.

Luft BJ, Remington JS. Outbreak of central nervous system toxoplasmosis in western Europe and North America. *Lancet*, 1: 781–784, 1983.

Markell, E.K., John, D.T., Krotoski, W.A. 1999. Markell and Voge's Medical Protozoology, 8th Edition, WB Saunders Company, 123-88.

Mary C, Faraut F, Drogoul MP, Xeridat B, Schleinitz N, Cuisenier B, Dumon H. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations: quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patient follow-up. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Nov;75(5):858-63.

Mehlhorn H. Encyclopedic References of Parasitology, Diseases-Treatment-Therapy, Springer Verlag, Berlin P: 584-598. 2001.

Meinecke, C.K., Schottelius, J., Oskam, L., Fleischer, B. 1999. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, 104 (5), 6.

Montaya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toksoplazmosis. *JID.* 185 (supply 1): 873-82. 2002.

Navin, T.R. 1988. Leishmaniasis. In: Balows, A., Hauster, W.J., Ohashi, M., Turano, A. (Eds). "Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice." Springer-Verlag Comp., Vol I: 904-10.

Novy, F.G., MacNeal, W.J. 1904. On the Cultivation of *Trypanosoma brucei*, *J Infect Dis.*, 1, 1-30.

Overdulse JP. Studies on the life cycle of *Toxoplasma gondii* in germ free genotobiotic and conventional cats. *Proc. K. Ned. Akad. Vet. Ser. C.* 81: 19-59, 1978.

Özbel Y., Özensoy Töz S. Leishmaniasis. *Tıbbi Parazit Hastalıkları* (Eds. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007; No: 22;197-241.

Özbilgin, A., Topluoglu, S., Es, S., İşlek, E., Mollahaliloglu, S., Erkoç Y. Sağlıkta

dönüşüm programı kapsamında sıtmayla savaş programının detaylı analiz ve değerlendirme çalışması Ed: Prof. Dr. Recep AKDAĞ T.C. Sağlık Bakanlığı Analiz Raporu 2-40, Ankara, 2010

Özcel MA Sıtma. Tıbbi Parazit Hastalıkları (Eds. Özcel MA, Özbel Y, Ak M, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 2007; No: 22;79-138.

Özcel MA, Üner A, Ertuğ S. İmmunofluoresans Yöntemi. Parazit hastalıklarında tanı. Ed. Özcel MA ve Altıntaş N. s.215–239, T. Prz. Dern. Yayın No: 15, İzmir, 1997.

Özcel, M.A. Sıtma Epidemiyolojisi. Tıbbi Parazit Hastalıkları Kitabı. Editör: Özcel MA. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 22. Bölüm II; Kan ve Dokularda Görülen Protozoon Hastalıkları. s:79-140, İzmir, 2007

Pearson RD., De Queiroz Sousa A. Leishmaniasis. Bennett J.C., Plum F. (Eds). “Cecil, Textbook of Medicine”. 20th ed. W.B. Saunders Comp. 1996; 1903-07.

Pearson, R.D., De Queiroz Sousa, A. 2000. *Leishmania* species: Visceral (Kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds). “Principles and Practise of Infectious Diseaes”. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2831-45.

Reithinger R., Dujardin JC., Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications, Journal of Clinical Microbiology, 45(1), 21-5, (2007).

Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Chapter 5, Toksoplazmosis, In: Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant. 4th Ed. Remington&Klein. WB Saunders Company, pp: 140-267, 1992.

Romand, S., Chosson, M., Franck, J., Wallon, M., Kieffer, F., Kaiser, K., Dumon H., Peyron, F., Thulliez, P., Picot, S. 2004. Usefulness of quantitative polymerase chain

reaction in amniotic fluid as early prognostic marker of fetal infection with *Toxoplasma gondii*, Am J Obstet Gynecol., 190(3), 797-802.

Roth, A, Roth B, Hoffken G. Application of polymerase chain reaction to diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in immunocompromised Patients. Euro. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. 11: 1177–1181, 1992.

Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K., Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays., J.Clin Microbiol. 2004 Dec; 42(12):5636-43.

Röser, D., Simonsen, J., Nielsen, H.V., Stensvold, C.R., Mølbak, K. 2013. *Dientamoeba fragilis* in Denmark: epidemiological experience derived from four years of routine real-time PCR, Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 32(10), 1303-10.

Scholtyssek E. Fine structure of parasitic protozoa. An atlas of micrographs, drawing and diagrams. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 1979; 44-45.

Schonian G., Nasereddin A., Dinse N., Schweynoch C., Schallig HDFH., Presber W., Jaffe CL., PCR Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Local and Imported Clinical Samples. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 47, 349–358, (2003).

Schoondermark-Van de van E, Glama J, Kraaijeveld C. Value polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patient with AIDS. Clin. Infect. Dis. 16: 661 666. 1993.

Schussek, S., Groves, P.L., Apte, S.H., Doolan, D.L. 2013. Highly sensitive quantitative real-time PCR for the detection of *Plasmodium* liver-stage parasite burden following low-dose sporozoite challenge, PLoS One, 2;8(10), 77811.

Seaman J., Mercer AJ., Sondorp HE., Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis

in Southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med.* 1996; 124: 664-72.

Selseleh, M., Modarressi, M.H., Mohebali, M., Shojaee, S., Eshragian, M.R., Selseleh, M., Azizi, E., Keshavarz, H. 2012. Real-time RT-PCR on SAG1 and BAG1 gene expression during stage conversion in immunosuppressed mice infected with *Toxoplasma gondii* Tehran strain. *Korean J Parasitol.*, 50(3), 199-205.

Shepp D, Hakman R, Conley F. *Toxoplasma gondii* reactivation identified by detection of parasitemia in tissue culture. *Ann. Internal Med.* 103: 218–221, 1985.

Sinha R., Datta U., Sehgal S. Importance of bone marrow culture for diagnosis of kala-azar. *Scand J Infect Dis.* 1993;25: 787-9.

Siegel SE, Lunda MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS. Transmissions of toxo-plasmosis by leucocyte transmissions. *Blood*, 37: 388–394, 1971.

Sundar S., Rai M., Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis, *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 951–958, (2002).

Svobodova M., Alten B., Zídková L., Dvorák V., Hlavacková J., Myšková J., Šeblová V., Kasap OE., Belen A., Votypka J. and Volf P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*, *International Journal for Parasitology*, 2009; 39: 251-256.

Thulliez P, Remington JS, Santora F. A new agglutination test for the diagnosis of acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Pathol. Biol. (Paris)*, 34: 173 -77, 1986.

Tobie, E.J., Von Brand, Th., Mehlman, B. 1950. Cultural and physiological observations on *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense*, *J Parasitol.*, 36, 48-54

Toz, S.O., Culha, G., Zeyrek, F.Y., Ertabaklar, H., Alkan, M.Z., Vardarli, A.T., Gunduz, C., Ozbel, Y. 2013. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey, PLoS Negl Trop Dis., 7, 5

Unat, E.K. Sıtmanın Tarihi. Sıtma Kitabı. Özcel MA. Ed: T. Parazitoloji Derneği Yayın No: 16, s.1-7, Bornova İzmir, 1999

Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M. Sıtma , Tıp Parazitolojisi. s: 623 – 664, İst. Üniv, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, 1995

Van Knapen F, Panggabean SO. Detection of *Toxoplasma* antigen in tissue by means of ELISA. Ame. J. Clin. Path. 77: 755–757, 1982.

Vitale F., Reale S., Vitale M., Petrotta E., Torina A., Caracappa S., TaqMan- Based Detection of *Leishmania infantum* DNA Using Canine Samples, Annals of N.Y. Academic Science, 1026, 139–143, (2004).

Wallss KW, Bullock SL, English DK. Use of ELISA and its adaptation for the serodiagnosis of toksoplazmosis. J. Clin. Microbiol. 5: 273–277, 1977.

Walton BC, Benchoff MB, Brooks WH. Comparison IFAT test and methylene blyue dye test for the detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. Ame. J. Trop. Med. Hyg. 15: 149–152, 1966.

Weinman, D. 1944. Cultivation of Trypanosoma gambiense in vitro in ceel-free medium, Proc Sos Exp Biol and Med., 55, 82-3.

WHO Technical Report Series-949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010.

WHO Web Sayfası. <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default>

WHO. “Report on consultative meeting on HIV/ Leishmania co-infections”, co-

sponsored by the Instituto Superiore di Sanita and the World Health Organization, Rome, 1994; 95.35.

WHO. World Malaria Report. WHO and UNICEF, (Erişim: <http://www.rbm.who.int/wmr2005>; erişim tarihi:10.03.2011, 2005

WHO-World Health Organization. Leishmaniasis. 2015
[<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>], 05.02.2016

Wilson M, Remington JS, Clavet C. Evaluation of six commertial kits for detection of human IgM Antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 35: 3112–3115, 1997.

Wolf A, Cowen D, Paige BH. Toxoplasmic encephalomyelitis. VI. clinical diagnosis of infantile of congenital toksoplazmosis. Arch. Neurol. Psyc. 48: 689–739, 1942.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	TUBA	Soyadı	OYUR
Doğum Yeri	İZMİR	Doğum Tarihi	25.05.1986
Uyruğu	T.C.	Tel	0 530 353 33 02
E-mail	oyurtuba@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Şehit Mehmet Gönenç Lisesi - Bandırma	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Gönüllü Laboratuvar Asistanı	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji laboratuvarı	Nisan 2010 – Haziran 2011
Ege Bölge Bayii (Satış Sorumlusu)	BM Laboratuvar Sistemleri- Ankara	Mayıs 2012 – Şubat 2015
Kurucu Ortak	Triogen Biyoteknoloji San. Tic. Ltd. Şti.	Şubat 2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	Orta	Orta
Yabancı Dil Sınav Notu #			

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office (Word, Excel, Power Point, Outlook), MS-Dos, Adobe Photoshop CS4	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

EK: Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirileri, vb.)

- Balcıoğlu IC, Kurt Ö, Limoncu ME, Ermis VO, Tabak T, Oyur T, Muslu H, Kavur H, Gorgun S, Girginkardesler N, Yereli K, Bilac C, Özbel Y. Okullarda Düzenli Aralıklarla Gerçekleştirilen Kontroller Saç Biti (Pediculus capitis) İnsidansını Düşürmekte Yeterli Olabilir mi? *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012; 18 (Suppl-A): A151-A154.
- Ünver A, Oyur T, Kurt Ö, Özensoy Töz S, Turgay N. Ocak 2010-Haziran 2011 Tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Polikliniğinde Saptanan *E. histolytica/dispar* Olguları. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012; 18 (Suppl-A): A201-A204.
- Bayram A, Oyur T, Ünver A, Aydemir Ş, Özacar T, Özensoy Töz S, Turgay N. Gastrointestinal Sistem Yakınması Olan Hastalarda Dışkıının Parazitolojik ve Bakteriyolojik İncelemelerinin Karşılaştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012; 18 (Suppl-A): A205-A208.
- Turgay N, Ünver-Yolasığmaz A, Oyur T, Bardak-Özcem S, Töz S. Monthly distribution of intestinal parasites detected in a part of western Turkey between May 2009-April 2010-results of acid fast and modified trichrome staining methods. *Acta Parasitologica Turcica* 2012; 36(2):71-4.

ULUSLARARASI KONGRE VE SEMPOZYUMLARDA SUNULAN ÇALIŞMALAR

- Özbilgin A, Kurt Ö, Oyur T, Ermiş Vö, Tabak T, Çakmaklıoğulları Ek, Stensvold C. Cryopreservation Of Blastocystis: Significance Of Foetal Calf Serum. 21st European Congress Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases (Eccmid), 7–10 Mayıs 2011, Milan - Italy.
- Çınar E, Oyur T, Görgün S, Özbilgin A, Taşkın E, Kurt Ö, Taşkın E. Efficacy Of Some Local Marine Algae Against Leishmania Tropica Promastigotes İn Vitro. 5th International Meeting On

The Model Brown Alga Ectocarpus. Esil 2012: Algal Post-Genomics, 23-25 Nisan 2012, Roscoff, France.

3. Kurt Ö, Akyar I, Görgün S, Oyur T, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Concentration Of Stool Samples In A Parasitology Laboratory: Comparison Of Three Methods For Efficacy And Cost-Effectiveness. 23rd European Congress Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases (Eccmid), 27-30 Nisan 2013, Berlin - Germany.

ULUSAL KONGRE VE SEMPOZYUMLARDA SUNULAN ÇALIŞMALAR

1. Kurt Ö, Akyar I, Görgün S, Oyur T, Girginkardeşler N, Özbilgin A. Parazitolojik tanıda dışkı örneklerinin konsantrasyonu: Üç Yöntemin Karşılaştırılması. Sözlü Bildiri. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 3-7 Kasım 2012, Kuşadası.
2. Ünver A, Özensoy Töz S, Oyur T, Kurt Ö, Turgay N. Ocak 2010-Haziran 2011 tarihleri arasında Entamoeba histolytica/dispar olguları. PB008. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2011, Kars.
3. Kurt Ö, Akyar I, Karatuna O, Öktem Okullu S, Aytekin Ünübol N, Çakıroğlu HN, Görgün S, Oyur T, Kocagöz T. Dientamoeba fragilis'in gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (GZ-PZT) ile tanısı: İstanbul'dan bir ön çalışmanın sonuçları. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül – 5 Ekim 2013, Denizli.k1
4. Görgün S, Oyur T, Tetik A, Özensoy S, Gündüz C, Balcıoğlu İC, Kurt Ö. Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (GZ-PZT) yöntemiyle *Giardia intestinalis*'in tanısı ve filogenetik gruplarının insan ve sokak köpeklerinden alınan örneklerle birlikte araştırılması. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül – 5 Ekim 2013, Denizli.

İŞTİRAK EDİLEN KONGRE VE SEMPOZYUMLAR

1. Fourth International Conference on Phthiraptera, 13-18 June 2010, Ürgüp-Nevşehir, TURKEY.
2. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 5-10 Eylül 2011, Kars, TURKEY.
3. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül – 5 Ekim 2013, Denizli, TURKEY.
4. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 10-13 Mayıs 2014, Barselona – İSPANYA.
5. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 9-12 Nisan 2016, Amsterdam – HOLLANDA.

ÖDÜLLER

1. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 29 Eylül – 5 Ekim 2013, Denizli, “En iyi ikinci poster ödülü”. Kurt Ö, Akyar I, Karatuna O, Öktem Okullu S, Aytekin Ünübol N, Çakıroğlu HN, Görgün S, Oyur T,

Kocagöz T. *Dientamoeba fragilis*'in gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi (GZ-PZT) ile tanısı: İstanbul'dan bir ön çalışmanın sonuçları.



11. EKLER

EK-1 : Etik Kurul İzni

EK-2 : Yüksek Lisans Tez Çalışması Orjinallik Raporu

EK-3 : C.B.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı



EK-1

T.C.
Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu
Karar Formu

18.09.2014

KARAR TARİH / NO	08 /10 / 2014 / 20478486 - 332						
ARAŞTIRMANIN ADI	Leishmania spp., plasmodium spp. ve toxoplasma gondii'nin gerçek zamanlı polimeraz zincirleme tepkimesi ile tanisi: limit saptama						
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN - Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji A.D.						
ARAŞTIRMA EKİBİ	Doç. Dr. Özgür KURT, İbrahim ÇAVUŞ, Tuba OYUR						
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ ☐		YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ ☒		AKADEMİK AMAÇLI ☐		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma başvuru formu ve gerekli ekleri incelenmiş; Etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.						
Ünvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Ünvanı/Adı/Soyadı		Araştırma ile ilişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Farmakoloji AD		☐	☐	Prof. Dr. Necip KUTLU Fizyoloji AD		☐	☐
Prof. Dr. Cengiz KIRMAZ Alerji İmmünoloji BD		☐	☐	Prof. Dr. Ece ONUR Tıbbi Biyokimya AD		☐	☐
Prof. Dr. Pelin ERTAN Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD		☐	☐	Prof. Dr. Canan TIKIZ F. T. R Algoloji AD		☐	☐
Prof. Dr. Erhun KASIRGA Çocuk Sağlığı Hastalıkları AD		☐	☐	Prof. Dr. Gönül Tezcan KELEŞ Anestezi ve Reanimasyon AD		☐	☐
Prof. Dr. Artuner DEVECİ Psikiyatri AD		☐	☐	Prof. Dr. F. Sırri ÇAM Tıbbi Genetik AD		☐	☐
Doç. Dr. Selda BEREKET Antrenörlük Eğitimi AD		☐	☐	Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD		☐	☐
Doç. Dr. Peyker TEMİZ Patoloji AD		☐	☐	Yrd. Doç. Dr. Tarık ULUÇAY Adli Tıp AD		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD		☐	☐	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemşireliği AD		☐	☐
Nazlı KÜEY Avukat		☐	☐	Derviş KILIÇ Sivil Üye		☐	☐
Etik Kurulumuzun kararı yukarda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname - Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Prof. Dr. Ercüment ÖLMEZ Başkan							

EK-2

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı: *Leishmania spp., Phlebotomus spp. ve Toxoplasma gondii'nin*
Genel Temarlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu ile Tanısı Limit Sayısı

Tezime ilişkin 02/06/16 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen açıklamalar çerçevesinde filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %27 olarak tespit edilmiştir.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
02.06.2016

Adı Soyadı : *Tuba Oğur*
Öğrenci No : *5303533302*
Anabilim Dalı : *Tıbbi Parazitoloji*
Programı : *Tıbbi Parazitoloji*

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Prof. Dr. Bilgin
C. B. U. C. B. F. A. D.
P. A. D.

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN
C. B. U. C. B. F. A. D.
P. A. D.

AÇIKLAMALAR

- 1- Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.
- 2- Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır. (400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)
- 3- TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır. Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreçlenmesinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)
- 5- İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.
- 7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.
- 8- Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9- Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

Parazitoloji | Yüksek Lisans Tezi - TESLİM TARİHİ 09 | Roadmap

1 / 1

Originality

GradeMark

PeerMark

Yüksek Lisans

TUBA OYUR TARAFINDAN

%2
BENZİ

Eşleşmeyi Gözden Geçir

1	library.cu.edu.tr İnternet kaynağı	%3
2	www.acibadem.edu.tr İnternet kaynağı	%2
3	www.birgrupyazar.com İnternet kaynağı	%2
4	webtest.acibadem.edu.tr İnternet kaynağı	%1
5	www.turkiyeparazitode... İnternet kaynağı	%1
6	dergi.cumhuriyet.edu.tr İnternet kaynağı	%1
7	arca.icict.fiocruz.br İnternet kaynağı	%1
8	www.mikrobiyolbul.org İnternet kaynağı	%1
9	www.turkiyeparazitoloji... İnternet kaynağı	%1
10	saglikbe.cbu.edu.tr İnternet kaynağı	%<1
11	cms.galenos.com.tr İnternet kaynağı	%<1
12	University of Liverpool '... Öğrenci ödevi	%<1
13	Celal Bayar Â niversite... Öğrenci ödevi	%<1
14	www.dominipublico.g... İnternet kaynağı	%<1

Gönderim Bilgisi

GÖNDERİM NUMARASI	680621010
GÖNDERİM TARİHİ	02-Haz-2016 10:35
GÖNDERİM SAYISI	1
DOSYA ADI	Tuba_Tez_31052016.doc
DOSYA BOYUTU	3.01M
KARAKTER SAYISI	121178
KELİME SAYISI	17713
SAYFA SAYISI	77
ORJİNALLİK	
TOPLAM	%27
İNTERNET	%24
YAYINLAR	%17
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ	%9
GRADEMARK	
SON PUANLANAN	01-Haz-2016
YORUMLAR	0
QUICKMARKLAR	0



SAYFA: 27 / 77



Salt-Metin Raporu

EK-3



**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
YÖNETİM KURULU**

Toplantı Tarihi: 09.06.2016

Toplantı Sayısı:14

Karar Sayısı:21

**ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU
ALINAN KARARLAR**

Karar15. / Tıbbi Parazitoloji Yüksek Lisans öğrencisi Tuba Oyur'un, İntihal Raporunun ve 2014-2015 Güz – Bahar ve 2015 güz yarıyılına ait Tez Ara Raporlarının kabulüne, Savunma Sınavının 30 Haziran 2016 Perşembe günü saat 10:30'da, Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. kat 320 numaralı odada yapılmasına, Tez Sınav Jürilerinin aşağıda belirtildiği şekilde atanmasına ve sınav evraklarının 3 gün içerisinde enstitümüze gönderilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi

Asıl Jüri:

1. Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN (Danışman)
2. Prof. Dr. Nogay GİRGİNKARDEŞLER
3. Prof. Dr. Mucide AK (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, mucide.ak@ege.edu.tr)

Yedek Jüri:

1. Prof. Dr. Ali Ahmet KİLİMCİOĞLU
2. Prof. Dr. Nevin TURGAY (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, nevin.turgay@ege.edu.tr)

ENSTİTÜ YÖNETİM KURULU

Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ	Müdür	
Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER	Müdür Yardımcısı	
Doç. Dr. Özge YILMAZ	Müdür Yardımcısı	
Prof. Dr. Necip KUTLU	Üye	
Doç. Dr. Mehmet GÖRAL	Üye	
Doç. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ	Üye	
Özcan GERÇEKER	Raportör	

Özcan GERÇEKER
Ens.Sek
ASLININ AYNISIDIR

Prof. Dr. A. AKTAŞ	Doç. Dr. E. TÜRKÖZ ULUER	Yrd. Doç.Dr. Ş.ŞENOL	Doç. Dr. M. GÖRAL	Prof. Dr. N. KUTLU	Doç. Dr. S. ÇINAR PAKYÜZ	Raportör Ö. GERÇEKER
İznil	Müdür V.	Paraf	Paraf	Paraf	Paraf	Paraf