



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜRKİYE'DEN ELDE EDİLEN KUTANÖZ LEİSHMANİASİS
ETKENİ İZOLATLARIN SIVI BESİYERLERİNDEKİ
ÜREMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

YALÇIN DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN

TEZ SINAVI JÜRİSİ

Prof. Dr. İ. Cüneyt BALCIOĞLU

Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL

Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN

MANİSA-2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEN ELDE EDİLEN KUTANÖZ LEİSHMANİASİS
ETKENİ İZOLATLARIN SIVI BESİYERLERİNDEKİ
ÜREMELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YALÇIN DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN

TEZ SINAVI JÜRİSİ

Prof. Dr. İ. Cüneyt BALCIOĞLU

Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL

Prof. Dr. AHMET ÖZBİLGİN

MANİSA-2018

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez 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.

Yalçın DEMİR

İmza

TEŐEKKÜR

Başta tezimi baŐından sonuna kadar büyük bir titizlikle değerlendirip her aŐamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren yaptığı akademik ve bilimsel katkılarından dolayı danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN'e yüksek lisans eğitimim sırasında desteği ve yardımlarını esirgemeyen Bio. İbrahim ÇAVUŞ'a bölümümüz tüm ğretim üyelerine, akademik çalıŐmalarım süresince sevgi ve fedakrlıklarıyla sürekli yanımda olan sevgili eŐim Emine DEMİR, kızım Merve Hira DEMİR ve oğlum Hasan Metehan DEMİR'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2016-165 numaralı proje ile desteklenmiŐtir.

Yalçın DEMİR
Manisa/2018

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AIDS:	Immune Deficiency Syndrome
BKH:	Brain Heart Medium, Containing Bovine Hemoglobine
DDT:	Dikloro Difenile Trikloroethan
DKL:	Diffuz Kutonöz Leishmaniasis
DAT:	Direct Agglutination Test
DMSO:	Dimetilsülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
D-MEM:	Dulbecco's modified Eagle Medium
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMTM:	Evans' Modified Tobie's Medium
FRET:	Förster/fluorescence resonance energy transfer
FCS:	Fetal Calf Serum
HIV:	Human İmmune Deficiency Virus
ICT:	İmmürokromatografik Tanı Testi
IFA:	Immunoflourescence Assay
IFAT:	İmmünfloresan antikor testi
kb:	Kilobaz
kDNA:	Kinetoplast DNA
KL:	Kutanöz Leishmaniasis

L.:	<i>Leishmania</i>
LB:	Broth-Liyofilize
LmF:	<i>L. major</i> Friedlin suşu
MCGM:	Mccoy Cell Culture Growth Medium
MKL:	Mukokutanöz Leishmaniasis
MLEE:	Multilocus Enzyme Electrophoresis
M-199:	Media-199
NAD:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
µm:	Mikrometre
NNN:	Novy Mac Neal Nicole Besiyeri
PYH:	Peptone-Yeast Extract Medium Bovine Hemoglobin
PKDL:	Post Kala Azar Dermal Leishmaniasis
PBS:	Phosphatebuffered saline
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD:	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPMI-1640:	Roswell Park Memorial Institut-1640
SLM:	Sheeb Blood-LB Medium
Spp.:	Türleri
TBH:	Trypticase Beef Extract Hemoglobin
VL:	Viseral Leishmaniasis
WB:	Western Blot
WHO:	World Health Organisation

İÇİNDEKİLER

1.ÖZET.....	1
1. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ	3
4. LİTARATÜR BİLGİLERİ.....	5
4.1. LEİSHMANİASİS TARİHÇESİ	5
4.2. EPİDEMİYOLOJİSİ	8
4.3. TAKSONOMİ	12
4.4. MORFOLOJİ.....	13
4.4.1. Amastigot Form	13
4.4.2. Promastigot Form	15
4.5. LEİSHMANİASİS'DE YAŞAM DÖNGÜSÜ.....	17
4.6. KLİNİK	19
4.6.1. Visceral Leishmaniasis	20
4.6.2. Kutanöz Leishmaniasis	23
4.6.3. Mukokutanöz Leishmaniasis	25
4.6.4. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis.....	25
4.7. TANI	25
4.7.1. Direkt Mikroskopi.....	27
4.7.2. Serolojik Yöntemler.....	27
4.7.3. Moleküler Yöntemler.....	28

4.7.3.1. Leishmania türlerinin genetik yapısı.....	28
4.7.4. <i>Leishmania</i> Türleri İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kullanılan İn-Vitro Yöntemler	33
4.7.4.1. Leishmania besiyerlerinde kültür ortamları	40
5.1.1. NNN. Besiyerinin Hazırlanması	45
5.2. <i>LEISHMANIA</i> İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ.....	46
5.2.1. DNA İzolasyonu	46
5.2.2. PZR Yöntemi	46
5.3. Besiyerlerinin Hazırlanması, İzolatların Ekimi ve Sayımı.....	47
6. BULGULAR.....	49
6.1. <i>L. TROPICA</i> SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU	49
6.2. <i>L. MAJOR</i> SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU	50
6.3. <i>L. INFANTUM/DONOVANI</i> SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU	51
7. TARTIŞMA	53
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
9. KAYNAKÇA.....	61
10. EKLER.....	72
10.1. Ek 1: Enstitü Yönetim Kurulu Kararı.....	72
10.2 Ek. 2: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu	73
10.3. Ek 3: Tez Orjinallik Raporu	74
11. ÖZGEÇMİŞ	75

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Leishmaniasis Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması (Alkan Ve Ark. 1997)	26
Tablo- 2: <i>L. tropica</i> Suşunun Kullanılan Besiyerlerdeki Günlük Promastigot Sayısı.	50
Tablo- 3: <i>L. major</i> Suşunun Kullanılan Besiyerlerdeki Günlük Promastigot Sayısı	51
Tablo- 4: <i>L. infantum /donovani</i> Suşunun Kullanılan Besiyerlerdeki Günlük Promastigot Sayısı.	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-1: Kan Emmiş Kum Sineği Dişisi (Ecdc.Europa.Eu'dan Değiştirilerek)	4
Şekil-2: Visserel Leishmaniasis'in Dünyadaki Yayılımı (Who 2010).	8
Şekil-3: Leishmaniasisin Dünya'daki Dağılımı (Davies Ve Ark. 2003).	9
Şekil-4: Leishmaniasisin Viseral Ve Kutanöz Klinik Tiplerinin Ayrı Ayrı Epidemiyolojilerinin Harita Üzerinde Gösterilmesi (Http://Www.Who.Int/Leishmaniasis/Burden/En/2017)	10
Şekil-5: Viseral Ve Kutanöz Leishmaniasisin Türkiye'deki Yayılımı (Özcel 2009).	12
Şekil-6: <i>Leishmania</i> Amastigotları Giemsa Boyalı Preparatların Işık Mikroskopunda Görünümü (40x10 Büyütme) (Orijinal).	14
Şekil-7: <i>Leishmania</i> Amastigotları Giemsa Boyalı Preparatların Işık Mikroskopunda Görünümü (40x10 Büyütme) (Orijinal).	15
Şekil-8: Vektör Kum Sineğindeki Promastigot Formu (Ateş 2012)	16
Şekil-9: <i>Leishmania</i> Promastigotlarının Giemsa Boyalı Preparatların Işık Mikroskopunda 40x10 Büyütme İle Görünümü (Orijinal).	16
Şekil-10: <i>Leishmania</i> Promastigotlarının Bölünmesi Giemsa Boyalı Preparatların Işık Mikroskopunda 40x10 Büyütme İle Görünümü (Orijinal).	17
Şekil-11 : <i>Leishmania</i> Parazitinin Kum Sineğindeki Hayat Döngüsü (Atlas Of Medical Helminthology And Protozoology'den Değiştirilerek).	18
Şekil-12: <i>Leishmania</i> 'nın Omurgalıdaki Hayat Döngüsü (Atlas Of Medical Helminthology And Protozoology'den Değiştirilerek).	19
Şekil-13: Viseral Leishmaniasis Olgusunda Karaciğer Büyümesi (Sciencephoto.Com'dan Değiştirilerek).	23

Şekil-14:Kutanöz Leishmaniasis Olgusunda Üzeri Krutlu, Etrafı Hiperemik Lezyon (Kuru Tip) (Teke Ve Ark. 2014'ten Değiştirilerek)	24
Şekil-15:Kutanöz Leishmaniasis Olgusu (Yaş Tip) Www.Tibbiyardim.Com/Sark- Cibani.Html"Erişim Tarihi: 15 Aralık 2018)	24
Şekil-16: Leishmania'daki Mitokondrial Ve Nüklear Genomun Yerleri	30
Şekil-17: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası (Orijinal).	45
Şekil-18: Genotipleme Eğrileri	47

1.ÖZET

Proje Adı: Türkiye’den Elde Edilen Kutanöz Leishmaniasis Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması

Öğrenci Adı: Yalçın DEMİR

Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN

Ana Bilim Dalı: Tıbbi Parazitoloji A.D

Amaç:Moleküler çalışmalarda, izoenzim analizlerinde ve ilaç çalışmalarında kullanılabilen leishmania promastigotlarını en kısa sürede en fazla üreten sıvı besiyerini saptamaktır.

Gereç ve yöntem:Sıvı azot tankında saklanan, Türkiye’deki KL hastasından elde edilmiş *Leishmania* izolatları çıkarılıp canlandırılmış ve Novy Mac Neal Nicole Besiyeri (NNN) besiyerine ekimleri yapılmıştır. Üretilen izolatların Real-Time PCR yardımıyla ITS1 bölgesine özgü primer ve problemlerle genotiplendirilmiştir. Türkiye’deki KL hastalarından elde edilen ve genotiplendirme sonucu *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* olarak tür tayinleri yapılan izolatlardan birer tanesi çalışmaya alınmış ve RPMI-1640, M199, Schneiders, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine ekimleri yapılmıştır ve besiyerleri her gün 12. güne kadar kontrolleri yapılarak, Thoma lamı yardımıyla üreme yoğunlukları hesaplanmıştır.

Bulgular ve sonuçlar: Türkiye’deki KL hastalarından elde edilmiş ve tür tayini yapılmış *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* izolatlarının sekizinci günden itibaren RPMI-1640 besiyerinde çalışmada kullanılan diğer besiyerleri olan M199, Schneiders, Nutrient Broth, Brain Heart Broth besiyerlerine göre tüm türlerin promastigotlarını daha fazla sayıda üretebildiği görülmüştür ($p < 0,05$). Bu nedenle Türkiyeden izole edilen KL etkeni *Leishmania* türlerine gereksinim olduğu durumlarda en iyi sıvı besiyerinin RPMI-1640 olduğu saptanmıştır. Diğerleri sırayla M199, Schneiders, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin tercih edilmesinin uygun olacağı bildirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Leishmania*, Besiyeri, Türkiye, Kültür

1. ABSTRACT

Project Title: The Comparison Of Reproductions Of Isolates, Obtained In Turkey, With Cutaneous Leishmaniasis In Liquid Culture Media

Student Name: Yalçın DEMİR

Advisor: Prof. Ahmet ÖZBİLGİN

Master of Science: Medical Parasitology M.S

Objective: Ascertain the liquid culture medium reproducing *Leishmania* promastigotes, to be used in molecular studies, isoenzyme analyses and drug studies, at most and within the shortest time.

Materials and Methods: Obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey, *Leishmania* isolates stored in liquid nitrogen were vitalized in an appropriate occasion and inoculated into NNN culture medium. The isolates reproduced in the culture medium were genotyped via the method of Real-Time PCR with primers and probes specific to ITS1 sequence. The isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey and determined as *L.tropica*, *L.major* and *L.infantum./donovani* after genotyping, were inoculated into RPMI-1640, M199, Schneiders, Nutrient Broth and Brain Heart (infusion) Broth culture media. Inoculated culture media were controlled on every day up to 12th day after inoculation and reproduction density of those was assessed in Thoma slide.

Results and conclusion: It is observed that *L.tropica*, *L.major* and *L.infantum/donovani* isolates, obtained from the patients with cutaneous leishmaniasis in Turkey, can be reproduced in RPMI-1640 culture medium better than M199, Schneiders, Nutrient Broth, Brain Heart Broth culture media, used in the study, with much more promastigote reproduction for all *Leishmania* spp. beginning from 8th day ($p < 0,05$). Therefore, it was ascertained that the best liquid culture medium is RPMI-1640 if promastigote reproduction of *Leishmania* spp., causing CL, obtained from Turkey is needed at most. Later on, it was concluded that M199, Schneiders, Brain Heart Broth and Nutrient Broth mediums would be suitable.

Key Words: *Leishmania*, Culture media, Turkey, Culture.

3. GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* türlerinin sebep olduğu ve vektörü dişi kum sineği olan ve bu vektörün ısırması ile bulaşan bir hastalıktır. Leishmaniasise neden olan rezervuar konaklar enfekte insanlar, köpekler ve ratlardır. Leishmaniasis kutanöz, mukokutanöz veya viseral olması *Leishmania* türüne ve konağın immün yanıtına göre değişmektedir. (WHO 2010).

Leishmaniasise neden olan parazit uzun süredir bilinmesine rağmen leishmaniasis gelişmekte olan ülkeler öncelikli olmak üzere bir çok ülkede önemli bir toplumsal sağlık sorunu olarak devam etmektedir. Tedavi ve zorluğu nedeniyle, parazitlerin neden olduğu hastalıklar içinde önem sırasında sıttadan sonra leishmaniasis gelmektedir. Leishmaniasis vakalarının büyük kısmı kırsal bölgelerde yaşaması sebebiyle tanı ve tedavi olanakları kısıtlanmıştır. (WHO 2010; WHO 2014; Harman 2015).

Hastalığın etkeni olan *Leishmania* (*L.*) parazitleri, ilk kez 1901 yılında saptanmış ve isimlendirilmiştir (Marquardt ve ark. 2000). Morfolojik bakımdan aynı olan çeşitli *Leishmania* türleri, kendiliğinden düzelebilen deri hastalıklarından, iç organlarayerleşen ve epidemilerle yüzbinlerce kişinin ölümüne neden olan birçok hastalığın nedeni olduğu bilinmektedir. Günümüze kadar, leishmaniasisin varlığı 98 ülkede tespit edilmiştir, ayrıca her yıl 350 milyon kişiyi risk altında yaşamaktadır (WHO 2010).

Leishmania'nın hücre dışında bulunan, uzun kamçısı sayesinde hareketli olan promastigotlar, bu formu barındıran *Phlebotom* ve *Lutzomyia* cinsi vektör sinekler tarafından memeli konağa verildikten sonra makrofajlar içerisine girmekte ve hücre içinde hareketsiz ve oldukça küçük olan amastigot forma dönüşmektedir.

Vektör artropodlar, hastalık oluşturan etkenleri omurgalı bir canlıdan bir diğer omurgalıya taşıyan, dolayısıyla insanlara ve hayvanlara enfeksiyonunda, büyük öneme sahip olan omurgasız canlılardır (Ok ve ark. 2002).

Vektör kaynaklı hastalıklardan birisi olan leishmaniasis, tropik ve subtropik

bölgelerde görülen, *Leishmania* parazitleri tarafından oluşturulan birbirinden klinik olarak farklı hastalıklar grubunu kapsamaktadır. *Leishmania* paraziti, makrofaj ve dendritik hücreleri hedefleyen, bağışıklık sisteminin hücre içi patojenidir (Özcel ve ark. 2009).

Leishmaniasis hastalığı, kum sineği adı verilen ve Dünya üzerinde yaklaşık 800 türü tanımlanmış artropodlar tarafından taşınmaktadır (WHO, 2010). Bu sinekler Psychodidae familyasının Phlebotominae subfamilyasında bulunan ve kan emerek beslenen dişi kum sineklerdir. Bunlar çeşitli bölgelere göre değişen ve o bölgelere has isimleri vardır. Bu isimlerden bilimsel olarak en sık kullanılan ismi 'sand fly'dır. Türkçede 'kum sineği' manasında olan 'sand fly'dır. Ülkemizde kum sineği olarak bilinmektedir ancak bazı bölgelerde yakarca, küp düşen, mucuk, yapıyan, çeti sineği gibi isimlerle anılmasına rağmen en çok kullanılan ismi 'tatarcık'dır (Erel 1973; Doğan, 1981; Yaman, 1999). Kum sineklerinin konağa verdiği rahatsızlıklar arasında ağrı ve kaşıntının yanı sıra *Leishmania* parazitinin sebep olduğu Leishmaniasis hastalığı *Bartonellabacilliformis* isimli bakterinin neden olduğu bartonellosis ve Flavivirus grubunda bulunan bazı virüslerin neden olduğu tatarcık hummasının ile beraber birçok hastalık etkeninin vektörlüğünü yapmaktadırlar. (Perfil'ev 1968)



Şekil-1: Kan emmiş kum sineği dişisi (ecdc.europa.eu'dan değiştirilerek)

4. LİTARATÜR BİLGİLERİ

4.1. LEİSHMANİASİS TARİHÇESİ

Eski insanlık tarihinde leishmaniasis hastalığının varlığını bildiren raporlardan bir kaçını bulunabildi. Asur Kralı Asurbanipal kütüphanesinde M.Ö 7. yüzyılda kutanöz leishmaniasis (KL) anımsatan lezyonların varlığı bildirilmiştir. Paleoparasitolojik bir çalışmada, M.Ö 2000 yıllarında Batı Thebes'teki krallık mezarında, dört örnekte leishmanial mitokondriyal deoksirübonükleik asit (DNA) bulunmuştur. M.Ö 800 yıllarında 6 yaşında Perulu bir kızın mumyasında immünolojik analiz kullanılarak, *Leishmaniaparaziti* ile enfekte olan makrofajlar, tespit edildi.

930 yıllarında Pers bilginlerinden Rhazes Bağdat bölgesinde kutanöz yaraların oluşumunu tarif etmiştir. KL ilk doğru tanımı büyük Fars filozofu ve hekimi Avicenna, tarafından yapılmıştır. Bu olguda Kuzey Afganistan'dan Balkh boğaz ağrısı olarak bilinen ve *L. tropica*'nın neden olduğu kuru cilt lezyonlarını düşündüren dermal bir durumu tanımladı. Buna ek olarak Yeni Dünya'da, 5. yüzyılda MCL'yi andıran yüzdeki yaraları tarif eden, seramiklerde tasvir edilmiştir.

İskoç doktor ve doğa uzmanı Alexander Russell Halep'te çalışırken KL hem kuru hem de ıslak formlarının ayrıntılı bir klinik açıklamasını yaptı. İspanyolların 16. yüzyılın başında Amerika kıtasını sömürgeleştirilmesiyle birlikte MCL'yi andıran yüzdeki lezyonları anlatan raporlar yayımlandı. MCL'nin ilk açıklarından biri, 1571'de İspanyol tarihçi Pedro Pizarro tarafından verildi. Peru And Dağları'nın alt doğu yamaçlarında çalışan koka yetiştiricilerinin burun ve dudakların tahrip edilmesi ile ilgili belgeler bulunmuştur.

Askeri cerrah William Twining tarafından 1827'de Hindistan'da Bengal'de dalak büyümesi, akut anemi ve aralıklı ateş ile zayıflamış görünen hastaları hakkında bir makale yayımlandığı bildirilmiştir.

Farklı leishmaniasis formlarından sorumlu olan etken ajanların aranması 19. yüzyılın başında başlasa da, *Leishmania* parazitlerinin kesin olarak tanımlanması yine bu yüzyılın sonlarına doğrudur. Bununla birlikte, 1885 yılında İskoç Doktor David Douglas Cunningham bir Delhi kaynağında *Leishmania* parazitlerini gördü, ancak ne olduklarını anlamadı. Daha sonra, Rus ordusu doktoru Piotr Fokich Borovsky, KL hastalarında bulunan cisimlerin protozoa olduğunu ilk tanıyan kişi olmuştur Bulgularını 1898'de ismi bilinmeyen bir Rus dergisinde yayınladığı için gözlemleri fark edilmemiştir.

Kasım 1900'de, Hindistan'daki İngiliz Ordusunda görev yapan İskoç patolog William Boog Leishman ölen bir askerin dalağında alınan lekelerde oval gövdeleri keşfetti. Daha sonra, deneysel olarak enfekte olmuş beyaz bir sıçanda benzer organları buldu. Bulgularını 1903'te yayınladı ve oval gövdelerin dejenere edilmiş tripanom formları olduğunu ve bu nedenle 'Dum-dum humması' olarak adlandırdığı hastalığın bir tripanozomiyaz şekli olduğunu öne sürdü. Daha sonra, İrlandalı Doktor Charles Donovan Madras Tıp Fakültesinde ateş şikâyeti dalak büyümesi olanyerli Hintli deneklerin dalak örneklerinde benzer organlar bulunduğunu rapor etmiştir. Bu arada, Hint hükümeti tarafından 1898'de kala-azar'ı incelemesi emri ile İngiliz tıp doktoru Ronald Ross, Kasım 1903'te Leishman ve Donovan'ın dalakta bulunan oval cisimlerin keşfedilmesi üzerine yorum yapan bir bildiri yayınladı ve bu cisimciğe *L. donovani* ismi verilmiştir. *L. infantum* türünün neden olduğu visseral leishmaniasis (VL) hastalığını ilk olarak 1908 yılında Fransız bakteriyologu Charles Jules Henry Nicole tarafından Tunuslu splenik anemiden rahatsızlığı olan çocuklarda tanımlanmıştır. Aynı yıl, meslektaşı Charles Comte ile birlikte, paraziti Tunus'ta köpeklerde de buldu ve o zamandan beri köpekler VL için önemli rezervuar barınağı olarak gösterilmektedir.

Amerikan patolog James Homer Wright 1903 yılında, Ermeni kızdaki bir örnekten organizmanın ayrıntılı bir tanımını yayınladı ve parazit *H. tropicum* olarak adlandırdı. 1906'da Alman hekim ve zoolog Max Lühe adını *L. tropica* olarak değiştirdi. Bu arada, *L. tropica*'nın iki alt türünün iki lezyon türü ve epidemiyolojideki farklılıklar ile ilişkili olduğu keşfedildi. *L. minör* parazitinin sebep olduğu kuru nodüler lezyonlar görülmesi ve kentsel ortamlarda daha sık rastlanması, *L. major* parazitinin ise ülser lezyonlar ürettiği ve kırsal bölgelerde ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu farklılıklara dayanarak, Bray 1973'de sırasıyla iki tropik türün

olduğunu ve bunları *L. tropica* ve *L. major* olarak sınıflandırmayı önerdiler. Ayrıca aynı yayında, Etiyopya'da *L. aethiopica* olarak adlandırdıkları farklı bir CL formuna neden olan yeni bir *Leishmania* türünün keşfedildiğini bildirdiler.

Yeni Dünya Leishmaniasis'e sebep olan parazitleri ilk Brezilyalı doktor Adolpho Carlos Lindenberg tarafından 1909 yılında São Paulo Eyaletinde hastaların cilt lezyonlarında tanımlanmıştır. Başlangıçta, Yeni Dünya parazitlerinin *L. tropica* ile aynı olduğu düşünülüyordu. 1911 yılında, Brezilyalı klinisyen ve bilim adamı Gaspar de Oliveira Vianna bir hastanın cilt lezyonundan elde edilen, parazitin morfolojik olarak *L. tropica* parazitinden farklı olduğu sonucunu rapor etti ve buna *L. brazilienses* ismi verildi.

VL ilk olarak 1930'larda Latin Amerika'da kaydedildi. Bunun sebebi ise Aristides Marques da Cunha ve Evandro Serafim Lobo Chagas bilinmeyen bir nedenden ötürü, lobartuvar hayvanlarına parazit enjekte edildiğinde enfeksiyon oluşurken Brezilya'da bulunan VL enjekte edilmiş laboratuvar hayvanlarına bulaşmadı. Eski Dünya VL hastalığına neden olan *L. donovani* ve *L. infantum* parazitlerinin Yeni Dünya'da VL hastalığına neden olan yeni bir tür keşfettilerini düşündüler ve bunda sorumlu parazite *L. chagasi* adını verdiler. Bununla birlikte, 1 yıl sonra, Cunha, Amerikan VL vakalarından izole edilmiş kültürlerle sahip hayvanlara bulaştırmayı başardığını ve böylece Latin Amerika'daki VL ajanının *L. infantum* ile aynı olduğu sonucuna vardığını bildirdi.

L. martiniquensis türleri yeni keşfedildi ve ilk olarak 1995 yılında izole edilmiş olup, ilk olarak *L. siamensis* adı verildi. Ancak yakın tarihli deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizi, daha önce *L. siamensis* olarak tanımlanan parazit izolatlarının esasen *L. martiniquensis* ile aynı olduğunu göstermiştir.

Fransız kardeşler ve biyologlar Edmond Sergent ve Étienne Sergent'in, KL vakalarındaki lezyonların üzerine kum sineklerinin uçtuğunu ve konduğunu gözlemlediler. Ancak 1941 yılına kadar kanıtlanmadı kum sineği ile Leishmaniasis arasındaki bağlantıyı kanıtlayamadılar.

Kum sineğinin ısırığı yoluyla hastalığın aktarıldığı ilk olarak 1941 yılında deney yaparak enfekte olan kum sineklerinin beş gönüllüyü başarıyla bulaştırdığını İngiliz-

İsrail parazitoloğu Saul Adler tarafından gösterildi. Bir yıl sonra, kum sineklerinin kala-azar vektörü olduğu kesin olarak kanıtlandı. 1922'de, Brezilyalı Doktor Henrique de Beurepaire Rohan Aragão Güney Amerika'daki leishmaniasis'in aktarılmasından kum sineklerinin sorumlu olduğunu gösterdi. Daha sonra Yeni Dünya'da leishmaniasis ileten kum sineklerinin *Lutzomyiacinsine* ait olduğu bulundu. Son araştırmalarda gösteriyorki, 42 *Phlebotomus* türü ve 56 *Lutzomyia* türü, Eski ve Yeni Dünyada Leishmaniasisenfeksiyonunda rol oynamaktadır (Steverding 2017)

4.2. EPİDEMİYOLOJİSİ

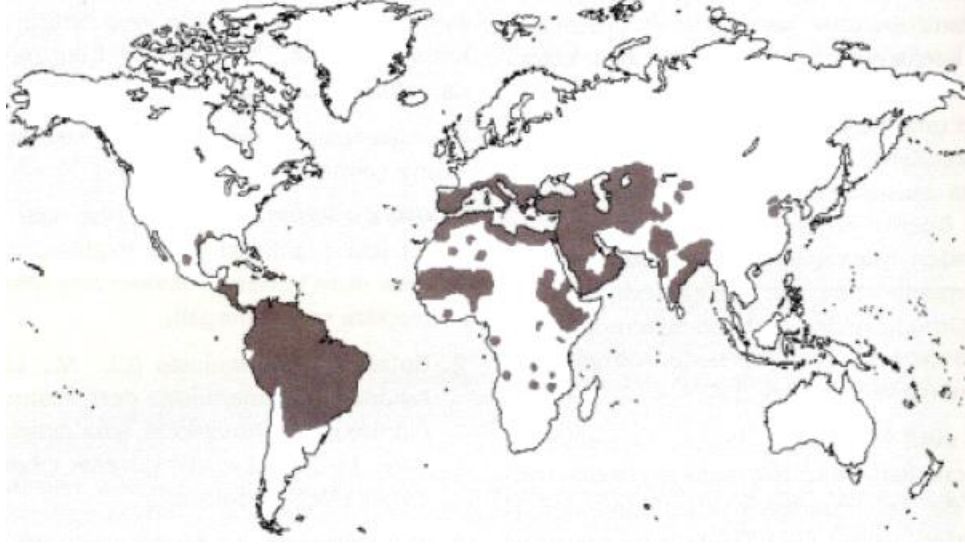
Viseral Leishmaniasis (VL), yüksek ateş, anemi, lökopeni, karaciğer ve dalak büyümesiyle belirti verir ve ilerleyen safhalarda tedavi edilmezse ölümlü sonuçlanabilir. *L. donovani* ve *L. infantum* parazitinin etken olduğu VL, Akdeniz bölgesi, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Orta ve Doğu Afrika ve Güney Amerika'da yayılım gösterir. Yeni Dünya ve Eski Dünya Viseral Leishmaniasisise sebep olan, paraziti taşıyan kum sineklerinin geniş coğrafik yayılım aralığı içindeki yarı kurak, açık alanlarda daha fazla ortaya çıktığı görülmektedir.



Şekil-2: Visserel leishmaiasis'in dünyadaki yayılımı (WHO 2010).

KL hastalığı 21. yüzyılda hala bir dünya sağlık sorunu olarak karşımızda durmaktadır. Her yıl 2 milyon yeni olgu olduğu tahmin edilmekte, bunların 300 bini resmi olarak rapor edilmektedir. Eski Dünya'da *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. major*'un;

Yeni Dünyada ise *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* başta olmak üzere çeşitli *Leishmania* türlerinin K.L'e sebep olduğu Eski Dünyada ise Akdeniz Havzası, Kuzey ve Batı Afrika, Orta Doğu, Güney Asya, Orta ve Güney Amerika'da yaygındır.Yeni vakaların tamamına yakını Afganistan, Irak, İran, Suriye, Cezayir, Sudi Arabistan, Brezilya ve Peru'dan olduğu bildirilmektedir. KL hastalığının Dünyadaki dağılımı bu hastalığa vektör olan eski dünyada *Phlebotomus* türleri Yeni dünya'da *Lutzomyia* türlerinin dağılımı ile paralellik göstermektedir. Elde edilen verilere göre Tropikal ve subtropikal bölgelerde bulunan bütün ülkelerde (Avustralya, Yeni Zelanda ve Pasifik adaları dışında) görüldüğü rapor edilmiştir. (Ashford ve ark.1991; Desjeux 2001).



Şekil-3: Leishmaniasisin Dünya'daki dağılımı (Davies ve ark. 2003).

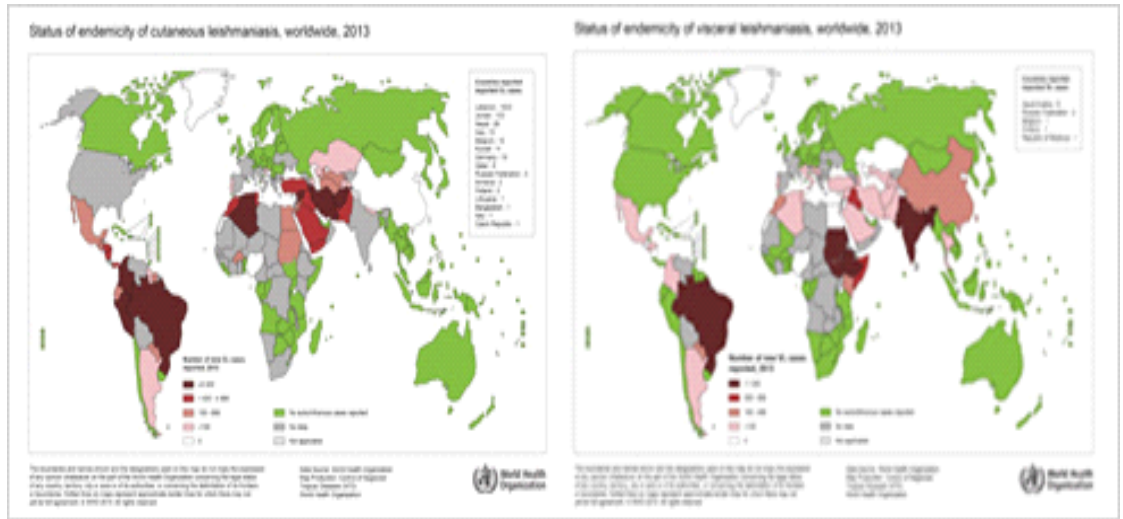
Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) edinilen sayılara göre 98 ülkede yaklaşık 12 milyon leishmaniasis olgusu bildirilmiş olup, 350 milyon insanın ise risk altında olduğu belirtilmiştir. Her sene bu verilere 2 milyon yeni olgunun katıldığı, ve bu sayının 500 bin kadarı VL, 1,5 milyon kadarı da KL olgusudur. KL'e ait raporlar sadece 300 bin seviyelerindedir. VL tüm dünyada 88 ülkede endemik olarak görülmekte hastaların yarısı Hindistan'da gözlenmektedir. Ayrıca enfeksiyon erkek bireylerde kadın bireylere kıyasla daha çok görülmektedir.

Hindistan başta olmak üzere bazı alanlarda VL'in yaşam döngüsünde yalnızca vektör ve insan rol oynamaktadır. Diğer alanlarda ise bazı köpekgil ve kemirgen türler rezervuar olduğu bildirilmektedir. (Özbel ve Töz 2007).

Dünyadaki KL vakalarının %90'ı Afganistan, Sudan, İran, Irak, Suriye, Suudi Arabistan, Cezayir, Peru, Kolombiya, Bolivya ve Brezilya'da görülmektedir. Özellikle ülkemize sınır olan Suriye'de 2003 ve 2004 senelerinde 25 000 vaka ve bu vakaların ise 10 bini ise Halep şehrinde bildirimi yapılmıştır (Gürel ve ark. 2012).

Global ısınma ile birlikte sıcaklıklardaki 1-2 °C'lik artışın hastalığın yayılmasında çok önemli rol oynayacağı, ve hava sıcaklıklarındaki bu artışın bile Güney Fransa'da sınırlı olan vektör dağılımının İngiltere sınırlarına uzanabileceği bildirilmektedir (Klaus ve ark. 1999).

Ancak Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da rapor edilen KL vakalarının endemik alanlardan geri gelen askerler, turistler ve işçilerde görülmektedir. Bu hastalar genellikle koruyucu önlemler almamakta buna ek olarak uygun olmayan bazı tedaviler aldıkları için tanı, geç olarak konulmaktadır (Herwald ve ark. 1993).



Şekil-4: Leishmaniasisin viseral ve kutanöz klinik tiplerinin ayrı ayrı epidemiyolojilerinin harita üzerinde gösterilmesi

<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/2017>

Ülkemizde VL hastalığının en çok rastlandığı bölgeler Ege ile Akdeniz bölgeleridir. Fakat buna ek olarak tüm bölgelerimizden rapor edilmiş vakalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda insan ve köpeklerden izole edilen parazitlerden izoenzim analizi gibi yöntemler kullanılarak Akdeniz etrafındaki ülkelerde etken türün *L. infantum* olduğu bulunmuştur (Özbel ve Töz 2007).

Türkiye 1950 yılından önce özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaygın şekilde rastlanırken 1950 sonrası yoğun Dikloro Difenil Trikloroethan(DDT) kullanılması ve buna bağlı olarak enfektif kum sineği popülasyonunun azalması hastalığın Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile sınırlanmıştır. Ancak 1980 yılından sonra Şanlıurfa ve Çukurova’da yeni KL vakalarında büyük artışlar belirtilmiştir.

Türkiye’de Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde hastalığa neden olan türün *L. tropica* olduğu ve bu türde enfeksiyon hayat döngüsünün enfekte insan-vektör-insan olduğu bildirilmektedir. Hastalığın vektörü olan dışı kum sineklerinin aktiviteleri ilkbaharın son dönemleri yaz aylarının başlangıcında başlar ve sonbahara kadar sürdüğü belirtilir ve bu sezona ‘bulaşım sezonu’ ismi verilir. Enfeksiyonun, kum sineklerinin aktif olduğu Nisan-Eylül ayları arasında ve genellikle Haziran-Ağustos arasında vakaların tespit edildiği bilinmektedir. İnkübasyon periyoduna bağlı olarak da vakalar daha çok Ekim ayı ile Şubat ayı arasında olan dönemde meydana gelmekte ve hastaların sağlık merkezlerine başvuruları da çoğunlukla bu dönemde olmaktadır. Çukurova’da ise inkübasyon periyodu daha erken olmakta KL vakaları daha erken ortaya çıkmaktadır(Kavur 2011; Gürel ve ark. 2012).

Türkiye KL hastalığının endemik olduğu ülkelerden olup Türkiye’nin sınırlarındaki ülkelerde özellikle İran ve Suriye’ de KL önemli bir halk sağlığı problemidir. Buna ek olarak Suriye’deki savaştan kaçan ve ülkemize göç eden 2 milyonu aşan göçmenler KL hastalığını ülkemize taşınması riskini bulunmaktadır. Türkiye’de binlerce sayıda yerli ve Suriyeli KL vakası rapor edilmiştir (Harman 2015).



4.3. TAKSONOMİ

Leishmaniasis olgularında

30 *Leishmania* türünün 21'i insanlarda enfeksiyon meydana getirmektedir. Bu farklı türler morfolojik olarak ayırt edilememekte ancak izoenzim analizleri, moleküler metotlar ve monoklonal antikorlar kullanılarak ayırımları gerçekleştirilmektedir.

- Alem** : Protista
Şube : Mastigophora
Altşube : Oligomastigophora
Sınıf : Kinetoplastidea
Takım : Kinetoplastida
Alttakım : Trypanosomatina
Aile : Trypanosomatidae
Cins : *Leishmania*
Altcins (1) : *Leishmania*

Tür (1) : *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, (*L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L. enrietti*).

Altcins (2) : *Viannia*

Tür (2) : *L. braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis*, *L. colombuensis*, *L. equatorensis*, *L. peruviana*), *L. guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*) *L. lainsoni*, *L. naiffi*.

Ayrıca soğukkanlı hayvanlarda görülen ve vektör kum sineklerinin *Sergentomyia* cinsine ait olan arthropodları bulaştırarak ve literatürde *Leishmania* like adı verilen türler de bulunmaktadır (Göçmen 2000; Özbel ve Özcel 2007).

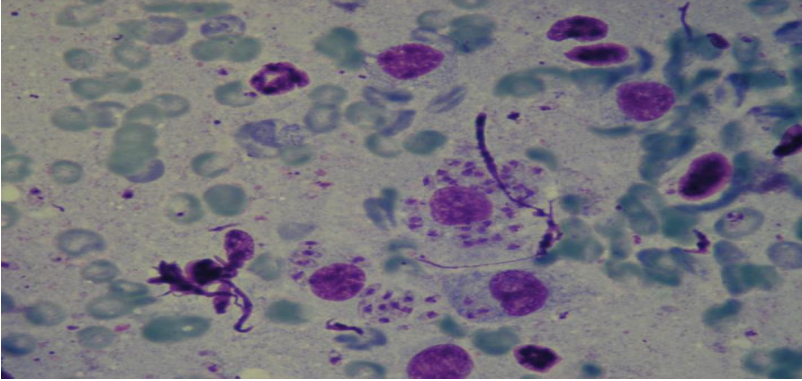
4.4. MORFOLOJİ

Leishmania protozoanları, tek bir kamçı, mitokondri benzeri bir organel, kinetoplast, lizozom, endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, vakuoller ve zengin DNA içeriğine sahip nükleusu bulunan tek hücreli ökaryot organizmalardır. *Leishmania* parazitleri yaşam siklusları boyunca iki formda gözlenirler. Parazitin vektör olan sineğin gastrointestinal sisteminde bulunan, kamçılı ve hareketli formuna promastigot, hastalarda ve hayvan rezervuarlarda bulunan kamçısız ve hareketsiz formuna ise amastigot denir (Özcel ve Daldal 1997; Özçelik 1999; Descoteaux ve Turco 2002).

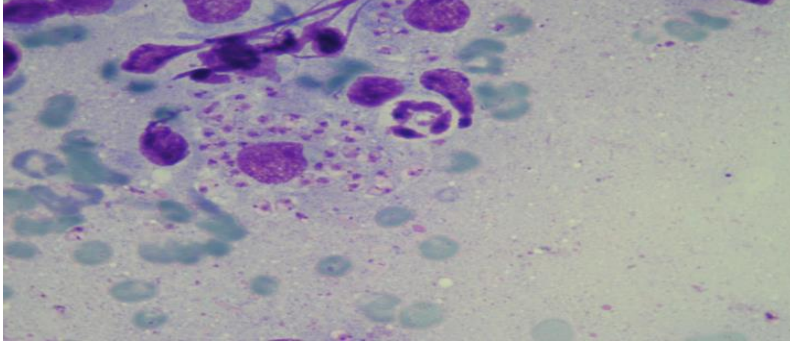
4.4.1. Amastigot Form

Parazitlerin amastigot formu, yaklaşık 1–3 µm eninde ve 2-5 µm boyunda; oval ve hareketsizdir. Bu formlar omurgalı konakta retikuloendotelial sistem makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalmaktadır. Sitoplazmada büyük bir nükleus ve nükleusa yakın kinetoplast bulunur. Kinetoplast *Leishmania*'yı da içeren kinetoplastida sınıfındaki

tüm protozoonlarda bulunan bir organeldir. Kinetoplast, şekli çubuğa benzeyen mitokondrial bir yapıdır. İçerisinde yaklaşık 10 bin kadar mini DNA halkaları ile 50 kadar büyük DNA halkaları bulunmaktadır. Bu halkalar ‘minicircle’ ve ‘maxicircle’ olarak adlandırılır. Kinetoplastın hücre içindeki işlevi tam olarak aydınlanmamakla birlikte, büyük halkaların mitokondrial ribozomal RNA’yı kodladığı; küçük halkaların ise mRNA’nın edisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Elektron mikroskopunda disk biçiminde görülen kinetoplastın boyutu 0,4 µm –0,8 µm arasında değişir. Giemsa ile boyanan yaymalarda amastigotun sitoplazması açık mavi, nükleusu ise koyu renkte görülür. Kinetoplast nükleusun yanında parlak kırmızı veya mor renkte boyanır. Nükleus ve kinetoplastın her ikisi de DNA içerir. Kinetoplasttaki DNA nükleustakinden farklıdır. Bu DNA’nın dizilimi türlere göre farklılık gösterdiğinden tür tayinlerinde kullanılır (Manson 1987; Töre 1996; Özcel ve Daldal 1997; Brewster ve ark. 1998; Özçelik 1999; Roberts ve ark. 2000; Sundar ve Rai 2002).



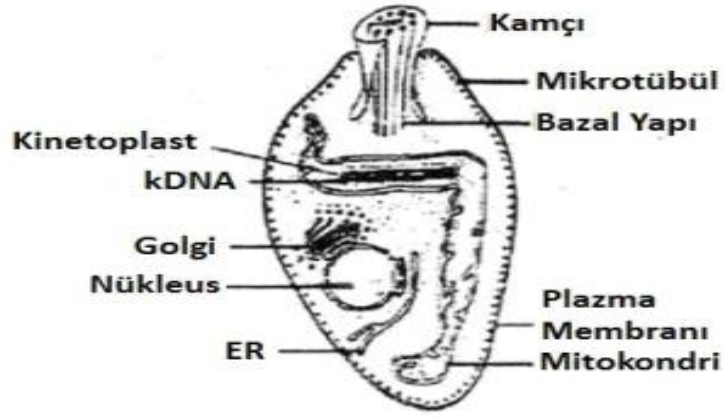
Şekil-6: *Leishmania* amastigotları Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskopunda görünümü (40x10 büyütme) (Orijinal).



Şekil-7: *Leishmania* amastigotları Giemsa boyalı preparatların ışık mikroskobunda görünümü (40x10 büyütme) (Orijinal).

4.4.2. Promastigot Form

Vektörlerin bağırsaklarında ve in vitro kültür ortamlarında bulunan ve parazitin hücre dışı formu olan promastigotlar ise, 14-20 μm boyunda, 2-3 μm genişlikte ve parazitin ön kısmından çıkan serbest bir kamçı boyları 20 μm 'ye ulaşabilen ve yüksek oranda hareketliliğe izin veren bir yapıya sahiptirler. Kamçının bir çift merkez ve dokuz çift periferik fibril çiftinden oluşan bir aksonemi vardır. Ön kısımda yuvarlak veya at nalı görünümünde kinetoplast ve kamçının dip bölgesinde ise blefaroplast bulunur. Nükleusa ile nükleolus merkezde bulunur ve nükleus zarında porlar vardır. Ayrıca sitoplazma içinde endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı organelleri bulunur (Bryceson 1996; Garcia 2001; Elçicek 2009).



Şekil-8: Vektör kum sineğindeki promastigot formu (Ateş 2012)



Şekil-9: *Leishmania* promastigotlarının Giemsa boyalı prepatların ışık mikroskobunda 40x10 büyütme ile görünümü (Orijinal).



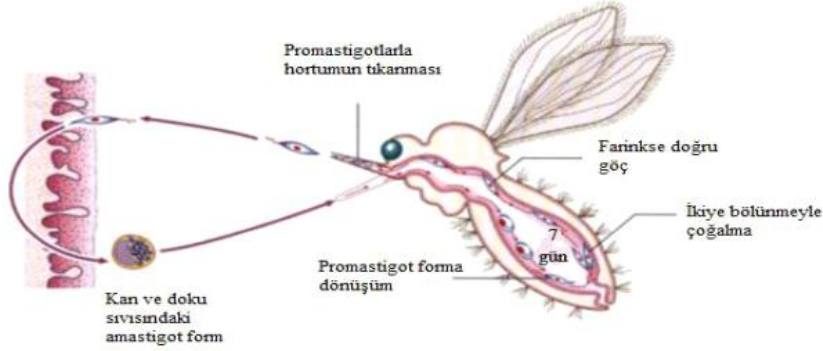
Şekil-10: *Leishmania* promastigotlarının bölünmesi Giemsa boyalı prepatların ışık mikroskobunda 40x10 büyütme ile görünümü (Orijinal).

4.5. LEİSHMANİASİS'DE YAŞAM DÖNGÜSÜ

Leishmania parazitlerinin vektörü olan eski dünyada *Phlebotomus* yeni dünyada *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri, enfektif omurgalı konaktan kanemerken makrofajların içindeki parazitin amastigot formunda vücuduna almaktadırlar. Daha sonra emilen kan orta midede 'peritrofik membran' ismi verilen bir örtü ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri peritrofik membrana salgılanmaktadır. *Leishmania* parazitlerin bir kısmı, makrofajların lizis olması ile birlikte sindirilirken diğer amastigot formlar uzamakta ve kamçı meydana gelerek enfektif olmayan promastigot forma dönüşmektedir. Bu forma 'prosiklik' promastigot denmekte ve bölünerek çoğalmaktadır. Daha sonra parazitler salgıladıkları enzimlerle peritrofik membranın ön bölgesini parçalayarak torasik mideye ulaşmaktadırlar. Prosiklik forma göre daha uzun ve ince olan bu forma 'nektomonad' ismi verilmektedir. Torasik midenin ön tarafında bulunan kapağa geldiklerinde kamçıları ile bağırsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslara yapışmaktadırlar. Burada gelişen parazit formuna ise 'hektomonad' denilmektedir. Sonraki safhalarda bu formlar midenin ön kısmına doğru gelerek özafagus ve farinksde bulunan kıvrımlara kamçıları vasıtası

ileyapışmakta ve lümeni tıkamaktadırlar. Bunda sonra promastigot formları özafagus ve farinksden ayrılarak daha uzun ve küçük formlar şeklinde ağız kısımlarına gelmekte fakat burada bölünmemektedir. Enfeksiyonu yapan asıl bu forma ise ‘metasiklik’ promastigotlar denmektedir. Parazitler aynı sıttadaki gibi tükürük bezlerinde görülmemektedirler.

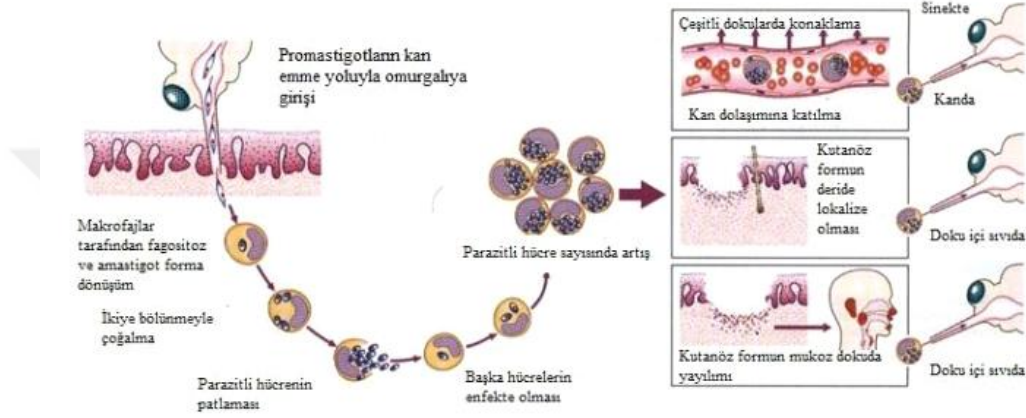
Enfektif metasiklik promastigot formların vektörü olan dişi kum sineği, kan emmek için omurgalı konağı ısırduğında 500 ile 1000 enfektif promastigot formları da gidiş yönü kan akımının tersine olacak şekilde konağa enjekte etmektedirler. Kan emme sırasında salgılanan tükürük salgısının pıhtılaşıma önleyici özelliği ile beraber omurgalı konağa enfeksiyonun yerleşmesinde ve enfektif promastigotların az olmasına rağmen enfeksiyonun başlayabilmesinde önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir.



Şekil-11 :*Leishmani* parazitinin kum sineğindeki hayat döngüsü (Atlas of Medical Helminthology and Protozoology’den değiştirilerek).

Vücut içerisine giren promastigotlar ilk olarak serumda bulunan kompleman tarafından opsonize edilmekte ve komplemanla opsonize olmuş parazitler; konağa ait monosit, makrofaj, ya da Langerhans hücreleriyle fagosite edilirler. Fagosite olan metasiklik promastigotların kamçısını yok olarak amastigot forma dönüşmektedir. Amastigot formlar fagositik vakuol içinde kalarak ikiye bölünme ile çoğalmaktadır. Bu aşamadan sonra enfektif olan konak hücresi, parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar formlar dağılarak diğer makrofajları enfekte

edebilmektedirler. Enfeksiyonun buradan sonraki durumunu *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Parazitin türene göre enfeksiyon deride sınırlı kalabilmekte KL sebep olmakta veya iç organlara göç ederek VL hastalığına neden olmaktadır. Enfektif olan makrofajlar kan yoluyla dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi dokulara gelmekte ve bu dokularda patolojilere neden olmaktadır.



Şekil-12: *Leishmania*'nın omurgalıdaki hayat döngüsü (Atlas of Medical Helminthology and Protozoology'den değiştirilerek).

Leishmania parazitlerinin enfektif metasiklik promastigotları kum sineği tarafından konağın vücuduna inoküle edildiğinde hızlıca enfeksiyonun başlaması ve gelişmesi beklenmemelidir. Bunun sebepleri arasında yeterli miktardan daha az miktarda promastigotun inoküle edilmesi, konağın immun sisteminin güçlü olması gibi durumlarda konağın vücudunda parazite karşı antikormeydana gelmekte ve enfeksiyon gelişmemektedir (Killick-Kendrick 1979; Meinecke ve ark. 1999; Gillespie ve ark. 2000).

4.6. KLİNİK

Hastalıkların klinik görünümdeki farklılıkların parazitteki genetik çeşitliliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Ancak sadece bir bölümü

enfeksiyona neden olan parazitin türü ile açıklanabilmektedir. Bildirilen leishmaniasis olguları da aslında gerçekten hastalığa yakalanmış olan insan sayısını tam olarak verememektedir, çünkü her paraziti alan kişide enfeksiyongelişmemekte veya enfeksiyon başlasa bile her insanda hastalık ilerleyememektedir. Hastalığın oluşmasında malnütrisyon, stres ve immün bozukluklar önemli rol oynamaktadır ve bu yüzden VL'nin epidemik olarak bulunduğu yerler genelde fakirliğin, açlığın, savaşın ve immün süpresyonun görüldüğü yerlerdir. KL'de olasılıkla etken *Leishmania* türüne bağlı olarak birkaç klinik şekilde görülmektedir. Bunlar genellikle tedavi edilmeden iyileşen lokalize KL, tedavisi çok zor olan Diffuz Kutanöz Leishmaniasis (DKL) ve yüzde şekil bozukluğu ve sakatlanmaya yol açan lezyonlar oluşturan en şiddetli şekil olan Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) dir (Seaman ve ark. 1996; Alvar ve ark. 2008; WHO, 2010).

Leishmaniasisde hastalığında farklı klinik tablolarla ortaya çıkmaktadır:

- Viseral leishmaniasis hastalığına Kala Azar, VL, iç organlar leishmaniasisi, , dum dum fever (kara humma),tropikal splenomegali, öldüren ateş (death fever) ,kara hastalık isimleri verilmektedir.
- Kutanöz leishmaniasis hastalığına CL, KL, LCL, cutaneous leishmaniasis, lokal kutanöz leishmaniasis, deri leishmaniasisi Şark çıbanı (oriental sore,), Halep çıbanı (Aleppo button) gibi isimler verilmektedir.
- Mukokutanöz leishmaniasis hastalığına ise MCL, mucocutaneous leishmaniasis ismi verilmekte iken daha sonra diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve Post Kala Azar dermal leishmaniasis (PKDL) hastalıklarında bu isimde toplanmıştır (Özcel 2007).
- Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis tablosunda ise *L. donovani* ile oluşan VL hastalığının iyileşmesinden sonra bazı hastalarda görülür

4.6.1. Viseral Leishmaniasis

Visceral leishmaniasis (VL) aynı zamanda kala-azar olarak da bilinen bu hastalık kutanöz leishmaniasis enfeksiyonunbaşlangıç bölgesinde bulunan parazit ile enfekte

olmuş makrofajların metastazına bağlı *Leishmaniaparaziti*. amastigotlarının retiküloendotelial sistem hücrelerinde yerleşmesi ile gelişir. Eski dünyada VL ile bulaşma *L. donovani* parazitleri (Hindistan, Pakistan, Afrika bölgelerinde) ve *L. infantum* parazitleri (Akdeniz bölgesinde) nedeni ile kaynaklanmaktadır. Ayrıca HIV ile birlikte enfekte olmuş bireylerin, atipik sunumlar geliştirmeye özel bir duyarlılığı vardır ve HIV hastalarında VL'nin şiddeti ve VL'nin gelişimi, Immune Deficiency Syndrome(AIDS) hastalığını tanımlayan bir hastalıktır. Bu muhtemelen, her iki ajanın da konakçının bağışıklık sistemi üzerindeki düzensizlik etkilerinden kaynaklanmaktadır (McGwire ve Satoskar 2014)

Türkiye'de etken parazit *L. infantum* olarak bildirilmiştir. Bazı belirtileri ile sıtma, lösemi veya lenfoma gibi hastalıklarla karışabilen ve tedavi edilmediği takdirde ölüme sonuçlanan hastalık olup VL'nin kesin tanısı koymak laboratuvar bulgularına dayanır. VL Türkiye'de bildirim zorunlu bir hastalıktır. Aktif olguları belirleme ve tedavisi hastalığın kontrolü için çok önemli unsurlar olarak kabul edilmektedir (WHO 2010; Resmi Gazete, 2011).

Özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf nodlarında bulunan mononükleer fagositik sistem hücrelerinin enfekte olması sonucu görülen bir hastalıktır. Etkenlerinden *L. donovani* Hindistan ve Afrika'da, *L. infantum* Akdeniz Bölgesi'nde ve *L. chagasi* ise Yeni Dünya'da görülmektedir. VL yetersiz beslenme, organ nakilleri sonucu oluşan immün yetersizlik ve AIDS gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda kolaylıkla gelişebilmektedir. Bununla birlikte, mononükleer fagositik sistem hücrelerinin bulunduğu akciğer ve bağırsaklarda da görülebilir. Hastalığın kuluçka süresi genellikle 2-4 aydır. Bu süre bir yıla kadar uzayabilir. Hastalık genellikle kendini gizleyerek sinsi başlar, immün sistemin baskılandığı durumlarda aniden ortaya çıkabilir. Ayrıca ateş, hepatomegali, splenomegali, anemi, trombositopeni, lökopeni ve hipergammaglobülinemi gibi klinik semptomlar gösterir. Başlangıçta baş ağrısı, zayıflama ve hafif ateş görülür. Daha sonra yüksek ateş ile birlikte dalak büyür. Hastalığın ilerlemesi ile ateş yükselip düşerek VL'ye özgü bir eğri çizer. Günde iki kez yükselen aralıklı bir ateş ile devam eder. Genelde 39-40°C olmakla beraber bazen 40-40,5°C'ye çıkabilir. Yetişkinlerde de görülen VL genellikle çocuklarda tedavi edilmez ise ciddi enfeksiyonlara ve hatta ölümlere neden olabilir. Ayrıca eğer tedavi bırakılırsa,

hastalığın, immün baskılayıcı ve ikincil hastalıklara dayalı yüksek bir ölüm oranı mevcuttur.

Klinik olarak VL'in akut, subakut ve kronik olmak üzere 3 formu olduğu belirlenmiştir. Subakut form; klinik olarak en sık görülen form olup akut forma göre daha belirgindir. Tedavi edilmesine rağmen hastalığın %1 ile %11 arasında ölümlerle sonuçlandığı bildirilmiştir. Ölüm sebebi olarak gastrointestinal sistem kanamaları, karaciğer yetmezliği ve anemiye bağlı olarak gelişen kalp yetmezliği bildirilmiştir. Akut form; şiddetli dış eti, burun, bağırsak kanamaları ile kemik iliği baskılanmasına bağlı oluşan kanda eritrosit, lökosit ve trombosit sayısının normalin altına düşmesi sonucu hastalık daha da ağırlaşarak ilerlemekte ve özellikle ishal şikâyetlerinin eklenmesi ile hastanın genel durumu bozulmakta, ve hasta 2-3 ay içinde hayatını kaybetmektedir. Kronik vakalarda ise zayıflama, karaciğer ve dalak büyüklüğü dışında genelde hastalarda bir şikâyet yoktur ve hastanın yaşamına normal olarak devam ettirdiği bildirilmiştir. Genellikle *L. infantum*'un rezervuarı köpekler olup, seroprevalansı bu hayvanlarda %0,72-%33 olarak belirlenmiştir. Son yıllarda immün yetmezliği olan hasta olgularının artmasına paralel olarak VL olgularında da artış görüldüğü dikkat çekmektedir (Bettini ve Gradoni 1986; Ak ve ark. 1995; Unat ve ark. 1995; Töre 1996; Berman 1997; Garcia 2001; Sundar ve Rai 2002; Elçiçek 2009).



Şekil-13: Visceral leishmaniasis olgusunda karaciğer büyümesi (sciencephoto.com'dan değiştirilerek).

4.6.2. Kutanöz Leishmaniasis

KL, parazitin deride monosit ve makrofaj içinde üremeleri sonucunda oluşan, uzun süreli geçmeyen yaralara neden olan ve vücudun değişik bölgelerinde ve özellikle yüzde izler bırakan bir enfeksiyondur (Erişöz Kasap 2010)

KL lezyonu enfekte dişi kum sineğinin ısırıldığı vücutta örtülmeyen kısımlardaki deri yüzeyinde üç haftadan daha fazla zaman geçmiş olmasına rağmen eritemli bir papül olarak başlar ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar olmadıkça ağrı meydana gelmeyen papül, veya nodül formunda olabilen yavaş bir şekilde büyüyerek merkezinde volkan kraterini anımsatan lezyonlara dönüşür. Lezyon üzerindeki güçlü şekilde yapışık sert kabuk kaldırıldığında kabuk kısmının alt bölümünde çiviye benzer çıkıntılar mevcuttur. Bunlara Hulusi Behçet'in "çivi belirtisi" ismi verilmektedir ve vücutta çok sayıda ısırma varsa çok sayıda lezyon olabilmektedir. Lezyonlar genellikle aynı özelliktedirler ve tedavisi yapılmayan olgulara ait lezyonlar genelde 1-1,5 yılın sonunda yaşam boyu kalacak olan bir skara neden olarak iyileşme gösterirler. İyileşmenin sonrasında bireyi hayat boyu enfeksiyonların tekrar etmesinden koruyan bağışıklık gelişmektedir. *L. tropica*'nın neden olduğu KL kuru tip olarak bilinir ve daha çok kırsal olmayan alanlarda görülür. Lezyonlar yavaş bir şekilde devam eder ve geç ülserleşir.

Genellikle çok fazla miktarda, kuru, ülserle nodül ve lezyonlar olur (şekil13). Lezyonlar en erken bir yıl veya bunun üzerinde sürede lezyonun yerinde kötü skar bırakarak iyi olurlar. İnkübasyon süresi çoğunlukla 2-8 aydır. *L. major*'un sebep olduğu KL yaş tip olarak bilinir ve çoğu kez kırsal alanlarda görülmektedir (Şekil 14). Lezyonlar hızlı ve şiddetli enfeksiyon olur ülserle görünümündedir ayrıca 2-8 ayda iyileşmektedir (Özbel ve Töz 2007;Harman 2015 www.saglik.gov.tr 2017;).



Şekil-14:Kutanöz leishmaniasis olgusunda Üzeri krutlu, etrafı hiperemik lezyon (kuru tip) (Teke ve ark. 2014'ten değiştirilerek)



Şekil-15:Kutanöz leishmaniasis olgusu (yaş tip) www.tibbiyardim.com/sark-cibani.html"Erişim tarihi: 15 Aralık 2018)

4.6.3. Mukokutanöz Leishmaniasis

Mukokutanöz leishmaniasis (MCL), lokal deri hastalığından ya da parazit metastazının mukokutanöz dokuya uzanmasına bağlı olabilen *L. braziliensis* parazitinin sebep olduğu Leishmaniasis hastalığı kliniğinin bir türü olarak kaynaklanmaktadır. MCL, primer lezyonların iyileşmesinden aylar sonra da ortaya çıkabilir. Bu hastalık genellikle burun, ağız ya da nazofarenks ve göz kapak dokularını deforme eden ve kronik lokal doku harabiyetinden kaynaklanan bir enfeksiyondür. Ayrıca ileri safhalarda solunum fonksiyonunu etkiler ve beslenmeyi engelleyebilir. Konak ve parazit faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu altta yatan patojenez MCL iyi anlaşılmamıştır. Buna bağlı olarak hastalık genellikle kemoterapiye dirençlidir ve hastalar genellikle sekonder süper enfeksiyonlardan ve yetersiz beslenmeden ölmektedir.

4.6.4. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis

VL için başarılı bir şekilde tedavi edilmiş olan ve yıllarca belirti vermeyen bazı hastalarda, derinin içinde maküla, makülo-papüler veya nodüler lezyonlara neden olan parazitlerin aniden üremesi ile meydana gelen bir hastalıktır. PKDL sebep olan tür *L. donovani* parazitidir. PKDL hastalığının patogenezi tam olarak bilinmese de vücutta kalan dermal parazitlere karşı ortaya çıkan konakçı immün yanıtı interferon γ sitokinlerle yanıtı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Lezyonların biyopsisi, VL'yi oluşturan parazitlere genotipik olarak özdeş olan amastigotlarla ve makrofajları göstermektedir (McGwire ve Satoskar 2014).

4.7. TANI

KL bazı cilt rahatsızlıklarıyla kliniğine çok benzemektedir. Örnek olarak; akne, egzama, tüberkülozis verrucosus, kan çıbanı, lupus eritromatozus, leptomlu lepra, lupus

vulgaris, ciltteki tümörler vs. verilebilir. Bu sebeple KL'in diğer cilt hastlıklarına karışma durumu olması sebebiyle laboratuvar yöntemleriyle bu hastalığın ayrımın sağlanması gerekmektedir. En sık başvuru laboratuvar yöntemleri mikroskopi ve kültür yöntemleridir. Tanıya yönelik kullanılan yöntemler aşağıdaki çizelgede avantaj ve dezavantaj yönleriyle belirtilmiştir(Alkan ve ark. 1997).

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Mikroskopi	Oldukça kolay ve doğrudan yöntem olması Düşük maliyet gerektirmesi	Düşük parazitemide düşük duyarlılık Benzerliklerin ayırt edilememesi Tecrübeli çalışan gerektirmesi
Seroloji yöntemleri	Hızlı ve kolay yöntem Fazla sayıda örnek incelemesine imkan sağlaması	Standartizasyon gerektirmesi Özgüllüğün düşük oluşu
Kültür yöntemi	Canlı halde parazit tespiti	Masraflı ve zaman alıcı Canlılığın takibi Türler arası varyasyon oluşması
Moleküler yöntemler	Direkt türün tespiti Canlılık gerektirmemesi Düşük parazitemiye rağmen yüksek duyarlılık	Masraflı ve çok aşama Kontaminasyona ve inhibitörlere bağlı negatif sonuç

Tablo 1: Leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması (Alkan ve ark. 1997)

4.7.1. Direkt Mikroskopi

Öncelikle KL düşünülen lezyon %70'lik alkol ile temizlenir. Sonra lezyonun sağlam deriyle birleştiği yerde 0,5 cm uzunluğunda ve 2-3 mm derinliğinde küçük bir kesi yapılır. Kesi yeri bisturiyle kazınarak ya da lezyon ülsere ise bir pipetle lezyondan kan içermeyen seröz örnek alınır. VL düşünülen hastalarda etkensel tanı olarak, kemik iliği, lenfnodu ve dalak aspirasyon materyalleri ve idrar örnekleri kullanılır. Lama yayılan örnek metanol ile fikse edilme işlemi sonrası Giemsa ya da Wright boyasıyla boyanır ve mikroskopta incelenir ve hücre dışında veya içinde amastigotların görülmesi ile klinik tanı doğrulanır. Tek preparat tanıya yeterli olabilmekle birlikte, 5 smear yapmak testin duyarlılığını artırır. Çoğunlukla üç aydan kısa lezyonlarda parazit daha kolay gözlemlenirken, altı aydan eski lezyonlarda parazit gözlemek daha zordur (An 2017).

4.7.2. Serolojik Yöntemler

Montenegro cilt testi KL vakalarında oldukça yüksek duyarlılık bir test olarak görünse deenfeksiyonunne zaman başladığı ilgili yanlış sonuçlar vermektedir.

Leismaniasis tanısında; Enzim-bağlı immünassay (ELISA) testi, western blot (WB), rk39 immürokromatografik tanı testi (ICT), İmmünfloresan antikor testi (IFAT), gibi serolojik yöntemlere de başvurulmuştur. Bu yöntemlerin ana koşulu, hastanın serumunda veya idrarında parazite karşı oluşan antikor veya antijenlerinin belirlenmesine dayanan yöntemlerdir (Zorba 2015).

Serolojik tanı daha güvenlidir ve iki test geliştirilmiştir. Bunlar direkt agglutination test (DAT) ve Ks30 dipstick testi. DAT, dondurularak kurutulmuş bir antijen kullanarak anti-leishmania antikor titrelerini ölçer. Ancak uzun inkübasyon, standartizasyon ve birden çok numune kullanımı gerektirir. . K39 dipstick testi, VL için oldukça spesifiktir ve39 amino asit dizisine (K39) karşı antikorları tespit eder. Bir immürokromatografik şerit test çubuğu olarak geliştirilmiştir. Testin gerçekleştirilmesi kolaydır. Ayrıca kit ortam sıcaklığında saklanabilir, ekipman gerektirmez ve uzak bölgelere taşınabilir (Lockwood ve Sundar 2006).

4.7.3. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler Leishmaniasis tanısında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca moleküler yöntemler konaktaki *Leishmania* sayısını belirlemek, tür tanımlaması, virulansınıya da direncini belirleyen genleri belirlemek için kullanılan yöntemlerdendir. Moleküler yöntemler ile tanı, kantitasyon ve canlılık çalışmalarında duyarlılık yüksek seviyede gereklilik arz ettiğinden kopya sayısı yüksek olan rRNA genleri ve kinetoplast DNA genleriyle çalışılmaktadır.

PCR-RFLP yöntemi Leishmaniasis tanısında en çok uygulanan yöntemlerdendir. Bu yöntem uygulanışı ise klasik PCR yönteminin arkasından ürünlerin restriksiyon enzimleri ile kesilip elektroforez uygulandıktan sonra etidyum bromür ile boyanıp görüntülenmesi olayında dayanır.

Real-Time PCR yönteminde ise SYBR-green boyası ile boyanarak ya da TaqMan Förster/fluorescence resonance energy transfer (FRET) gibi floresan problarla parazitler hibridize edilerek aynı anda analiz edilmektedir. Diğer bir yöntem olan Reverse line blot hibridizasyon yöntemleri (RLB) birçok patojenin hızlı tanısında uygulanmaktadır.

Başka bir yöntem olan Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) yöntemi ile *Leishmania* parazitlerinin DNA'ları çoğaltılıp aynı zamanda ürünleri görüntülenebilmektedir. Bu yöntemde görüntüleme çoğalan ürün oluşumunda yeşile dönüşen eğer ürün yoksa portakal renginde kalan SYBR-Green I boyası ile yapılır (Eroglu 2012).

4.7.3.1. *Leishmania* türlerinin genetik yapısı

Epidemiyolojik araştırmalar için en uygun taksonomik belirteç olarak çok uzun bir süredir izoenzim analiz yöntemi kabul edilmektedir. Oniki enzimden oluşan bir panel şu anda kabul edilmiş olan tüm türleri yeterince ayırt edebilmektedir ve her bir türde tek bir izoenzim seti tarafından tanımlanan değişik zimodemler bulunabilmektedir. Yöntemin

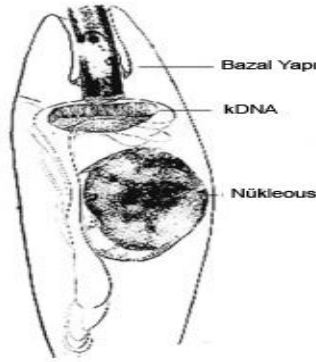
bir avantajı da zimodemlerle her bir tür içinde, bir coğrafi bölgedeki izolatları gruplamak için stabil bir belirteç sağlamasıdır. İzoenzim analizi taksonomik analiz için halen altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, restriction fragment length polymorphism(RFLP), birçok değişik primerler ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve monoklonal antikor yöntemi gibi modern ve hızlı yöntemler artık bu külfetli ve deneyim gerektiren, günümüzde ancak referans merkezlerinde yapılabilen bu yöntemin yanı sıra hızla gelişmekte ve giderek kabul görmekte-dirler (Hommel 1999).

Parazit polimorfizminin enfeksiyonun sonuçlanmasında önemli rolü olduğu bildirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, parazit genotipinin tür içi düzeyde bile hastalığı etkilediğini göstermiştir. Kolombiya’da belirli *L. braziliensis* suşlarının insanlarda daha çok mukozal yayılıma neden olduğu bildirilmiştir (Saravia ve ark. 2002; Schriefer ve ark. 2008). Diğer bir çalışmada da “randomly amplified polymorphic DNA” (RAPD) yöntemiyle birbirinden farklı gruplara ayrılan parazit genotipleri ile oluşan klinik hastalık (KL, MKL, DKL gibi) arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır (Schriefer ve ark. 2004). Eski Dünya *L. donovani* enfeksiyonlarında PKDL gelişiminin en azından belli bir oranda suşa bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu parazit suşları genetik gruplama ile ayırt edilebilir (Sreenivas ve ark. 2004; Schriefer ve ark. 2008). Gen ekspresyonu mikroarray yöntemi ile PKDL hastalarından elde edilen suşlarda VL hastalarından elde edilen suşlara oranla bazı genlerin daha fazla eksprese olduğu saptanmış ve PKDL gelişmesinin buna bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır (Salotra ve ark. 2006; Schriefer ve ark. 2008).

Moleküler epidemiyolojinin önemli bir sorunu etiyolojik ajanın sınıflandırılmasıdır. *Leishmania* cinsinin tanımlanmasından bu yana türlerin sayısı değişmiştir. ‘Multilocus Enzyme Electrophoresis’ (MLEE, izoenzim elektroforezi) halen *Leishmania* için tür ve tür içi düzeyinde referans tanımlayıcı yöntemdir. Nükleotidler kullanılarak ayırma gidilmesi 1970’lerin başında tahmin edilmeye başlanmıştır. Farklı genomik hedeflerdeki nükleotid polimorfizmlerine dayalı filogeni Akdeniz Bölgesi’ndeki endemik olan iki tür gibi bazı istisnalar dışında izoenzim elektroforezine dayalı *Leishmania* cinsi taksonomisini doğrulamaktadır. İzoenzim analizi ile VL etkeni *L. infantum*’un Sudan’da *L. donovani* ve *L. archibaldi* gibi iki visserotrofik suş ile birlikte olduğu düşünülmekteydi. Ancak birden fazla değişik moleküler belirtece dayalı

son alışmalar Sudan'da viseralize olan türün bir tek *L. donovani* olduğunu ve bu suşun genetik olarak Hindistan ve Kenya'daki *L. donovani* ve Akdeniz ve Güney Amerika'daki *L. infantum*'dan farklı olduğunu göstermiştir (Lukes ve ark. 2007). Ayrıca Tunus ve Libya'da giderek artan bir şekilde bildirilen *L. killicki* parazitinin izoenzim analizine göre ayrı bir tür olarak kabul edilirken moleküler analizler ile *L. tropica* olduğu gösterilmiştir (Schonian ve ark. 2008). Tr içindeki farklılıkların sınıflandırılabilmesi için standart izoenzim analizi sınırlı derecede yararlıdır. Akdeniz ve Latin Amerika'daki VL etkenlerinin çoğu izoenzim analizi ile MON-1 olarak saptanırken modifiye izoenzim tiplendirmesi ile MON-1 suşlarında genetik heterojenite saptanmıştır (Kuhls ve ark. 2008; Schonian ve ark. 2008).

Leishmania ve diğer trypanosomatid organizmalar, nükleusta bulunan DNA segmentinin yanısıra kinetoplast DNA (kDNA) olarak da bilinen mitokondrial genoma sahiptir. kDNA, 'minicircle' ve 'maxicircle' adı verilen yapıların dev bir şebekesini içermektedir. Her bir şebekede yaklaşık olarak 10 000 minicircle ve 50 maxicircle bulunmaktadır. Bu durum doğadaki genelde görülmeyen DNA yapılarından biridir



şekil-16:Leishmania'daki mitokondrial ve nüklear genomun yerleri

L. major, *L. infantum* ve *L. braziliensis* genomları bazı kek eksiklikler dışında Wellcome Trust Sanger Enstitüsü öncülüğünde uluslararası işbirliği ile tamamlanmıştır. *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-877), *L. major* Friedlin ve *L. braziliensis* (MHOM/BR/75M2904) genomları 2003 yılında tamamlanarak araştırıcıların kullanımına açılmıştır. Eski Dünya türleri 36 kromozoma sahipken Yeni Dünya türü

olan *L. braziliensis*'de ise 35 kromozom bulunmaktadır. Kromozom sayısındaki farklılık 20. ve 34. kromozomların birleşerek tek bir kromozom oluşturmamasından kaynaklanmaktadır (Peacock vd. 2007)

Son iki yılda üç *Leishmania* türünün genom analizlerinin tamamlanmasıyla *Leishmania* genomunda 8300 protein kodlayan ve 900 RNA geninin bulunduğu belirlenmiştir. Protein kodlayan genlerin yaklaşık %40'ı 2 ila 500 arasında üyesi bulunan toplam 662 ailede yer almaktadır (Myler 2008).

Leishmania genomunun büyüklüğü türe göre değişmektedir. DNA'sı 10^7 - 10^8 baz çifti arasında değişmektedir ve üç farklı kompartmanda bulunmaktadır. Hücre nükleusundaki kromozomal DNA'nın (nDNA) yanı sıra özgür olarak kopyalanan DNA'lar bulunmaktadır. Bunlar mitokondride bir ağ olarak birbirine bağlanan DNA moleküllerinden oluşan kinetoplast DNA'sı (kDNA) ve sitoplazmadaki virüs benzeri partiküllerdir. *Leishmania* ve diğer kinetoplastid protozoonlar en ilkel ökaryotlar arasında yer almaktadırlar ve belki de filogenetik yerleşimlerinin bir yansıması olarak gen organizasyonu ve ekspresyonunda birçok beklenmeyen durum göstermektedirler. Örneğin genomlarında ardı ardına dizilmiş tekrarlanan genler bulunmaktadır ve olasılıkla olgun mRNA'ların polisistronik prekürsörleri olarak RNA'ya dönüşmektedirler. Bu mRNA'ların işleme yöntemlerinin en özgünlerinin 'trans-splicing' ve mitokondrial mRNA'ların 'post -transkripsiyonel editing' ile işlenmesi olduğu düşünülmektedir. Ökaryotlarda, DNA'da kodlanan genetik bilgi hücre içinde kromozomlarda paketlenmiştir. Fakat çoğu ökaryotik organizmadan farklı olarak arazitik protozoonların kromozomları hücre bölünmesi sırasında yoğunlaşmadıkları için ışık mikroskobu ile görüntülenemez. Bu nedenle, protozoonların genleri kromozomlara özgü sitogenetik yöntemler ile haritalanamazlar. Ancak kromozom büyüklüğündeki DNA moleküllerinin ayrılmasını sağlayan 'pulsed-field electrophoresis' (iki yönlü elektroforez) yöntemi ile bu sorun çözümlenmiştir. Bu yöntem ile ilk çalışmalar *Leishmania* türünün yüksek derecede esnek bir kromozom organizasyonu olduğunu ve tür içinde bile kromozom büyüklüğü ve sayısında değişikliklerin saptanabildiğini ortaya çıkarmıştır. Tüm Eski Dünya suşlarının toplamda haploid genom için 35 Mb (± 2 mb) büyüklüğündeki, 36 heterolog kromozom tanımlanmıştır. Birkaç tane *L. infantum* geni klonlanmış ve incelenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, incelenen genlerin çoğunda;

korunmuş kodlama bölgeleri ve farklı protein eksprese edilmeyen bölgeleri olan, polisistronik transkripsiyon (haberci RNA oluşumu) oluşan ve transkripsiyon sonrasında gen ekspresyonunun düzenlendiği ardı ardına organize genlerden oluşan ortak noktalar bulunmuştur. *L. infantum*'un kromozomlarının 'pulsed-field electrophoresis' ile analizi kromozomlarda büyüklük 270-2600 kilobaz (kb) ve sayı polimorfizmleri gösterilerek her suşun ayrı bir moleküler karyotipe sahip olduğu belirlenmiştir. Tür içinde yüksek derecede polimorfizm bulunmaktadır. Bir suşun tekrar klonlanması sonucundaya klonlama sırasında da kromozomların yeniden düzenlenebildiği gözlenmiştir. Kromozom büyüklüğündeki değişikliklerin çoğu, ardarda tekrar eden DNA dizilerinin eş bölünme sırasında kromatidler arasında eşit olmayan bir şekilde taşınması sonucunda DNA dizisinin amplifikasyonu ya da delesyonuna bağlı gibi görünmektedir. En küçük kromozomlarda ise büyüklük farkı, *Plasmodiumfalciparum*'da olduğu gibi subtelomerik bölgelerin dayanıksız olmasına bağlı gibi görünmektedir (Bastien ve ark. 1990; Blaineau ve ark. 1991; Requena ve ark. 1997).

Bu kadar farklılığa karşın, *L. infantum*'un değişik suşları ve hatta eski dünya suşlarının tümünde fiziksel bağlantı (linkage) gruplarının tam olarak korunduğu gözlenmiştir. Böylece, kromozom büyüklüğündeki polimorfizme karşın genomun genel yapısının korunduğu ve bunun *Leishmania* için gerekli olduğu akla gelmektedir. *L. infantum*'un moleküler karyotipi üzerindeki gen haritalamasında en azından evrimsel olarak korunan genlerin kromozomal dağılımında bir eğilim olduğu gösterilmiştir(Requena vd. 1997).

Leishmania parazitlerinin diploid olduğu kabul edilse de doğal izolatlarda özellikle trizomik kromozomlarda anöploid gözlenmiştir. Genom dizi analizi projesinde referans suş olan *L. major* Friedlin suşunda (LmF) 3 homolog kromozom 1 bulunmaktadır. Bu 300 kb kromozomun tam dizi analizinde kodlama bölgelerinin tam olarak aynı olduğu gözlenmiştir. Bu homolog kromozomlar, kromozom 1a ve 1b/c arasında bulunan sağ kodlanmayan subtelomerik bölgenin bitişinde bulunan 30 kb büyüklük farkıyla ayrılmaktadırlar. *Leishmania* ve *Trypanosoma* genom dizi analiz projelerindeki en anlamlı bulgu bu protozoonlardaki gen organizasyonudur. Genlerin çoğu aynı DNA dizisinde grup oluşturan büyük polisistronik gruplar (50-300 kb) içinde yer almaktadır. Bu kümeler kromozom bölgesine bağlı transkripsiyonel olarak farklı ya da benzer

olabilmektedir (Wincker ve ark., 1996; Myler ve ark., 2000; Dubessay ve ark. 2002).

Leishmania cinsinde yüksek derecede korunan genlerin benzer büyüklükteki kromozomlar üzerinde yer aldığı gösterilmiştir. Tüm *Leishmania* türlerinde yüksek derecede korunan genlerin 1 Mb'dan büyük kromozomlarda yerleştiği gözlenmiştir. Böylece asıl gerekli olan genlerin büyük kromozomlarda olduğu, diğer kromozomların özel adaptasyonlar için ya da çok özel fonksiyonlar (yüzey proteazları, antijenler, sekresyon faktörleri vs.) için yardımcı gen kopyalarını taşıdığı düşünülmektedir (Requena vd. 1997).

4.7.4. *Leishmania* Türleri İçin Kullanılan Besiyerleri ve Kullanılan İn-Vitro Yöntemler

Monofazik insect besiyeri, *L. brasiliensis*, *L. mexicana* ve *L. enriettii* suşlarının çoğaltılmasında uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Amastigotlar, antibiyotik ve değişen konsantrasyonlarda Fetal Calf Serum (FCS) içeren Grace Schneider ve Mitsuhashi-Maramorosch besiyerine aşılanmıştır. 27 °C'de 4-7 gün süreyle inkübe edildikten sonra verimlilikleri 1×10^8 /ml. olarak belirlenmiştir (Childs ve ark. 1978).

L. donovani parazitleri üç çeşit besiyeri üzerinde kala-azar hastalarından kemik iliği aspirasyonlarının kültürasyonu ile izole edilmiştir. İzolasyon, vakaların %88'inde başarılı olmuştur. İzolasyonda pH, D-glikoz, L-prolin ve antibiyotik konsantrasyonunun etkileri araştırılmış olup L-prolin ile kullanılan yarı katı besiyeri pH değeri 7,4, birincil izolasyon için modifiye NNN besiyerinden daha etkili bir besiyeri olduğu belirlendiği bildirilmiştir (Rassam ve Al-Mudhaffar 1979).

Leishmania parazitlerinin yetiştirilmesi için basit bir sıvı besiyeri tarif edilmiştir ve bu besiyerinde kültürlenmiş *L. brasiliensis* ve *L. peruviana*, 7 gün içinde ml başına 10^7 promastigot sayısından daha büyük hücre yoğunluklarına ulaşmıştır. Bu besiyeri, *Leishmania* türleri ve diğer hemoflagellatları yetiştirmek için kullanılan daha kompleks besiyerlerinden çok daha basit bir besiyeri olduğu belirtilmiştir (Palomino 1982).

L. major promastigotları enfekte olmuş bir fareden blood agar besiyeri ve Schneider media+%30 fetal calf serum besiyerinde izole edildi ve yaklaşık bir yıldır takip edildimiştir. CD1 suşu ve BALB / c suşundaki enfektivite çalışmaları, Schneider besiyerinde yetiştirilen promastigotların, kültürasyon periyodu boyunca BALB / c farelerine bulaşmayı sürdürdüğünü gösterdiği belirtilmiş olup ayrıca CD1 suşu farelerine bulaşıcılık giderek kaybolmuştur. Bununla birlikte her iki fare suşunda da blood agar besiyerinde üretilen promastigotlardaSchneider besiyerinde yetiştirilen promastigotlardan daha hızlı bir oranda enfektiviteyi kaybetmiş olduğu bildirilmiştir (Neal 1984).

Grace's insect besiyerine %20 (v / v) ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (FBS) ve %15 defibrinlenmiş havuzlanmış tavşan kanı eklenmesiyle, modifiye NNN besiyerinde daha duyarlı olduğu gösterilmiş olup kemik iliği aspiratlarının kültürlerinden gelen *L. donovani* promastigotlarınınin vitro birincil izolasyonu için Grace's insect besiyerine %20 (v / v) ve%30 (v / v) FBS (P'den az) eklenerek yapılan besiyerlerinde olumlu sonuçlar bulunduğu bildirilmiştir. Bu besiyerinin, tedavi edilmemiş visceral leishmaniasis vakalarının parazitolojik tanısı için ve kemik iliğinden alınan aspiratlarda*L. donovani* cisimciklerinin için mikroskopik incelemelerinin negatif olduğu durumlarda yararlı bulunduğu belirtilmiştir (Saran ve ark. 1986).

*Leishmani*türleri ve diğer flagellatların kültürasyonu için kan veya serum içermeyen bir sıvı besiyerigeliştirilmiştir. Karaciğer infüzyon suyu ve triptoz içeren bir temel LIT besiyerine, Roswell Park Memorial İnstitute (RPMI-1640) veM-199 karışımı eklenmiştir.Bu kombinasyon, biyokimyasal ve immünolojik çalışmalar için yüksek parazit oluşumuna izin verdiği bildirilmiştir (Sadigursky ve Brodskyn 1986).

Başka bir çalışmadaki besiyerinde *L. tropica* promastigotları yavaş yavaş gelişmiştir ancak daha önce diğer *Leishmani* parazitleri için formüle edilmiş veya bu besiyerinin basitleştirilmiş versiyonları olan serumsuz hemin içeren besiyerilerindendaha uzun süre bozulmadan saklandığıgözlemlenmiştir. Ayrıca besiyerinde heminin hemoglobin tarafından değiştirilmesi, daha uzun bir log fazına ve bölünme süresinde önemli bir azalmaya neden olduğu belirtilmiş olup ayrıca *L. donovani* ve *L.*

enrietti promastigotlarının yetiştirilmesinde de uygun bulunmuştur (Gholamhosseinian ve Vassef 1988).

Fetal buzağı serumu ihtiva eden Nutrient Broth, *L. donovani* parazitlerinin hayvanlardan izole edilmesinde ve *L. major*, *L. donovani* ve *L. adleri* parazitlerinin dondurulmasında başarılı bir şekilde uygulandığı bildirilmiştir. Ayrıca *L. donovani*, *L. major*, *L. adleri* ve tanımlanamayan benzeri flagellatların laboratuvar suşlarının promastigotlarının yavaş büyümesini desteklemiştir (Kaddu ve Nyamori 1990).

Leishmania türleri. parazitlerinin transformasyonunda insect besiyeri idrar bileşenleri ile güçlendirilmesi, insan idrarının bir besiyeri maddesi olarak etkisi araştırılmıştır. %10'luk fetal dana serumu içeren %1'lik idrarla Schneider'in *Drosophila* besiyerine eklenmesi, sekiz farklı taksonomik grubu temsil eden 11 *Leishmania* suşunun çoğalmasındaki sayının arttırıldığı belirlenmiştir. Bölünmeyen organizmalarda hücre bölünmesi, besiyerleri ile uyarıldı. Bu çalışmada kullanılan besiyerinde *L. donovani* ve *L. braziliensis* parazitlerini izolasyonu için faydalı olacağını ileri sürülmüştür (Howard ve ark. 1991).

L. braziliensis hücrelerinin in vitro kültürü zordur ve genellikle sürekli hücre bölünmesi için serum ile desteklenmiş besiyeri gerektirir. Taze, steril idrar, bir adet *Leishmania RNA* virüsü ile enfekte edilmiş ve enfekte olmamış *L. braziliensis* parazitine ait iki 2 suşunun serum yerine kullanılmış ve serum varlığında yetiştirilen aynı suşlar ile aynı hücre yoğunluğuna ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca *L. major*'ünün bir suşu da idrar takviyeli besiyerinde başarılı bir şekilde kültivasyonu yapıldığı bildirilmiştir (Armstrong ve Patterson 1994).

Başka bir çalışmada ise Körfez Savaşı'ndan dönen ABD'li eski bir askerden izole edilen *L. tropica* suşunun promastigotları, amastigotlara dönüşümü için üç besiyerleri üzerinde çalışılmıştır. Promastigotlar Schneider's *Drosophila*, Dulbecco's modified Eagle Medium (D-MEM) ve RPMI-1640 olmak üzere üç farklı besiyerinde yetiştirilmiştir. Her bir besiyeri için düşük pH, yüksek sıcaklık (34 derece C) ve her iki koşulun etkisi karşılaştırılmıştır. Hücreler sayıldı ve günlük morfolojik değişiklikler incelendi. D-MEM ve Schneider besiyerindeki morfolojik olarak tipik amastigotlara dönüşüm, D-MEM besiyerinde sekizinci günde pH'ı 5,8 ve 34 °C koşullarında promastigotların

amastigotlara dönüşüm en üst seviyededir. RPMI-1640'ta aynı koşullarda istenilen seviye ulaşılamamıştır. Dönüştürülmüş amastigotlar, fare makrofajlarını başarılı bir şekilde enfekte ettiği bildirilmiştir (Mohareb ve ark. 1995).

Leishmaniapromastigotlarının büyümesini ve çoğalmasını sağlayan kuru bir besiyeri tasarlanmıştır. Besiyerinde protein hammaddesi kullanılarak hazırlanmıştır. Besiyerinin temel besini bir enzimatik pepton olan amino nitrojen kaynağı olduğu belirtilmiştir. *Leishmaniaparazitlerinin* fizyolojik gereksinimlerini karşılamak için büyüme faktörleri bir maya özütü, vitaminler, amino asitler, karbonhidrat, kaynağı inorganik tuzlarda ve iz elementler kantitatif oranlarda seçilmiştir. Çalışmada kuru tozdan basit ve kullanımı kolay besiyerin hazırlanmasını belirtmiştir (Osokina ve Strelkova 1996).

Başka bir çalışmada ise In vitro olarak *Leishmaniapromastigotlarının* başarılı bir şekilde kültivasyonu için FCS' ye gerek duyulmadan yarı sentetik, otoklavlanabilir bir sıvı besiyerini açıklamakta olduğu belirtilmiştir. Parazitler, %10 FCS ve %2 memeli idrarı ile takviye edilmiş ticari olarak temin edilebilen M-199'da büyütüldü ve büyüme, FCS içermeyen aynı besiyeri ile karşılaştırıldı ve FCS içermeyen besiyerindeki parazitlerin büyümesi FCS içeren besiyerine oranla daha iyi olduğu bulunmuştur (Ali ve ark. 1998).

Diğer bir çalışmada ise, insan, köpek, sıçan ve kuş kanıyla zenginleştirilmiş El-On's besiyerindeki *L. major* ve *L. infantum* parazitlerinin büyüme oranı in vitro olarak kullanılmıştır. Tavşankanı kontrol olarak kullanılmıştır. Bu besiyerinde bu tip kanlarla birlikte Leishmania suşlarının albino farelere bulaşma üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Başka bir çalışmada ise sonuç olarak El-ON besiyerinde tavşan kanı yerine kuş kanı kullanılarak kültürde hem *L. major* hem de *L. infantum* parazitlerinin daha fazla üretildiği bildirilmiştir. *L. major* ve *L. infantum* parazitlerinin her türlü morfolojik formları bunlar uzamış promastigotlar, iğ promastigotları, paramastigotlar ve amastigotlar, besiyerinde üreme boyunca değişken yüzdelerde mevcut olduğu bildirilmiştir (Azab ve ark. 1999).

Enfekte olmuş bir hayvandan elde edilen *L. donovani* suşu AG83'ün amastigotlardan promastigotların dönüşümlerini üç besiyerinde; Schneider's *Drosophila* medium (SDM), Medium 199 (M-199) ve biphasic M-199 %10 fetal bovine serum (B-

M199) ile incelenmiştir. SDM ve B-M199 besiyerleri M199 ile karşılaştırıldığında promastigotların daha etkili bir dönüşüm yaptığı görülmüştür. Hamster ve BALB / c farelerinde yapılan enfektivite çalışmaları, B-M199 besiyerinde izole edilen promastigotların M-199'dan elde edilenlerden çok daha fazla enfektif olduğu gösterilmiştir. Ayrıca benzer koşullarda üretilen AG83 suşları ve SL94 suşlarının promastigotların enfektivitesi ve virülansının karşılaştırılması sonucunda hem makrofajlar hem de hayvan modelleri için SL94 suşunun daha etkin enfektiviteye sahip olduğu ortaya koymuştur. Çalışma sonucunda ise amastigotların promastigotlara dönüştürülmesinde kullanılan besiyerinin hamster ve BALB / c farelerinde dönüştürülmüş *L. donovani* promastigotlarının enfektivitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiş olup parazitin kaynağı ve suşu da *L. donovani* enfeksiyonunun sonucunu etkilediği bildirilmiştir (Dey ve ark. 2002)

NNN besiyerinde yetiştirilen 100 adet *L. infantum/chagasi* parazitleri 24 kuyucuklu plakalarda tutulmuş 2,5 ml. hacmindeki McCoy cell culture growth medium (CGM) besiyerine inoküle edilerek beş gün sonunda besiyerinde promastigotların üremesi istenilen seviye geldiği belirtilmiştir. Çalışmada, CGM tekniği ile Leishmania izolasyonunun avantajı, küçük bir miktar parazit (10^2 promastigot) ile düşük maliyet ve yüksek etkinlik sağladığı bildirilmektedir. Araştırma sonuçları, antijenler veya parazitler tarafından üretilen çözünebilir antijenleri elde etmenin yanı sıra, omurgalılarda ve omurgasızlarda *Leishmania* parazitlerinin üretilmesi ve izolasyonunda kullanılan yeni teşhis kitlerinin üretimi için düşük maliyetli bu tekniğin kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Nogueira ve Galati 2006).

Başka bir çalışmada ise *L. donovani* promastigotlarının yetiştirilmesi için besiyerlerinde bulunan FBS yerine keçi, inek ve mandaların tinalize yöntemiyle steril edilen sütlerinin kullanılabileceği öngörülmüştür. Promastigotların sayıları %10 FBS kontrol olarak kullanıldığında mililitrede $1,9 \times 10^7$ olarak bulunmuş ve buna kıyasla sırasıyla %10 keçi, inek ve manda sütü kullanılan besiyerlerinde mililitrede $2,6 \times 10^7$, $2,3 \times 10^7$ ve $2,1 \times 10^7$ sayılarına ulaşıldığı bildirilmektedir. Primer izolasyonda, süt takviyeli besiyeri 26 numunedan 22'sinin promastigotlar için pozitif olduğunu ve hücrelerin gözlenen 6 aylık sürede başarılı bir şekilde korunduğu bildirilmiştir (Muniaraj ve ark. 2007).

Leishmania parazitleri, insanlarda ve diğer memelilerde, tropik ve subtropikal bölgelerde kutanöz, mukokutanöz ve viseral leishmaniasis hastalıklarına neden olurlar. Parazitlerin büyümesini ve farklılaşmasını destekleyen *Leishmania* türlerinin invitro kültürlenmesi için bir besiyerinin hazırlanması, cinste teşhis, biyokimyasal, biyolojik ve immünolojik çalışmalar için önemli bir araçtır. Burada hızlı, ucuz ve güvenilir bir monofazik kültür besiyeri gelişimi bildirilmiştir. PBHIL olarak isimlendirilen yeni bir besiyerinde uzun süreli canlılık ile yüksek miktarlarda promastigotlar üretme ve *L. amazonensis* promastigotlarının amastigot benzeri formlara (%93) dönüşümünü sağladığı bildirilmiştir (Rodrigues ve ark. 2010).

Kültür ile tanının duyarlılığı, besiyerine inokülasyon sırasında aseptik koşullara dikkat edilmesi ve daha sonraki günlerde kültürlerin dikkatlice incelenmesiyle arttırılabildiği belirtilmektedir. Ancak tanının hemen mümkün olmaması kültüre ekim yönteminin dezavantajı olduğu bildirilmektedir. Eğer yeterince dikkat edilmez ise kontaminasyon riski bulunduğu varsayılmaktadır. Hastadan alınan örneklerin kültür besiyerine ekilmesi ile parazitin izole edilmesi de mümkün olduğu için kültür, leishmaniasis ile ilgili her laboratuvarında mutlaka uygulanan bir yöntem olduğu belirtilmektedir. Besiyeri olarak bifazik kanlı besiyeri NNN veya ticari olarak satılan RPMI-1640, Schneider's besiyeri veya M-199 kullanılabilir (Korkmaz ve Ok 2011).

Leishmaniaparazitlerinin in vitro kültürü promastigot ve amastigot formların her ikisi içinde yapılabilmektedir. Ancak memeli konaklarda hücre içinde yaşayan amastigotların kültürü, makrofaj benzeri hücreler içinde yapılması nispeten zor ve zahmetli olması nedeniyle, promastigot kültürü tercih edilmektedir. Promastigot ve amastigot formdaki parazitlerin büyüme koşulları arasında, sıcaklık, pH, besin kaynağı ve serum komponentleri açısından önemli farklılıklar bulunur. Sıcaklık ve pH'ın, promastigotların amastigotlara dönüşümünü tetiklemede önemli rolü vardır. Bu şekilde ortam özelliklerini değiştirerek promastigotlar aksenik amastigotlara dönüştürülebilir. *Leishmaniaparazitlerinin* kültürünün yapılması parazitlerin biyokimya, immünoloji ve hücre biyolojisi üzerine çalışma yapılmasına olanak sağladığı bildirilmiştir. Leishmaniasis ile enfekte hayvanlardan alınan biyopsi örnekleri, uygun besiyerine ekilerek *Leishmaniapromastigot* kültürü yapılabilmektedir. Kültüre inoküle biyopsi örneklerindeki *Leishmania* parazitleri önce hareketli promastigotlara dönüşür daha sonra

çoğalmaya başladığı bildirilmiştir (Ateş 2012).

1994 yılında, McNeal ve Novy tarafından *Trypanosoma* kültürünü elde etmek için hazırlanan bifazik besiyeri, Nicole tarafından modifiye edilerek *Leishmaniapromastigot*larını üretmek için denenmiş ve tüm dünyada McCoy cell culture growth medium (CGM) ismiyle bilinen besiyeri geliştirmiştir. Günümüzde *Leishmaniatür*lerinin kültürü için çeşitli katı, yarı katı ve sıvı besiyerleri bulunmaktadır. Katı besiyerlerinden olan NNN besiyeri; agar, tuz ve defibrine edilmiş tavşan kanı içermektedir. Besiyerine ayrıca %20 fetal calf serumu (FCS) ilave edilerek 5–14 günde *Leishmania* türlerinin %25 oranında promastigotların üremesi sağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca Schneider'in besiyeri sıvı bir besiyeri olup birçok amino asit içermekte olduğu belirtilmiştir. Bu besiyeri genelde serolojik ve biyokimyasal çalışmalar için kullanıldığı bildirilmektedir. Bu besiyerine belli oranlarda FDS eklenmesi ile promastigot kültüründe kullanılması gerektiği bildirilmiştir. Schneider'in besiyeri, *Leishmaniaparazit*lerinin üremesini hızlandırmakta böylelikle kısa sürede yüksek parazit miktarlarına ulaşılabildiği görülmektedir. Ayrıca başka bir çalışmada tampon olarak HEPES kullanılan ve %10 ile %20 FDS eklenmesi ile uygun sonuç alınabilen M-199 besiyeri ile *Leishmania* pasajı 2 haftaya kadar dayanabilmektedir. Bunun yanı sıra RPMI-1640 gibi besiyerlerine %10 FDS eklenmesi ile rutin promastigot kültürü başarılı bir şekilde yapılmaktadır (Ateş 2012).

*Leishmaniaparazit*lerinin yetiştirilmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur ve bunların arasında, Nicolle-Novy-MacNeal besiyeri gibi bifazik besiyerleri, parazitlerin başlangıçtaki izolasyonu ve bunların in vivo enfektivitesi için üstün olduğu belirtilmiştir. Sheeb Blood-LB Medium (SLM) besiyerinin etkinliği, *L. major* promastigotlarının yetiştirilmesi için değerlendirilmiştir. Sonuç olarak SLM, besiyeri *Leishmania* parazitlerinin rutin izolasyonu, kültivasyonu ve parazitlerin çoğalmasını için in vivo enfektiviteye sahip bir besiyeri olarak kullanıldığı gösterilmiştir (Nasiri 2013)

Yeni standardize edilen ve içinde Semolina (18,5 gr), Dekstroz (5 gr), Agar 10 (gr), Kan (100 ml), Gentamisin (1,5 ml) ve Distile su (500 ml) bulunan bir besiyerin *L.donovani* promastigot kültüründeki performansının NNN besiyeri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada ise söz konusu sıvı besiyerin 5.günde saptanan hücre sayısının NNN

besiyerinde saptanan sayıya çok yakın olduğu belirtilmiştir (Mohammed 2015).

Köpek örneklerinden *Leishmania* türlerinin in vitro izolasyonu için en yaygın kullanılan besiyerleri, ka tavşan kanı kullanılarak hazırlanan bifazik NNN besiyeridir. Doğal enfeksiyonlardan kaynaklanan *L. infantum* parazitleri, ilk olarak köpeğin vücudundan alındığı zaman, bulaştırıcı olmayan koşullarda büyüme için oldukça hassastır ve büyümeye ihtiyaç duyduğu saptanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, (NNN-test) besiyerinde kontrol edildikten sırasıyla sonra tavuk kanı (NNN-C), sığır kanı (NNN-O), at kanı (NNN-H) veya koyun kanı (NNN-S) ile hazırlanan besiyerlerinde bulunan *L. infantum* parazitleri durumunu saptanmaya çalışıldığı bildirilmektedir. Bu araştırmanın sonucunda Tavuk, öküz, at ve koyundan elde edilen kanın, doğal olarak enfekte olmuş köpeklerden alınan *L. infantum* parazitinin birincil izolasyonu için NNN besiyerinin hazırlanması için uygun olduğu ve gerektiğinde tavşan kanına alternatif olarak düşünülebileceği gösterilmiştir (Santos ve ark. 2018).

4.7.4.1. Leishmania besiyerlerinde kültür ortamları

İn vitro kültür ortamlarında sıcaklık, pH, CO₂ ve O₂ varlığının *Leishmania* promastigotlarının amastigotlara dönüşümü ve bunun tersi yönünde amastigotlarında promastigotlara dönüşümünde en önemli unsurlar olduğu kabul edilmektedir.

Phlebotom sineğinin orta bağırsağındaki pH değeri henüz bilinmemektedir; Bununla birlikte bazı sivrisineklerde alkali olduğu rapor edilmiştir. Ancak promastigotların fagositoz sırasında konakçı makrofajlarla meydana gelen amastigotlara farklılaşması için parazitlerin asidik bir ortamda bulunması gerekir. *Leishmania* parazitleri, çeşitli enzimatik deneylerle saptanmış ve farklı pH değerlerine adapte olabildiği görülmüştür. Örneğin, *L. mexicana* promastigotları, yüzeylerinde pH değeri 7 seviyelerinde optimum aktivite sergileyen bir metaloproteinaz genini ifade eder. *L. donovani*'nin promastigotları, pH değeri 7,0 ile pH değeri 7,5 seviyelerinde glukoz, prolin ve nükleosidleri en hızlı şekilde metabolize eder. Diğer yandan amastigotlar bu substratları optimum pH değeri 4,5 ile pH değeri 5,0 seviyelerinde katabolize eder. Benzer şekilde prolin taşınması

promastigotlarda pH değeri 7,0 ile Ph değeri 7,5 seviyelerinde olurken *L. donovani* amastigotlarında pH değeri 5,5' seviyeleri optimum seviyelerdir. Son çalışmalarla ilgili olarak besiyerlerinin asitleştirilmesi amastigotlarda prolin taşınmasını arttırdı, ancak promastigotlarda bu aktiviteyi gözlemlenemedi. Buradaki deney ve gözlemler sonucunda *Leishmania* parazitlerinin, her bir yaşam evresinin uygun çevresel pH seviyesinin optimum aktivitesini mümkün kılan adaptasyon mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir.

Ayrıca bu denemeler promastigot ve amastigotların çevresel pH seviyelerindeki değişiklikleri algılamak için mekanizmalar geliştirdiklerini ve bu pH seviyelerinde çalıştıklarını göstermektedir. Bu hipotez, pH değeri 4,5, pH değeri 5,0 ve pH değeri 6,0 seviyelerindeki ölçümleri uzun süreli kültüre adapte edilmiş *L. donovani*, *L. major* ve *L. mexicana* promastigotlarının hücresel aktiviteleri ve özellikleri incelenerek değerlendirildi. Ölçüm değeri pH değeri 6 olan büyümeye adapte olmuş promastigotların çoğaltılması pH değeri 7 seviyelerinde yetişen promastigotlara aynı sayıda olmuş ancak pH değeri 6 seviyesinden düşük değerlerde sayı azalmıştır. Bu değer pH değeri 4,5 seviyesinde büyümeye adapte edilmiş promastigotlar, en iyi pH değeri 7 seviyesinde kültivasyon olmuş promastigotlara göre 1,6 kat daha hızlı üreme göstermiştir. Seviye olarak pH değeri 4,5 seviyelerinde olan besiyerlerinde çoğaltılan promastigotlar, tekrar pH 7 değerlerindeki besiyerine ünoküle edildiğinde birkaç saat içinde tekrar üremeye başlamıştır. Bu çalışmalara bakılarak, promastigotların büyüme hızının pH değerlerine adaptasyonunun genetikten ziyade fenotipik olduğunu göstermektedir. Ayrıca besiyeri ortamının pH seviyesi *L. donovani* promastigotlarının DNA ve protein sentezini önemli ölçüde etkilediği de bildirilmiştir.

Aşırı sıcaklık değişiklikleri, *Leishmania* türleri tarafından karşılaşılan diğer bir çevresel faktörü oluştururken, kum sineği vektöründe, *Leishmania* parazitleri 22-28 °C sıcaklıklarla karşılaşır. Memeli konaklarına geçtikten sonra cilt lezyonlarında sıcaklık ölçümleri 31°C-35 °C, viseral organlarda ise 37 °C'ye kadar yüksek sıcaklıklara maruz kalırlar. Sıcaklıktaki bu tür değişiklikler, hücre ölümüne yol açan hücresel proteinlere ve zarlara zarar verebilir. Bu nedenle, konaklarında hayatta kalmak için, *Leishmania* türlerinin termotoleransı edinmiştir. Sıcaklığın enfeksiyon bölgesi virulens üzerindeki etkisi ve memeli vücudundaki farklı bölgelerde enfeksiyon yapma nedeniyle sıcaklık

stresine duyarlılıklarında farklılık gösterir. Önceki invitro besiyerlerindeki yapılan çalışmalarda *L. tropica* ve *L. major*, parazitleri in vitro olarak, 35 °C'de makrofajlar içinde 37 °C'de olduğundan daha hızlı çoğalır 39 °C'de ise tamamen yok edilirlerdi. *L. mexicana* parazitlerinin çoğaltılması da sıcaklığa karşı hassastır ve bu türün parazitleri 34 °C'de kültürlenmiş makrofajlarda iyi büyür ve çoğalırken enfeksiyon 37,5 °C'de ilerleme görülmez. Sıcaklığın *L. panamensis* parazitinin üzerindeki etkisi, sıcaklığın 33 °C olduğu burun ve kulaklardaki lezyonlarının periton içi enjeksiyonuna rağmen sınırlı gelişme ile gösterildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, *L. donovani* promastigotları 35 °C ve 37 °C'de bulunan besiyerlerinde eşit olarak çoğalır ve sadece kısmen 39 °C'de elimine edildiği görülmüştür. Morfolojik olarak in vitro besiyerlerinde dönüşen promastigotların üretilmesi, sadece 33-34 °C'den düşük sıcaklıklarda meydana gelir. *Leishmania* türlerinin tümü ısı şokuna cevap olarak morfolojilerini değiştirmez. Örneğin, *L. major* promastigotları, memelilerin tipik sıcaklıklarında inkübe edildiğinde, ısı şok proteinlerinin sentezi arttı, ancak tübülün gibi proteinlerin translasyonu neredeyse etkilenmedi. Sıcaklığın neden olduğu promastigot dönüşümü, yüksek sıcaklıklarda sentezlenmeyen değişken bir proteinin bozulması ile ilişkili olabilir. Sıcaklık yükselmesinin parazit morfolojisi, protein sentezi ve spesifik transkriptlerin şekli üzerindeki birleşik etkileri, sıcaklığın *Leishmania* parazitleri için bir faktör olduğunu gösterilmiştir (Zilberstein & Shapira, 1994)

Leishmania parazitlerinin aerobik organizma olduğu düşünülmektedir. *Leishmania* parazitleri, hem memelideki hücre içi evre parazit in amastigot formu ve hastalığı doğal olarak ileten kum sineğinin bağırsağında doğal olarak oluşan promastigotlar formları, muhtemelen mitokondri içinde mevcut olan sitokrom aracılı bir solunum zinciri yoluyla oksijen tüketebildiği düşünülmektedir.

Leishmania promastigotlarında çeşitli karboksilasyon reaksiyonlarının meydana geldiği ve metabolizmanın düzenlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir, ancak farklı CO₂ seviyelerinin büyüme üzerindeki etkileri araştırılmamıştır.

Promastigotlar, monofazik ortamda in vitro olarak yetiştirilebilir ve benzer şartlar altında memelilerden izole edilen amastigotlar, benzer şartlar altında promastigotlara dönüşebilir. Bu sebeple optimum koşulları belirlemek amacıyla

*Leishmaniapromastigotların büyümesini ve amastigotların çeşitli CO₂ ve O₂ konsantrasyonlarında invitro besiyerinde transformasyonu araştırılmıştır. Her iki durumda gaz fazı olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Ancak *Leishmaniatürlerinin vivo olarak karşılaştığı CO₂ ve O₂ seviyelerinin havadakilerden önemli ölçüde farklı olması ve memelilerde ve kum sineklerinde farklı olması muhtemel olduğu belirtilmiştir.**

Sonuçlar, parazitin doğal ortamlarına, transformasyon için olası bir tetikleyiciye ve amastigotların ve promastigotların metabolik yeteneklerine ilişkin bazı belirtiler verir.

Ayrıca *Leishmaniapromastigotlarının büyümesi besiyerindeki O₂ varlığına oldukça bağımlıdır. Düşük oksijen varlığında promastigotların boyutu, protein içeriği ve hareketliliği azaldı ve ölümler meydana geldiği bildirilmiştir.*

Karbondioksit konsantrasyonundaki (%0,1 ile %5,0) değişikliklerin promastigot büyümesi üzerinde çok az etkisi oldu.

Leishmania amastigotlarının in vitro olarak promastigotlara dönüşümü de oksijen gerektirmiştir, ancak düşük bir seviye (%0,4) amastigotların yüksek bir yüzdesinin dönüşmesi için yeterli olmuştur. Yüksek O₂ konsantrasyonlarında, dönüşüm biraz daha hızlıydı ancak parazit transformasyonu sayı daha az etkilendi.

CO₂ bulunan invitro ortamlarda daha büyük bir etki bulundu ve %5'de, parazit transformasyonu%0,1'den çok daha hızlıydı ve ayrıca 48 saat içinde daha büyük miktarda promastigotlar amastigotlara dönüştü. Bunlara ek olarak, amastigotların, in vivo olarak karşılaşılan düşük oksijen miktarı büyüme için gerektiği ve yüksek karbondioksit seviyelerinin amastigotun kum sineği tarafından alınmasından sonra promastigota dönüştürülmesi için bir tetikleyici olarak hareket edebileceğine dair bazı belirtiler vermektedir (Hart ve Coombs, 1981).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. LEISHMANIA İZOLATLARININ ELDE EDİLMESİ

Çalışmamızda, ülkemizdeki farklı leishmaniasis endemik alanlarından rapor edilen KL hastalarından izole edildikten sonra Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında NNN besiyerlerinde ardaşık pasajlarla devam ettirilen *L. tropica*, *L. infantum/donovani* ve *L. major* suşları kullanılmıştır. NNN besiyerine kultivasyona bırakılan promastigotlar RPMI 1640 +%15 Fetal Bovine Serum +%1 Gentamisin solüsyonu ve %1 Penicillin/Streptomycin solüsyonu bulunan besiyerlerinde inokülasyon yapılarak 25°C’de etüvde 10 gün bekletilmiştir. Üreme periyoduna giren promastigotlar steril falcon tüplerine aktarılmış ve 4400 rpm 10 dk +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst kısım dökülerek kalan partüküllerin üzerine 10 ml Phosphate-buffered saline (PBS) eklenmiş ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Son işlemin ardından kalan partikülün üzerine PBS eklenerek Thoma lamı kullanılarak sayıldıktan sonra promastigot sayısı 10^8 ml/promastigot olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan promastigot süspansiyonlarının üzerine %15 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek steril pipet kullanılarak homojen olarak karıştırılması sağlanmıştır. Bu işlemden sonraserial internal kapaklı kriyo tüplerine 1 ml olacak şekilde aktarılmıştır. *L. tropica*, *L. infantum/donovani*, *L. major* türlerinin her biri için 12 kriyo tüp ve toplamda 48 kriyotüpü hazırlanmıştır. Daha sonra Kriyo tüpleri Coolcell kutularına konularak -86°C’de 12 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda Coolcell kutularından hızlıca çıkarılan kriyo tüpleri sıvı azot tankına transfer edilmiştir. Sıvı azot tankında -196 °C’de sıvı azot içerisinde içeren kriyo tüplerinde bulunan *L. tropica*, *L. infantum/ donovani*, *L. major* promastigotları her türden bir adet tüp çıkarılarak 37°C’lik su banyosunda eritilmiştir. Promastigotların mikroskop altında hareketliliklerine ve Eozin boyası testine göre değerlendirilmeleri için Thoma lamı ile canlılık yüzdelerine bakılmıştır. Her bir

örnek NNN besiyerine ekimleri yapılarak 25°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır



Şekil-17: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası (Orijinal).

5.1.1. NNN. Besiyerinin Hazırlanması

500 ml'lik beher içinde 90 ml distile suya 0,6 gr NaCl ve 1,4 gr Bacto agar karıştırıldı ve ısıtılarak agarın tam olarak erimesi sağlandı. Besiyeri, otoklavda (121°C'de 15 dakika) sterilize edildikten sonra 50-55°C'ye soğutuldu ve içine 10 ml defibrine tavşan kanı eklendi. 4°C'ye alınan besiyerlerine 0,2 ml penisilin G ve streptomisin sülfat eklendi daha sonra vida kapaklı tüplere 4'er ml olarak dağıtıldı. Eğik pozisyonda agarın donması sağlandı. Besiyerleri, buzdolabına 2°C-8°C sıcaklıkta muhafaza edildi. Kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarıldı ve dip kısımlarında toplanan az miktarda yoğunlaşma sıvısı üzerine 1 ml %10 FCS içeren RPMI-1640 besiyeri eklendi

5.2. LEISHMANIA İZOLATLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ

5.2.1. DNA İzolasyonu

Yayma preparatlardan “Roche High Pure PCR Template Preparation Kit” ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Örnekler PZR öncesi -20 °C’de bekletilmiştir.

5.2.2. PZR Yöntemi

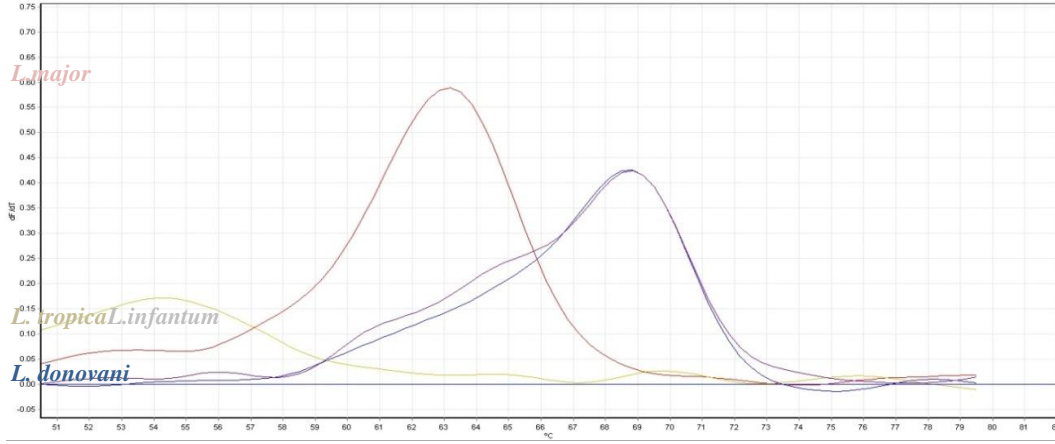
Çalışmanızda Internal Transcribed Spacer 1 “ITS1” gen bölgesinin problu gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. *Leishmania* parazitlerinin SSU rRNA ve 5.8S rRNA’yı kodlayan genleri ayıran ribozomal ITS1 bölgesinin Forward Primeri: 5’-CTGGATCATTTTCCGATG-3’, Reverse Primeri ise: 5’-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3’ şeklindedir. Bu primerler, QuantiTect Probe PCR kitin master karışımı ile birlikte aşağıda verilmiş olan spesifik problemler kullanılarak çoğaltılacaktır (Bakirci vd. 2015).

Probe 1: 5’-CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTTCGGTTT-Fluo-3’

Probe 2: 5’-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-pHo-3’

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.

Leishmania parazitlerinin saptanması için yapılan gerçek zamanlı PZR analizindeki termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma basamaklarından oluşmaktadır. Rotor-Gene cihazının programına çalışma protokolleri olarak bu basamaklar kaydedilmiştir. Rotor-Gene melting analizi yaparak sonuçları elde etmiştir. Genotipleme sonucu *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* türleri saptanmış izolatlardan birer tanesi çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil-18: Genotipleme eğrileri

5.3. Besiyerlerinin Hazırlanması, İzolatların Ekimi ve Sayımı

RPMI-1640, M-199, Schneiders, Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerleri ticari olarak satın alındı. Sıvı azotta kriyoprezervasyon yöntemiyle korunan promastigotlar buradan çıkarılıp sıcak su banyosunda hızlı bir biçimde çözündürüldü. Daha sonra NNN besiyerinde kültivasyon yapılmıştır. NNN besiyerinde üremeye başlayan *Leishmania* promastigolarında fazla miktarda üretmek amacıyla RPMI-1640 besiyerinde kültüre alınmıştır. Besiyerini kullanmadan önce %10 FCS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenmiştir. 25 ml'lik flasklere 5 ml aktarılmıştır ve üreyen promastigotlardan 50 µL üzerine ilave edilerek 25°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Parazitlerin çoğalması takip edilerek 2-3 günde bir besiyerinin eklenmesiyle 10^8 promastigot/mL içeren besiyeri elde edilmiştir. Daha sonra promastigot sayısı 10^6 promastigot/mL olacak şekilde Thoma lamı ile sayılarak promastigot içeren süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan RPMI-1640, M-199, Schneiders, Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerine eşit miktarlarda ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimleri yapılan besiyerlerinin 27°C'lik etüv ortamında bekletilmiştir. 3.5.7.9. ve 12. gün kontrolleri yapılarak thoma lamı yardımı ile üreme yoğunlukları hesaplanmıştır.

Parazitlerin thoma lamında sayımında yapıların işlemler ise çalışmamızda kullanılan her beş besiyerinden her birinden ve daha sonra % 2'lik formol-PBS karışımından eşit oranda alınarak Eppendorf tüpünde homojen olarak karışımı sağlandı.

Böylece promastigotların hareketsiz kalmaları temin edildi. Bundan sonra hazırlanan çözeltiden mikropipet yardımıyla bir miktar alındı ve Thoma lamına pipetlendi. Üzerine lamel kapatılıp ışık mikroskopunda 40x büyütme ile promastigotlar sayıldı. Thoma lamında bir büyük kare ve bunun içinde 16 küçük kare vardır. Bu kare alanın kenarı 1 mm, yüksekliği 0,1 mm. dir hacmi ise $1 \times 1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$ dür. $1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3$ dür. Tüm bu 16 karelerdeki promastigotların sayımı yapıldığında $0,1 \text{ mm}^3$ 'deki parazit sayısı bulunmuş olur. Daha sonra 1 ml' deki promastigot sayısını bulmak için ise 10.000 ile çarpılır. Besiyerlerinden alınan promastigotlar % 2'lik formolin ile eşit miktarda karıştırıldığından dolayı 16 karede sayılan promastigotlar 2 ile çarpılır. Sonuç olarak 1 ml. deki parazit sayısı = 16 büyük karedeki promastigot sayısı $\times 2 \times 10000$ formülü ile hesaplanır.

Çalışmamızda kullanılan beş farklı besiyerde üç farklı *Leishmania* türünün 15 çalışma grubu oluşturulmuştur. Çalışma grupları diskriminant analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

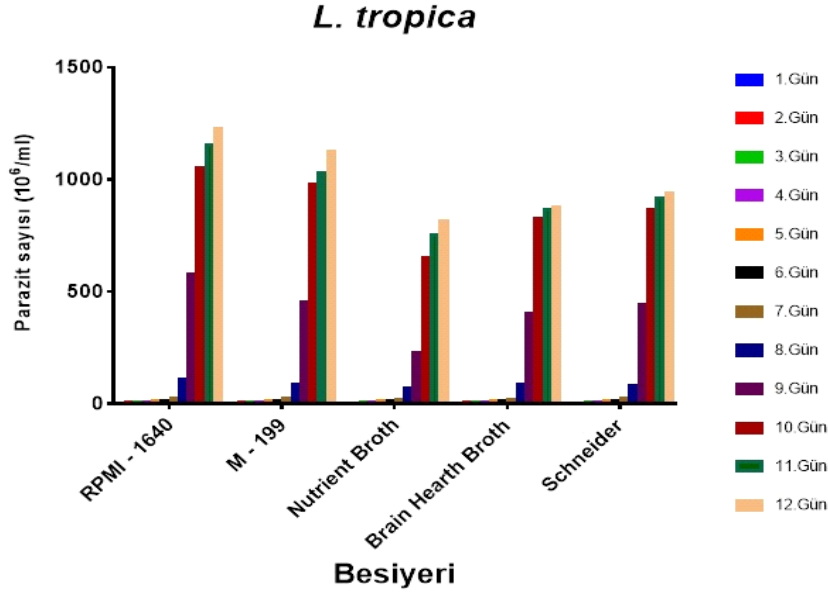


6. BULGULAR

Çalışmamızda, leishmaniasis etmeni olan promastigotlardan *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* suşları 12 gün süre ile RPMI-1640, M-199, Nutrient Broth, Brain Hearth Broth ve Schneider besiyerlerindeki durumları gözlemlenmiştir.

6.1. *L. TROPICA* SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU

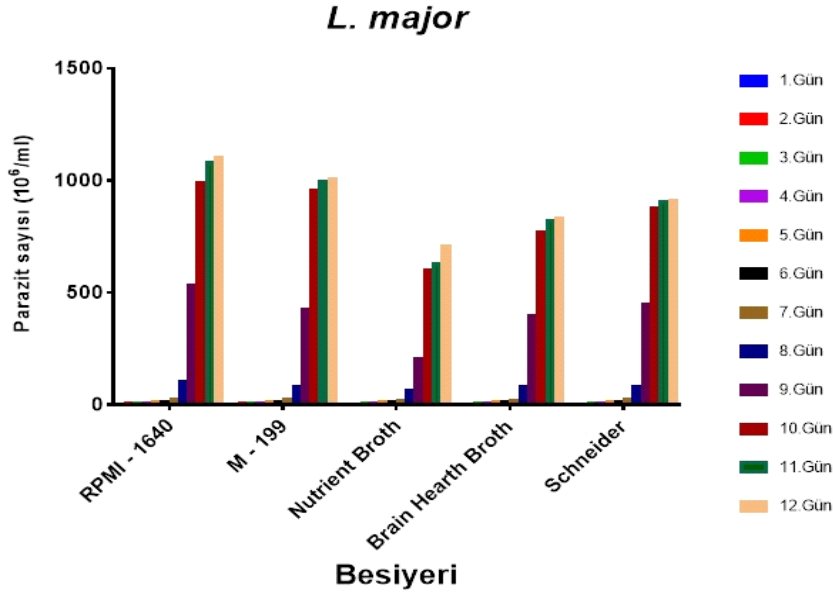
L. tropica'nın, 12 günlük çalışma sonunda, en az gelişim gösterdiği besiyeri, $812 \times 10^6/\text{ml}$. promastigotların bulunduğu Nutrient Broth olarak belirlenmiştir. Brain Hearth Broth besiyeri $877 \times 10^6/\text{ml}$ promastigot sayıldığı diğer besiyerleridir. Schneider besiyerinde, $935 \times 10^6/\text{ml}$, M-199 besiyerinde $1125 \times 10^6/\text{ml}$ promastigot sayılmıştır. En iyi gelişim gösterdiği *L. tropica* suşunun besiyeri ortamı ise $1225 \times 10^6/\text{ml}$. parazitin sayıldığı RPMI-1640 olarak saptanmıştır. Bununla birlikte birey sayısı dikkate alınarak tüm günlerin birbirleri ile karşılaştırıldığı istatistiksel analizde; testin birinci günden altıncı güne kadar her dört besiyerinde üreme hızı yönünden anlamlı bir fark görülememiştir ($p > 0,05$). 7. günden itibaren ise M-199, Nutrient Broth ve Brain Heart Broth besiyerlerine göre RPMI-1640 besiyerinde istatistiksel test anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Schneider's besiyerinde ise anlamlı bir fark saptanmazken ($p > 0,05$) sekizinci günden 12. güne kadar RPMI-1640 besiyeri her dört besiyerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 2).



Tablo- 2: *L. tropica* suşunun kullanılan besiyerlerdeki günlük promastigot sayısı.

6.2. *L. MAJOR* SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU

L. major'un en az ürediği besiyeri 12. günün sonunda 707×10^6 /ml promastigotun bulunduğu Nutrient Broth besiyeri olarak tespit edilmiştir. Brain Hearth Broth, Schneider ve M-199 besiyerlerinde sırasıyla 829×10^6 /ml, 906×10^6 /ml ve 1005×10^6 /ml promastigot sayılmıştır. Söz konusu parazit için en fazla gelişimin gözlemlendiği besiyeri ise 1150×10^6 /ml. promastigotun sayıldığı RPMI-1640'tır. Bununla birlikte birey sayısı dikkate alınarak tüm günlerin birbirleri ile karşılaştırıldığı analizde RPMI-1640 besiyeri esas alındığında beş besiyeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p > 0,05$). Fakat ikinci günden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth'a göre RPMI-1640'ın daha fazla promastigot ürettiği görüldükçe üçüncü gün ile altıncı gün arası üreme yoğunluğu aynı olduğu görülmüştür ($p > 0,05$). 7. günden itibaren Nutrient Broth ve Brain Heart Broth'a göre RPMI-1640'ın daha fazla promastigot ürettiği saptanırken sekizinci. gün ile 12. gün arası RPMI-1640 diğer dört besiyerinden anlamlı olarak daha fazla promastigot ürettiği saptanmıştır ($p < 0,05$)(Tablo 3).

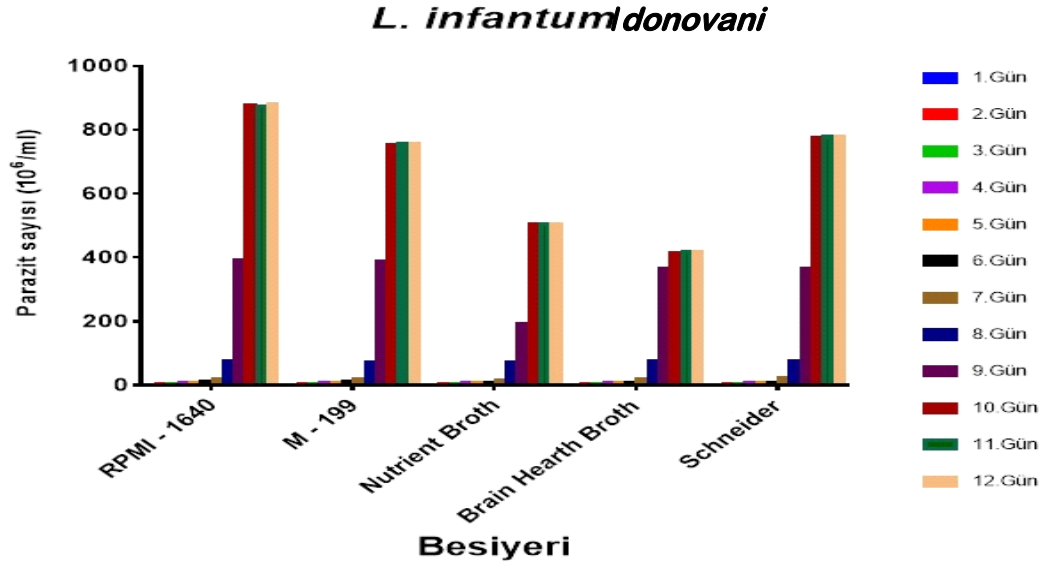


Tablo- 3: *L. major* suşunun kullanılan besiyerlerdeki günlük promastigot sayısı

6.3. *L. INFANTUM/DONOVANI* SUŞUNUN KULLANILAN BESİYERLERDEKİ DURUMU

L. infantum, en az gelişim gösterdiği ve 12. günün sonunda $417 \times 10^6/\text{ml}$. parazitin sayıldığı besiyeri Brain Hearth Broth olarak bulunmuştur. Nutrient Broth, M-199 ve Schneider besiyerlerinde sırasıyla $504 \times 10^6/\text{ml}$, $757 \times 10^6/\text{ml}$. ve $777 \times 10^6/\text{ml}$. birey sayılmıştır. *L. infantum*'un en fazla gelişim gösterdiği besiyeri $882 \times 10^6/\text{ml}$. bireyin sayıldığı RPMI-1640 olarak saptanmıştır. Günler arasındaki korelasyonu göstermek için uygulanan istatistiksel test sonucuna göre birinci ile 5. gün arasında promastigot üretimi açısından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). altıncı ve 9. gün RPMI-1640 besiyeri Nutrient Broth, Brain Heart Broth ve Schneider besiyerine göre daha fazla promastigot üretirken ($p < 0,05$) M-199 besiyeri ile promastigot yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). 7. günde RPMI-1640 sadece Nutrient Broth besiyerine göre daha fazla promastigot yoğunluğu içerdiği görülmüştür ($p < 0,05$). 8. gün

yoğunlukları ise RPMI1640 besiyeri M-199 ve Nutrient Broth besiyerine göre daha fazla promastigot üretebildiği saptanmıştır ($p<0,05$). 10. ile 12. gün arası RPMI-1640 besiyerinin diğer dört besiyerinden daha fazla promastigot ürettiği görülmüştür ($p<0,05$)(Tablo 4).



Tablo- 4: *L. infantum/donovani* suşunun kullanılan besiyerlerdeki günlük promastigot sayısı

7. TARTIŞMA

Bir çalışmada 40 insan olgusundan 55 şüpheli lezyonun iğne aspiratları, bir lezyonun dış kenarından steril serum fizyolojik içine enjekte edilerek yapılmıştır. Aspiratlar, bir insect besiyeri olan %30 FBS ile takviye edilmiş Schneider's *Drosophila* besiyerin enjekte edildi ve kültürasyon işlemi yapılmıştır. Duyarlılık karşılaştırması için kan bazlı bir besiyeri olan NNN besiyeri kullanılmıştır. Promastigotlar, Schneider besiyerinde altıncı günde 55 lezyondan alınan şüpheli lezyonun 37 lezyonda gözlemlenirken bu sayı NNN besiyerinde 11,6 günde 55 şüpheli lezyonun 8 lezyonunda gözlemlendiği bildirilmiştir (Hendricks ve Wright 1979).

Kenyada tespit edilen visceral leishmaniasisli hastaların tedaviden önce, tedavi sırasında ve tedaviden sonra çeşitli zamanlarda 26 hastadan elde edilmiştir. 90 adet dalak aspiratlarında üç besiyerine; Schneider's *Drosophila* medium besiyeri, %20 fetal bovine serum eklenmiş RPMI 1640 besiyeri ve McConnell'in Senekje besiyerinin %0,9 tuzlu su ile modifiye edilmiştir Besiyeri inoküle edilerek giemsa boyalı smearlerle karşılaştırıldı. Sonuçlar, ön tanı için, hem kültür hem de aspiratların direkt mikroskopisinin kullanılması gerektiğini bildirmiştir (Lightner ve ark. 1983).

Başka bir çalışmada 33 °C ve 35 °C'de *L. mexicana pifanoi* amastigotlarının seri olarak kültürlenmesi için hücresiz bir sıvı besiyeri tasarlanmış ve esas olarak yüksek konsantrasyonda suda çözünebilir vitaminler, nükleotitler ve etkisizleştirilmiş fetal sığır serumu ile takviye edilmiş M199 besiyerinden oluşmuştur. İlk subkültürde ortamın başlangıç ölçümlerde pH seviyesi 7,2 olup, ilk olarak promastigotlar inoküle edilmiştir. Dört gün ile on gün aralıkları ile 33 °C ve 35 °C'de seri olarak kültürlenmiştir ve sonuç olarak amastigotların oranı sürekli olarak artmıştır ve promastigotların oranı ilk olarak yavaş yavaş azalmıştır. İkinci altkültürde inkübasyon döneminin sonunda, hemen hemen tüm organizmalar amastigot formlara dönüştüğü bildirilmiştir. Bu şekilde elde edilen amastigotlar, seri transferlerle süresiz olarak kültürasyon yapıldığı belirtilmiştir. Bu besiyerinde amastigotlar, 33 °C ve 35 °C'de 10 günlük inkübasyondan 5×10^7 / ml'den amastigotların 8×10^7 / ml'lik bir yoğunluğa ulaşabildiği bildirilmiştir. Besiyerini

başlangıç. pH'si 8,0 olacak şekilde modifiye edildi. Bundan sonra besiyeri, Hapes [4- (2-hidroksietil) -1-piperaziniletansülfonik asit] tamponu ve daha yüksek sodyum bikarbonat konsantrasyonları ile başlangıç pH seviyesi 8,0 olacak şekilde modifiye edilmiştir. 33 C° ve 35 C° 'de asıl besiyerinde kültürasyon olan amastigotlar modifiye edilmiş besiyerine aktarılıp 26 °C'de inkübe edildiğinde, amastigotlar üç kere pasajlandıktan sonra tamamen promastigotlara dönüştüğü bildirilmiştir (Pan 1984).

Farklı besiyerlerinde bir patojenik olmayan *L. donovani*, UR6 suşunun büyüme meodeli üzerindeki çalışmalar, Hindistan'da üretilmekte olan Modifiye Ray Agar besiyerinde ve diğer üç sıvı besiyerinde (DME Medium, M-199 ve RPMI-1640) düzenli olarak yetiştirilebildiğini gösterilmiştir. İyi bilinen NNN besiyeri, bu besiyerine kıyasla kantitatif olarak daha zayıf bir büyüme sağlamıştır. Bir spektrofotometrede optik yoğunluk ile *L. donovani* hücre konsantrasyonunun ölçülmesi ve mililitrede bulunan hücreler antijenler üzerinde immünokimyasal gözlemlerin ifade edilmesi için çalışılmıştır (Majumder ve Sen 1990).

Primer izolasyon ve daha sonra üretilmesi için tam kan içermeden *L. donovani* promastigotları için basit bir büyüme besiyeri tarif edilmiştir. Bu besiyeri Aljeboor'nin bifazik besiyerine sığır eti ekstresi, pepton, sodyum klorür, bactoagar, FCS ve glukoz ekleyerek ve katı fazda pH'ı saptayarak ve sıvı fazda (%91) FCS'yi önemli ölçüde azaltarak yeni bir besiyeri oluşturulmuştur. Besiyerindeki parazitlerin etkili büyümesinin yanı sıra, kala-azar hastalarından *L. donovani* promastigotlarının izolasyonuna yardımcı olduğu bildirilmiştir. Bu besiyeri basit, güvenilir, tekrarlanabilir ve kullanışlı olup, immünolojik, moleküler ve izoenzim çalışmaları için parazitik hücrelerin kullanılmasında minimal etkileşime sahip olduğu bildirilmiştir (Bhattacharya ve ark. 1994).

Viseral ve kutanöz leishmaniasis tanısı konan iki hastadan elde edilen kemik iliği aspirasyon ve biyopsi materyal örnekleri FCS, penisilin ve streptomisin içeren NNN besiyeri ve Nutrient Broth besiyerlerinde 10 gün boyunca 27 °C'de inkübe edildi. Daha sonra *L. infantum* ve *L. major* promastigotları günlük olarak gözlemlendiği bildirilmiştir. Promastigotlar inkübasyonun ilk günden sonra Nutrient Broth besiyerinde gözlenirken, inkübasyonun ikinci veya üçüncü gününden sonra NNN besiyerinde

gözlenmiştir. Sonuç olarak her iki leishmaniasis formunun erken teşhisinde Nutrient Broth besiyerinin etkinliğini gösterdiği bildirilmiştir (Ozbilgin ve ark. 1995).

L. infantum ve *L. tropica* promastigotlarının NNN besiyeri içeren kültürlerinden alınarak konulduğu, RPMI-1640 %10 Fetal Calf Serum (FCS), P-Y %10 FDS ve NNN besiyerleride sırasıyla 14. günün sonunda *L. infantum* için; 17×10^6 , 16×10^6 ve $3,5 \times 10^6$ hücre, *L. tropica* için ise; 17×10^6 , 15×10^6 ve 3×10^6 hücre sayılmıştır. Başka bir çalışmada ekonomik ve ticari olarak elde edilebilen kimyasallarla hazırlanan ve *Leishmania* promastigotlarının in vitro kültürlenmesinde test edilmiştir ve çok sayıda organizmanın serolojik çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir sıvı besiyeri açıklanmıştır. NNN besiyerinden alınan *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotlarının sayısı, 8 nci gün sonunda yeni besiyerinde 1×10^7 / ml.'ye ulaşmıştır, ancak NNN besiyerinde ulaşılan organizma sayısı sadece, 5×10^6 / ml. bulunmuştur. Sonuç olarak bu yeni besiyeri diğer ticari olarak temin edilebilen besiyerleri karşılaştırıldığında oldukça ucuz, basit ve başarılı olarak değerlendirildiği bildirilmiştir (Limoncu ve ark. 1997).

L. donovani, her yıl binlerce insanın yaşadığı Hindistanın alt bölgelerindeki insan popülasyonlarda visceral leishmaniasis enfeksiyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Parazitler bu çalışmada FCS ile takviye edilmiş hücre bulunmayan besiyerlerinde aktarılmıştır. İnsanlardan ve diğer memeli türlerin idrar sıvılarının *Leishmani* türlerinin büyümesini uyardığı bildirilmiş olup *L. donovani* hiçbir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, %10 insan idrarı içeren M-199 besiyerinde *L. donovani* promastigotlarının fizibilitesini araştırılmış ve fenotipik ve genotipik karakterleri, FCS ile karşılaştırılmıştır. Büyüme eğrisi, idrar ve FCS takviyesinde promastigot sayımında anlamlı bir fark göstermediği bildirilmiş olup çalışma sonucunda en iyi promastigot veriminin dişi türlerin menopoz sonrası idrarla desteklenmiş besiyerlerinde gözlemlendiği belirlenmiştir (Singh ve ark. 2000).

Mısırlı ZCL hastasından izole edilen *L. major* promastigotları, yeni bir besiyeri olan peptone-liver (P-L) besiyerine 4×10^6 / ml. ile inoküle edilmiş ve 25 ± 1 derecede inkübe edilmiştir. Bu arada, aynı sayıda promastigot, Schneider'in *Drosophila* besiyerinde kontrol olarak inoküle ve 25 ± 1 inkübe edilmiştir. 10. günde *L. major* promastigot sayısı $29,25 \times 10^6$ / ml. üreme sayısına ulaşmış olup aynı sayı, dört gün içinde Schneider'in

Drosophila besiyeri ile elde edilmiştir. yenibesiyeri olan P-L besiyeri ucuz ve kolay bir şekilde hazırlandığı bildirilmiş olup ayrıca Schneider'in *Drosophila* besiyerinden daha uzun sürelerde aynı sayıda promastigot verdiği bildirilmiştir (Mazyad ve Abdel-Aziz 2003).

Başka bir çalışmada ise amacının, uzun süreli canlılık ile yüksek miktarda *Leishmania* promastigotları elde etme potansiyeli olan ve mikrobiyoloji veya parazitoloji laboratuvarlarında kolayca bulunan malzemelerden oluşan yeni bir besiyeri oluşturmak olduğu bildirilmiştir. Bu besiyerinin diğer özelliği içerisinde kan olmadığı için FCS veya eritrosit lizatına gereksinim duymadığı bildirilmektedir. Üç besiyeri hazırlanmıştır. Bunlardan ilki Trypticase Beef Extract Hemoglobin (TBH) besiyeridir ve içeriğinde triptikaz sığır özü ve maya özü bulunmaktadır. Karbonhidrat ve protein kaynağı olarak da FeNH₄ ve sığır hemoglobin içerdiği bildirilmektedir. İkinci besiyeri Peptone-Yeast extract medium bovine hemoglobin (PYH) olduğu belirtilmiştir. Bu besiyerinde pepton maya özü ve sığır hemoglobini içermekte olduğu bildirilmiş olup *Leishmania* parazitlerinin yetiştirilmesi için önceki çalışmalarında etkili olduğu tespit edilmiştir. Üçüncü besiyeri Brain Heart medium, containing bovine hemoglobine (BKH) besiyeri olduğu bildirilmiş olup sığır hemoglobin içeren beyin kalp besiyeridir. Çalışmanın sonucunda besiyerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı belirtilmiş ve sonuçlar, çalışmada değerlendirilen üç sıvı kültür besiyerinin, FCS veya eritrosit lizatına gerek olmaksızın promastigotların çoğaltılmasında etkili olduğunu ve hasta izolasyonu ve saha çalışmalarında da etkili bir şekilde kullanılabileceğini gösterildiği bildirilmiştir (Limoncu ve ark. 2004).

Leishmaniasis, vektör kaynaklı bir protozon hastalığıdır. Leishmaniasis etmeni *Leishmania* türleri farklı maçlar doğrultusunda dünyada farklı birçok besiyeri ortamında üretilmektedir. Ülkemizdeki tüm KL olgusu bildirilen yerlerden izole edilen *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum* parazitlerinin çalışmamızda kullanılan sıvı besiyerlerdeki gelişimi gözlemlenmiştir.

Türkiye'de VL ve KL tanıları klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik bakışı ile konulmaktadır.

Parazit izolasyonu için NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleri uygulanmaktadır(Özcel ve ark. 2009).

Leishmaniasis tanısı için önemli olan bu yöntemler, altın standart olarak bilinmektedirler. Deney hayvanlarına aşılama da leishmaniasisin teşhisinde çok değerli bir uygulamadır (Özbilgin ve ark. 2010).

Çalışmamızdaki kullanılan besiyerlerden Brain Heart, Nutrient Broth, RPMI-1640 ve NNN'in yanı sıra pepton-maya özü'nün kullanıldığı ülkemizde yapılan bir çalışmada, NNN besiyerinin en iyi sonuç verdiği, pepton-maya özü ve Nutrient Broth'unda besiyeri ortamı olarak kullanılabilceği, Brain Heart ortamında ise çalışmanın hiçbir gününde promastigot varlığının saptanmadığı bildirilmiştir (Özbilgin ve ark. 2010).

Leishmania promastigotları için geliştirilen Evans' Modified Tobie's Medium (EMTM), RPMI-1640 ve PY besiyerleri arasında yapılan bir karşılaştırmada; EMTM ortamı yüksek sayıda parazitin gelişmesine izin verse de, çiftliklerde yetiştirilen hayvanlardan taze tavşan kanının kullanılmasını gerektirdiği için teknik olarak zordur, RPMI-1640 ve P-Y ise EMTM'den daha düşük büyüme oranlarını gösterdiği bildirilmiştir(Castelli ve ark. 2014).

Leishmania parazitleri promastigotlarının in vitro etkinliğini dört farklı denek hayvanından (at, eşek, keçi ve koyun) kan kullanılarak hazırlanan bifazik NNN besiyerinde test edilmiştir. Amaç, deneysel çalışma ve antijen çoğaltılması için yüksek sayıda ve en kısa zamanda *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica* ve *L. major* parazitlerinin promastigotlarını elde etmek amacıyla, test edilmiştir. 7. günün sonunda, at kanı kullanan NNN besiyeri tüm *Leishmania* parazitleri içinde en yüksek sayıda promastigot üretildiği bildirilmiştir. Keçi kanı kullanılan NNN besiyeri ise en az sayıda promastigot veren besiyeri olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda *Leishmania* parazitlerinin nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) maddesine gereksinim duyması ve at eritrositlerinde (NAD) maddesini bulundurması ile açıklanmıştır.(Ladopoulos ve ark. 2015).

Leishmania promastigotları ilk olarak 1904 yılında NNN besiyerinde üretilmiş; o tarihten bu yana sıvı, katı ve bifazik olarak çok çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir.

Günümüzde rutin laboratuvarlarda en sık kullanılan besiyeri NNN besiyeridir. Bifazik besiyerlerinde katı faz genellikle kan ile sağlanırken, sıvı faz FCS, eritrosit lizati ve ticari sıvı besiyerleriyle desteklenir ve ayrıca NNN ve Nutrient Broth besiyerinin kullanıldığı bir çalışmada promastigot sayısı üçüncü ve 7. günlerde Nutrient Broth besiyerinde fazlayken, 10. günde her iki besiyerinde üreyen promastigot sayıları eşitlenmiştir(Gökmen ve ark. 2015).

FCS içeriği, *Leishmaniabesiyerlerinin* en önemli parçası ve en pahalı maddesidir. Çalışmada kullanılan LB (broth-liyofilize) besiyeri FCS yerine tavşan serum ile desteklenerek bu besiyerinin (LLR) etkinliği, *L. major* parazitinin çoğaltılmasındaki durumu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak LLR besiyeri parazitlerin gelişmesini ve çoğalmasını desteklenmiş ve parazitlerin liyofilize tavşan serumu varlığında hayatta kalması ve çoğalması, bu serumun iyi bir besin kaynağı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışma, *Leishmaniaparazitlerinin* yetiştirilmesinde kullanılabilecek düşük maliyetli bir besiyerine sahip olmanın yeni bir yöntemin olduğu bildirilmiştir(Nasiri ve ark. 2017).

Yeni standardize edilen ve içindeirmik (18,5 gr), Dekstroz (beş gram), Agar (10gr.)Kan(100ml), Gentamisin (1,5ml.) ve Distile su(500ml.) içeriği bulunan bir besiyerin*L.donovanipromastigot* kültüründeki performansının NNN besiyeri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada ise söz konusu sıvı besiyerin 5. günde saptanan hücre sayısının NNN besiyerinde saptanan sayıya çok yakın olduğu belirtilmiştir(Mohammed 2017).

Amino asitlerinin kültür ortamlarındaki etkilerinin gözlemlendiği bir çalışma da *Leishmaniaparazitlerinin* genellikle çoklu pasajlanması yapılırken verimli bir şekilde üremeyi sağlayan zengin, serum destekli besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, bu tür tanımlanmamış besiyerlerini kullanımının proteomik analizleri engelleyici olduğunu ve metabolizma ile ilgili yapılan çalışmalarda yanlış sonuçlar verebildiği düşünülmektedir. Çalışma sürecinde kullanılanpromastigotların sürekli büyümesini sağlayan ve klasik bir besiyeri oluşturduğu belirtilmiştir. Bu besiyerinde promastigotların amino asit gereksinimlerini araştırmak için fenilalanin, triptofan, arjinin, lösin, lizin ve valinin aminoasitlerinin besiyerinde canlılık için gerekli olduğu belirtilmiştir. Ayrıca alanin, asparajin ve glisin hariç 20 proteojenik amino asidin

Leishmania promastigotlarının büyümesini teşvik ettiği bulunmuştur. Bu besiyeri, promastigot substrat gereksinimleriyle ilgili daha ileri çalışmalar için faydalı olacağı ve gelecekteki proteomik ve metabolomik analizleri kolaylaştıracağı belirtilmiştir (Nayak ve ark. 2018).

Sonuç olarak leishmaniasis tanısı için kullanılan kültür yönteminde kullanılan sıvı besiyerler arasında NNN besiyeri en çok kullanılan besiyer olarak bilinmektedir. En uygun şartların sağlandığı ortamlarda, aşılması gereken *Leishmania* promastigotlarının miktarı, ortamın ideal sıcaklığı, pH ve CO₂ oranı belirlenebilir. Sıvı ortam çalışmalarda, NNN ve ticari ortamların yanı sıra, *Leishmania* promastigotlarının üretiminde çeşitli maddeler ve çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanan farklı kültür ortamları sıklıkla kullanılmıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bizim çalışmamızda da *L. tropica*, *L.major* ve *L.infantum/donovani* türlerinde 7. günden itibaren her beş besiyerinde de promastigotları ile çalışılabilir bir yoğunluk elde edildiği gözlenmiştir. *Leishmania tropica* ($105 \times 10^5/\text{ml.}$) ve *L. major*'da ($101 \times 10^5/\text{ml.}$) sekizinci günden sonra özellikle RPMI-1640 besiyerinde bol miktarda üreme görülürken *L. infantum/donovani*'de ise 9. günden sonra çalışmalarda kullanılabilir yoğunlukta promastigot üremeleri saptanmıştır. Tüm besiyerlerinde *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani*'nin 11. günden sonra yeterli sayıda promastigot üreterek planlanacak laboratuvar çalışmalarında kullanılabilirliği saptanmıştır.

L. tropica, *L.major* ve *L.infantum/donovani* izolatlarında daha fazla sayıda promastigot elde etmek için öncelikle RPMI-1640 besiyerinin tercih edilmesi uygun olacağı kanısına varılmıştır ve söz konusu besiyerin mikrobiyoloji ve parazitoloji laboratuvarlarında kullanılması tarafımızca mantıklı bulunmaktadır. Daha sonra ise sırasıyla M199, Schneiders, Brain Heart Broth ve Nutrient Broth besiyerlerinin tercih edilmesi uygun olacaktır.

L. tropica, *L.major* ve *L.infantum/donovani* türlerinin her bir besiyerindeki promastigotlarının üreme sayıları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p > 0,05$).

9. KAYNAKÇA

Ak M, Özbel Y, Özensoy S, Turgay N. Visceral Leishmaniasis immun etmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir; 1995, s: 69-119.

Ali SA, Iqbal J, Ahmad B & Masoom M (1998) A semisynthetic fetal calf serum-free liquid medium for in vitro cultivation of Leishmania promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 163–165.

Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M. Moleküler biyolojik yöntemler. Ed Özcel MA, Altıntaş N, Parazit Hastalıklarında Tanı. Tıbbi Parazitoloji Derneği, Ege Üniversitesi, 1997: Yayın No: 15 373-411

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(2): 334–359.

An İ. Kutanöz Leishmaniasis Konusunda Deneyimli Dermatolog Tarafından Yapılan Lezyonal Yaymaların Kutanöz Leishmaniasiste Tanısal Değeri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Diyarbakır 2017.

Armstrong TC & Patterson JL (1994) Cultivation of Leishmania braziliensis in an economical serum-free medium containing human urine. *J. Parasitol.* 80, 1030–1032.

Ashford RW, Desjeux P, Raadt P. Estimation of population at risk of infection with leishmaniasis. *Immunol Today.* 1991; 8: 104-105.

Ateş CA. İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, *Leishmania* Parazitlerinin Yeni Mikrokültür Yöntemi ve Diğer Yöntemler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2012, İstanbul.

Azab ME, El-Sherif EA, Abdel-Mawla MM, Bishara SA, Mikhail EM & Mohamed AA (1999) Study of factors affecting growth of *Leishmania* in cultures. *J Egypt Soc Parasitol* 29, 261–273.

Bakirci, Serkan vd. 2015. “Gerbils, As Experimental Animals (*Meriones unguiculatus*): Is A Good Role Model for *Leishmania major*?” *Turkish Journal of Parasitology* 39(3): 212-17.

Bastien P, Blaineau C, Taminh M, Rioux JA, Roizès G, Pagès M, 1990. Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmaniainfantum* imply a 'mosaic' strain structure. *Mol Biochem Parasitol*. 1990; 40(1): 53-61.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*. 1997; 24: 684-703.

Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Insect science and its application*. 1986; 7: 241-245.

Bhattacharya J, Mukherjee H, Das DC & Hati AK (1994) A simple medium without blood modified for successful isolation & cultivation of LD bodies. *Indian J. Med. Res.* 99, 171–172.

Blaineau C, Bastien P, Rioux JA, Roizès G, Pagès M, 1991. Long-range restriction maps of size-variable homologous chromosomes in *Leishmaniainfantum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 46(2): 292-302.

Brewster S, Aslett M, Barker DC. Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitol Today*. 1998; 14: 437-438.

Bryceson A. *Manson's Tropical Diseases*. 20th Edition, WB Saunders Ltd., London; 1996.

Castelli G, Galante A, Verde VL, Migliazzo A, Reale S, Lupo T, Piazza M, Vitale F, Bruno F. Evaluation of Two Modified Culture Media for *Leishmaniainfantum* Cultivation Versus Different Culture Media. *J. Parasitol*. 2014; 100(2): 228–230.

Childs GE, Foster kris A & McRoberts MJ (1978) Insect cell culture media for cultivation of new world Leishmania. *International Journal for Parasitology* 8, 255–258.

Descoteaux A, Turco SJ. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect.* 2002; 4: 975-981.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95: 239–243.

Dey T, Afrin F, Anam K & Ali N (2002) Infectivity and virulence of *L. donovani* promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49, 270–274.

Doğan F. *Leishmania* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi *Leishmania*'ların Rezervuar ve Vektörleri, Leishmaniasis Kala-azar ve Şark çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet Kitabı. Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir; 1981, s: 25-50.

Dubessay P, Ravel C, Bastien P, Crobu L, Dedet JP, Pagès M, Blaineau C. The switch region on *Leishmania major* chromosome 1 is not required for mitotic stability or gene expression, but appears to be essential. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(17): 3692-3697.

Elçiçek S. Polimerlerin *Leishmania*-Konak Hücre Etkileşimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2009, İstanbul.

Erel D. Psychodidae, Anadolu vektörleri ve mücadele metotları. Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı Hıfzısıhha Okulu Yayın no: 47 Akış Basımevi, 1973 Ankara; s: 206-282.

Erişöz Kasap Ö. Doğu Akdeniz'de Larrousius Alt Cinsine (Diptera: Psychodidae) Ait Kum Sineği Türlerinin Moleküler Taksonomisi Ve Bazı Ekolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2010, Ankara.

Eroğlu F. *Leishmania* Türlerinin Dna Dizi Analizi İle Tanımlanması Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi Adana 2012

Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 4th Edition, D.C.: ASM Press., Washington; 2001.

Gholamhosseinian A & Vassef A (1988) Superiority of hemoglobin to hemin for cultivation of *Leishmaniatropica* promastigotes in serum-free media. *J. Protozool.* 35, 446–449.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immuno-modulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva, *Parasite Immunol.* 2000; 22(7): 319-331.

Göçmen B. Genel Parazitoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir; 2000. s: 338.

Gökmen AA, Öncel K, Özdemir OA, Pektaş B, Çavuş İ, Güngör S, Uzun B, Kaya S, Karaca Ş, Yula E, Demirci M, Özbilgin A. Kutanöz Leişmanyazis Tanısında Alternatif Bifazik Nutrient Besiyeri. *Mikrobiyol Bul.* 2015; 49(2): 266-271.

Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgün MK, Özbek Y. Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasisin Durumu. *Türkiye Parazitol Derg.* 2012; 36: 121-9.

Harman M. Kutanöz Leishmaniasis. *Turk J Dermatol.* 2015; 9: 168-176.

Hart, D. T, & Coombs, G. H. (1981). The effects of carbon dioxide and oxygen upon the growth and in vitro transformation of *Leishmaniamexicana mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4(1), 117-127.

Hendricks L & Wright N (1979) Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider’s Drosophila Medium. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 962–964.

Herwald BL, Stokes SL, Juranek DD. American cutaneous leishmaniasis in U.S. travellers. *Ann Intern Med.* 1993; 118: 779-784.

Hommel M. Visceral Leishmaniasis: Biology of the Parasite. *J Infect.* 1999; 39: 101-111.

Howard MK, pHaroad MM, Ashall F & Miles MA (1991) Human urine stimulates growth of *Leishmania* in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85, 477–479.

Kaddu JB & Nyamori MP (1990) Nutrient broth for the cultivation of *Leishmania*. *J. Parasitol.* 76, 265–266.

Kavur H. Türkiye’de Kutanöz Leishmaniasisin Endemik Olduğu İki Alanda *Phlebotomus halepensis*’in Vektörlüğünün Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2011.

Killick-Kendrick R. Biology of *Leishmania* in Phlebotomine sandflies. İçinde: Lumsden WHR, Evans DA, eds. *Biology of the Kinetoplastida*. 1979 2(407): 172-180.

Klaus SN, Frankenburg H, Ingber A. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1999; 17: 257-260.

Korkmaz M, Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. İçinde: Özbel Y, Töz Özensoy S, eds. *Leishmaniasis*. 1. Baskı, Meta Basım, İzmir; 2011.

Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, ampino L, Haralambous C, Soteriadou K, Pratlong F, Dedet JP, Mauricio I, Miles M, Schaar M, Ochsenreither S, Radtke OA, Schönian G. Differentiation and Gene Flow among European Populations of *Leishmaniainfantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 9;2(7): e261.

Ladopoulos T, Ntais P, Tsirigotakis N, Dokianakis E & Antoniou M (2015) The proliferation potential of promastigotes of the main *Leishmania* species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals. *Exp. Parasitol.* 157, 124–127.

Lightner LK, Chulay JD & Bryceson AD (1983) Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 296–299.

Limoncu ME, Balcıoğlu İC, Yereli K, Özbel Y, Özbilgin A. A New Experimental In Vitro Culture Medium for Cultivation of *Leishmania* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 1997; 35(9): 2430-2431.

Limoncu ME, Ozbilgin A, Balcioglu IC & Ozbel Y (2004) Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of *Leishmania* parasites. *J. Basic Microbiol.* 44, 197–202.

Lockwood, Diana N. J., ve Shyam Sundar. “Serological tests for visceral leishmaniasis”. *BMJ : British Medical Journal*, c. 333, sy 7571, Ekim 2006, ss. 711-12. PubMed Central, doi:10.1136/bmj.38989.567083.BE.

Lukes J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 29;104(22): 9375-80.

Majumder R & Sen GP (1990) Growth study of a nonpathogenic strain of *Leishmania donovani* with different nutrients. *J Commun Dis* 22, 213–217.

Manson-Bahr PEC. *Diagnosis, Late of Overseas Development Administration.* Volume II. London; 1987.

Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. *Leishmania* and the Leishmaniases. In: *Parasitology and Vector Biology.* Harcourt/Academic Press. 2000; 57-71.

Mazyad SAM & Abdel-Aziz A (2003) Peptone-liver (P-L) a new culture medium for the Egyptian *Leishmania major*. *J Egypt Soc Parasitol* 33, 41–45.

McGwire, B. S., ve A. R. Satoskar. “Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment”. *QJM: An International Journal of Medicine*, c. 107, sy 1, Ocak 2014, ss. 7-14. *PubMed Central*, doi:10.1093/qjmed/hct116.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniosis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics.* 1999; 104(5): 65.

Mohammed ST. Preparation of new culture medium for culturing *Leishmania* parasite by using Semolina and Rock candy. *Journal of Chemical and pHarmaceutical Sciences.* 2015; 10(4): 1542-1544.

Mohammed, Sabaa. 2017. “preparation of new culture medium for culturing Leishmania parasite by using semolina and Rocky candy”. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* 10: 1-4.

Mohareb EW, Boghdady AM, Bassiouny GA & Eassa AH (1995) Viscerotropic *Leishmania tropicalis*: transformation to amastigotes in cell-free media. *J Egypt Soc Parasitol* 25, 883–891.

Muniaraj M, Lal CS, Kumar S, Sinha PK & Das P (2007) Milk of cow (*Bos taurus*), buffalo (*Bubalus bubalis*), and goat (*Capra hircus*): a better alternative than fetal bovine serum in media for primary isolation, in vitro cultivation, and maintenance of *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1353–1356.

Myler PJ, Sisk E, McDonagh PD, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Sunkin SM, Yan S, Madhubala R, Ivens A, Stuart K. Genomic organization and gene function in *Leishmania*. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28(5): 527-31.

Myler PJ. Genome Structure and Content. İçinde: *Leishmania: After The Genome*. Myler PJ, Fasel N, eds. Caister Academic Press. 2008.

Nasiri V (2013) Sheep blood-LB agar base medium (SLM) as a simple and suitable medium for the cultivation of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol. Res.* 112, 3741–3742.

Nasiri V, Dalimi A & Ghaffarifar F (2017) LB broth-lyophilized Rabbit serum (LLR) as a new and suitable culture medium for cultivation of promastigotes of *Leishmania major*. *J Parasit Dis* 41, 247–251.

Nayak A, Akpunarlieva S, Barrett M & Burchmore R (2018) A defined medium for *Leishmania* culture allows definition of essential amino acids. *Exp. Parasitol.* 185, 39–52.

Neal RA (1984) *Leishmaniamajor*: culture media, mouse strains, and promastigote virulence and infectivity. *Exp. Parasitol.* 57, 269–273.

Nogueira YL & Galati EAB (2006) Reproduction of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in conditioned cell culture growth medium. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48, 147–150.

Ok Z, Balcıoğlu İC, Özkan AT, Özensoy S, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta tropica*. 2002; 84: 43-48.

Osokina TI & Strelkova MV (1996) [A dry nutrient medium for the cultivation of *Leishmania promastigotes*]. *Med Parazitol (Mosk)*, 43–45.

Özbel Y, Töz OS. Leishmaniasis, Özcel MA. Tıbbi Parazit Hastalıkları 1. Baskı, İzmir: Mete Basım Matbaacılık Hizmetleri, 2007: 198-230

Ozbilgin A, Ozbel Y, Alkan MZ, Atambay M & Ozcel MA (1995) Cultivation of *Leishmania spp.* in nutrient broth. *J Egypt Soc Parasitol* 25, 437–441.

Özbilgin A, Zeyrek F, Limoncu ME, Östan İ, Tabak T, Aşar K, Türkmen H, Kilimciolu AA. Comparison of culture media in the isolation and diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4(11): 1038-1043

Özcel MA, Daldal N. Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir; 1997.

Özcel MA. Moleküler Parazitoloji. İçinde: Özbel Y, Özensoy S. *Leishmania*'nın Moleküler Biyolojisi. 1. Baskı, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir; 2009, s: 407-424.

Özcel MA. Parazit Hastalıkları. İçinde: Özbel Y, Özensoy S. Leishmaniosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, İzmir; 2007, s:197-241.

Özçelik S. Kamçılı Protozoonlar ve Yaptıkları Hastalıklar. Güneş Kitapevi, Ankara; 1999.

Palomino JC (1982) Peptone-yeast autolysate-fetal bovine serum 10, a simple, inexpensive liquid medium for cultivation of *Leishmaniaspp.* *J. Clin. Microbiol.* 15, 949–950.

Pan AA (1984) *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Exp. Parasitol.* 58, 72–80.

Peacock, Christopher S. vd. 2007. “Comparative Genomic Analysis of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease”. *Nature Genetics* 39(7): 839-847.

Perfil'ev PP. Phlebotomidae (sandflies), In Fauna of USSR. Wiener Bindery Ltd, Jerusalem, 1968, s: 1-362.

Rassam MB & Al-Mudhaffar SA (1979) The primary isolation of *Leishmaniadonovani* from Iraq on different culture media. *Ann Trop Med Parasitol* 73, 345–347.

Requena, J. M., M. Soto, L. Quijada, ve C. Alonso. 1997. “Genes and Chromosomes of *Leishmania Infantum*”. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 92(6): 853-58.

Roberts LJ, Handman E, Foote SJ. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ*. 2000; 321:801-804.

Rodrigues I de A, da Silva BA, dos Santos ALS, Vermelho AB, Alviano CS, Dutra PML & Rosa M do SS (2010) A new experimental culture medium for cultivation of

Sadigursky M & Brodskyn CI (1986) A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 942–944.

Salotra P, Duncan RC, Singh R, Subba Raju BV, Sreenivas G, Nakhasi HL. Upregulation of surface proteins in *Leishmaniadonovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2006; 8(3): 637-644.

Santos RCD, Pinho FA de, Passos GP, Larangeira DF & Barrouin-Melo SM (2018) Isolation of naturally infecting *Leishmaniainfantum* from canine samples in Novy-MacNeal-Nicolle medium prepared with defibrinated blood from different animal species. *Vet. Parasitol.* 257, 10–14.

Saran R, Gupta AK, Shrivastava SN & Prasad LS (1986) Use of modified Grace's insect medium for the primary isolation of *Leishmaniadonovani donovani* in Bihar, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 488–490.

Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, Escorcía B, McMahon-Pratt D. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66(6): 738-744.

Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol.* 2008; 24(3):135-42.

Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmaniabraziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004; 72(1): 508-14.

Schriefer A, Wilson ME, Carvalho, EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008; 21(5): 483–488.

Seaman J, Mercer AJ, Sondorp E. The epidemic of visceral leishmaniasis in western Upper Nile, southern Sudan: course and impact from 1984 to 1994. *Int J Epidemiol.* 1996; 25(4): 862-71.

Singh S, Mohapatra DP & Sivakumar R (2000) Successful replacement of fetal calf serum with human urine for in vitro culture of *Leishmaniadonovani*. *J Commun Dis* 32, 289–294.

Sreenivas G, Raju BV, Singh R, Selvapandiyan A, Duncan R, Sarkar D, Nakhasi HL, Salotra P. DNA polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmaniadonovani* that cause kala-azar from those that cause post-kala-azar dermal Leishmaniasis in humans. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(4): 1739-41.

Steverding D (2017) The history of leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 10. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312593/> [Accessed February 6, 2019].

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis", *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9:951-958.

T. C. Resmi Gazete. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik. 02 Nisan 2011. Sayı: 27893. Başbakanlık Basımevi, Ankara.

Töre O. Protozooloji. Güneş&Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 1996.

Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. Volume 15, Doyuran Matbası, İstanbul; 1995.

WHO Regional Publications, Eastern Mediterranean Series, 35; Manual for case management of cutaneous leishmaniasis in the WHO Eastern Mediterranean Region, 2014.

WHO-World Health Organization. WHO Technical Report Series Report. 2010.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic Acids Res. 1996; 24(9):1688-94.

Yaman M. Konya Yöresi pHebotominae (Diptera: Psychodidae) Türleri. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1999, Konya.

Zorba A. P. *L. tropica* Parazitlerinden Elde Edilen İmmünojen Moleküllere Karşı Tanıda Kullanılmak Üzere Hibridoma Teknolojisine Dayalı Antikor Üretilmesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı Yüksek Lisans Tezi İstanbul, 2015

Zilberstein, D.,& Shapira, M. (t.y.). The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites, 1994 22.

10. EKLER

10.1. Ek 1: Enstitü Yönetim Kurulu Kararı

 **MANİSA**
CELAL BAYAR
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
01.11.2016	25	69

Karar 60- Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Yüksek Lisans öğrencilerinden, Yalçın DEMİR'in'' Türkiye'de elde Edilen Kutanöz Leishmaniasis Etkeni İzotların Sıvı Besiyerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması'' başlıklı Tez Konusunun kabulüne, **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

e-imzalıdır Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü		
e-imzalıdır Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Doç. Dr. Özge YILMAZ Müdür Yardımcısı	e-imzalıdır Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
e-imzalıdır Doç. Dr. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye		e-imzalıdır Doç. Dr. Murat TAŞ Üye
e-imzalıdır Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri		

Aşlı Gibidir
19/03 /2019


Aynur PALAMUTÇUOĞLU
Enstitü Sekreteri



10.2 Ek. 2: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu
Karar Formu

KARAR TARİH / NO	07 / 12 / 2016 / 20.478.486 - 385				
ARAŞTIRMANIN ADI	Türkiye'den Elde Edilen Kutanöz Leishmaniasis Etkeni İzolatların Sıvı Besiyerlerindeki Üremelerinin Karşılaştırılması				
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN - MCBÜ Tıp Fak. Tıbbi Parazitoloji AD.				
ARAŞTIRMA EKİBİ	Bio. Yalçın Demir				
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	YÜKSEK LİSANS--DOKTORA TEZİ <input checked="" type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	24 / 11 / 2016 / Tarih ve 348 sayılı; araştırma dosyası				
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir				
Ünvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye	Ünvanı /Adı /Soyadı	Araştırma ile ilişkili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Zeki ARI Tıbbi Biyokimya AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Doç. Dr. Ayşen TÜREDİ YILDIRIM Çocuk Hematolojisi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Erol OZAN Psikiyatri AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Beyhan Cengiz ÖZYURT Halk Sağlığı AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Yrd. Doç. Dr. Dilek ÇEÇEN Cerrahi Hemşireliği AD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Tuğba ÇAVUŞOĞLU Farmakoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	Mukadder YILMAZER Avukat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Serdar TOK BESYO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ihsan AVCI Sivil Üye	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<p>Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. <u>Araştırmanız Her Hangi Bir Aşamada Etik Kurulumuzun "İzleme – Denetleme" Görevi Gereği Lüzumu Halinde Haberli / Habersiz Olarak Denetlenebilir.</u> Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname – Bölüm E kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.</p>					
Prof. Dr. Zeki ARI Başkan					

10.3. Ek 3: Tez Orjinallik Raporu

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orjinallik Raporu

Tıbbi Parazitoloji
Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez
Adı: Türkiye'den Elde Edilen Kutanda Leishmaniasis Etkeni
17.02.2019
S.Ü. Besiye'deki Üremelerinin Karşılaştırılması

Tezime ilişkin 13.02.2019 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7.7'tür.

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.

Adı Soyadı : Yalın Demir
Öğrenci No : 161356002
Anabilim Dalı : Tıbbi Parazitoloji
Programı : Tezli Yüksek Lisans

Tarih ve İmza
14.02.2019
Yıldırım

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Ahmet Özbilgin

Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN
C.B.U. Tıp Fak.
Parazitoloji A.D.

Açıklamalar

- 1-Tez Çalışması Orjinallik Raporu (TÇÖR), 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 TÇÖR 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-TÇÖR, 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 kelmeden 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 süreç 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 Orjinallik 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 Orjinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.
- 9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	YALÇIN	Soyadı	DEMİR
Doğum Yeri	AFŞİN	Doğum Tarihi	10.10.1980
Uyruğu	T.C	Tel	5544635494
E-mail	yalcindemir81@mynet.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	07.03.2016
Lise	810212 - DÜZCE 15 TEMMUZ ŞEHİTLER ANADOLU LİSESİ (DÜZCE - MERKEZ)	15.06.1997

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
LABORATUVAR TEKNİKERLİĞİ	TC. SAĞLIK BAKANLIĞI	2005-2019

Yabancı Dilleri *	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İNGİLİZCE	İYİ	ZAYIF	ORTA

Yabancı Dil Puan Notu

YÖKDİL	75
---------------	----

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES	58,97688	49,95179	54,50092

