



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA  
LEISHMANİASIS'İN SEROLOJİK TANISI İÇİN YENİ  
BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Eslam Sadeldin Mohamed SAD ELDİN**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Müjde ERYILMAZ**

**ANKARA**

**2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ BASKILANMIŞ HASTALARDA  
LEISHMANİASIS'İN SEROLOJİK TANISI İÇİN YENİ  
BİYOBELİRTEÇLERİN ARAŞTIRILMASI**

**Eslam Sadeldin Mohamed SAD ELDİN**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Müjde ERYILMAZ**

**ANKARA**

**2022**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Hastalarda Leishmaniasis’in Serolojik Tanısı İçin Yeni Biyobelirteçlerin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikri/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Eslam Sadeldin Mohamed SAD ELDIN

Tarih:

İmza:

## KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Eslam Sadeldin Mohamed Sad Eldin tarafından hazırlanan “Bağışıklık Sistemi Baskılanmış Hastalarda Leishmaniasis'in Serolojik Tanısı İçin Yeni Biyobelirteçlerin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:25.05.2022

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR  
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Müjde ERYILMAZ  
Ankara Üniversitesi  
(Danışman)

Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK  
Anadolu Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Leishmania</i>	3
1.1.1. Tarihçe	4
1.1.2. <i>Leishmania</i> 'ların Yaşam Döngüsü	4
1.1.3. Bulaşma	6
1.1.4. Klinik Sendromlar	7
1.1.5. Epidemiyoloji	9
1.1.6. Laboratuvar Tanısı	11
1.1.6.1. Parazitolojik Yöntemler	11
1.1.6.2. Serolojik Yöntemler	13
1.1.6.2.1. Dolaylı Floresan Antikor Testi (Indirect Fluorescence Antibody-IFAT)	14
1.1.6.2.2. Enzim Bağlı Immunosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA)	14
1.1.6.2.3. Western Blotting (Immunoblotlama)	15
1.1.6.2.4. Doğrudan Aglütinasyon Testi (Doğrudan Agglutination Testi-DAT)	16
1.1.6.2.5. İmmünokromatografik Hızlı Tanı Testi (Dipstick)	16
1.1.6.2.6. Antijenin Tespitine Yönelik Testler	16
1.1.6.2.7. Leishmanin Deri Testi (LDT)	17
1.1.6.3. Moleküler Yöntemler	18
1.1.7. Tedavi	18

1.1.8. Korunma ve Kontrol	19
1.2. Human Immunodeficiency Virus (HIV)	20
1.3. Visceral Leishmaniasis ve HIV Koenfeksiyonu	22
1.3.1. Epidemiyoloji	22
1.3.2. <i>Leishmania</i> -HIV Koenfeksiyonunun İmmunopatogenezi	24
1.3.3. <i>Leishmania</i> -HIV Koenfeksiyonunun Kliniği	25
1.3.4. HIV ile Enfekte Hastalarda Visceral Leishmaniasis Tanısı	26
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>27</b>
2.1. Serum Örneklerinin Toplanması	27
2.2. ELISA Testinde Kullanılan Antijenler	27
2.3. Enzim Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA)	29
2.4. Dolaylı Floresan Antikor Testi (IFAT)	30
<b>3. BULGULAR</b>	<b>32</b>
3.1. Serum Örnekleri Kullanılan HIV Pozitif Hastaların Çeşitli Özelliklerine Göre Dağılımı	32
3.2. ELISA Test Sonuçları	33
3.2.1. Eşik (Cut off) Değerinin Belirlenmesi	33
3.2.2. ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	34
3.2.3. ELISA Test Sonuçlarının Doğrulanması	36
3.3. IFAT Test Sonuçları	40
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>43</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>49</b>
<b>ÖZET</b>	<b>50</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>51</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>57</b>

## ÖNSÖZ

Leishmaniasis, immüno-supresyon ile ilişkili bir hastalıktır. *Leishmania* ve HIV ile koenfekte olmuş kişilerde, ağır seyreden hastalık tablosu ve görülen yüksek ölüm oranları nedeniyle hastalığın erken tanısı çok önemlidir. Leishmaniasis'in tanısı parazitolojik, moleküler, serolojik testler (hızlı tanı testleri) ve klinik tablonun değerlendirilmesi ile yapılır. Serolojik testler özellikle VL'nin endemik olduğu bölgelerde HIV pozitif bireylerde asemptomatik VL'in saptanmasında büyük öneme sahiptir.

Bu çalışmada yeni bir biyobelirteç olarak *Leishmania infantum* cytosolic trypanredoxin peroxidase (LicTXNPx veya CPx antijen) ile Soluble Promastigote Leishmania Antigen (SPLA) ve rekombinant antijen rK28'in immünojenitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu antijenlerin HIV ile enfekte subklinik Viseral Leishmaniasis'in saptanmasında tanısal açıdan kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Müjde ERYILMAZ'a, bölümde yer alan tüm hocalarıma, Porto Üniversitesi Moleküler ve Hücre Biyolojisi Enstitüsü'ndeki Prof. Dr. Anabela Cordeiro başta olmak üzere, tüm parazit hastalığı grubu üyelerine ve genç araştırmacı Ana Isabel Pinto'ya çalışmama sağladıkları katkılardan dolayı çok teşekkür ederim. Türkiye Bursları Programı'na bana yüksek lisans yapma fırsatı sağladığı ve sarsılmaz destekleri için şükranlarımı sunuyorum. Son olarak hayatımın her anında bana özveriyle destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
CDC	Centers for Disease Control
CPX	Cytoplasmic Peroxiredoxin
DAT	Direct Agglutination Test
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFAT	Indirect Florescence Antibody Test
IFN- $\gamma$	Interferon Gamma
IL	Interleukin
KL	Kutanöz Leishmaniasis
LicTXNPx	<i>Leishmania infantum</i> Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
PBS-T	% 0,05 Tween İçeren Fosfat Tamponu
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimer Zincir Reaksiyonu)
rK28	Rekombinant rK28 Antijeni
rK39	Rekombinant rK39 Antijeni
SECA	Soluble <i>Escherichia coli</i> Antigen
SPLA	Soluble Promastigote <i>Leishmania</i> Antigen
Spp.	Species
Th	T-helper Hücreleri
VL	Visseral Leishmaniasis
VL/HIV	Visseral Leishmaniasis /Human Immunodeficiency Virus Koenfeksiyonu

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b> <i>Leishmania</i> türlerinin sınıflandırılması	3
<b>Şekil 1.2.</b> <i>Leishmania spp.</i> yaşam döngüsü formları	5
<b>Şekil 1.3.</b> <i>Leishmania spp.</i> yaşam döngüsü	6
<b>Şekil 1.4.</b> Leishmaniasis'in klinik belirtileri	9
<b>Şekil 1.5.</b> Viseral leishmaniasis'in dünya çapında endemik durumu	10
<b>Şekil 1.6.</b> Kutanöz Leishmaniasis'in dünya çapında endemik durumu	11
<b>Şekil 1.7.</b> Viseral Leishmaniasis'li hastanın kemik iliği aspiratından hazırlanan preparatın Giemsa ile boyanmış mikroskopik görüntüsü	12
<b>Şekil 1.8.</b> Pozitif leishmanin deri testi	18
<b>Şekil 1.9.</b> Leishmaniasis'in dünya çapındaki dağılımı	23
<b>Şekil 1.10.</b> Leishmaniasis'de immün yanıtta rol oynayan hücreler	25
<b>Şekil 3.1.</b> Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların yaş, cinsiyet, uyruk ve eğitim seviyelerine göre dağılımı	32
<b>Şekil 3.2.</b> Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların ikamet ettikleri ülkelere göre dağılımı ve Portekiz'de ikamet eden hastaların bölgelere göre dağılımı	33
<b>Şekil 3.3.</b> ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi	35
<b>Şekil 3.4.</b> Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri	35
<b>Şekil 3.5.</b> Antijenlerin (rK28, SPLA, CPx, SECA) seroreaktivite değerlerine göre korelasyonu	36
<b>Şekil 3.6.</b> ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi	37
<b>Şekil 3.7.</b> Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri	38
<b>Şekil 3.8.</b> ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi	39
<b>Şekil 3.9.</b> Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri	40
<b>Şekil 3.10.</b> HSJ051'in parlak alan ve immüno Floresan mikroskopi görüntüleri	41
<b>Şekil 3.11.</b> HSJ027'in parlak alan ve immüno Floresan mikroskopi görüntüleri	42

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b> HIV pozitif hastalarda VL tanısı için kullanılan başlıca tanı yöntemleri	26
<b>Çizelge 3.1.</b> Örneklerin istatistiksel verileri	33
<b>Çizelge 3.2.</b> Her antijen için eşik değerinin belirlenmesi	34
<b>Çizelge 4.1.</b> İki seropozitive hasta için dört antijenin ortalama OD değerleri	46



## 1. GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* genusuna ait parazitlerin neden olduğu vektör aracılı paraziter bir hastalıktır. *Leishmania*, enfekte dişi kum sinekleri ile hayvandan insana veya insandan insana bulaşabilen zorunlu hücre içi parazitidir. Ayrıca kontamine iğne kullanımı, kan transfüzyonu, enfekte hamile kadından bebeğine geçiş yoluyla da bulaş söz konusudur. Hastalığın kutanöz, yaygın kutanöz, mukokutanöz ve viseral olmak üzere çeşitli formları bulunmaktadır (Murray ve ark., 2013; Uzun ve ark., 2017; CDC, 2020; WHO, 2021).

Hastalık özellikle yoksul ve olumsuz barınma koşullarına sahip toplumları ve yetersiz beslenen, immün sistemi zayıf kişileri etkilemektedir (CDC, 2020; WHO, 2021). Leishmaniasis'in endemik olarak görüldüğü bölgelerde yaşayan HIV hastaları koenfeksiyon açısından büyük risk altındadır (van Griensven ve ark., 2014; Monge-Maillo ve López-Vélez, 2016; Botana ve ark., 2019).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 700.000 ile 1.000.000 arasında değişen yeni Leishmaniasis vakası görülmektedir. Visseral Leishmaniasis (VL), vakaların %95'inden fazlasında tedavi edilmezse ölümcüldür. Düzensiz ateş nöbetleri, kilo kaybı, dalak ve karaciğerde büyüme ve anemi ile karakterizedir. Çoğu vaka Brezilya, Doğu Afrika ve Hindistan'da görülmektedir. Hastalığın en yaygın görülen formu Kutanöz Leishmaniasis (KL), cilt lezyonlarına sebep olarak yaşam boyu yara izleri ve ciddi sakatlıklara neden olur. Kutanöz Leishmaniasis vakalarının yaklaşık %95'i Amerika, Akdeniz havzası, Orta Doğu ve Orta Asya'da görülmektedir (WHO, 2021).

Leishmaniasis, immünosupresyon ile ilişkilidir. *Leishmania* ve HIV ile koenfekte olmuş kişilerde, ağır seyreden klinik hastalık ve yüksek ölüm oranları görülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre Brezilya, Etiyopya ve Hindistan'ın Bihar eyaleti *Leishmania*-HIV koenfeksiyonu oranlarının yüksek olarak bildirildiği bölgelerdir (WHO, 2021).

Leishmaniasis tanısı parazitolojik, moleküler, serolojik testler (hızlı tanı testleri) ve klinik tablonun değerlendirilmesi ile yapılır (CDC, 2020; WHO, 2021). Semptomatik açıdan Leishmaniasis ve HIV'in benzer olması, Leishmaniasis'in klinik tanısını zorlaştırmaktadır (Alvar ve ark., 2008). İmmüsupresif hastalarda yüksek mortalite oranına sahip olması nedeniyle HIV pozitif hastalarda Leishmaniasis'in erken tanısı çok önemlidir (Cavalcanti ve ark., 2012).

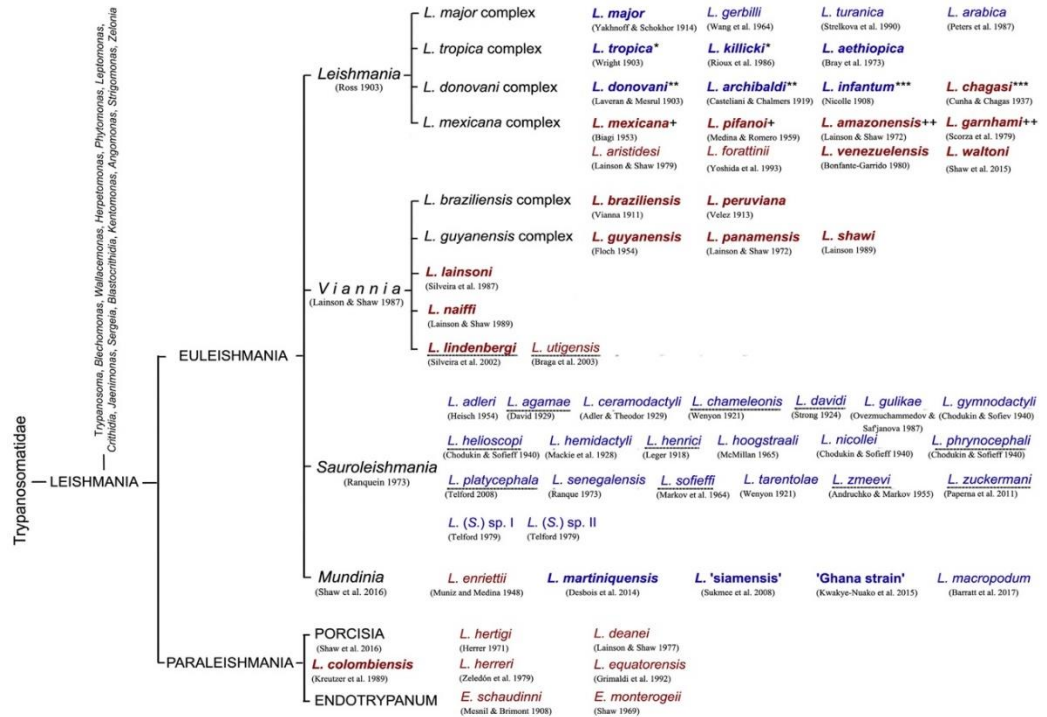


## 1.1. Leishmania

*Leishmania* cinsi, Protista aleminin Protozoa alt alemi içinde yer alan Trypanosomatidae familyası içinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 1.1).

*Leishmania* türlerinde bulunan iki önemli hücre komponenti nükleus ve kinetoplasttır. Kinetoplast çubuk şeklinde bulunan mitokondriyal bir yapıdır. Kinetoplastın içinde minik DNA halkaları (minicircle) ve büyük DNA halkaları (maxicircle) bulunur. Büyük halkalar mitokondriyal rRNA'yı, küçük halkalar ise mRNA'yı kodlamaktadır (Brewster ve ark., 1998)

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi protozoonların neden olduğu vektör aracılı bir zoonozdur. Hastalığın bulaşı halk arasında kum sineği, tatarcık veya yakarca olarak da bilinen *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi enfekte dişi kum sinekleri aracılığıyla gerçekleşir. Günümüzde en az 20 *Leishmania* türünün hastalığa neden olduğu bilinmektedir (CDC, 2020).



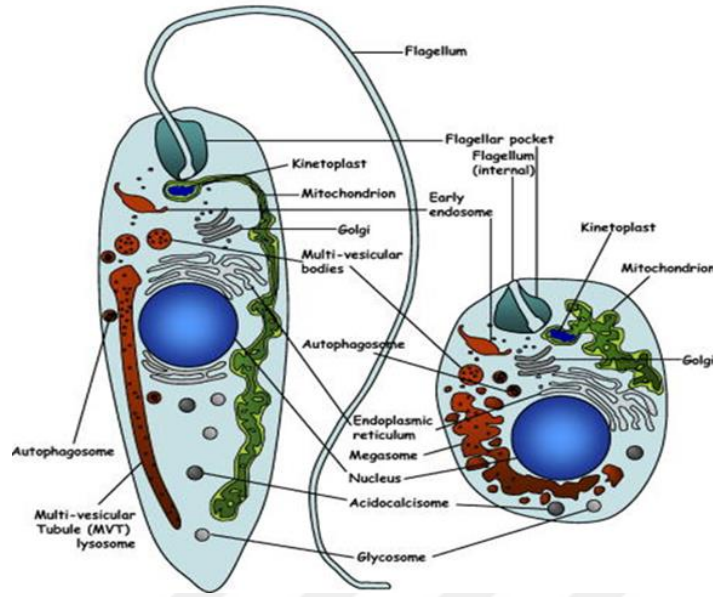
Şekil 1.1. *Leishmania* türlerinin sınıflandırılması (Akhoundi ve ark., 2017)

### 1.1.1. Tarihçe

Leishmaniasis'in geçmişi çok eski yıllara dayanmakla birlikte, hastalığın etkeni olan parazitler ilk kez 1903 yılında William Leishman ve Charles Donovan tarafından tanımlanmıştır. İlk olarak Leishman, ateşi yüksek, anemili, müsküler atrofilili ve splenomegalili bir hastanın dalağında ovoid cisimcikler görmü ve bu hastalığı "dumdum hastalığı" olarak tanımlamıştır. Birkaç hafta sonra Donovan, bir başka hastada gözlemediği benzer bulguları yayınlamıştır. Boyanan amastigotlara ilk olarak Leishman-Donovan cisimcikleri adı verilmiş fakat daha sonra *Leishmania donovani* olarak değiştirilmiştir (Leishman, 1903; Ross, 1903; Vannier-Santos ve ark., 2002).

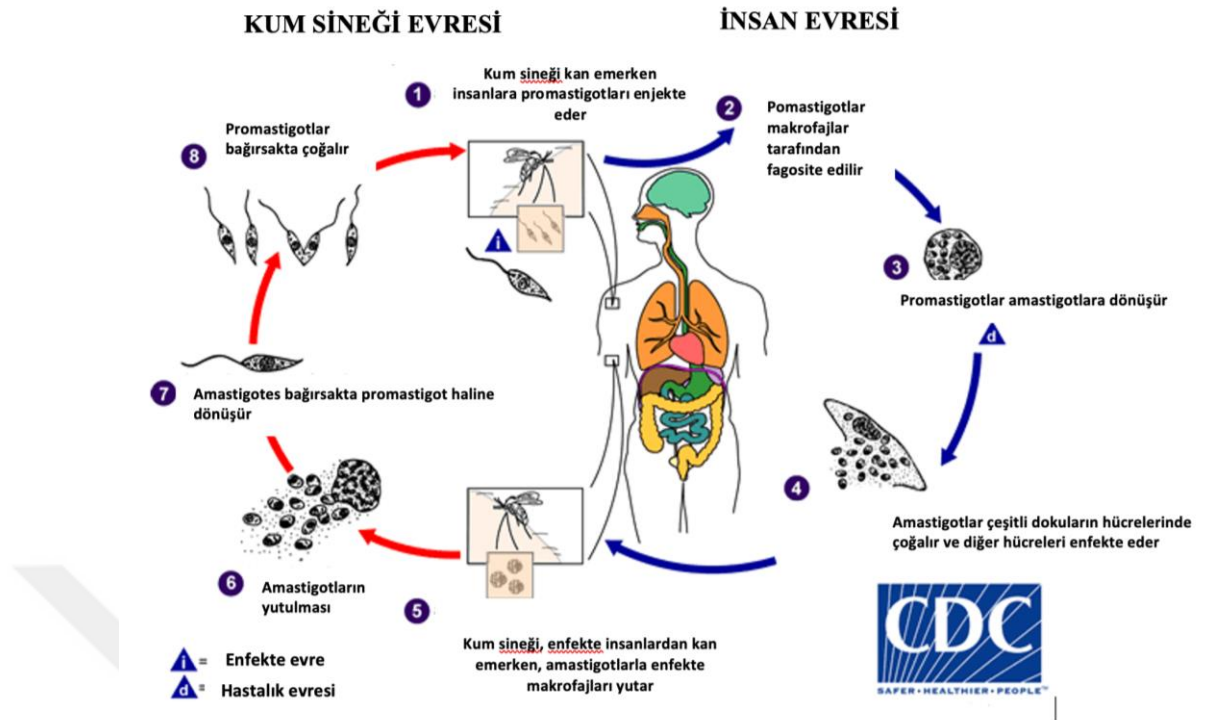
### 1.1.2. *Leishmania*'ların Yaşam Döngüsü

*Leishmania* türlerinin yaşam döngüsünde iki form bulunur. Amastigot, insan ve diğer memelilerin monosit ve makrofajlarında canlılığını sürdüren, 2-5  $\mu\text{m}$  boyunda, hücre içi, kamsız, hareketsiz formdur. Amastigotlar 37  $^{\circ}\text{C}$ 'de ikiye blnrleri. Bu yapılar hücre içinde Leishman-Donovan cisimcikleri olarak adlandırılırlar. Promastigot ise kum sineği sindirim sisteminde bulunan, 15-30  $\mu\text{m}$  boyunda, hücre dışı, kamlı, hareketli yaşam formudur. Promastigotlar enfeksiyona neden olan formdur. 27  $^{\circ}\text{C}$ 'de ikiye blnrleri (Farrel, 2002; Rodrigues ve ark., 2016) (şekil 1. 2).



**Şekil 1.2.** *Leishmania* spp. yaşam döngüsü formları (Besteiro ve ark., 2017).

*Leishmania*'ların yaşam döngüsü Phlebotomus cinsi dişi sineklerin, *Leishmania* parazitleri ile enfekte olmuş memeli rezervuardan (insan veya köpekgiller-kemirgenler gibi diğer memeliler) kan emerken aldıkları parazitlerin vektörün gastrointestinal kanalına geçmesi ile başlar. Amastigot formundaki bu parazitler sineklerin orta bağırsağında pH ve sıcaklığın etkisi ile promastigot formuna dönüşerek çoğalmaya başlarlar. Promastigotlar, sineklerin farinksine ve yanak kavitesine göç ederek, bu bölgeye yerleşirler. Promastigot formu enfekte kum sineklerinin tükürüklerinde bulunur ve enfekte kum sineğinin insanı sokması sırasında deriden içeri girerek enfeksiyona neden olur. Promastigotlar kamçılarını kaybederek amastigot formuna dönüşürler ve retikuloendotelial hücrelere yayılırlar. Amastigotlar ve enfekte makrofajlar, dolaşımda ve lezyonun altındaki bölgede bulunur. Phlebotomus cinsi dişi sineklerin kan emmesi ile tekrar enfekte makrofajlar alınır ve döngü aynı şekilde devam eder. Promastigot formundan amastigot formuna değişim, organizmanın konak immün yanıtından korunmasını sağlar. Parazitin yüzey moleküllerindeki değişiklik makrofajların bağlanmasını önler ve parazitin immün yanıtından kaçışında rol oynar (Anversa ve ark., 2018). *Leishmania*'ların yaşam döngüsü Şekil 1.3'te gösterilmektedir.



Şekil 1.3. *Leishmania* spp. yaşam döngüsü (CDC, 2020).

### 1.1.3. Bulaşma

Zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania*, insandan insana veya hayvandan insana enfekte dişi kum sinekleri aracılığı ile bulaşır. Hastalığın bulaşında vektör olarak rol oynayan dişi kum sinekleri, parazitleri enfekte olmuş insan ve hayvanları ısırarak alırlar. Ayrıca *Leishmania* paraziti ile kontamine iğne kullanımı, kontamine kanın transfüzyonu ve enfekte hamile kadından bebeğine geçiş yoluyla da bulaş söz konusu olabilmektedir (CDC, 2020).

*Leishmaniasis*'in coğrafi konuma göre farklılık gösteren iki bulaş yolu vardır. Bunlar, insan-vektör-insan yolu ile gerçekleşen antroponotik bulaş ve hayvan-vektör-insan yolu ile gerçekleşen zoonotik bulaş olarak sıralanabilir. Hint yarımadası bölgesinde ve Doğu Afrika'da en yaygın bulaşma yolu antroponotik bulaş iken, zoonotik bulaşma Akdeniz havzasında ve Güney Amerika'da daha yaygın olarak görülür. Zoonotik *Leishmaniasis*'de rezervuar, köpekler, kemirgenler ve lagomorflar (tavşanlar)'dır (Alemayehu ve Alemayehu, 2017).

#### 1.1.4. Klinik Sendromlar

DSÖ'ne göre, Leishmaniasis'in üç farklı klinik formu vardır. Enfeksiyona neden olan parazitin türüne ve konağın immün yanıtına bağlı olarak gelişen bu klinik formların belirti ve bulguları aşağıda verilmiştir (WHO, 2021).

**a) Viseral Leishmaniasis (Kala-azar):** İç organları (özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği) önemli ölçüde etkileyen, ciddi sistemik hastalığa neden olan ve ölümlle sonuçlanabilen kronik formdur. İnkübasyon dönemi değişkendir. Hastalık, sinek ısırığından birkaç hafta ile bir yıl sonrasına kadar değişebilen sürede gelişebilir. Viseral Leishmaniasis'e neden olan *Leishmania* türleri vücutta bulunan retiküloendotelyal sistem hücrelerini enfekte etmektedir. Retiküloendotelyal sistem hücrelerine yayılım sonucu, karaciğer ve dalakta büyüme, ateş ve kilo kaybı görülür (Şekil 1.4A). Glomerüler hücrelerin tutulması, böbrek hasarına yol açabilir. Anemi, lökopeni, trombositopeni ortaya çıkar. Hastalığın kontrolü doğru ve erken tanı konulması ve acilen tedaviye başlanması ile mümkündür. Tedaviye başlanmazsa hastalık kemik iliğini, lenf düğümlerini, iç organları etkileyerek, ölümlle sonuçlanabilir. Kalıcı hastalık durumunda deride koyu pigmentasyon ve granülomatoz alanlar oluşur. Bu tablo kala-azar sonrası dermal leishmaniasis olarak adlandırılır. Soluk renkli, maküler lezyonlarda az sayıda; nodüler, eritematöz lezyonlarda çok sayıda parazit bulunur. Bu tip hastalık Doğu Afrika (Sudan) ve Güney Asya (Bangladeş, Nepal ve Hindistan) olmak üzere iki coğrafi bölge ile sınırlıdır (Chappuis ve ark., 2007; WHO, 2007; Murray ve ark., 2013; Mukhopadhyay ve ark., 2014; WHO, 2022).

Viseral Leishmaniasis'e *L. donovani* kompleksinde yer alan *L. donovani* ve *L. infantum* neden olur (Srividya ve ark., 2011). *L. infantum*, ana rezervuar köpekler olmak üzere hayvan-vektör-insan yolu ile gerçekleşen zoonotik bulaştan sorumludur. Bu bulaş türü Orta Doğu, Güney Amerika, Çin ve Akdeniz Bölgesi'nde görülür. *L. donovani* ise insan-vektör-insan yolu ile gerçekleşen antroponotik bulaştan sorumludur. Bangladeş, Nepal, Hindistan ve Doğu Afrika bu bulaş türünün görüldüğü bölgeler olarak sıralanabilir. (Alvar ve ark., 2012; Monge-Maillo ve López-Vélez, 2016).

**b) Kutanöz Leishmaniasis (Şark Çıbanı):** En sık karşılaşılan formdur. Sineğin ısırıldığı bölgede 2 hafta ile 2 ay arasında değişen süre içinde görülen yara ile karakterizedir. Oluşan yara rahatsızlık verecek derecede kaşınır ve zaman içinde büyüyerek ülser dönüşür. (Şekil 1.4B). Ülser sertleşir, kabuk bağlar ve yaradan seröz bir sıvı sızmaya başlar. Bu durumda yarada sekonder bakteriyel enfeksiyonlar gelişebilir. Bazı kişilerde yaraya yakın bölgelerde bulunan lenf bezlerinde şişlikler görülebilir. Oluşan lezyon genellikle iz bırakarak, birkaç ay içinde kendiliğinden iyileşebilir. Yaralar sıklıkla sinekler tarafından ısırılmaya açık olan yüz, kollar, bacaklar gibi açık bölgelerde oluşur (Murray ve ark., 2013).

Kutanöz Leishmaniasis Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis'i ve Yeni Dünya Kutanöz Leishmaniasis'i olmak üzere ikiye ayrılır. Eski Dünya Kutanöz Leishmaniasis'ine neden olan etiyolojik ajanlar *L. tropica*, *L. majör*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, *L. donovani* olarak sıralanabilir. *L. mexicana* kompleksinde yer alan *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* ve *Viannia* alt cinsinde sınıflandırılan *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* ve *L. infantum/L. chagasi* türleri ise Yeni Dünya Kutanöz Leishmaniasis'ine neden olan etiyolojik ajanlardır (CDC, 2020).

**c) Mukokutanöz Leishmaniasis:** En az karşılaşılan formdur. Vakaların çoğunda etiyolojik ajan *L. braziliensis* kompleksidir. İnkübasyon dönemi kutanöz Leishmaniasis ile benzerlik gösterir. Nazal veya oral mukozada kısmen veya tamamen oluşan ülserlerle karakterizedir. Oluşan mukozal lezyonlar kendiliğinden iyileşmez. Sekonder bakteriyel enfeksiyon riski taşımaktadır. İlerleyen vakalarda yüz bölgesinde deformasyon ve şekil bozuklukları görülür (Şekil 1.4C). Vakalar nadiren ölüm ile sonuçlanabilir (Chappuis ve ark., 2007; Murray ve ark., 2013; WHO, 2022).

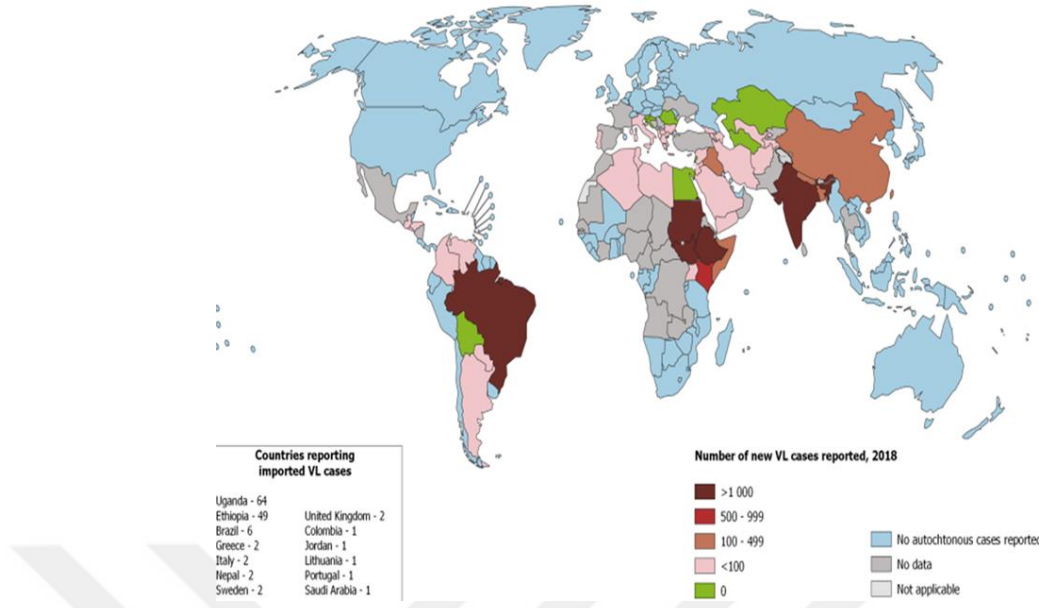


**Şekil 1.4.** Leishmaniasis'in klinik belirtileri. **A)** Visceral leishmaniasis **B)** Kutanöz leishmaniasis **C)** Mukokutanöz leishmaniasis (Baron, 1996).

### 1.1.5. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre başlıca etkilenen tropik ve subtropik bölgeler olmak üzere 97 ülke Leishmaniasis için endemiktir (Ruiz-Postigo ve ark., 2020; WHO, 2021). Günümüzde 54 *Leishmania* türü tanımlanmış olup, bunlardan en az 21 tanesi insanlarda hastalığa neden olmaktadır (CDC, 2020). İnsanlarda hastalık yapan bu türlere örnek olarak *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* verilebilir. Son yıllarda görülen vakaların çoğu Afganistan, Cezayir, Bangladeş, Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Etiyopya, Hindistan, İran, Peru, Güney Sudan, Sudan ve Suriye'den bildirilmektedir (Steverding, 2017).

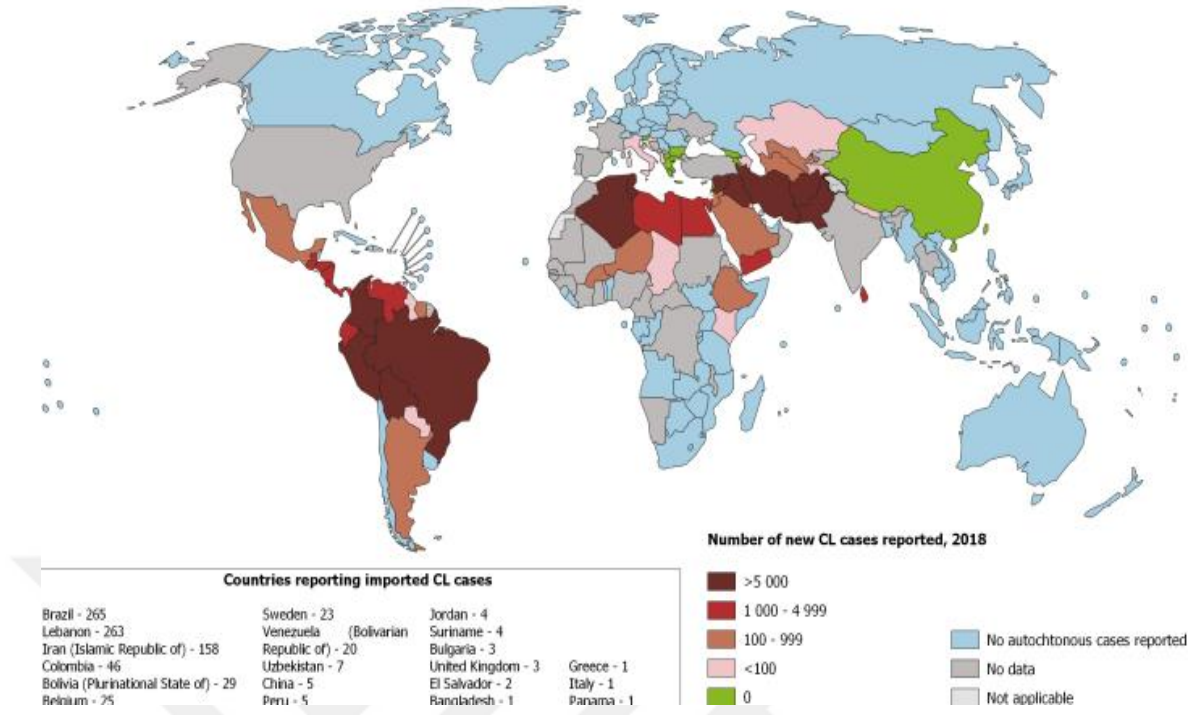
DSÖ verilerine göre, dünya genelinde 12 000 000 visceral Leishmaniasis vakası olduğu tahmin edilmektedir. Bu vakaların, %90'ı Etiyopya, Sudan, Güney Sudan, Bangladeş, Brezilya ve Hindistan'dan bildirilmektedir (WHO, 2022) (Şekil 1.5).



**Şekil 1.5.** Visceral leishmaniasis'in dünya çapında endemik durumu, 2018 (Ruiz-Postigo ve ark., 2020).

Kutanöz Leishmaniasis vakalarının çoğu Amerika, Akdeniz Havzası, Orta Doğu ve Orta Asya'dan bildirilmektedir. DSÖ verilerine göre, 2019'de bildirilen yeni kutanöz Leishmaniasis vakalarının %87'i Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Irak, Libya, Pakistan, Suriye ve Tunus'tan rapor edilmiştir. Dünya çapında her yıl 600 000 ile 1 000 000 arasında değişen rakamlarda yeni vakanın görüldüğü tahmin edilmektedir. (WHO, 2021) (Şekil 1.6).

DSÖ verilerine göre, mukokutanöz leishmaniasis vakalarının %90'ından fazlası Bolivya, Brezilya, Etiyopya ve Peru'da görülmektedir (WHO, 2021).



Şekil 1.6. Kutanöz Leishmaniasis'in dünya çapında endemik durumu (WHO, 2021).

### 1.1.6. Laboratuvar Tanısı

Hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde, kütanöz, viseral veya mukokütanöz leishmaniasis'in tanısı klinik bulgulara göre yapılabileceği gibi kesin tanı, klinik ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilmesi ile konur. Hastalığın laboratuvar tanısı parazitolojik, serolojik ve moleküler olmak üzere üç farklı yöntemle yapılabilir (Thakur ve ark., 2020).

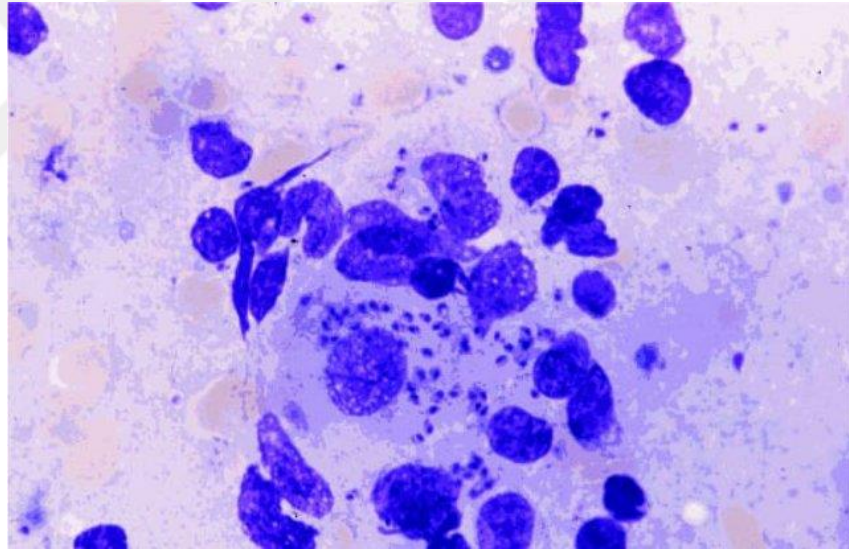
#### 1.1.6.1. Parazitolojik Yöntemler

Parazitolojik tanı, klinik örneklerde amastigotların veya yapılan kültürde promastigotların saptanması ile yapılır (Murray ve ark., 2013; Thakur ve ark., 2020).

Kütanöz ve mukokütanöz Leishmaniasis'de lezyon ya da ülser biyopsisinden hazırlanan boyalı preparatlarda amastigotların varlığı araştırılır. Ayrıca ülser

dokusundan yapılan kültür ile de tanı konulabilir. Visceral leishmaniasis'in tanısında ise, dalak ponksiyonu, karaciğer biyopsisi, lenf nodu aspiratı, sternal aspirat, iliak kemik iliği ve venöz kandan yapılan "buffy coat" klinik örnek olarak kullanılabilir. Dalak aspiratları duyarlılıkları oldukça yüksek klinik örneklerdir. Bununla birlikte yüksek kanama riski bulunması nedeniyle tecrübe sahibi kişiler tarafından alınması gereklidir (Alvar ve ark., 2008; Murray ve ark., 2013; de Vries ve ark., 2015; Thakur ve ark., 2020).

Boyalı mikroskopik inceleme için klinik örneklerden hazırlanan preparatlar, Giemsa, immünoperoksidaz veya hemotoksilen eosin boyalarından biri kullanılarak boyanabilir. Giemsa ile boyanan preparatlarda sitoplazma soluk mavi renkte, nükleus ve kinetoplast pembe-mor renkte boyanır (Sundar ve Rai, 2002).



**Şekil 1.7.** Visceral Leishmaniasis'li hastanın kemik iliği aspiratından hazırlanan preparatın Giemsa ile boyanmış mikroskopik görüntüsü (Singh, 2006).

Kültür için klinik örneklerden, tavşan kanlı tuzlu agar içeren Novy-MacNeal-Nicoll (NNN) besiyerine ekim yapılır. Ekim yapılan tüpler 22-25 °C'de inkübe edilir. Parazit varlığı en erken 2-3 gün sonra kültürlerde promastigotların görülmesi ile saptanabilir. Kesin sonuç verebilmek için kültürlerin 4 hafta süre ile bekletilmesi gerekmektedir. NNN besiyeri dışında Schneider'in Drosophila besiyeri ve RPMI 1640 besiyerleri de kullanılabilir (Rasti ve ark., 2016).

### 1.1.6.2. Serolojik Yöntemler

Serolojik yöntemler etken *Leishmania* türlerinin antijenlerinin veya bu antijenlere karşı oluşmuş antikörlerin hasta serumlarında saptanması esasına dayanır. Dolaylı floresan antikor testi (Indirect Fluorescence Antibody-IFAT), enzim bağlı immünosorbent deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA), Western blotting teknikleri, direkt aglütinasyon testi (Direct Agglutination Test-DAT) ve rK39 özgül antijeninin kullanıldığı immünokromatografik hızlı tanı testi (dipstick) Leishmaniasis'in serolojik tanısında sıklıkla kullanılan serolojik testler olarak sıralanabilir (Akbaş, 2015).

Kutanöz Leishmaniasis'de hiç saptanamayan veya çok düşük titrede saptanabilen antikörler oluştuğu için tanıda serolojik testler tercih edilmezken, viseral Leishmaniasis tanısında kullanılmaktadır. Serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri kullanılan antijene göre farklılık gösterebilir. Serolojik testlerden, amastigot antijeni K39'un rekombinantı olan rK39 antijenini kullanan dipstick testi ve promastigot antijenlerini kullanan DAT, IFAT, ELISA gibi testler arasında DAT ve dipstick testinin tanıda en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmektedir. Dipstick testi özellikle hastalığın endemik olduğu bölgelerde yaygın olarak kullanılır (Singh ve Sivakumar, 2003). rK39 antijenini kullanan dipstick testi, viseral Leishmaniasis'in erken tanısında hem periferal hem de merkezi düzeyde kullanılabilir (Boelaert ve ark., 2004).

Tanıda serolojik testlerin kullanımının bazı sınırlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Bunlar özgül antikörlerin yıllarca pozitif kalması nedeniyle relapsların serolojik yöntemlerle tanımlanamaması, hastalığın endemik olduğu bölgelerde sağlıklı bireylerin birçoğunun anti-leishmanial antikörler açısından pozitif olması olarak sıralanabilir. Bu gibi nedenlerden dolayı antikor tarama testlerinin, klinik açıdan vaka tanımına uygun olan semptomatik kişilerde kullanılması gerekmektedir (WHO, 2022).

### **1.1.6.2.1. Dolaylı Floresan Antikor Testi (Indirect Fluorescence Antibody-IFAT)**

Dolaylı floresan antikor testi, kullanımda olan en hassas testlerden biridir. Bu test ile enfeksiyonun çok erken aşamalarında gösterilebilen ve tedaviden altı ile dokuz ay sonra saptanmayan antikorların tespiti mümkündür. IFAT testi, floresan mikroskobu ile tespiti kolay, floresan işaretleyici raportör bir molekülün antikora bağlanması temeline dayanır. Anti-leishmanial antikorların tespiti, yüzeye fikse edilmiş promastigotların kullanımı ile sağlanır. 1:20'nin üzerindeki titreler anlamlıdır ve 1:128'in üzerindeki titreler tanı açısından önemlidir. Bu test, ELISA'ya kıyasla daha duyarlı (%96) ve spesifik (%98) olarak kabul edilse de zahmetli olması ve saha koşullarında uygulanmasının zor olması dezavantajlarıdır (Singh ve Sivakumar, 2003; Thakur ve ark., 2020).

### **1.1.6.2.2. Enzim Bağlı Immunosorbent Deneyi (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA)**

Enzim bağlı immünosorbent deneyi, Leishmaniasis'in serolojik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Bu yöntem hem sahada kullanım için hem de laboratuvar analizleri için uygundur. ELISA yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü antijene bağlı olarak farklılık gösterir. ELISA'da, amastigotların veya promastigotların ham veya çözünür antijenleri de dahil olmak üzere çeşitli antijen türleri kullanılabilir. Çapraz reaktivite nedeniyle *L. donovani*'den rGBP, *L. infantum*'dan rORFF, *L. chagasi*'den rgp63, rK9, rK26 ve rK39 gibi çeşitli rekombinant antijen türleri geliştirilmiş ve test edilmiştir. Bunlardan, rK39 antijenin oldukça duyarlı olduğu ve VL hastalarında tanı amacıyla kullanılabileceği bildirilmektedir. Buna karşılık kutanöz veya mukokütanöz Leishmaniasis'te oluşan antikorların varlığını saptayamaz. Bu antijene karşı belirlenen antikor titresi doğrudan aktif hastalıkla ilişkilidir ve tedavinin gidişini izleme, klinik nöksleri öngörme imkânı tanımaktadır. rK39 antijeni ile yapılan ELISA, AIDS hastaları gibi bağışıklığı baskılanmış kişilerde VL'i tespit etmek için

yüksek oranda doğru sonuç vermektedir (Singh ve Sivakumar, 2003; Srividya ve ark., 2012).

Afrika'da rk39 antijenine düşük duyarlılık görülmesi nedeniyle yeni nesil bir antijen olan rk28 geliştirilmiştir. rK28, *L. donovani* haspb1 ve k39 kinesin genlerinden antijen epitop yoğunluğunu arttırmak için tasarlanmıştır (Srividya ve ark., 2012).

LicTXNPx, *L. infantum* sitoplazmasında bulunan ve paraziti oksidatif strese koruyan farklı enzimatik yollarda görev alan peroksiredoksinlerden biridir (Castro ve ark., 2002). Portekiz'de endemik bir bölgede yaşayan enfekte çocuklarda beş farklı rekombinant proteini (LmSIR2, LmS3a, LimTXNPx, LicTXNPx ve LiTXN1) kullanarak, ELISA yöntemi ile anti-leishmanial antikörlerin varlığını araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre, LicTXNPx %78 duyarlılık ve %94 özgüllük göstermiştir. Buradan yola çıkarak, LicTXNPx'in VL tanısında ve hastalığın iyileşmesinin izlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Santarém ve ark., 2005).

#### **1.1.6.2.3. Western Blotting (Immunoblotlama)**

ELISA testini yapabilmek için ileri tekniklerin ve bu konuda yetiştirilmiş personelin gerekli olması, tanı için immünoblotlama yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Çözünür antijenler kullanılarak yapılan immünoblotlama ile serolojik tanının oldukça duyarlı ve spesifik olduğu bildirilmiştir. Bu testin duyarlılığı %90-98 arasında, özgüllüğü ise %98-100 arasındadır. İmmünoblotlamada, enfeksiyon sırasında eksprese edilen çeşitli antijenler ve enfeksiyonun seyri sırasında oluşan antikörler gösterilebilir. Böylece hastalığın hangi evrede olduğu, elde edilen bant profili ile belirlenebilir (Singh ve Sivakumar, 2003; Thakur ve ark., 2020).

#### **1.1.6.2.4. Doğrudan Aglütinasyon Testi (Direct Agglutination Test-DAT)**

Doğrudan aglütinasyon testi, yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip, etkili, uygun maliyetli basit bir testtir. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü çeşitli çalışmalarda sırasıyla %70.5–100 ve %53–100 aralıklarında bildirilmiştir. Hem sahada hem de laboratuvarında kullanım için uygundur. Testin prensibi, dondurularak kurutulmuş *Leishmania* promastigotları ile anti-leishmanial antikorların reaksiyona girmesi sonucu promastigot aglütinasyonu oluşmasıdır. Test, serum, plasma veya tam kan kullanılarak yapılabilir. Uzun inkübasyon süresi (18 saat) ve serum veya kanın seri dilüsyonlarının hazırlanması testin dezavantajları olarak sıralanabilir. DAT testinin prognostic değeri yoktur. Test, tedavi sonrası birkaç yıl süre ile pozitif çıkabilir (Singh ve Sivakumar, 2003; Thakur ve ark., 2020).

#### **1.1.6.2.5. İmmünokromatografik Hızlı Tanı Testi (Dipstick)**

Hastalığın endemik olarak görüldüğü bölgelerde ileri teknoloji ve ekipman gerektirmeyen, kolay uygulanabilen, hızlı ve ucuz testlere ihtiyaç duyulmaktadır. rK39 strip testi basit, çabuk sonuç veren, uygun maliyetli, uygulanması kolay bir testtir. Hasta serumundan VL tanısında yaygın olarak kullanılmaktadır. Saha koşullarında kullanım için tasarlanmış, rk39 antijenini kullanan ve lateral akışa dayalı, antijen emdirilmiş nitroselüloz kâğıt şeritler biçimindeki ticari bir kit (InBios®, ABD) mevcuttur (Singh ve Sivakumar, 2003).

rk39 antijenini kullanan immünokromatografik hızlı tanı testlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü değişkenlik göstermektedir (Kiros ve Regassa, 2017).

#### **1.1.6.2.6. Antijenin Tespitine Yönelik Testler**

Enfeksiyon tanısında hastalık etkeninin antijenlerinin tespiti sıklıkla kullanılır. Saptanan antijen seviyesi ile parazit yükü arasında doğrudan ilişki olduğu düşünülür.

Bu tanı yöntemi, özellikle antikor yanıtının çok zayıf olduğu, bağışıklığı baskılanmış hastalarda antikor saptama yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilir. Bununla birlikte antijenin hastanın serumunda tespiti, yüksek düzeyde antikorların bulunması, dolaşımdaki immün kompleksler, romatoid faktör ve otoantikorların varlığı ile komplike bir hal alır. Bu durumlar immünolojik açıdan önemli antijenik determinantları maskeleyebilir veya serbest haldeki antijenin bağlanmasını kompetitif olarak inhibe edebilir. Bu konuda yayınlanmış birkaç çalışma olmasına rağmen, hala günümüzde doğruluğundan emin olunan bir antijen tespit sistemi bulunmamaktadır. Günümüzde, VL'li hastaların idrarlarından *Leishmania* antijenlerini tespit edebilen bir lateks aglütinasyon testi (KATEX) geliştirilmiştir. Farklı VL odaklarına sahip hastalardan toplanan numuneler kullanılarak KATEX ile elde edilen sonuçlar, örneklerin coğrafi kökeninden bağımsız olarak testin iyi çalıştığını göstermektedir. Test, %100 özgüllüğe ve %68-100 arasında değişen duyarlılığa sahiptir. Asemptomatik VL vakalarının tespiti ve tedavinin seyri açısından testin uygunluğu henüz doğrulanmamıştır (Singh ve Sivakumar, 2003).

#### **1.1.6.2.7. Leishmanin Deri Testi (LDT)**

Montenegro reaksiyonu olarak da bilinen Leishmanin Deri Testi (LDT), kutanöz leishmaniasisin tanısında kullanılan, *Leishmania* kültür antijenlerinin deri içine inokülasyonu ile yapılan, gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonudur. LDT testi, oluşan gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunun 5 mm'den fazla olması durumunda pozitif, az olması durumunda ise negatif olarak değerlendirilir (Şekil 1.8). LDT'nin uygulanması kolay olup, duyarlılığı %86,4-100 arasında değişmektedir. Bu test genellikle insan ve hayvan popülasyonunda kutanöz ve mukokutanöz Leishmaniasis'in prevalansının göstergesi olarak kullanılır. LDT, epidemiyolojik araştırmalarda *Leishmania* parazitlerine maruziyeti belirlemek ve asemptomatik vakaları ayırt etmek için tercih edilen değerli bir yöntemdir (Singh and Sivakumar, 2003; Thakur ve ark., 2020).



**Şekil 1.8.** Pozitif leishmanin deri testi (Manzur ve Bari, 2006).

### **1.1.6.3. Moleküler Yöntemler**

Leishmaniasis'in laboratuvar tanısında, parazitolojik ve serolojik tekniklerin yetersiz kaldığı durumlarda moleküler yöntemler kullanılabilir. Moleküler yöntemler, mikroskopik inceleme ve kültüre kıyasla daha duyarlıdır. Bununla birlikte, maliyetli olmaları, özel cihaz ve ekipman gerektirmeleri ve eğitilmiş personele gereksinim duyulması dezavantajları arasında sıralanabilir. PCR, Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA (RAPD), Restriksiyon Fragment Length Polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizi Leishmaniasis'in tanısında kullanılan moleküler yöntemler olarak sıralanabilir. Bu yöntemler sayesinde parazitler, tür ve alt tür seviyesinde tanımlanabilmektedir. PCR'da nükleer DNA (SSU rRNA gen bölgesi, mikrosatellit DNA, internal transcribed spacer gen bölgesi-ITS-, gp63 gen bölgesi, tubulin gen) veya ekstrakromozomal DNA (minisörkıl kinetoplast DNA) bölgeleri hedef bölgeler olarak çoğaltılmaktadır. (Marfurt ve ark., 2003; Thakur ve ark., 2020).

### **1.1.7. Tedavi**

Leishmaniasis'in tedavisi hastalığın klinik formu, eşlik eden patolojiler, etken parazit türü ve coğrafi konum gibi çeşitli faktörler göz önünde bulundurularak hastaya özel olarak yapılmalıdır (CDC, 2020; WHO, 2021).

Kutanöz leishmaniasis’de oluşan cilt yaraları tedavi uygulanmasa bile genellikle kendiliğinden iyileşir. Ancak bu kendiliğinden iyileşme süreci aylar hatta bazen yıllarca sürebilir. Leishmaniasis tedavisi süresince hastanın immün sisteminin kuvvetli olması önemlidir. İmmüno-supresyon durumunda hastalığın nüksü söz konusudur. VL teşhisi konan hastalarda tedaviye mümkün olan en kısa sürede başlanmalıdır. VL vakaları tedavi edilmezse ölüm ile sonuçlanabilir (CDC, 2020; WHO, 2021).

Günümüzde Leishmaniasis tedavisinde en yaygın kullanılan ilaç grubu pentavalent antimon (sodyum stiboglukonat-Pentostam®) bileşikleridir. Pentavalent antimon bileşiklerine dirençli olguların tedavisinde amfoterisin B ve miltefosin alternatif tedavi seçenekleri olarak kullanılabilir. IV infüzyonla uygulanan, parenteral bir ajan olan lipozomal amfoterisin B (AmBisome®) VL tedavisi için Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylıdır. Oral alkilleyici antineoplastik bir ajan olan miltefosin, 2014 yılında FDA tarafından belirli *Leishmania* türlerinin etken olduğu kutanöz, mukozal ve viseral Leishmaniasis tedavisi için onay almıştır. Miltefosin gebelerde kontrendikedir. Emziren annelerin tedavi süresince ve sonrasında 5 ay boyunca emzirmemeleri önerilir (CDC, 2020).

Bunların dışında Leishmaniasis tedavisinde, pentamidin izetionat ve azollerde (ketokonazol, itrakonazol ve flukonazol) kullanılan diğer ilaçlar arasında yer almaktadır (CDC, 2020).

Kutanöz leishmaniasis’de ilaç tedavisinin yanında kriyoterapi (dondurma), yakma ve cerrahi eksizyon gibi yöntemlerden de faydalanılmaktadır (Murray ve ark., 2013).

### **1.1.8. Korunma ve Kontrol**

Leishmaniasis'in bulaşı insan veya hayvan rezervuar konağını, parazit ve tatarcık vektörünü içeren karmaşık bir biyolojik sistemde gerçekleşir. Bu nedenle enfeksiyonun önlenmesi ve kontrolü için birden fazla etken gözönünde

bulundurularak, kombine şekilde uygulanmalıdır. Enfekte kişilerin erken teşhisi ve etkili tedavi seçenekleriyle hızlı tedavisi, rezervuar konakların ve vektör kontrolü hastalıktan korunmada başlıca uygulanması gereken stratejiler olarak sıralanabilir (Murray ve ark., 2013; WHO, 2021).

Günümüzde Leishmaniasis enfeksiyonunu önleyecek hiçbir aşı veya profilaktik ilaç seçeneği bulunmamaktadır (CDC, 2020).

## **1.2. Human Immunodeficiency Virus (HIV)**

İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus: HIV) Retroviridae ailesi, Lentivirinae alt ailesinde sınıflandırılan zarflı bir virüstür. Kronik enfeksiyon hastalığına neden olan HIV, bağışıklık sisteminin baskılanması sonucunda görülen fırsatçı enfeksiyonlar ile seyreden AIDS tablosu sonucunda ölüme sonuçlanabilmektedir. HIV-1 ve HIV-2 olmak üzere iki serotipi bulunmaktadır. Tüm dünyada yaygın olarak görülen tip HIV-1'dir. HIV-2 ise sıklıkla Batı Afrika ülkeleri olmak üzere Hindistan, Güney Amerika ve Afrika'nın diğer bölgelerinde de görülmektedir (Fanales-Belasio ve ark., 2010; Sharp ve Hahn 2011; Seitz, 2016; T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

HIV küresel öneme sahip, ciddi bir halk sağlığı sorunudur. DSÖ verilerine göre her yıl 2 milyon yeni HIV vakası bildirilmektedir. Günümüzde %66'sından fazlası Afrika Bölgesi'nde olmak üzere, 37,7 milyon kişinin HIV ile enfekte olduğu bilinmektedir (WHO, 2021).

HIV, bağışıklık sistemini hedef alan bir virüstür. Virüs özellikle yardımcı T hücreleri olarak adlandırılan ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde önemli rolleri olan CD4+ hücreleri hedef alır. Bağışıklık hücrelerini enfekte ederek, fonksiyonlarını bozar ve kişide immün yetmezlik durumunun ortaya çıkmasına sebep olur. Bu aşamada enfekte kişi fırsatçı enfeksiyonlara ve kansere karşı korunmasız kalır (Walker ve McMichael 2012; T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

HIV kontamine kan ve kan ürünleri, cerrahi malzemeler, enjektörler aracılığıyla, cinsel ilişki yoluyla, hamilelik, doğum ve emzirme dönemlerinde anneden bebeğe bulaşabilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2019).

HIV enfeksiyonunun semptomları, enfeksiyon evresine göre farklılık gösterir. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'ye göre, HIV enfeksiyonunun üç evresi vardır. Birinci evre, hastalarda döküntü, boğaz ağrısı ve ateş gibi semptomların görüldüğü akut HIV enfeksiyonu evresidir. Bu dönemde enfekte olan kişinin kanında bol miktarda virüs bulunur ve kişi bulaştırıcıdır. İkinci evre, kronik HIV enfeksiyonu veya asemptomatik HIV enfeksiyonu evresi olarak adlandırılır. Bu evrede hastalıkla ilgili herhangi bir semptom görülmeyebilir. Kişi enfekte olduğunu bilmiyorsa ve HIV tedavisi görmüyorsa bu dönem 10 yıl veya daha uzun sürebilir. Bununla birlikte bazı hastalarda bu dönem daha hızlı ilerleyebilmektedir. Bu dönemde de bulaştırıcılık söz konusudur. İkinci evreden sonra hastanın virüs yükü artmaya devam eder ve buna paralel olarak CD4+ hücre sayısı azalmaya başlar. Böylece kişi hastalığın en şiddetli evresi olan üçüncü evreye, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu) dönemine geçmiş olur. Bu dönemde kişilerde lenf bezlerinde şişme, ateş, kilo kaybı, ishal ve öksürük gibi belirtiler görülür. HIV enfeksiyonuna yönelik tedavi görmeyen kişilerde tüberküloz, kriptokok menenjitisi veya çeşitli bakteriyel enfeksiyonlar ve lenfoma, Kaposi sarkomu gibi kanser türleri görülebilir (CDC, 2021; WHO, 2021).

Hastalığın tanısı enfeksiyonun evrelerine göre yapılan kan testleriyle konur. Antijen/antikor varlığını araştıran serolojik testler ve nükleik asit testleri tanıda sıklıkla kullanılmaktadır (CDC, 2021).

HIV enfeksiyonunun tedavisinde kombine olarak antiretroviral ilaçlar kullanılmaktadır. Antiretroviral ilaçlar, hastalığı kesin olarak tedavi edememekle birlikte, kontrolünde etkili olmaktadır. Bu ilaçlar vücutta virüsün çoğalmasını önleyerek, hastalığın ilerlemesini baskılamaktadır. Bu şekilde enfekte kişilerin yaşam süreleri uzar ve yaşam kalitesi artar (WHO, 2021).

### 1.3. Visceral Leishmaniasis ve HIV Koenfeksiyonu

#### 1.3.1. Epidemiyoloji

HIV'nin VL insidansı üzerinde etkisi vardır. DSÖ tarafından VL/HIV koenfeksiyonu vakaları ilk olarak Akdeniz Havzası'nda tespit edilmiştir (Alvar ve ark., 2008; Botana ve ark., 2019; Mohebalı ve Yimam 2020). 1985 yılında ilk vaka İspanya'dan rapor edilmiştir (Alvar ve ark., 2008; Mohebalı ve Yimam, 2020). Koenfekte hastalarda VL etkeni mikroorganizmalar başlıca *L. infantum* ve *L. donovani* türleri olarak bildirilmiştir (Ezra ve ark., 2010).

Dünya genelinde şimdiye kadar 35 ülkeden Leishmaniasis-HIV koenfeksiyonu vakaları bildirilmiştir. Bu koenfeksiyonların çoğu VL ile ilişkilendirilmiştir. Mevcut verilerin büyük kısmı Güney Avrupa ülkelerine aittir (WHO, 2000; Lindoso ve ark., 2016; WHO, 2022).

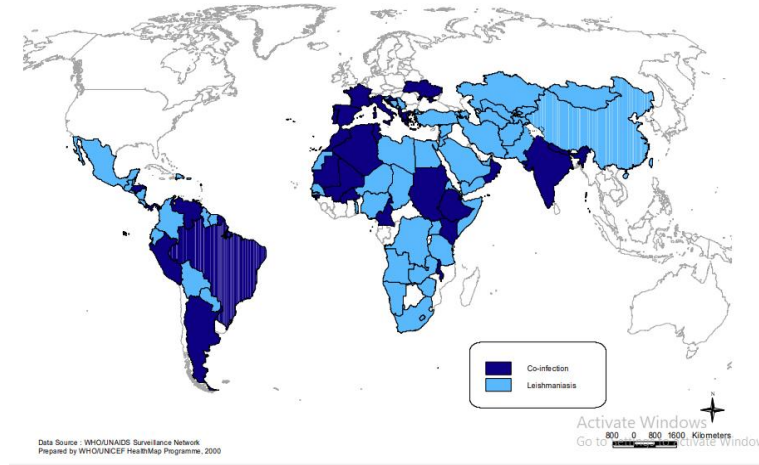
1980 yılından önce *L. infantum* çocuklarda daha yaygın olarak görülmekteydi. İlerleyen yıllarda HIV enfeksiyonu, kemoterapi veya radyoterapi gibi nedenlerden dolayı bağışıklığı baskılanmış yetişkin hastalara etken mikroorganizma yayılarak, Güney Avrupa'daki yetişkinler arasında VL vakalarında artış olduğu görülmüştür (Rosenthal ve ark., 1995; Pintado ve López-Vélez, 2001).

Akdeniz bölgesinde VL insidansı düşük olmakla birlikte, VL/HIV vakalarının dünya çapındaki toplam vakaların sadece %5-6'sını oluşturduğu bildirilmektedir (Monge-Maillo ve ark., 2014; Lindoso ve ark., 2016). Bunun birlikte, Avrupa'da yeni tanımlanan VL vakalarının yaklaşık %50-70'i HIV pozitif hastalardır (WHO, 2000; Colomba ve ark., 2009). Başlıca etken mikroorganizma *Leishmania infantum*'dur. Köpekler birincil rezervuardır (Zoonotik Bulaş). Leishmaniasis-HIV koenfeksiyonu vakaları, Fransa, İtalya, Portekiz ve İspanya'dan bildirilmiştir (Monge-Maillo ve ark., 2014).

Etiyopya'da *Leishmania* ile enfekte hastaların %35'inde aynı zamanda HIV enfeksiyonunda var olduğu saptanmıştır. Bu durum Sudan gibi komşu ülkeler içinde söz konusudur. Hindistan'da 2002-2006 yılları arasında VL/HIV vakalarının prevalansının yaklaşık 2,5 kat arttığı görülmüştür. Brezilya'da ise koenfeksiyon prevalansının 2001-2012 yılları arasında 12 kat arttığı bildirilmiştir (Lindoso ve ark., 2016).

Güney Avrupa'da, 2001 yılının başlarında VL/HIV koenfeksiyonu vakalarının sayısı 1911 olarak rapor edilmiştir. Bu vakaların %8,3'ü (n=159) Portekiz'den bildirilmiştir. Portekiz'de VL/HIV vakalarının %80'i Lizbon ve Porto başta olmak üzere kentsel alanlarda bulunmaktadır (Marques ve ark., 2007).

DSÖ, VL/HIV koenfeksiyonunun halk sağlığı üzerindeki etkisini belirleyebilmek amacıyla Leishnet olarak isimlendirilen dünya çapında bir sürveyans ağı kurmuştur. Bu ağ başlangıçta bir çoğu Avrupa'dan olmak üzere 28 kuruluşan oluşmaktaydı (Ruiz-Postigo ve ark., 2020). DSÖ ve Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Ortak Programı (UNAIDS) tarafından birlikte hazırlanan kılavuz bu duruma ortak bakış açısı sağlaması açısından önemlidir (Pintado ve López-Vélez, 2001).



**Şekil 1.9.** Leishmaniasis'in dünya çapındaki dağılımı (2001) (açık mavi) *Leishmania*/HIV koenfeksiyonu bildiren ülkeler (2001) (koyu mavi) (WHO, 2000).

### 1.3.2. *Leishmania*-HIV Koenfeksiyonunun İmmunopatogenezi

Hem HIV hem de Leishmaniasis, enfekte kişilerde immünolojik açıdan büyük değişikliklere neden olur. Her iki enfeksiyonunda hedef aldığı hücre tipi aynıdır. *Leishmania* türleri, makrofajlar içinde çoğalırlar. HIV'de CD4+ T hücrelerinin yanısıra makrofajlarda hedef hücrelerdir. İmmunokompetan kişilerde *Leishmania* parazitlerine karşı yanıt T-helper (Th) hücreleri aracılığıyla gerçekleşir. Oluşan yanıt hastalığın şiddeti ve klinik tablo ile uyumludur (Olivier ve ark., 2003).

*Leishmania*'ya karşı oluşan bağışıklık, antijen sunucu hücrelerin başlangıçta IL-12 üretmesi ve bunun da Th1 T hücreleri tarafından IFN- $\gamma$  salınımını uyarmasıyla gerçekleşir. Bunun sonucunda makrofajların özellikle hücre içi amastigotları hedef alan nitrik asit ve oksijen üretimi gibi mikrobisidal mekanizmaları aktive olur (Cavalcanti ve ark., 2012).

Duyarlılığa, poliklonal B hücresi aktivasyonu sonucu artan gama globulin seviyeleri ve artan IL-4, IL-5, IL-10 seviyeleri ile karakterize olan Th2 sitokin profili neden olur. Bu durumda makrofaj aktivasyonu engellenir ve parazit proliferasyonu kontrol edilemez. (Olivier ve ark., 2003; Alvar ve ark., 2008; Rodrigues ve ark., 2016).

HIV hastalarında, Th1 sitokin profilinin, viral enfeksiyonu ve/veya enfeksiyonun AIDS evresine ilerlemesini önleyen, virüse karşı koruyucu bağışıklık sağlanması ile ilişkili olduğu varsayılmıştır. Bununla birlikte serokonversiyonun ve hastalığın AIDS evresine ilerlemesinin Th2 sitokin profili ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Alvar ve ark., 1997).



### 1.3.4. HIV ile Enfekte Hastalarda Visceral Leishmaniasis Tanısı

HIV ile enfekte hastalara, VL tanısı koymak spesifik olmayan klinik semptomlar nedeniyle zordur (Alvar ve ark., 2008; Cavalcanti ve ark., 2012). HIV pozitif hastalarda VL tanısı için kullanılan başlıca tanı yöntemleri Çizelge 1’de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.1.** HIV Pozitif hastalarda VL tanısı için kullanılan başlıca tanı yöntemleri (Lindoso ve ark., 2016).

Laboratuvar Yöntemi	Açıklama	Duyarlılık	Özgüllük	Yorum
Mikroskopik inceleme (kemik iliği aspirasyonu-Giemsma boyama)	Amastigot formların mikroskopik olarak gösterilmesi	%93,2	%100	Ucuz, invaziv yöntem, özgüllük ve duyarlılığı yüksek
DAT	Aglütinasyon testi	%81	%90	En iyi serolojik yöntem
rk39 Hızlı Tanı Testi	Rekombinant K39 antijeni kullanılarak immunokromatografik test	%46,6–81	%96–100	Basit ve hızlı tanı yöntemi, özgüllük ve duyarlılığı yüksek
ELISA	Enzim immunoassay testi	%50–60	%90	Basit tanı yöntemi, kullanılan antijene bağlı olarak değişen duyarlılık ve özgüllük
IFAT	Immunofloresan kullanılarak anti-Leishmanial antikorların tespiti	%51-61	%93	Basit tanı yöntemi, kullanılan antijene bağlı olarak değişen duyarlılık ve özgüllük
PCR	Moleküler yöntem	%87,2-98	%96	Özgüllük ve duyarlılığı yüksek

Bu çalışmada, Leishmaniasis’in serolojik tanısında kullanılabilecek yeni bir biyobelirtecin, HIV pozitif hasta kan örnekleri taranarak araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Serum Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızda, Temmuz-Kasım 2020 tarihleri arasında Portekiz'in Porto kentinde bulunan São João Üniversitesi Hastanesi Bulaşıcı Hastalıklar Bölümü'ne başvuran, yaşları 31-49 arasında değişen, 78 HIV pozitif hastadan alınan serum örneği kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastalara, yapılacak olan çalışma konusunda bilgi verildikten sonra onayları alınmıştır. Çalışma Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Kan örnekleri 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, serum kısmı ayrılarak, *Leishmania*'ya karşı antikor varlığının araştırılacağı ELISA testinde kullanılmak üzere, -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada semptomatik VL hastalarından alınan örnekler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 2.2. ELISA Testinde Kullanılan Antijenler

ELISA testinde aşağıda belirtilen antijenler kullanılmış olup, kullanılan tüm antijenler DC (detergent compatible) TM Protein Assay (BioRad, Germany) ile ölçülerek, tek kullanımlık alikvatlar halinde -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

- Çözünür promastigot *Leishmania* antijeni (**SPLA**: soluble promastigote *Leishmania* antigen).
- *Leishmania* rekombinant proteinleri- *L. infantum* cytosolic trypanredoxin peroxidase (**LicTXNPx**) (**CPx**).
- Rekombinant **rK28** antijeni.
- Çözünür *Escherichia coli* antijeni (**SECA**: soluble *Escherichia coli* antigens).

SPLA, LicTXNPx ve SECA alikvatları Santarem ve ark. (2010) tarafından tanımlanan yöntem ile Parazit Hastalıklar Grubu (i3S, Porto) tarafından hazırlanmıştır.

SPLA için, ilk olarak *Leishmania* promastigotları kültüre edilmiştir. Beş günlük kültürler fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkanmıştır. 3,500 g'de, 4 °C'de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet, 1 mM fenil metil sülfonil florür proteaz inhibitörü içeren fosfat tamponu içerisinde  $10^8$  parazit/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiş ve parazitlerin rüptürü için 10 donma-çözülme döngüsüne tabi tutulmuştur. Elde edilen süspansiyon 13,000 g'de, 4 °C'de, 30 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı ayrılmıştır. SPLA miktarı ölçülerek, saklanmıştır (Santarem ve ark., 2010).

Rekombinant protein LicTXNPx, Ni-NTA kolonu (Qiagen) kullanılarak afinite kromatografisi ile saflaştırılmış ve N-terminalinde altı histidin kalıntısı içeren bir rekombinant protein olarak elde edilmiştir. Elde edilen LicTXNPx miktarı ölçülmüş ve tek kullanımlık alikvatlar halinde -80 °C'de saklanmıştır (Santarem ve ark., 2010). LicTXNPx'in leishmaniasis tanısında multiparametrik serolojik yaklaşımla kullanımı ilk kez çalışmamızda araştırılmıştır.

Liyofilize rK28 antijeni, Infectious Disease Research Institute (Seattle, USA)'den temin edilmiştir. 0,22 µm por çaplı membran filtreden geçirilmiş deiyonize su içerisinde süspansiyon edilerek, miktarı ölçülmüş ve tek kullanımlık alikvatlar halinde -80 °C'de saklanmıştır (Santarem ve ark., 2010).

SECA, Lima ve ark. (2019) tarafından tanımlanan yöntem ile hazırlanmıştır (Lima ve ark., 2019). Agar plaklarında 37 °C'de bir gece inkübe edilmiş *E. coli*'nin DH5-α suşundan tek koloni alınarak, Luria Bertani Broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) besiyerine ekim yapılmıştır. 37 °C'de bir gecelik inkübasyon sonrasında bakteri kültürünün yoğunluğu 600 nm'de ölçülmüştür. İnkübasyon için 3 saat daha beklenmiş ve 4000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet 1 mM fenil metil sülfonil florür proteaz inhibitörü içeren fosfat tamponu içinde süspansiyon edilmiş ve bakterilerin rüptürü için 10 kez donma-çözülme döngüsüne tabi tutulmuştur. Elde edilen süspansiyon 13,000 g'de, 4 °C'de, 30 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı ayrılmıştır. Miktarı ölçüldükten sonra tek kullanımlık alikvatlar halinde -80

°C’de saklanmıştır (Lima ve ark. 2019). Bu çalışmada SECA antijeni kontrol olarak kullanılmıştır.

### **2.3. Enzim Bağlı Immunosorbent Testi (ELISA)**

ELISA testi düz tabanlı, 96 kuyucuklu mikrolaklarda (Greiner Bio-One GmbH, Germany) yapılmıştır. Bunun için mikrolaklar ilk olarak, 5 µg/ml LicTXNPx / 100 µg/ml rK28 / 10 µg/ml SPLA veya 10 µg/ml SECA antijenlerini içeren 50’şer µl kaplama tamponu (0,05M karbonat/bikarbonat tampon - 4 °C’de pH’sı 9,6) ile kaplanmıştır. Antijenler ile kaplanan mikrolaklar bir gece boyunca 4 °C’de bekletilmiştir. Ertesi gün mikrolakların kuyucuklarının içinde bulunan kaplama tamponları dökülerek, kuyucukların içine pH’sı 7,4’e ayarlanmış, %10 az yağlı süt (Milco, Nestle) içeren 200’er µl fosfat tampon ilave edildikten sonra 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası mikrolakların kuyucukları %0,05 Tween 20 içeren fosfat tampon (PBS-T) ile yıkanmıştır (BioTek ELx50 Microplate Strip Washer, USA).

Serum örnekleri %1 az yağlı süt içeren PBS-T ile 1:400 oranında dilüe edildikten sonra kuyucuklara 100’er µl olarak ilave edilmiştir. Bu işlem duplike olarak yapılmıştır. Mikrolaklar 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol kuyucuklarına test edilen her bir antijen için 100’er µl, %1 az yağlı süt içeren PBS-T ile 1:500 oranında dilüe edilmiş pozitif kontrol konulmuştur. Pozitif kontrol olarak, VL tanısı doğrulanmış ve iyileşmiş hasta örnekleri kullanılmıştır.

PBS-T ile yıkama işlemi sonrasında kuyucuklara 100’er µl, %1 az yağlı süt içeren PBS-T ile 1:10000 oranında dilüe edilmiş Anti-Human IgG-Peroksidaz (Sigma, USA) konularak, 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası mikrolaklar PBS-T ile yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 100’er µl, 0,5 mg/ml o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma, USA) ilave edilerek, 10 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Çalışma sırasında OPD’nin aktivasyonu için hidrojen peroksit (Sigma-ALDRICH, Germany) kullanılmıştır. Reaksiyonun durdurulması için

kuyucuklara 50'şer µl 3M HCl eklenmiştir. Kuyucukların absorbans değerleri 492 nm'de ELISA Plate Reader (Synergy HT, BioTek Instruments, USA) kullanılarak ölçülmüştür.

Varyans katsayısı (standart sapma/ortalama) %25'ten büyük olan tekrarlar gözden geçirilerek, tekrar edilmiştir.

#### **2.4. Dolaylı Floresan Antikor Testi (IFAT)**

IFAT, düşük çapraz reaksiyon insidansı ile yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterir. Bu nedenle, serolojik açıdan altın standart olarak kabul edilir. Çalışmamızda, ELISA ile eşik değerinin (cut off değeri) üzerinde seroreaktivite gösteren örnekler aynı zamanda IFAT ile de test edilmiştir.

Serum örneklerinin IFAT analizleri kuyucuk başına  $5 \times 10^4$  *L. infantum* promastigotu (MHOM/MA/67/ITMAP-263) kullanılarak yapılmıştır. Duraklama fazında bulunan *L. infantum* promastigotları, pH'ı 7,2'ye ayarlanmış fosfat tamponu ile, 1800 g'de 10 dakika süre ile santrifüj edilerek üç kere yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında promastigotlar fosfat tampon içerisinde süspansiyon edilmiştir. Hazırlık aşamasından geçirilen promastigotlar, IFAT lamalarına yerleştirilmiş, havada kurutulmuş ve daha sonra -20 °C'de 1 saat asetona daldırılarak fikse edilmiştir. Havada kurutulan lamalar, -20 °C'de saklanmıştır.

IFAT ile test edilecek olan serum örnekleri, pozitif ve negatif kontroller, fosfat tamponu içinde (1X) iki katlı seri dilüsyonları (1:40 ve 1:80) hazırlanarak, her bir kuyucukta 15 µl olacak şekilde değerlendirilmiştir. Her bir örnekten kuyucuklara iki tekrarlı olarak konulmuştur. IFAT lamı 37 °C'de, nemli ortamda, 30 dakika inkübe edilmiştir.

IFAT testinde pozitif kontrol olarak VL tanısı doğrulanmış hasta örnekleri, negatif kontrol olarak da VL öyküsü olmayan ve ELISA ile negatif olarak değerlendirilen hasta örnekleri kullanılmıştır.

İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için lam ilk aşamada %0,01 Tween 80 içeren fosfat tamponu (1X) ile durulanmıştır. Daha sonra 5 dakika süre %0,01 Tween 80 içeren fosfat tamponu (1X) ile çalkalamalı olarak yıkanmıştır. Temiz bir solüsyon kullanılarak çalkalamalı yıkama işlemi 5 dakika daha uygulanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında lam distile sudan geçirilerek, kurutulmuştur.

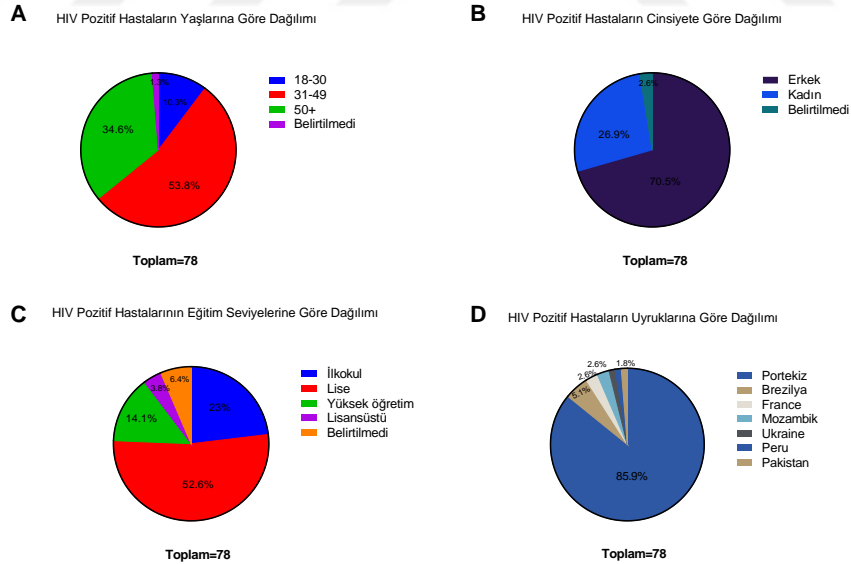
Her bir kuyuya, %0,01 Evans mavisi içeren fosfat tamponu (1X) ile seyreltilmiş, 10 µL Human Fluorescent Anti-Immunoglobulin Conjugate (FITC Conjugate Goat Anti Human IgG (γ-chain specific) (Sigma, USA) konulmuştur. Sekonder antikorlar, üretici firma önerileri doğrultusunda 1:32 oranında seyreltilmiştir. Lam, 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkama işlemi yukarıda belirtilen prosedür ile yapılmıştır.

Lam kurutulduktan sonra, yüzeyine immünofloresan mounting medium eklenerek, bir lamel ile kapatılmıştır. Kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra floresan mikroskobu (Nikon Eclipse E400, Japan) ile 40X büyütmede incelenmiştir. 1:80 ve üstü titreler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Pintado ve ark., 2001; Marques ve ark., 2007).

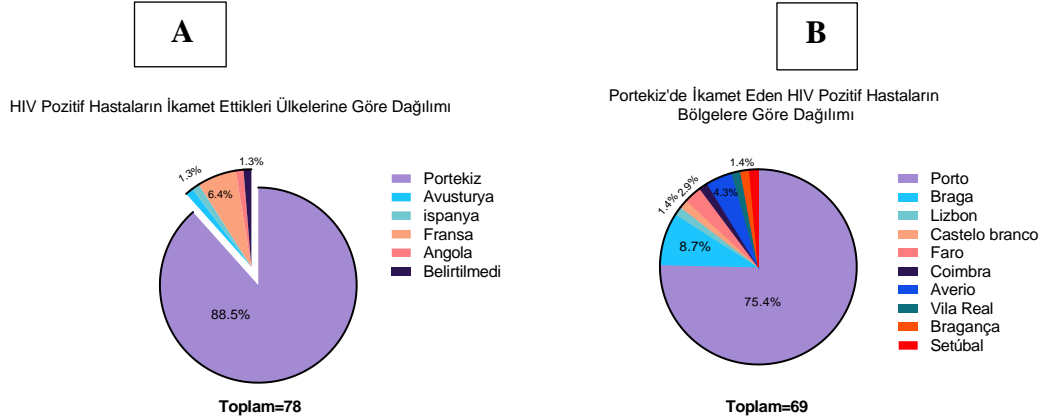
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Serum Örnekleri Kullanılan HIV Pozitif Hastaların Çeşitli Özelliklerine Göre Dağılımı

Çalışmada, Temmuz-Kasım 2020 tarihleri arasında São João Üniversitesi Hastanesi Bulaşıcı Hastalıklar Bölümü'ne başvuran HIV pozitif 78 hastadan alınan serum örneği kullanılmıştır. HIV pozitif hastaların yaş aralıklarına göre dağılımı %53,8 31-49 yaş, %34,6 50 yaş üzeri, %10,3 18-30 yaş olarak Şekil 3.1A'da gösterilmiştir. Cinsiyetleri %70,5 erkek, %26,9 kadın olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1B). Hastaların eğitim seviyelerine göre dağılımı %52,6 lise, %23 ilkökul, %14,1 lisans, %3,8 lisansüstü olarak Şekil 3.1C)'de gösterilmiştir. Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların büyük çoğunluğunun Portekiz vatandaşı (%85,9) olduğu, daha düşük oranlarda Brezilya (%5,1), Fransa (%2,6), Mozambik (%2,6), Ukrayna, Peru ve Pakistan ülkelerinin vatandaşları olduğu görülmüştür (Şekil 3.1D).



Şekil 3.1. Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların yaş (A), cinsiyet (B), eğitim seviyelerine (C) ve uyruklarına (D) göre dağılımı.



**Şekil 3.2.** Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların ikamet ettikleri ülkelere göre dağılımı (A) ve Portekiz’de ikamet eden hastaların bölgelere göre dağılımı (B).

Serum örneği alınan HIV pozitif hastaların ikamet ettikleri ülkelere göre dağılımı Şekil 3.2A’da verilmiştir. Buna göre hastaların büyük çoğunluğunun %88,5 oranı ile Portekiz’de daha düşük oranlarda Fransa (%6,4), Avusturya, İspanya, Angola vd. ülkelerde ikamet ettiği görülmüştür. Portekiz’de ikamet eden hastaların Portekiz içindeki bölgelere göre dağılımı Şekil 3.2B’de gösterilmiştir.

### 3.2. ELISA Test Sonuçları

#### 3.2.1. Eşik (Cut off) Değerinin Belirlenmesi

*Leishmania* spp. spesifik antijenleri SPLA, LicTXNPx, rK28 ve kontrol olarak kullanılan SECA antijenine karşı serolojik yanıtları değerlendirmek için ilk olarak her antijen için eşik (cut off) değeri hesaplanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Örneklerin istatistiksel verileri.

	rk28	SPLA	CPx	SECA
Örnek sayısı	78	78	78	78
Minimum	0	0	0	0,003
% 25 yüzdilik	0	0,004	0,004	0,085
Medyan	0,003	0,007	0,008	0,156
% 75 yüzdilik	0,008	0,012	0,014	0,304
Maksimum	0,127	0,061	0,062	1,156
Aralık	0,127	0,061	0,062	1,153
Ortalama	0,006	0,010	0,010	0,218

<b>Standart sapma</b>	0,011	0,010	0,009	0,188
<b>Standart hata</b>	0,001	0,001	0,001	0,015
%95 den düşük güven aralığı ortalaması	0,004	0,008	0,009	0,188
%95 den yüksek güven aralığı ortalaması	0,007	0,012	0,012	0,248

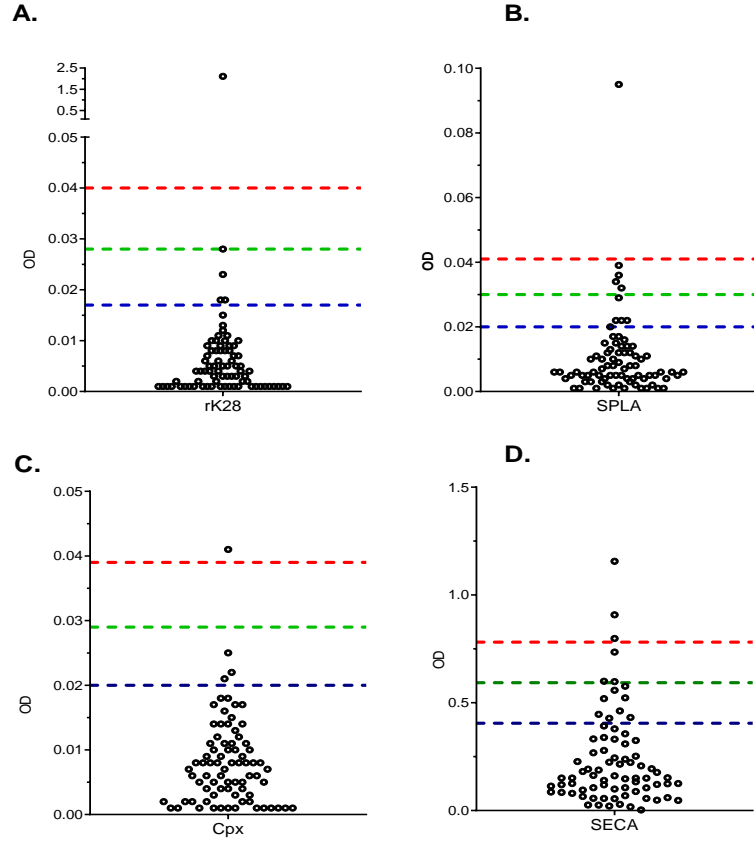
GraphPad Prism yazılımı kullanılarak, dört antijenin optik yoğunlukları analiz edilmiş ve her antijen için ortalama OD (Optic Density) ve standart sapma değerleri elde edilmiştir (Çizelge 3.1). Her antijen için ortalama OD + 1StDev, ortalama OD + 2 StDev ve ortalama OD + 3 StDev kullanılarak eşik değerleri belirlenmiştir. OD ortalaması+2 StDev (%95 CI) değerleri eşik değeri olarak seçilmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Her antijen için eşik değerinin belirlenmesi.

	<b>rk28</b>	<b>SPLA</b>	<b>CPx</b>	<b>SECA</b>
<b>Örnek sayısı</b>	78	78	78	78
Ortalama OD Değeri	0,006	0,010	0,010	0,217
Standart Sapma Değeri	0,011	0,010	0,009	0,188
<b>Eşik Değeri (Ortalama+2 Std Sapma)</b>	<b>0,028</b>	<b>0,030</b>	<b>0,029</b>	<b>0,593</b>
Ortalama+1 Std Sapma	0,017	0,020	0,020	0,405
Ortalama+3 Std Sapma	0,040	0,041	0,039	0,781

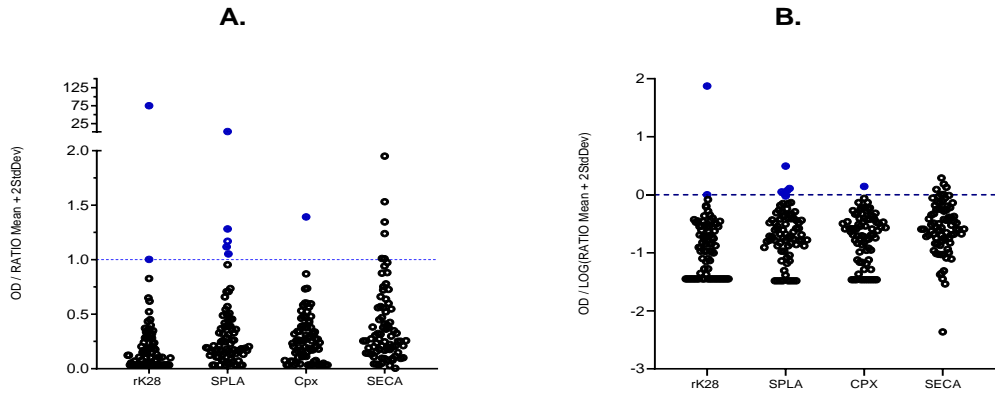
### 3.2.2. ELISA Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her antijen için Çizelge 3.2'de elde edilen eşik değerleri göz önüne alınarak veriler değerlendirilmiştir. rK28 antijeni için, eşik değeri (Ortalama+2 Std Sapma) göz önüne alınarak, seropozitite 6/78 (%7,7) olarak bulunmuştur. Aynı şekilde diğer antijenler için eşik değerleri göz önüne alındığında SPLA için seropozitite 6/78 (%7,7) olarak, CPx için seropozitite 1/78 (%1,3) olarak bulunmuştur. Değerlendirilen örneklerin bir tanesi hem rK28 hem de SPLA için seropozitif olarak bulunurken, farklı bir örnek de hem SPLA hem de CPx için seropozitivite belirlenmiştir (Şekil 3.3).



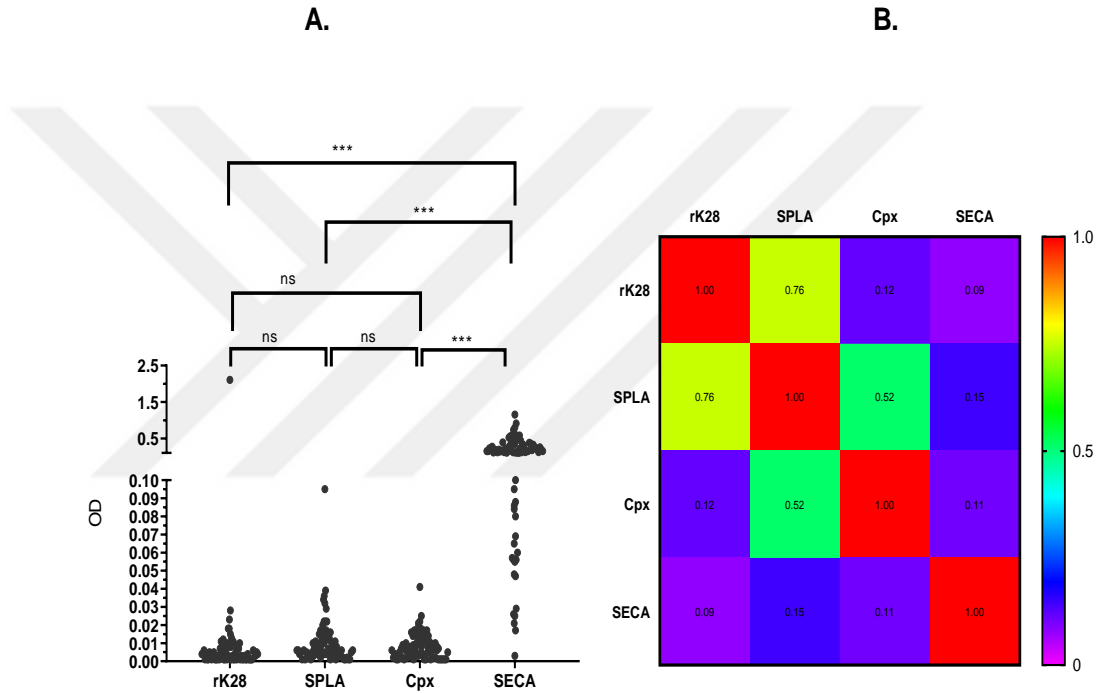
**Şekil 3.3.** ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi (rK28 antijeni (A), SPLA antijeni (B), CPx antijeni (C), SECA antijeni (D)), (n=78), (OD değerleri 492 nm’de ölçülmüştür) (mavi yatay kesikli çizgi: Ortalama+1 Std Sapma) (yeşil yatay kesikli çizgi: Ortalama+2 Std Sapma) (kırmızı kesikli çizgi: Ortalama+3 Std Sapma).

Normalleştirilmiş OD değerlerinin oranı, y eksenindeki bir "eşik değeri" haline gelmiştir. Şekil 3.4A ve Şekil 3.4B’de mavi noktalar pozitif değerleri ifade etmektedir.



**Şekil 3.4.** Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri. (n=78), ((A) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) oranı, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir, (B) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) logaritması, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir).

Çalışmamızda kullanılan dört antijen arasındaki korelasyon Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. En iyi korelasyon SPLA ve rK28 antijenleri arasında görülürken, SPLA ve CPx antijenlerinin de korele olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte CPx ve rK28 antijenleri arasında korelasyon saptanmamıştır. Kontrol olarak kullanılan SECA ve *Leishmania* antijenleri arasında korelasyon görülmemiştir. Elde edilen bu sonuçlar, çalışmada kullanılan antijenlerin özgünlüğünün göstergesidir (Şekil 3.5).

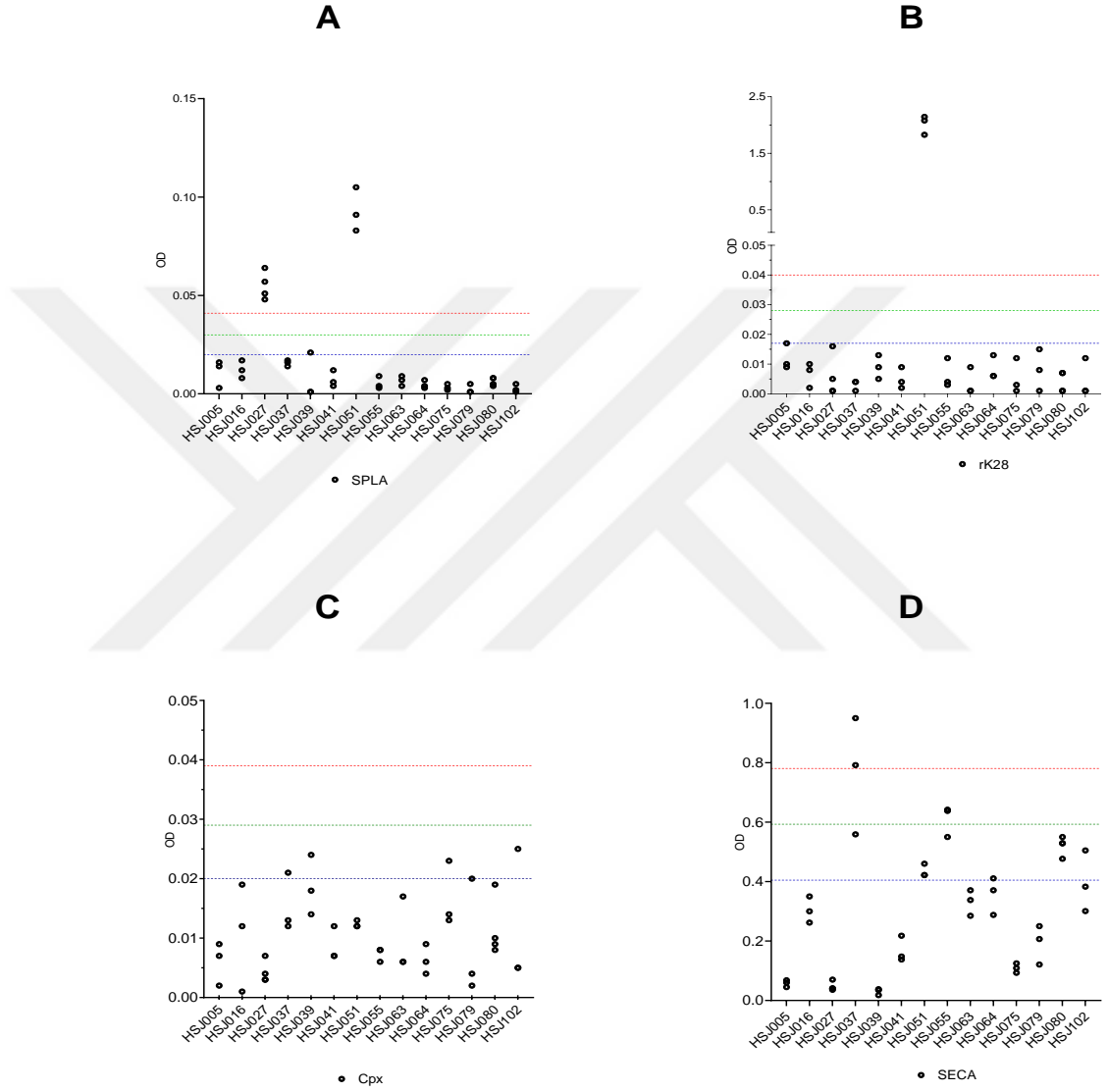


**Şekil 3.5.** Antijenlerin (rK28, SPLA, CPx, SECA) seroreaktivite değerlerine göre korelasyonu ((A) Korelasyon Tukey'in çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiştir) (n=78) (OD değerleri 492 nm'de ölçülmüştür) (\*\*\*= P<0.001, s>0.05, ns=anlamlı değil) ((B) Korelasyon Pearson Korelasyon Katsayısı'na göre değerlendirilmiştir).

### 3.2.3. ELISA Test Sonuçlarının Doğrulanması

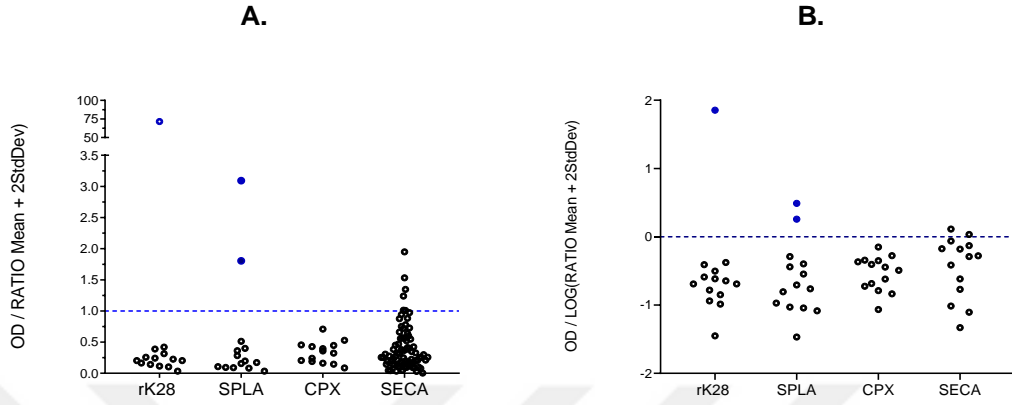
ELISA Test sonuçlarını doğrulamak için, OD değeri, OD Ortalama+1 Std Sapma'nın üzerinde olan bütün örnekler tekrarlanmıştır. Seçilen numunelerin (n=14) her biri en az üç bağımsız tekrar ile test edilmiştir. Test sonuçlarına göre iki hastanın serumunun (HSJ027, HSJ051) SPLA antijenine karşı seroreaktivite gösterdiği

doğrulanmıştır. Bu hastalardan birinin serumu (HSJ051) ayrıca rK28 antijenine karşı seroreaktivite göstermiş olup, hiçbir hastanın serumu CPx antijenine karşı seroreaktivite göstermemiştir (Şekil 3.6).



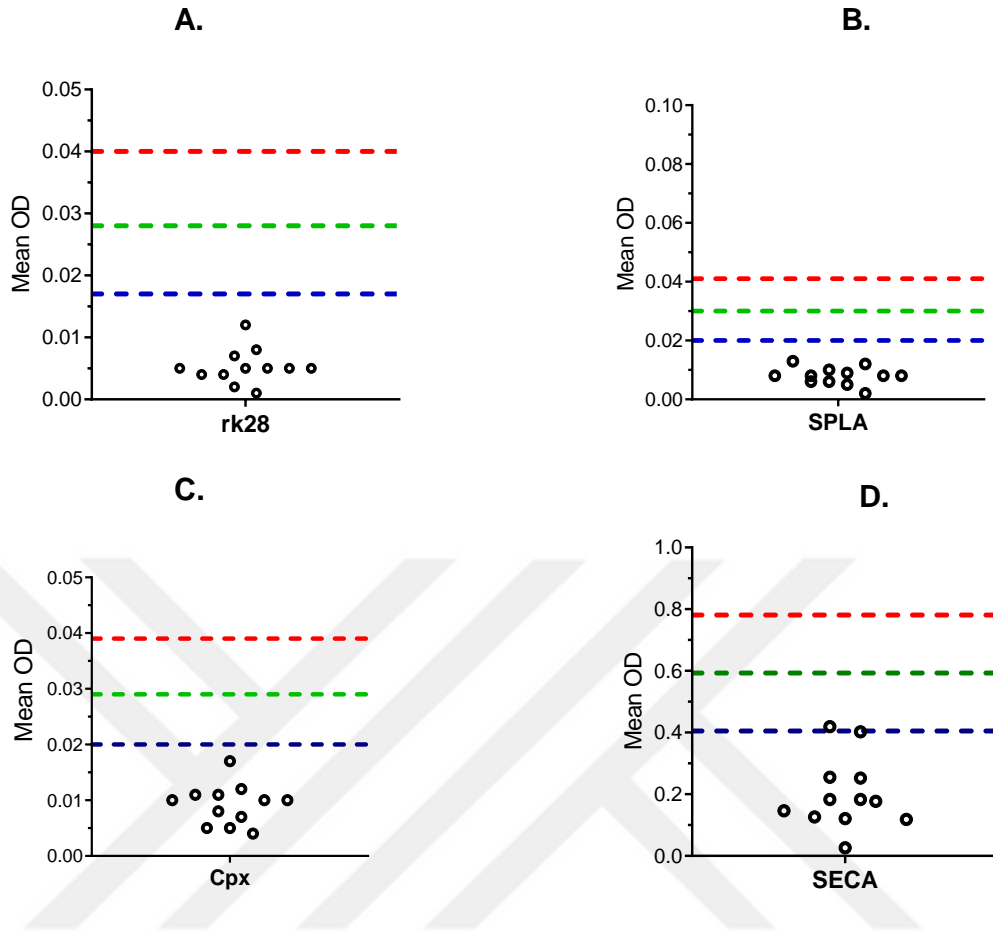
**Şekil 3.6.** ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi (rK28 antijeni (A), SPLA antijeni (B), CPx antijeni (C), SECA antijeni (D)), (n=14), (OD değerleri 492 nm’de ölçülmüştür) (mavi yatay kesikli çizgi: Ortalama+1 Std Sapma değeri) (yeşil yatay kesikli çizgi: Ortalama+2 Std Sapma değeri) (kırmızı kesikli çizgi: Ortalama+3 Std Sapma değeri).

Normalleştirilmiş OD değerlerinin oranı, y eksenindeki bir "eşik değer" haline gelmiştir. Şekil 3.7A ve Şekil 3.7B’de mavi noktalar pozitif değerleri ifade etmektedir.



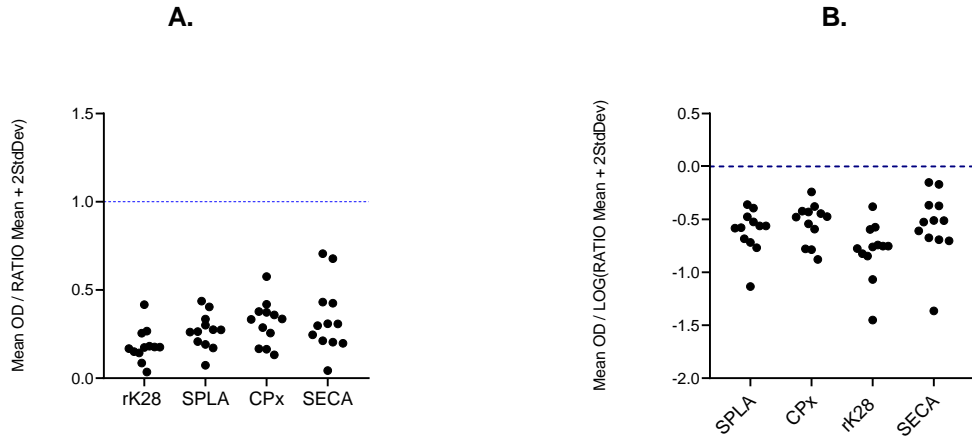
**Şekil 3.7.** Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri. (n=14), ((A) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) oranı, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir, (B) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) logaritması, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir).

Yukarıda verilen doğrulama testi OD değeri, OD Ortalama+1 Std Sapma 'nın altında olan ve rastgele seçilen 12 örnek için tekrarlanmıştır. Her bir örnek en az üç bağımsız tekrar ile test edilmiştir (Şekil 3.8). Doğrulama test sonuçları göz önüne alındığında ortalama OD değerlerinin test edilen tüm *Leishmania* antijenleri için eşik değerlerinin (Ortalama+2Std Sapma) altında kaldığı doğrulanmıştır.



**Şekil 3.8.** ELISA test sonuçlarının istatistiksel analizi (rk28 antijeni (A), SPLA antijeni (B), CPx antijeni (C), SECA antijeni (D)), (n=12), (OD değerleri 492 nm’de ölçülmüştür) (mavi yatay kesikli çizgi: Ortalama+1 Std Sapma değeri) (yeşil yatay kesikli çizgi: Ortalama+2 Std Sapma değeri) (kırmızı kesikli çizgi: Ortalama+3 Std Sapma değeri).

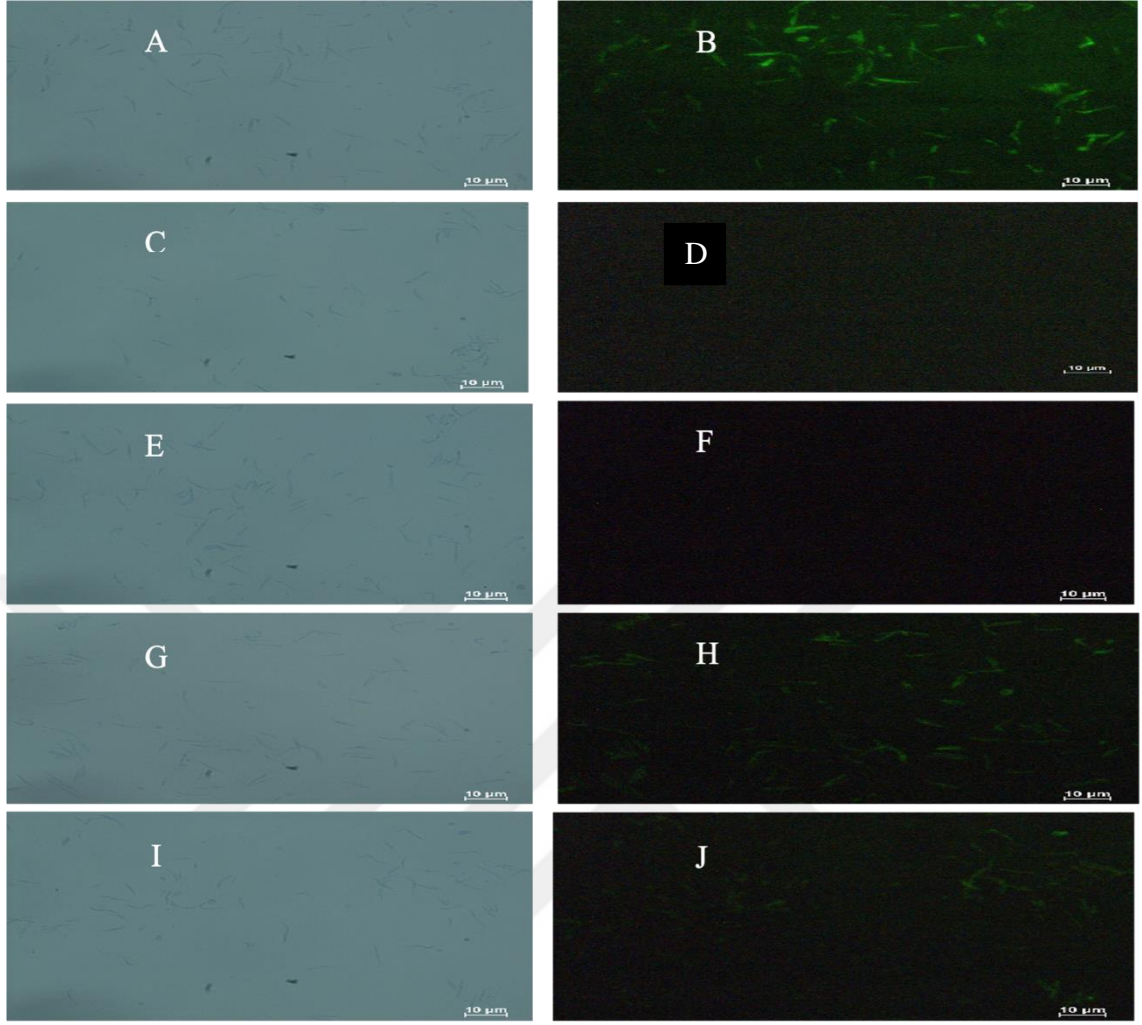
Normalleştirilmiş OD değerlerinin oranı, y eksenindeki bir "eşik değeri" haline gelmiştir. Şekil 3.9A ve Şekil 3.9B’de mavi noktalar pozitif değerleri ifade etmektedir.



**Şekil 3.9.** Test edilen antijenlerin seroreaktivite değerleri. (n=12), ((A) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) oranı, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir, (B) 492 nm'deki optik yoğunluğun (OD) logaritması, her antijen için eşik değeri ile normalleştirilmiştir).

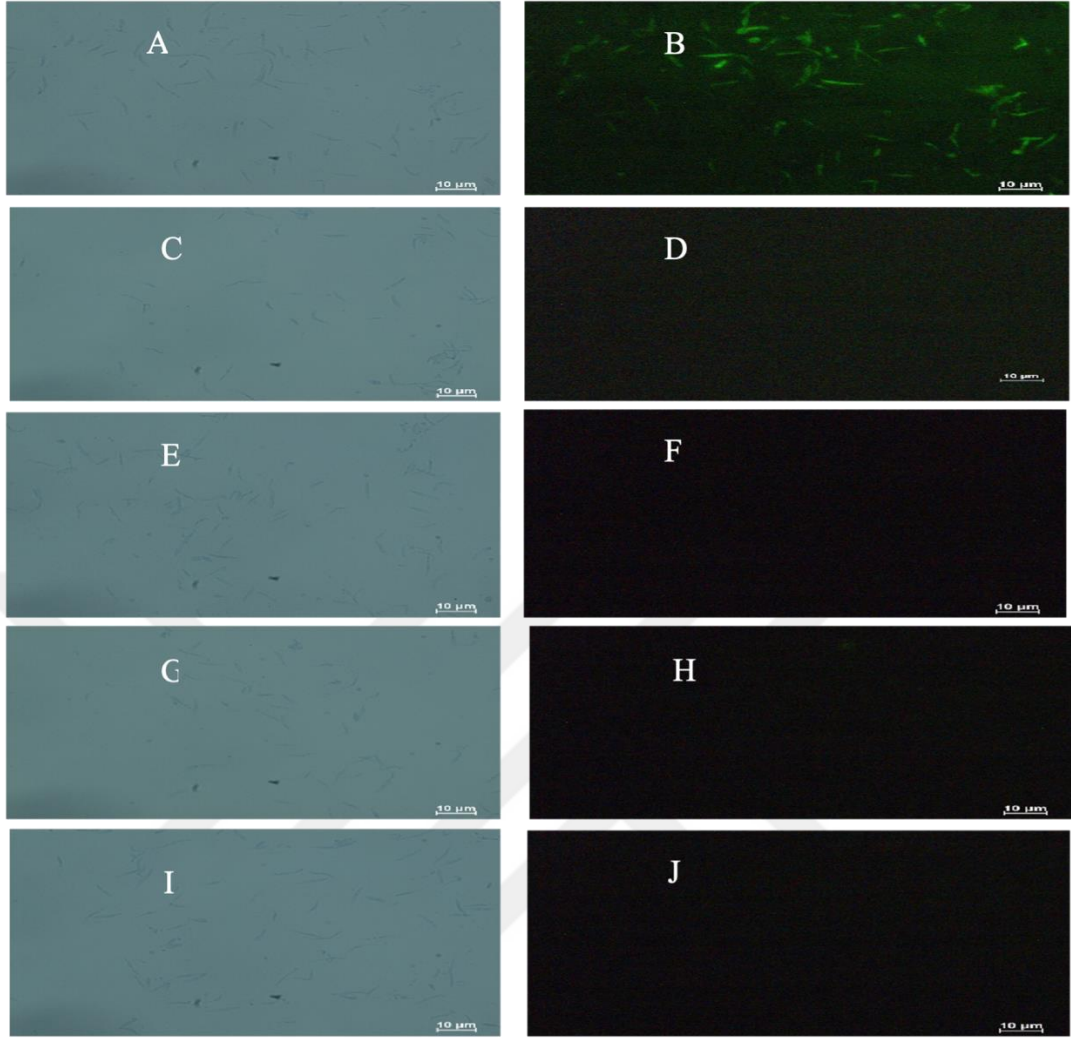
### 3.3. IFAT Test Sonuçları

ELISA ile eşik değerinin üzerinde seroreaktivite gösteren örnekler aynı zamanda IFAT ile de test edilmiştir. ELISA testi ile spesifik antijenlere karşı seropozitif bulunan iki örneğe (HSJ027, HSJ051), Indirect Fluorescent Antibody Testi (IFAT) uygulanmıştır. Örnek serumları ile pozitif ve negatif kontroller iki tekrarlı olarak ayrı kuyucuklara yerleştirilmiştir. Hazırlanan lam, 40X büyütmede floresan mikroskobu altında okunmuştur. Test edilen her iki (1:40 ila 1:80) seyreltmede de HSJ051 ile floresan tespit edilmiş ve titrenin ELISA sonuçlarıyla uyumlu olduğu (1:80) (pozitif IFAT  $\geq$  1:80) görülmüştür (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** H5N1'in parlak alan (sağ panel) ve immüno Floresan mikroskopi (sol panel) görüntüleri (40x) A= Pozitif kontrol (1:80), B= Pozitif kontrol (1:80), C=Negatif kontrol (1:40), D= Negatif kontrol (1:40), E= Negatif kontrol, sekonder antikor (1:32) seyreltme, F= Negatif kontrol, sekonder antikor (1:32), G= H5N1(1:40), H= H5N1 (1:40), I= H5N1(1:80), J= H5N1 (1:80).

Sonuçlar, pozitif ve negatif kontrollerle karşılaştırıldığında (1:40 ila 1:80) dilüsyonlarda örnek H5N1 ile hiçbir floresan tespit edilmemiş bu nedenle negatif olarak not edilmiştir (Şekil 3.11).



**Şekil 3.11.** HSJ027'in parlak alan (sağ panel) ve immünofloresan mikroskopi (sol panel) görüntüleri (40x) A= Pozitif kontrol (1:80), B= Pozitif kontrol (1:80), C=Negatif kontrol (1:40), D= Negatif kontrol (1:40), E= Negatif kontrol, sekonder antikor (1:32) seyreltme, F= Negatif kontrol, sekonder antikor (1:32), G= HSJ027 (1:40), H= HSJ027 (1:40), I= HSJ027 (1:80), J= HSJ027 (1:80).

### 3. TARTIŞMA

Leishmaniasis ciddi sağlık sorunlarına neden bulaşıcı ilk on hastalık arasında yer almaktadır. Epidemiyolojisi ve ekolojisi karmaşık olan bu hastalığın tanısında kolay uygulanabilir tanı araçlarının bulunmaması hastalığın sürveyansını zorlaştırmaktadır (Gradoni ve ark., 2017). VL, *Leishmania*'nın endemik olduğu bölgelerde HIV ile enfekte hastalarda giderek yaygınlaşan bir enfeksiyondur (García-García ve ark., 2006; Guedes ve ark., 2021). Buna rağmen hala fırsatçı enfeksiyon olarak kabul edilmemekte ve AIDS bildirim sistemlerinde nadiren rapor edilmektedir (WHO, 2000; Pasquau ve ark., 2005).

İmmünokompetan bireylerle karşılaştırıldığında, HIV pozitif hastalarının *Leishmania* enfeksiyonuna yakalandıklarında aktif VL'ye ilerleme riski daha yüksektir, ancak vakaların çoğu asemptomatik veya subklinik düzeyde kalır. Herhangi bir semptom göstermeden parazite maruz kalan HIV pozitif hastaların yüzdesi bilinmemektedir. Bu durum HIV ile koenfekte hastalarda latent *Leishmania* enfeksiyonu varlığının taranması ve profilaktik tedavinin gerekliliği konusunu gündeme getirmektedir (Gradoni ve ark., 2017).

*Leishmania* / HIV ko-enfeksiyonu, özellikle güney Avrupa'da görülmektedir. Bu bölgede görülen VL vakalarının %25-%75'i HIV hastalığı ile ilişkilidir. HIV ile enfekte olan hastaların %1,5-%9'u yeni VL gelişimi veya hastalığın nüksetmesi riski ile karşı karşıyadır (WHO, 1997).

1985 yılından önce, Portekiz'de *Leishmania* ile enfekte bireylerin çoğunluğunu çocuk hastalar oluşturmaktaydı. 1996 ile 2010 yılları arasındaki dönemde ise enfekte olan hastaların çoğunluğunu HIV pozitif yetişkinlerin oluşturduğu görülmüştür. Antiretroviral tedavinin 1997 yılında kullanıma girmesi ile Portekiz hariç Güney Avrupa'da, *Leishmania*/HIV ko-enfeksiyonunun insidansının azaldığı görülmüştür. Bu durum Portekiz'de HIV ko-enfekte hastalarının çoğunluğunun uyuşturucu kullanıcısı olması ve hastalığın tespitinin, takibinin zorluğu ile ilişkilendirilmiştir (Campino ve Maia, 2010).

Leishmaniasis vakaları tüm ülkede görülmeyle birlikte kuzeyden güneye doğru üç ana endemik odak nokta bulunmaktadır. Bu bölgelerden Alto Douro bölgesi, insanlarda 8.3/100.000 vaka ve köpeklerde %18,7 seroprevalansı ile en yüksek oranlara sahiptir. Diğer bölgeler olan *Leishmania*/HIV ko-enfeksiyon vakalarının yoğun olduğu metropol Lizbon bölgesi 0.2/100.000 vaka oranına, Güney Portekiz, Algarve bölgesi ise 1.2/100.000 vaka oranlarına sahiptir (WHO, 2011).

Portekiz'de insan viseral leishmaniasis vakalarının bildiriimi 1950'li yıllardan itibaren zorunlu kılınmıştır. Portekiz Ulusal Leishmaniasis Gözlemevi (ONLeish - Observatório Nacional das Leishmaniasis; www.onleish.org), köpek leishmaniasisinin epidemiyolojik takibini ve ayrıca sağlık çalışanları, doktorlar, veterinerler ve araştırmacılar arasında karşılıklı bilgi paylaşımını sağlamak için Eylül 2008'de kurulmuştur (WHO, 2011).

Serolojik testler özellikle VL'nin endemik olduğu bölgelerde HIV pozitif bireylerde asemptomatik VL'in saptanmasında büyük öneme sahiptir (WHO, 2021). Parazitin başarılı bir şekilde eradikasyonundan sonra uzun süre hastanın kanında antikorların bulunması serolojik tanının en büyük dezavantajıdır. Bu nedenle subklinik vakaları geçirilmiş enfeksiyonlardan ayırt etmek (Srividya ve ark., 2012) ve serolojik yöntemler kullanarak hastalığın tedavisini değerlendirmek zordur. Ticari olarak temin edilebilen serolojik testlerin, HIV ile enfekte hastalarda duyarlılıkları düşüktür (Santarém ve ark., 2005).

Geçmiş yıllarda ELISA testi ham veya çözünür amastigot veya promastigot antijenleri kullanılarak gerçekleştirilmekteydi. Ancak ilerleyen yıllarda çapraz reaktivite nedeniyle, immünolojik tanının duyarlılığını ve özgüllüğünü önemli ölçüde arttıran kinesin ilişkili bir protein olan rK39 gibi çeşitli rekombinant antijenler kullanılmaya başlanmıştır. Yeni nesil füzyon antijeni rk28, Afrika'da rk39 ile karşılaşılan düşük duyarlılık nedeniyle geliştirilmiştir (Srividya ve ark., 2012).

Bu çalışmada yeni bir biyobelirteç olarak *Leishmania infantum* cytosolic trypanredoxin peroxidase (LicTXNPx veya CPx antijen) ile Soluble Promastigote

*Leishmania* Antigen (SPLA) ve rekombinant antijen rK28'in immünojenitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu antijenlerin HIV ile enfekte subklinik VL'nin saptanmasında tanısal açıdan kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.

LicTXNPx, *Leishmania infantum* sitoplazmasında bulunan ve paraziti oksidatif stresten koruyan farklı enzimatik yollarda görev alan peroksiredoksinlerden birisidir (Castro ve ark., 2002). Santarém ve ark. (2005) LicTXNPx antijeninin VL tanısında ve hastalığın prognozunda kullanılabileceğini önermişlerdir. Çalışmalarında Portekiz'de endemik bir bölgede yaşayan enfekte çocuklardan elde edilen serumları kullanarak, beş farklı rekombinant proteinin (LmSIR2, LmS3a, LmTXNPx, LicTXNPx and LiTXN1) ELISA yöntemi ile antileishmanial antikorların saptanmasındaki etkinliğini araştırmışlardır. LicTXNPx diğerleri arasında en yüksek duyarlılığı %78 ve özgüllüğü %94 göstermiştir (Santarém ve ark., 2005). Bu çalışmada yeni bir biyobelirteç olan *Leishmania infantum* cytosolic trypanredoxin peroxidase (LicTXNPx veya CPx antigen)'ın tanıdaki etkinliği ilk kez HIV pozitif hasta kan örnekleri taranarak araştırılmıştır.

Çalışmada *Leishmania*'ya yönelik olmayan hümoral yanıtı belirlemek amacıyla, *Leishmania* antijeni SECA kullanılmıştır. Böylece SPLA, Cpx ve rK28'in spesifik olmama olasılığı ve hastaların üretken hümoral tepkiler oluşturma durumu da incelenmiştir (Lima ve ark., 2019).

Bu çalışmada üç *Leishmania* antijeni kullanılarak yapılan ELISA testinde 2 (%2,6) HIV hastasında anti-*Leishmania* antikorları tespit edilmiştir. Bu hastaların her ikisinin de 31-49 yaş aralığında yer alan erkek hastalar olduğu görülmüştür. Literatürde VL/HIV koenfeksiyonunun çoğunlukla erişkin erkek hastalarda görüldüğü bildirilmektedir. Bizim çalışma sonuçlarımızda bu açıdan literatür ile uyumludur (Marques ve ark., 2007; Pintado ve ark., 2001). Akdeniz bölgesinde, HIV enfeksiyonunun normal görülme oranları ile ilişkili olarak, *Leishmania*/HIV koenfeksiyonu esas olarak yetişkin erkeklerde görülmektedir (Campino ve ark., 1997). Bununla birlikte, Garrote ve ark. (2004), leishmaniasis prevalansının kohortlarındaki erkekler ve kadınlar arasında benzer olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda

seroreaktivite gösteren hastaların her ikisinin de Alto Douro bölgesinde (Porto ve Braga bölgeleri) ikamet ettiği görülmüştür.

Çalışmamızda iki hastada SPLA'ya karşı antikorlar tespit edildi. Bu iki hastadan bir tanesinde aynı zamanda rk28'e (en yüksek ortalama OD 2,018 ile) karşı da antikor yanıtı görüldü (Çizelge 4). Hastaların hiçbirinde Cpx antijenine karşı seroreaktivite saptanmadı. SPLA ve rK28 antijenine karşı antikor saptanan hasta serumunda (HSJ051), yapılan IFAT testi sonucunda da seropozitiflik belirlendi. VL tanısı koyulan bu hastanın daha sonra yapılan karaciğer biyopsisinde parazitlerin varlığı mikroskopik olarak gösterilmiştir. Bu sonuç bize HIV hastalarında VL tanısında uygulanan bu testlerin duyarlılık açısından güvenilirliğini yansıtmaktadır.

Hasta HSJ027 numaralı hasta serumu SPLA'a karşı seroreaktivite (ortalama OD 0,055) göstermesine karşın, rk28 ve Cpx antijenlerine karşı seroreaktivite göstermemiştir. Bu hasta serumu IFAT ile incelendiğinde negatif olarak bulunmuştur. Bu durum SPLA ile görülen çapraz reaktivite ile açıklanabilir.

**Çizelge 4.1.** İki seropozitive hasta için dört antijenin ortalama OD değerleri.

Hasta	rk28 (Ortalama OD)	SPLA (Ortalama OD)	Cpx (Ortalama OD)	SECA (Ortalama OD)
HSJ027	0,006	<b>0,055*</b>	0,004	0,047
HSJ051	<b>2,018*</b>	<b>0,094*</b>	0,013	<b>0,441*</b>

\*Ortalama OD değeri, seropozitiflik için eşik değerinden (Mean+Std Dev) daha yüksek olan değer.

Çalışmamızda, herhangi bir leishmaniasis semptomu göstermeyen HIV hastalarında, SPLA ve rK28 arasında iyi derecede korelasyon (0,76), CPx ve SPLA (0,52) arasında ise nispeten iyi bir korelasyon ile seroreaktivite tespit edildiğini görülmüştür. CPx ve rK28 (0,12) arasında ise hiçbir korelasyon saptanamamıştır. Bu üç antijenin özgüllüğünün, HIV pozitif hastaların SECA serolojik yanıtları ile ilişkisiz olduğu kanıtlanmıştır (<0,15) (Şek. 4.8B).

İtalya'da yapılan bir çalışmada çözünür *Leishmania* antijeni (SLA) kullanılarak HIV pozitif hastaların 2/145'inde (%1,4) *L. infantum*'a karşı antikor tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise multiparametrik bir yaklaşımla hastaların %2,6'sı seropozitif bulunmuştur. İtalya'da yapılan çalışmada bildirilen oranın düşük olması, o bölgedeki asemptomatik leishmaniasis insidansının düşük olması ile ilişkilendirilebilir (Colomba ve ark., 2009).

İspanya'nın Castilla-Leon bölegesinde *L. infantum* çözünür antijeni kullanılarak gerçekleştirilen ELISA test sonuçlarına göre, anti-*L. infantum* IgG prevalansı %4,9 olarak bulunmuştur. Çalışmada HIV ile enfekte, intravenöz ilaç kullanıcısı 217 hastanın serumu kullanılmıştır. ELISA testi ile yapılan test sonuçlarına göre taranan serumların 139 tanesi (%64) seropozitif olarak bulunmuştur (Garrote ve ark., 2004). Bu yüksek oran, intravenöz ilaç kullanıcılarının ortak enjektör paylaşımı sonucu bulaş yolu açması ile ilişkilendirilmiştir (Desjeux ve Alvar, 2003).

Güney İran'da, ham çözünür antijen kullanılarak yapılan ELISA testi sonucunda HIV pozitif 251 hastanın 13'ünde (%5,2) antileishmanial antikörler saptanmıştır (Rezaei ve ark., 2018). ELISA testi ile elde edilen oran, bulgularımızın yaklaşık iki katı kadardır. Bu oran, bölgenin İran'ın leishmaniasis için endemik alanlarından biri olduğunu göstermektedir. HIV ile enfekte hastaların serolojik test duyarlılığındaki farklılık göz önüne alındığında, gerçek enfeksiyon oranının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. *Leishmania*/HIV ko-enfekte hastalarda VL tanısını doğrulamak için en az iki serolojik test yapılması gerekmektedir (Ezra ve ark., 2010; Lindoso ve ark., 2016).

Orsini ve ark (2012)' a göre ham suda çözünür *L. infantum* antijenleri (MHOM/Br/74/PP75) kullanılarak gerçekleştirilen ELISA testi ile 381 HIV ile enfekte asemptomatik VL hastasının 41 tanesinde (%10,7) *Leishmania*-reaktif IgG antikörü tespit edilmiştir. Bu oran bizim bulgularımız ile kıyaslandığında yüksek bir orandır. Bu çalışmada rekombinant K39 antijeni (rk39) kullanıldığında %0,8, IFAT kullanıldığında ise %3,9 oranlarında seropozitif HIV hastası saptanmıştır. Çalışma sonuçları bölgede *Leishmania* enfeksiyonu görülme sıklığını yüksek olarak yansıtmasına rağmen bu hastaların hiçbirinde prospektif takip sonucunda hastalık gelişimi görülmemiştir. Bu durumun hastaların çoğunda *Leishmania*'ya karşı yeterli

bağışıklığı sağlayan antiretroviral tedavi nedeniyle olduğu düşünülmüştür (Orsini ve ark., 2012). Antiretroviral tedavi Th1 sitokin düzeylerini arttırarak etkili olmaktadır (de La Rosa ve ark., 2002).

Brezilya'da VL'in endemik olduğu bir bölgede ELISA testinde rK39 antijeni kullanılarak yapılan bir çalışmada %2,48 prevalans oranı bildirilmiştir. Bu oran bizim çalışmamızın sonuçları ile benzerdir. Bu çalışmada oranın düşük bulunması, HIV ile enfekte hastaların antiretroviral tedavi alması sonucu yüksek CD4+ T lenfosit sayısına sahip olmaları ve böylece VL gelişimine karşı korunmaları ile ilişkilendirilmiştir (Guedes ve ark., 2021).

VL'e karşı oluşan bağışık yanıt kişiler arasında heterojen özellik göstermektedir. Bu nedenle, farklı antijenlere karşı saptanan sero-reaksiyonlar, tek bir spesifik tanı aracı kullanılarak elde edilen sonuçlara kıyasla daha duyarlıdır. Çeşitli antijenlerin kombine edilmesi ile geliştirilecek olan tanı araçları özellikle asemptomatik VL tanısında daha etkili olacaktır (Singh ve Sundar, 2015).

HIV pozitif hastalarda VL tanısı için kullanılacak ELISA protokollerinin çoğunluğu sadece tek bir antijen kullanılarak hazırlanmıştır. Bu testlerin çoğunda rekombinant proteinler yerine ham/çözünür antijenler kullanılmıştır (Garrote ve ark., 2004; Colomba ve ark., 2009; Orsini ve ark. 2012; Rezaei ve ark., 2018; Guedes ve ark., 2021). Çalışmamızda, HIV hastalarında asemptomatik VL'nin etkin teşhisi için çoklu antijen yaklaşımı izlenmesinin daha etkili olacağı düşünülmüştür.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

İmmünesupresif hastalarda yüksek mortalite oranına sahip olması nedeniyle HIV pozitif hastalarda Leismaniasis'in erken tanısı çok önemlidir. Serolojik testler özellikle VL'nin endemik olduğu bölgelerde HIV pozitif bireylerde asemptomatik VL'in saptanmasında büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada yeni bir biyobelirteç olarak *Leishmania infantum* cytosolic trypanredoxin peroxidase (LicTXNPx veya CPx antijen) ile Soluble Promastigote *Leishmania* Antigen (SPLA) ve rekombinant antijen rK28'in immünojenitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu antijenlerin HIV ile enfekte subklinik VL'nin saptanmasında tanısal açıdan kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda üç *Leishmania* antijeni kullanılarak yapılan ELISA testinde 2 (%2,6) HIV hastasında anti-*Leishmania* antikorları tespit edilmiştir. SPLA'ya karşı antikor varlığı iki hastada tespit edilirken, bu iki hastanın sadece bir tanesinde aynı zamanda rK28'e karşı da antikor yanıtı olduğu görülmüştür. Hastaların hiçbirinde Cpx antijenine karşı seroreaktivite saptanmamıştır. SPLA ve rK28 antijenine karşı antikor saptanan hasta serumunda, IFAT testi sonucunda da seropozitiflik belirlenmiştir.

Leismaniasis tanısında en az iki farklı yöntem kullanılarak, tanının doğrulanması önerilmektedir. Çalışmamız sonucunda farklı antijenlerin (SPLA, rK28, Cpx) kombine kullanımı ve IFAT uygulanması ile tanının güvenilirliğinin sağlanacağı görülmüştür.

Bu çalışma sınırlı sayıdaki örneklem ile (78 HIV hastası) tamamlanmıştır. Bu hasta grubunda kullanılacak yeni tanı araçları geliştirmek için daha çok hastanın yer aldığı ve farklı antijenlerin denendiği çalışmalar planlanmalıdır.

## ÖZET

### **Bağıklık Sistemi Baskılanmış Hastalarda Leishmaniasis'in Serolojik Tanısı İçin Yeni Biyobelirteçlerin Araştırılması**

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi parazitlerin neden olduğu vektör kaynaklı bulaşıcı bir hastalıktır. Yüksek mortalite oranına sahip olması nedeniyle HIV pozitif hastalarda Leishmaniasis'in erken tanısı önemlidir. Serolojik testler özellikle visceral leishmaniasis (VL)'in endemik olduğu bölgelerde HIV pozitif bireylerde asemptomatik VL'in saptanmasında büyük öneme sahiptir.

Bu çalışmada Portekiz'in Oporto bölgesinde leishmaniasis klinik belirtisi olmayan 78 HIV pozitif hasta serolojik açıdan değerlendirilmiştir. Belirtilen hasta grubunda yeni bir biyobelirteç olarak *Leishmania infantum* cytosolic trypanothione peroxidase (LicTXNPx veya CPx antijen) ile Soluble Promastigote *Leishmania* Antigen (SPLA) ve rekombinant antijen rK28'in immünojenitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bu antijenlerin HIV ile enfekte subklinik VL'nin saptanmasında tanılmal açıdan kullanım potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda üç *Leishmania* antijeni kullanılarak yapılan ELISA testinde 2 (%2,6) HIV hastasında anti-*Leishmania* antikorları tespit edilmiştir. SPLA'ya karşı antikor varlığı iki hastada tespit edilirken, bu iki hastanın sadece bir tanesinde aynı zamanda rK28'e karşı da antikor yanıtı olduğu görülmüştür. Hastaların hiçbirinde Cpx antijenine karşı seroreaktivite saptanmamıştır. SPLA ve rK28 antijenine karşı antikor saptanan hasta serumunda, IFAT testi sonucunda da seropozitiflik belirlenmiştir. Leishmaniasis tanısında en az iki farklı yöntem kullanılarak, tanının doğrulanması önerilmektedir. Çalışmamız sonucunda farklı antijenlerin (SPLA, rK28, Cpx) kombine kullanımı ve IFAT uygulanması ile tanının güvenilirliğinin sağlanacağı görülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** ELISA, *Leishmania* spesifik antijenler, Leishmaniasis, Visceral Leishmaniasis/HIV koenfeksiyonu.

## SUMMARY

### **Investigation of New Serological Biomarkers for Diagnosis of Leishmaniasis in Immunocompromised Patients**

Leishmaniasis is a vector-borne infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*. Early diagnosis of Leishmaniasis is important in HIV-positive patients due to its high mortality rate. Serological tests are of great importance in detecting asymptomatic visceral leishmaniasis (VL) in HIV-positive individuals, especially in VL endemic regions.

This study was aimed to evaluate the serologic reactivity of 78 HIV positive patients with no clinical symptoms of leishmaniasis in the region of Oporto, Portugal. In our study, we performed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test using three *Leishmania* specific antigens, *Leishmania infantum* cytosolic trypanothione peroxidase (LicTXNPx, or CPx antigen), soluble promastigote *Leishmania* antigen (SPLA) and the recombinant antigen rk28. Antibodies against SPLA were detected in two patients (2,6%), only one of these two patients also had an antibody response to rk28. No patient reported seroreactivity to Cpx antigen. To further support the result obtained from ELISA, indirect fluorescent antibody test (IFAT) was also performed. The results obtained from IFAT did not overlap the results of ELISA. It is always recommended to perform more than detection techniques to confirm the diagnosis. In our study, by combining three different antigens (SPLA, rk28, Cpx), as well as performing IFAT, we were able to obtain results with higher sensitivity and specificity for antileishmanial antibodies identification.

**Keywords:** ELISA, *Leishmania* specific antigens, Leishmaniasis, Visceral leishmaniasis/HIV coinfection.

## KAYNAKLAR

- AKBAŞ E, (Ed.), (2014), Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi Cilt 1, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı Ankara. Erişim adresi [[https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarlari ve Biyolojik Urunler DB/rehberler/UMS\\_LabTaniRehberi\\_Cilt\\_1.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_1.pdf)]. Erişim tarihi: 24.08.2021.
- AKHOUNDI M, DOWNING T, VOTÝPKA, J, KUHL S, LUKEŠ J, CANNET A, RAVEL C, MARTY P, DELAUNAY P, KASBARI M, GRANOULLAC B, GRADONI L, SERENO D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*. **57**: 1–29.
- ALEMAYEHU B, ALEMAYEHU, M. (2017). Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. *Health Science Journal*, **11**(4):519
- ALVAR J, APARICIO P, ASEFFA A, DEN BOER M, CAÑAVATE C, DEDET JP, GRADONI L, TER HORST R, LÓPEZ-VÉLEZ R, MORENO J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **21**: 334–359.
- ALVAR J, CAÑAVATE C, GUTIÉRREZ-SOLAR B, JIMÉNEZ M, LAGUNA F, LÓPEZ-VÉLEZ R, MOLINA R, MORENO J. (1997). Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**:298–319.
- ALVAR J, VÉLEZ ID, BERN C, HERRERO M, DESJEUX P, CANO J, JANNIN J, DEN BOER M, WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*, **7**(5), e35671.
- ANVERSA L, TIBURCIO M G S, RICHINI-PEREIRA VB, RAMIREZ LE. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, **64**: 281–289.
- BARON S. (Ed.). (1996). *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.**4**:82.
- BESTEIRO S, WILLIAMS RA, COOMBS GH, MOTTRAM JC. (2007). Protein turnover and differentiation in Leishmania. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1063–1075.
- BOELAERT M, RIJAL S, REGMI S, SINGH R, KARKI B, JACQUET D, CHAPPUIS F, CAMPINO L, DESJEUX P, LE RAY D, KOIRALA S, VAN DER STUYFT P. (2004). A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **70**: 72–77.
- BOTANA L, IBARRA-MENESES AV, SÁNCHEZ C, CASTRO A, SAN MARTIN JV, MOLINA L, RUIZ-GIARDIN JM, CARRILLO E, MORENO J. (2019). Asymptomatic immune responders to Leishmania among HIV positive patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **13** (6), e0007461.
- BREWSTER S, ASLETT M, BARKER DC (1998). Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitology Today*, **14**: 437-438.
- CAMPINO L, MAIA C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal [Epidemiology of leishmaniasis in Portugal]. *Acta Medica Portuguesa*, **23**: 859–864.
- CAMPINO L, SANTOS-GOMES GM, PRATLONG F, ANTUNES F, MAURÍCIO I, DEDET JP, ABRANCHES P. (1997). HIV/Leishmania co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of Leishmania. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **91**: 433–436.
- CASTRO H, SOUSA C, SANTOS M, CORDEIRO-DA-SILVA A, FLOHÉ L, TOMÁS AM. (2002). Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and mitochondrial peroxiredoxins in Leishmania infantum. *Free Radical Biology & Medicine*, **33**: 1552–1562.
- CAVALCANTI ATDAE, MEDEIROS Z, LOPES F, ANDRADE LDD, FERREIRA VDM, MAGALHÃES V, MIRANDA-FILHO DDB (2012). Diagnosing visceral leishmaniasis and HIV/AIDS co-infection: a case series study in Pernambuco, Brazil, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **54**: 43-47.

- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2020). Parasites-Leishmaniasis. Erişim adresi: [ <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>]. Erişim tarihi: 03.08.2021.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2021). HIV basics. Erişim adresi: [ <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>]. Erişim tarihi:03.08.2021.
- CHAPPUIS F, SUNDAR S, HAILU A, GHALIB H, RIJAL S, PEELING RW, ALVAR J, BOELAERT M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, **5**: 873–882.
- COLOMBA C, SAPORITO L, VITALE F, REALE S, VITALE G, CASUCCIO A, TOLOMEO M, MARANTO D, RUBINO R, DICARLO P, TITONE L (2009). Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infectious Diseases*, **9**:199.
- DE LA ROSA R, PINEDA JA, DELGADO J, MACÍAS J, MORILLAS F, MIRA JA, SÁNCHEZ-QUIJANO A, LEAL M, LISSEN E. (2002). Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**:762–767.
- DE VRIES HJ, REEDIJK SH, SCHALLIG HD. (2015). Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *American Journal of Clinical Dermatology*, **16**: 99–109.
- DESJEUX P, ALVAR J. (2003). *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97**: 3–15.
- EZRA N, OCHOA MT, CRAFT N. (2010). Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, **2**: 248–257.
- FANALES-BELASIO E, RAIMONDO M, SULIGOI B, BUTTÒ S. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali Dell'Istituto Superiore di Sanita*, **46**: 5–14.
- FARREL JP (2002). World Class Parasites: Volume 4 *Leishmania*, *Kluwer Academic Publishers*, 1022.
- GARCÍA-GARCÍA JA, MARTÍN-SÁNCHEZ J, GÁLLEGO M, RIVERO-ROMÁN A, CAMACHO A, RIERA C, MORILLAS-MÁRQUEZ F, VERGARA S, MACÍAS J, PINEDA JA. (2006). Use of noninvasive markers to detect *Leishmania* infection in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4455–4458.
- GARROTE JI, GUTIÉRREZ MP, IZQUIERDO RL, DUEÑAS MA, ZARZOSA P, CAÑAVATE C, EL BALI M, ALMARAZ A, BRATOS MA, BERBEL C, RODRÍGUEZ-TORRES A, DOMINGO AO. (2004). Seroepidemiologic study of *Leishmania infantum* infection in Castilla-Leon, Spain. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **71**:403–406.
- GRADONI L, LOPEZ-VELEZ R, MOKNI M. (2017). Manual on case management and surveillance of the leishmaniasis in the WHO European Region. Erişim adresi: [ <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/978-92-89052-51-1.en>]. Erişim tarihi: 27.08.2021.
- GUEDES DL, JUSTO AM., BARBOSA JÚNIOR WL, SILVA E, AQUINO SR, LIMA JUNIOR M, MONTARROYOS U, BEZERRA G, VIEIRA A, PEREIRA V, MEDEIROS ZM. (2021). Asymptomatic *Leishmania* infection in HIV-positive outpatients on antiretroviral therapy in Pernambuco, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **15**(1), e0009067.
- KAYE P, SCOTT P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology*, **9**:604–615.
- KIROS YK, REGASSA BF. (2017). The role of rk39 serologic test in the diagnosis of visceral leishmaniasis in a Tertiary Hospital, Northern Ethiopia. *BMC Research Notes*, **10**(1), 169.
- LEISHMAN WB. (1903). ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. *British Medical Journal*, **1**: 1252–1254.
- LIMA C, SANTARÉM N, NIETO J, MORENO J, CARRILLO E, BARTHOLOMEU DC, BUENO LL, FUJIWARA R, AMORIM C, CORDEIRO-DA-SILVA A. (2019). The Use of Specific Serological Biomarkers to Detect CaniLeish Vaccination in Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, **6**: 373.

- LINDOSO JA, CUNHA MA, QUEIROZ IT, MOREIRA CH. (2016). Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)*, **8**:147–156.
- MANZUR A, BARI AU. (2006). Sensitivity of leishmanin skin test in patients of acute cutaneous leishmaniasis. *Dermatology Online Journal*, **12**(4), 2.
- MARFURT J, NASEREDDIN A, NIEDERWIESER I, JAFFE CL, BECK HP, FELGER I. (2003). Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 3147–3153.
- MARQUES N, CABRAL S, SÁ R, COELHO F, OLIVEIRA J, SARAIVA DA CUNHA JG, MELIÇO SILVESTRE A. (2007). Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia [Visceral leishmaniasis and HIV infection in the HAART era]. *Acta Medica Portuguesa*, **20**: 291–298.
- MOHEBALI M, YIMAM Y. (2020). Prevalence estimates of human immunodeficiency virus (HIV) infection among visceral leishmaniasis infected people in Northwest Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, **20**: 214.
- MONGE-MAILLO B, NORMAN FF, CRUZ I, ALVAR J, LÓPEZ-VÉLEZ R. (2014). Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**.
- MONGE-MAILLO B, LÓPEZ-VÉLEZ R. (2016). Treatment Options for Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection. *AIDS Reviews*, **18**: 32–43.
- MUKHOPADHYAY D, DALTON JE, KAYE PM, CHATTERJEE M. (2014). Post kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. *Trends in Parasitology*, **30**: 65–74.
- MURRAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER MA (2013). *Medical Microbiology*. 7th Ed. P.: 770-773.
- OLIVIER M, BADARÓ R, MEDRANO FJ, MORENO J. (2003). The pathogenesis of *Leishmania*/HIV coinfection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, **97**: 79–98.
- ORSINI M, CANELA JR, DISCH J, MACIEL F, GRECO D, TOLEDO A JR, RABELLO A. (2012). High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **106**: 283–288.
- PASQUAU F, ENA J, SANCHEZ R, CUADRADO JM, AMADOR C, FLORES J, BENITO C, REDONDO C, LACRUZ J, ABRIL V, ONOFRE J, LEISHMANIA HIV MEDITERRANEAN CO-OPERATIVE GROUP (2005). Leishmaniasis as an opportunistic infection in HIV-infected patients: determinants of relapse and mortality in a collaborative study of 228 episodes in a Mediterranean region. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **24**:411–418.
- PINTADO V, LÓPEZ-VÉLEZ R. (2001). HIV-associated visceral leishmaniasis. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **7**: 291–300.
- PINTADO V, MARTÍN-RABADÁN P, RIVERA ML, MORENO S, BOUZA E. (2001). Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine*, **80**: 54–73.
- RASTIS, GHORBANZADEH B, KHEIRANDISH F, MOUSAVI SG, PIROZMAND A, HOOSHYAR H, ABANI B. (2016). Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **30**: 610–615.
- REZAEI Z, SARKARI B, DEGHANI M, LAYEGH GIGLOO A, AFRASHTEH M. (2018). High frequency of subclinical *Leishmania* infection among HIV-infected patients living in the endemic areas of visceral leishmaniasis in Fars province, southern Iran. *Parasitology Research*, **117**: 2591-95.

- RODRIGUES V, CORDEIRO-DA-SILVA A, LAFORGE M, SILVESTRE R, ESTAQUIER J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites & Vectors*, **9**, 118.
- ROSENTHAL E, MARTY P, POIZOT-MARTÍN I, REYNES J, PRATLONG F, LAFEUILLADE A, JAUBERT D, BOULAT O, DEREURE J, GAMBARELLI F. (1995). Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**:159–162.
- ROSS R. (1903). FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *British Medical Journal*, **2**: 1401.
- RUIZ-POSTIGO JA, GROUTA L, JAINA S. (2020). Global leishmaniasis surveillance 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. World Health Organ. *Weekly Epidemiological Record*. **25**: 265–280.
- SANTARÉM N, SILVESTRE R, CARDOSO L, SCHALLIG H, REED SG, CORDEIRO-DA-SILVA A. (2010). Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**: 1866–1874.
- SANTARÉM N, TOMÁS A, OUAISSI A, TAVARES J, FERREIRA N, MANSO A, CAMPINO L, CORREIA JM, CORDEIRO-DA-SILVA A. (2005). Antibodies against a Leishmania infantum peroxiredoxin as a possible marker for diagnosis of visceral leishmaniasis and for monitoring the efficacy of treatment. *Immunology Letters*, **101**:18–23.
- SEITZ R. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV), *Transfusion medicine and hemotherapy: offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, **43**: 203–222.
- SHARP PM, HAHN BH. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, **1** (1), a006841.
- SINGH OP, SUNDAR S. (2015). Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era. *Journal of Parasitology Research*, **2015**: 239469.
- SINGH S, SIVAKUMAR R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine*, **49**: 55–60.
- SINGH S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research*, **123**: 311–330.
- SRIVIDYA G, KULSHRESTHA A, SINGH R, SALOTRA P. (2012). Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. *Parasitology Research*, **110**:1065–1078.
- STEVERDING D. (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, **10**: 82.
- SUNDAR S, RAI M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **9**: 951–958.
- T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI HALK SAĞLIĞI GENEL MÜDÜRLÜĞÜ. (2019). Türkiye HIV/AIDS Kontrol Programı (2019-2024). Ankara [ [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/HIV-ADS/Tani-Tedavi\\_Rehberi/HIV\\_AIDS\\_Kontrol\\_Programi.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/HIV-ADS/Tani-Tedavi_Rehberi/HIV_AIDS_Kontrol_Programi.pdf)]. Erişim tarihi: 01.09.2021.
- THAKUR S, JOSHI J, KAUR S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*, **44**: 253–272.
- UZUN S, GÜREL MS, HARMAN M (2017). Kutanoz Leşmanyazis Tanı ve Tedavi Rehberi. Galenos Yayınevi.
- VAN GRIENSVEN J, ZIJLSTRA EE, HAILU A. (2014). Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection: Time for Concerted Action. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(8), e3023.
- VANNIER-SANTOS M, MARTINYA, SOUZA W. (2002). Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*, **8**: 297–318.
- WALKER B, MCMICHAEL A. (2012). The T-cell response to HIV. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**(11), a007054.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1997). *Leishmania*/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. 1997. *Weekly Epidemiological Record*, **72**: 49-54.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2007). Report of the Fifth Consultative Meeting on Leishmania/HIV Coinfection. Erişim adresi: [\[https://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis\\_hiv\\_coinfection5.pdf\]](https://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_hiv_coinfection5.pdf). Erişim tarihi: 03.08.2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021). Leishmaniasis. [\[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis\]](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis). Erişim tarihi: 03.08. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2000). Leishmania/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: retrospective analysis of 965 cases. Erişim adresi: [\[https://www.who.int/hiv/strategic/en/leish\\_00\\_42.pdf\]](https://www.who.int/hiv/strategic/en/leish_00_42.pdf). Erişim tarihi: 03.08.2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2011). Portugal. Erişim adresi: [\[https://www.who.int/leishmaniasis/resources/PORTUGAL.pdf\]](https://www.who.int/leishmaniasis/resources/PORTUGAL.pdf). Erişim tarihi: 03.08.2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2021). HIV/AIDS. Erişim adresi: [\[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids\]](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids). Erişim tarihi: 18.12.2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2022) Leishmaniasis. [\[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis\]](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis). Erişim tarihi: 11.02.2022.