

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BODRUM YARIMADASINDA LEISHMANIASIS
EPİDEMİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Doktor
Naser REZAEI AZİZİ (SEVİL)

Danışman
Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL

İZMİR – 2008

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı

İmza

Başkan
(Danışman) : Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZBİLGİN

Üye : Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÜNER

Üye : Prof. Dr. Nevin TURGAY

Doktora Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Diğer Akdeniz havzası ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de önemli halk sağlığı sorunlarından olan kutanöz ve visseral leishmaniasis ile visseral hastalığın rezervuarlığında köpeklerin önemli bir rolü olması nedeniyle veteriner hekimlikte de daha ciddi sorun yaratan kanin leishmaniasisin birlikte görülmesi, bu konuda yapılan epidemiyolojik çalışmaların giderek artmasına neden olmaktadır. Daha önceki yıllarda hem kutanöz hem de visseral leishmaniasis olgularının bildirildiği fakat gerek kanin leishmaniasis prevalansı gerekse vektör *Phlebotomus* türlerinin yaygınlığı ve yoğunluğu hakkında bilgi bulunmayan Bodrum Yarımadası’nda bu verilerin oluşturulması için bu tez çalışmamız planlanmış ve gerçekleştirilerek bütün epidemiyolojik parametrelerin ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın planlanması, gerçekleştirilmesinde emeği geçen başta tez danışmanım Prof. Dr. Yusuf Özbel’e; çalışma ortamını en iyi şekilde sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Ziya Alkan’a; saha ve laboratuvar çalışmalarında, tezin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Seray Özensoy Töz, Prof. Dr. Nevin Turgay, Doç. Dr. Cüneyt Balcıoğlu, Doç. Dr. Hatice Ertabaklar ve Doç. Dr. Serdar Paşa ve Dr. Samiye Demir’e, moleküler yöntemlerin uygulandığı Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Laboratuvarı (AREL) sorumlusu Prof. Dr. Hakan Aydın’a, Doktora eğitimim sırasında her zaman ve her alanda yardımlarını gördüğüm Parazitoloji Anabilim Dalı tüm Öğretim Üyeleri’ne, yoğun çalışma tempomda daima destek gördüğüm eşim Zehra Tourchian’a zor da olsa anlayış gösterme(me)ye çalışan biricik oğlum Bora’ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 10.01.2008

Dr. Naser Rezaei Azizi (Sevil)

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. Sınıflandırma	6
1. 2. Tarihçe	8
1. 3. Morfoloji	12
1.4. Yaşam Döngüsü	13
1.5. Vektör	17
1.6. Rezervuarlar	23
1.6.1 Zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL)	23
1.6.2. Antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL)	24
1.6.3. Zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL)	24
1.6.4. Antroponotik visseral leishmaniasis (AVL)	25
1.7 Epidemiyoloji	28
1.8. Leishmaniasis Klinik Şekilleri	33
1.8.1. Kutanöz (Deri) Leishmaniasis	33
1.8. 2. Visseral (İç Organlar) Leishmaniasis (VL)	37
1.8.3. Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)	43

1.9. Tanı	44
1.9.1. Klinik Tanı	44
1.9.2. Etkensel tanı	45
1.9.3. Moleküler tanı	48
1.9.4. Serolojik Tanı Yöntemleri	49
1.8. Sağaltım	54
1.8.1. Visseral Leishmaniasis Tedavisinde ilaç kullanımı	54
1.8.2. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisinde ilaç kullanımı	60
1.9. Korunma	62
1.9.1. Vektör kontrolü	62
1.9.2. Rezervuar Kontrolü	63
1.9.3. Aşı çalışmaları	64

İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM	65
2.1. Çalışma Alanı	65
2.2. Materyal Toplanması	66
2.2.1. Köpeklerden Örnek Toplanması	66
2.2.2. <i>Phlebotomus</i> 'ların Toplanması	69
2.3. Laboratuvar Çalışmaları	73
2.3.1. Direkt Tanı ve Kültür Yöntemleri	73
2.3.2. IFAT (İmmunfluoresan Antikor Testi)	73
2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	75

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR	83
3.1. Köpeklerde Yapılan Çalışmaların Sonuçları	83
3.2. Kum Sinekleri ile Yapılan Çalışmaların Sonuçları	86

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA	92
-----------------------	-----------

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ ve ÖNERİLER	99
ÖZET	103
ABSTRACT	105
YARARLANILAN KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** *Leishmania* parazitinin iki formunun şekilsel gösterimi
- Şekil 2.** Parazitin yaşam döngüsü
- Şekil 3.** Kum sineğinin erkeği (solda) ve dişisi (sağda)
- Şekil 4.** Dünya’da leishmaniasis
- Şekil 5.** Türkiye’de KL ve VL’nin görüldüğü iller
- Şekil 6.** Bodrum yarımadasındaki çalışma lokaliteleri
- Şekil 7.** Köpeklerin ön bacağından kan örneği alınması
- Şekil 8.** Köpeğin popliteal lenf nodundan aspirasyon örneği alınması.
A: Lenf nodu iki parmakla fikse edilir, **B:** 20 ml’lik enjektör ile lenf yumrusuna girilir, **C:** lenf sıvısı alınır, **D:** NNN besiyerine ekilir ve **E:** lam üzerine yayılır.
- Şekil 9.** Bodrum yarımadasında örnekleme yapılan
4 lokalitedeki KanL prevalansı (%)
- Şekil 10.** KanL’deki deri belirtilerinden; **A:** tırnak uzaması
ve **B:** kepeklenme
- Şekil 11.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile alınan sonuçlar
- Şekil 12.** Bodrum yarımadasında saptanan
kum sineği türlerinin % yoğunlukları
- Şekil 13.** Bodrum yarımadasında farklı bölgelerde saptanan KanL
prevalansı ile olası vektör tür olan *P.tobbi*’nin dağılım ve
yoğunluklarının karşılaştırılması

TABLolar DİZİNİ

- Tablo 1.** *Leishmania* cinsinin sınıflandırması
- Tablo 2.** Türkiye'de tespit edilen kum sineği türleri
- Tablo 3.** Türkiye'de uygulanan VL tedavi protokolü
- Tablo 4.** Işıklı tuzakların yerleştirildiği 50 lokalitenin özellikleri
- Tablo 5.** Master miks hazırlanışı
- Tablo 6.** PZR protokolü
- Tablo 7.** Çalışma alanındaki 4 lokalitede saptanan KanL prevalansı
- Tablo 8.** Testlerden herhangi biriyle pozitif olarak saptanan köpeklerin sonuçları
- Tablo 9.** Bodrum yarımadasında ışıklı tuzakların yerleştirildiği lokalitelerin özellikleri ve toplama süresince kaydedilen sıcaklık ve nem değerleri
- Tablo 10.** Bodrum yarımadasındaki lokalitelerde yakalanan *Phlebotomus* türleri (aynı lokalitedeki birden fazla tuzaktan alınan sonuçlar birleştirilerek verilmiştir). D: Dişi; E: Erkek; T: Toplam
- Tablo 11** Bodrum yarımadasındaki lokalitelerde yakalanan *Sergentomyia* türleri (aynı lokalitedeki birden fazla tuzaktan alınan sonuçlar birleştirilerek verilmiştir). D: Dişi; E: Erkek; T: Toplam

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropikal hastalıktan birisi olarak kabul edilen leishmaniasis, 88 ülkede 12 milyon insanı etkileyen ve yaklaşık 350 milyon insanı tehdit eden, yılda 1.5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis, 500 bin ise visseral leishmaniasis olgusunun kayıtlara geçtiği bir paraziter enfeksiyondur. Bu enfeksiyona bağlı yaklaşık yıllık ölüm sayısının 57.000 civarında olduğu bildirilmektedir (184).

İnsanı infekte eden *Leishmania* türleri morfolojik olarak benzerlik göstermelerine rağmen, klinik olarak visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo ile ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda bu klinik formlara diffüz (yaygın) kutanöz leishmaniasis (DCL) ve *L. donovani*'nin VL etkeni olduğu alanlarda tedavi sonrası deride ortaya çıkan Post Kala Azar dermal leishmaniasis (PKDL) de eklenmiştir (123).

Leishmaniasis, memelilerin zorunlu hücre içi parazitleri olan *Leishmania* cinsi protozoonların retiküloendotelyal sistem (RES) organlarına yerleşerek meydana getirdiği hastalık grubudur (81). Etken, infekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri tarafından kan emme işlemi sırasında bulaştırılmaktadır

Ülkemizde leishmaniasisin, *L. infantum*'un etkeni olduğu visseral leishmaniasis (VL, iç organlar leishmaniasisi) ve *L. tropica*'nın etkeni olduğu kutanöz leishmaniasis (KL, şark çıbanı) olmak üzere iki klinik şekli görülmektedir (128, 173).

VL kliniğinin ana bulguları splenomegali, sürekli veya düzensiz ateş, hepatomegali ve pansitopenidir. Endemik bölgelerde yaşayan veya yakın zamanda endemik bölgeye

seyahat eden ve bu klinik belirtilerle başvuran, özellikle çocuk yaş grubundaki kişiler mutlaka VL yönünden araştırılmalıdır. Çocuklarda daha sık görülmesi nedeniyle çocuk sağlığı açısından da büyük önem taşıyan VL, tedavi edilmediğinde yüksek ölüm oranına sahiptir. Visseral leishmaniasis yurdumuzda çoğunlukla kıyı bölgelerinde İzmir, Aydın, Denizli, Manisa, Muğla'nın yanı sıra Bilecik, Karabük, Kars, Tokat, Kastamonu ve İstanbul gibi farklı coğrafi bölgelerde bulunan illerde de bildirimlerin olması bu hastalığın subtropikal iklimde yer alan ülkemizin her bölgesinde görülebileceğini düşündürmektedir (51).

VL, sosyoekonomik düzeyi düşük olan, kötü hijyen şartlarında yaşayan bireylerde daha sık rastlanmaktadır. Beslenme bozuklukları, vücut direncinin düşmesi de enfeksiyonun ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (51). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre yıllık ortalama 40 yeni VL vakası bildirilmektedir (120).

VL tanısında klinik bulgular ön tanıda rol oynasa da, kesin tanı parazitolojik ve serolojik laboratuvar testleri ile konulmaktadır. Hastadan alınan örneklerden (kemik iliği vs) yapılan yayma preparatların boyanarak direkt bakışı ve/veya NNN (Novy- MacNeal Nicolle) besiyerine ekilerek promastigotların görülmesi ile tanı konulabilir. Ayrıca indirekt tanıda serolojik yöntemlerden ELISA (Enzyme Linked İmmünosorbent Assay), IFAT (İndirekt Floresan Antikor Testi), DAT (Direkt Aglütinasyon Testi) ve rK39 hızlı tanı testi kullanılmaktadır. Laboratuvar tanı yöntemleri arasında nükleik asit dayalı Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri de yer almaktadır (141, 150).

KL ise daha çok, uzun sürede geçmeyen, özellikle yüz ve ellerde görülen ülser ile kendini gösterir. Kendiliğinden iyileşmesi genelde bir yıl sürdüğü için ülkemizde halk arasında "Yıl Çıbanı" adı da verilir. Herhangi bir tedavi uygulanmadan kendiliğinden geçer ve kişinin bağışıklık kazanmasına sebep olur. Yara izleri ise hayat boyu vücutta kalarak

estetik açıdan sorun yaratabilir. Bunu önlemek amacıyla, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde halkın bir kesimi deri lezyonlarından aldıkları akıntıları vücutlarının görünmeyen bir bölgesini çizerek bulaştırmakta ve bu şekilde bir çeşit aşılama ile ömür boyu bu enfeksiyondan korunmaktadır (81, 135, 173).

Her ne kadar leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktaysa da, günümüzde bile bu hastalığın kontrolü için harcanan çabalar yetersiz kalmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında, hastalığın klinik formları arasında geniş farklılık olması ve bunların epidemiyolojik durumlarının her bölgeye özgü kontrol prensip ve yöntemlerine gereksinim göstermesi büyük rol oynamaktadır.

Dünyada leishmaniasis üzerine yapılan çalışmalar; tanıya yönelik yeni testlerin geliştirilmesi, HIV/AIDS arasındaki ilişkisinin incelenmesi, KL ve VL'ye karşı insan ve özellikle köpeklerde kullanılabilir aşılar, sağaltım ve korunma yolları, KL için lokal, VL için genel sağaltım yöntemlerinin geliştirilmesi alanlarında yoğunlaşmıştır.

Doğada köpekgiller (kanidler) *Leishmania* parazitlerinin rezervuarı olarak rol oynamakta ve bunlarda görülebilen hastalığa ise "Kanin Leishmaniasis" (KanL, köpek leishmaniasisi) adı verilmektedir. Yakın zamanda kedilerin de rezervuar rolü oynayabileceği de gösterilmiştir (104). Kedilerde görülebilen hastalığa ise "Feline Leishmaniasis" (FL, KedL, kedi leishmaniasisi) adı verilmektedir.

Akdeniz ülkelerinde insan vakalarının sporadik olarak saptandığı köylerde bile köpeklerde %8-19 gibi yüksek bir oranda enfeksiyon saptanabilmektedir. Bu nedenle Türkiye'de genelde çocuklarda rastlanılan VL'nin kontrol altına alınması için köpek leishmaniasisinin kontrol edilmesi temel konu olarak ele alınmalıdır. VL'nin kontrolunda çok önemli yeri olan bu konuda uygulamaya geçilebilmesi için öncelikle VL'nin görüldüğü bölgelerdeki durumun bilinmesi gerekmektedir.

Leishmaniasis çok eskilere dayanan bir geçmişi olmasına rağmen hala hastalarla ilk karşılaşıldığında akla getirilmemesi temel tanı sorunlarından biridir. Tanıda hızlı ve güvenilir laboratuvar metotlarının yerinde uygulanmasının önemi de büyüktür.

Bu nedenlerle Bodrum yarımadasında gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda aşağıdaki amaçlara ulaşmak planlanmıştır; (i) yarımada IFAT ve PZR yöntemlerini kullanarak KanL prevalansını saptamak, (ii) PZR yönteminde kullanılacak DNA eldesi için iki farklı örneği kullanarak, sonuçlarının serolojik yöntemle karşılaştırmak, (iii) vektörlük yapabilecek türleri belirlemek amacıyla kum sineği faunasını belirlemek, (iv) koruyucu hekimliğin gereği olarak insanların hastalanmamalarını sağlayacak kontrol önlemlerini yetkili kişilere anlatmak ve kişisel önlemleri vurgulamak.

1. GENEL BİLGİLER

Leishmania paraziti birçok türü ve alt türü olan, hem insanları hem de hayvanları infekte edebilen, ancak kendi başına hasta organizmadan bir diğerine geçip infekte etme yeteneği olmayan, bu yolu kat etmek için de vektöre gereksinim gösteren; dolayısıyla bütün yaşamını parazit olarak geçiren bir mikroorganizmadır. *Leishmania* paraziti oldukça geniş yelpazedeki bir omurgalı grubunu infekte eder. Zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania*, infekte kum sinekleri (*Phlebotomus*, tatarcık, yakarca, sand fly) tarafından bulaştırılmaktadır. *Leishmania* türleri evrimlerini omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki konakta geçirmektedirler. Omurgalı konak insan veya diğer memeliler, omurgasız konak ise kum sinekleridir (166, 173). Zoonotik bir enfeksiyon olan visseral leishmaniasis, köpek ve diğer kemiricilerde de görülebilmektedir. Hastalığın başlaması ve klinik seyri, parazitin bulaşması ve patogenezi ile konağın bağışıklık sistemi arasındaki kompleks etkileşimlere bağlı olmakta, klinik tablo asemptomatik şekilden, akut şekle değişebilmektedir.

Leishmania türlerinin yaşam devrelerinde iki farklı morfolojik form görülmektedir: Amastigot formu, 2-4 µm büyüklüğünde yuvarlak veya oval, elektron mikroskopunda kısa bir kamçısı görülen ve omurgalı makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalan formdur. Promastigot formu ise aksenik kültürlerde ve omurgasız vektörün sindirim kanalında ekstrasellüler olarak çoğalan, 20-28 µm uzunluğunda kamçısı ve 10-20 µm uzunluğunda iğ şeklinde vücudu bulunan hareketli formdur. Parazit kinetoplast organelinin bulunmasıyla karakterizedir. Kinetoplast, çekirdek DNA'sından ayrı kDNA denilen bir DNA içermektedir (32, 173)

Leishmania'nın bilinen en az 30 türü vardır. Bunların 12 türü insanları infekte eder (93). Yurdumuzda *L. infantum* ve *L. tropica* türleri ile olan enfeksiyonlar görülmektedir. Bunlardan ilki insanlarda retikuloendotelial sistem hücrelerine yerleşerek iç organ

leishmaniasisine (Visseral leishmaniasis, VL) neden olur. *L. tropica* ve *L. major* türleri ise deriye yerleşerek deri leishmaniasisine (Kutanöz leishmaniasis, KL) sebep olurlar. Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği 6 hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL), mukokutanöz leishmaniasis (MKL), diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve post Kala-azar dermal leishmaniasisi (PKDL) olmak üzere 5 farklı klinik tablo ortaya görülmektedir (81, 135). Akdeniz bölgesinde de geniş bir yayılım gösteren leishmaniasis, eko-epidemiolojik açıdan antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL), zoonotik kutanöz Leishmaniasis (ZKL) ve zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL) olarak ayrılabilir.

Leishmaniasisin halk sağlığı üzerindeki etkileri uzun yıllar gözardı edilmiştir. Son 10 yılda hastalığın yayılışına paralel olarak olgu sayısında da bir artışın olduğu görülmektedir. DSÖ tarafından 1994 yılında AIDS sıklığındaki artışa paralel olarak VL olgularında da artış olduğu bildirilmiştir. Leishmaniasis; tedavi ve kontrolünde yaşanan zorluklar nedeniyle, paraziter hastalıklar içinde sıtmadan sonra ikincil önemli hastalık olarak anılmaktadır (51).

1.1. Sınıflandırma

Leishmania türlerinin ayırım ve sınıflandırmasında; yaptığı hastalıklar, coğrafik yayılış, biyolojik, immünolojik, biokimyasal ve enzimatik özellikler gibi verilerden yararlanılır. Bu amaçla vektör *Phlebotomus*'lardaki gelişmeleri, kemirgenlerdeki virülansları, promastigotlar tarafından besiyerine salgılanan faktörlerin (EF= excreted factor) serotipleri, monoklonal antikolar, DNA yoğunluğu ve kinetoplastik DNA'nın (kDNA) yapısı gibi özellikler kullanılarak veya içerdikleri izoenzimlerin karakterleri incelenerek tür ayırımı yapılabilmektedir (97, 173, 183).

Leishmania türlerinin sınıflandırılmasında tam olarak ortak bir noktaya varılamasa da, DSÖ tarafından yapılan son çalışmalar doğrultusunda şu sınıflandırma uygun görülmüştür (181).

Tablo 1. *Leishmania* cinsinin sınıflandırması (59, 128)

Regnum	: <i>Animalia</i>
Superphylum	: <i>Protozoa</i>
Phylum	: <i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum	: <i>Mastigophora</i>
Classis	: <i>Zoomastigophorea</i>
Ordo	: <i>Kinetoplastida</i>
Subordo	: <i>Trypanosomatina</i>
Familya	: <i>Trypanosomatidae</i>
Genus	: <i>Leishmania</i>
Subgenus	: <i>Leishmania</i>
	: <i>L. donovani</i> kompleks (<i>L. donovani</i> , <i>L. archibaldi</i>)
Species	: <i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i> , <i>L. major</i> : <i>L. mexicana</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. aristidesi</i>
Subgenus	: <i>Viannia</i>
	: <i>L. braziliensis</i> kompleks (<i>L. braziliensis</i> , <i>peruviana</i>)
Species	: <i>L. guyanensis</i> kompleks (<i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. shawi</i>) : <i>L. naiffi</i> , <i>L. lainsoni</i>

VL etkenleri, *L. donovani*, *L. infantum* ve *L. chagasi*'dir. Ancak son zamanlarda saptanan olgulardan izole edilen parazitler üzerinde yapılan çalışmalar, bu gruba *L. tropica* ve *L. amazonensis*'nin da dahil edilebileceğini göstermiştir (152).

Eski dünyada KL etkenleri ise *L. tropica* (Kuru tip KL), *L. major* (Yaş tip KL), *L. aethiopica* (Afrika KL) ve yine son yıllarda bu gruba dahil edilen *L. infantum*'dur.

Yeni dünyada endemik ve sporadik karakterli VL etkeni *L. chagasi*'dir. *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana venezuelensis*, *L. mexicana garnhami*, *L. mexicana pifanoi*'den oluşan beş alt türü bulunan ve dış kulak kıkırdağına yerleşen “Şiklero” etkeni olan *L. mexicana*, “Espundia” etkeni olan *L. braziliensis braziliensis*, “Orman piyani” etkenleri *L. braziliensis guyanensis*, *L. braziliensis panamensis* ve “Uta” etkeni *L. peruviana* yeni dünyadaki mukokutanöz leishmaniasis etkenleridir. *L. braziliensis* ve *L. peruviana* grubu *Leishmania* türleri dudak, farinks, trakea, genital organlar ve kulağı tutarak deri-mukoza sınırında ülserler oluştururlar (183).

1. 2. Tarihçe

Leishmaniasis çok eski tarihlerden beri bilinmektedir. *Phlebotomidae*'lerin jeolojik olarak yaklaşık 120 milyon yıl önce buldukları belirtilirken, leishmaniasisin M.Ö 650 yıllarında Mezopotamya'da var olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Güney Amerika'da, özellikle de Peru ve Ekvador'da M.S 1. yüzyıla ait çömleklerde, pre-Kolombiya dönemine ait çömleklerin üzerine çizilmiş desenlerde, Peru'daki “Moche” çanaklarında, binlerce yıl öncesine ait bazı insan kafataslarında KL'nin o dönemlerde var olduğunu düşündüren bir takım kanıtlara rastlanmıştır (8, 22, 175). Hastalık, M.S. 10. yüzyılda Avicenna tarafından tanımlanmış olup, Orta ve Doğu Afrika ile Asya'da, en azından 18. yüzyıl ortalarından bu yana bilinmektedir (175).

1756'da Alexander Russel bir Türk hastayı değerlendirmesinin ardından, o zamanlar bölgede “Halep çıbanı” olarak bilinen hastalığı aynen şöyle tarif etmiştir: “Skatrizasyonun ardından aylar boyunca morumsu renkte görünmekte ve sonra hayat boyu kaybolmayan bir skar oluşturmaktadır; eğer sürekli irritasyona maruz kalmıyorsa, nadiren ağrılı olabilmektedir” (8).

İlk Kala-azar epidemisi 1824 yılında, bugün Bangladeş sınırları içinde yer alan Jessore'de meydana gelmiştir. Bundan birkaç yıl sonra da hastalık tüm Ganj havzasına yayılmıştır. 1875-1900 yılları arasında tüm nüfusun %25'i bu hastalık yüzünden ölmüştür. Yirminci yüzyılın başında bu epidemi kendiliğinden sona ermiştir. Bu kendiliğinden sonlanmanın nedeni hala tam olarak aydınlanmamıştır (174).

Dünyada bu hastalığın tanınmaya başladığı tarih olarak 1835 kabul edilmesine rağmen VL'in batı dünyasında 19. yüzyılın ikinci yarısında tanınmaya başladığı kabul edilir. Kalkuta'da Avrupa Genel Hastanesinde çalışan Twining 1835 de "Bataklıklardan çıkan kokulara maruz tropikal ülkelerin endemik kaşeksisi" adını verdiği bir hastalığı tarif etmiştir. Hastalığın klinik tablosunun sporodik Kala-azar olduğunu Rogers 1908'de ortaya koymuştur. Yunanlılar 1836'da Spete adasında Klados ve Phonatos taraflarında bu hastalığın tarif edildiğini iddia ederler. Archibald'ın 1922 yılında yayınladığına göre, 1870'de Suudi Arabistan'da bir Kala-Azar epidemisi yaşanmıştır (74).

"Kala" sözcüğü bölgesel dilde "kara", "azar" sözcüğü de "hastalık" anlamına gelmektedir. Parazitin deri lezyonlarından alınan biyopsi materyalindeki varlığını ilk kez 1885'te İngiliz Binbaşı D. D. Cunningham bildirmiştir. 1898'de Rus Askeri Doktoru Peter Fokitsch Borovsky benzer bildirimlerde bulunmuştur. 1903 yılında Massachusetts'de bir hastanede Ermeni bir hastayı tedavi eden James Homer Wright hastalığı klinik olarak ilk tanımlayan kişi ünvanını almıştır. (35).

Hastalık VL, KL ve MKL olarak gruplandırmıştır. VL ya da Kala-azar olarak adlandırılan hastalığın etkeni; ilk kez 1900 yılında Hindistan'da hasta bir kişinin dalak yayma preparatında Leishman tarafından tanımlanmıştır. Aynı yıl Donovan, farklı olgularda etkeni ortaya koymuş ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Etken Ross tarafından *Leishmania donovani* olarak adlandırılmıştır. 1904 yılında bu parazit önce Leishman-Donovan

cisimcikleri, ardından da *Leishmania donovani* olarak isimlendirilmiştir (174, 187). Nicolle ve Compte 1908 yılında köpekte buldukları hastalık etkenini *Leishmania infantum* olarak adlandırmışlardır (81).

Hastalığın nasıl bulaştığı ve yayıldığı uzun süre bir sır olarak varlığını korumuştur. Knowles tarafında promastigotun ilk kez *Phlebotomus* içinde gösterilmesi 25 yıl sonra bu sineğin parazitin yayılımında doğrudan rol oynadığının gösterilmesi de bundan 14 yıl sonra gerçekleşebilmiştir (174).

S. R. Cristophers 1904'de Kala-azarın patolojisini tarif etmiş ve parazitin dalak, karaciğer ve kemik iliğinde hemen hemen aynı yoğunlukta bulunduğunu göstermiştir. 1908'de Ch. Nikolle, daha önce Bezankon ve Griffon tarafından tarif edilen besiyerini basitleştirerek, Novy ve WJ Mac Neal (N.N.N.)'in 1904'de tarif ettikleri besiyerine benzer bir besiyerinde paraziti üretmiş, köpeğe ve maymunlara aşılama ve Akdeniz alt bölgesinde iç organlar leishmaniasis'inin rezervuarının köpek olacağı hipotezini ileri sürmüştür. Tunus'ta 1908'de Nicole ve Compte köpekte *Leishmania* bulmuşlardır. Bu parazite 1908'de Nicoll *Leishmania infantum* adını vermiştir (140, 173).

1913'te Migone tarafından Güney Amerika kıtasında leishmaniasis olarak tanımlanabilecek ilk olgu bildirimini yapılmıştır. 1910 yılında Manson Kala-azar'ın antimonlu ilaçlarla tedavisini tavsiye etmiştir (173).

1914 yılında iki Rus bilim adamı, Yakimoff ve Schokhor, Özbekistan'da yaptıkları çalışmalarda Buhara'dan elde ettikleri örneklerle hazırladıkları preparatta gördükleri amastigotları *Leishmania tropica minor*, Termiz'den elde ettikleri preparatta gördükleri amastigotları ise *Leishmania tropica major* diye adlandırmışlardır. Bu isimler *L. tropica* ve *L. major* isimlerinin başlangıcını oluşturmuştur (76).

Unat'a göre Türkiye'de ilk vaka bildirimini 20. yüzyıl başlarında Doğu Karadeniz Bölgesi'nden yapılmıştır. Dr. Vefik Vassafa göre Kala-azarın varlığını ilk yazan Kristamonas'tır. Bu hekim Trabzon'da Kala-azar tesbit ettiğini bildirmiştir. General Ord. Prof. Dr. Abdülkadir Noyan 1916 yılında Bağdat'taki 11 Osmanlı askerinin dalak ve karaciğerlerinden yaptıkları ponksiyonlarında *L. donovani* tespit etmiştir. 1918 yılında Dr. Hofert Kaller İzmir civarından Kala-azar'a rastladığını bildirmiştir. İbrahim Osman 1931 yılında bir Kala-azar vak'ası yayınlamıştır. Dr. Akil Muhtar Özden 1936 yılında bir kaç Kala-azar olgusu bildirmiştir (173).

1980 yılına kadar özellikle hastalığın iç organları tutan formu için yapılan bildirimlerin çoğunluğu Ege Bölgesi'nden yapılmıştır. Örneğin; 1954–1964 yılları arasında yapılan bildirimlerin sayısı 55; 1974–1980 yılları arasında yapılan bildirimlerin sayısı ise 74'tür. Hastalığın deri formu aslında Anadolu'da yüzyıllardır bilinmesine ve değişik yöresel adlarla isimlendirilmesine rağmen, Unat'a göre 1833 yılı bilinen ilk bildirim yapıldığı yıldır. Bu konuda Reinhart ve Server Tevfik tarafından 1910 yılında hazırlanan bir broşür, Türkiye bağlamında halkı aydınlatıcı ilk basılı materyal olarak kayıtlara geçmiştir. 1911'de parazit ilk kez kültürde üretilmiş, ünlü deri hastalıkları uzmanı Hulusi Behçet, 1916'da ülserin altındaki epitel hücresi tabakasını 'stub sign' olarak tanımlamış ve tanıdaki önemini göstermiştir. Gramiccia ve arkadaşları tarafından 1984'te bildirildiğine göre, Türkiye içinde hastalığın deri formunun en endemik olduğu bölge Şanlıurfa'dır. 1996 yılında Şanlıurfa'da Türkiye Sağlık Bakanlığı tarafından bu hastalıkla savaş, vektör mücadelesi ve hastaların tanı ve tedavilerinin kolaylaştırılması amacıyla özel bir merkez kurulmuştur (51, 163).

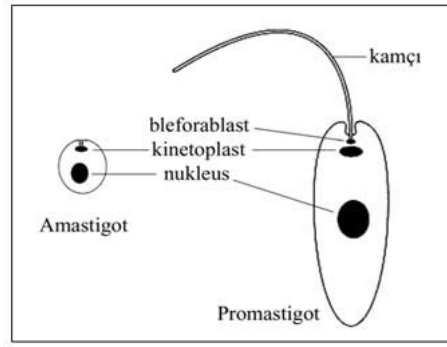
1. 3. Morfoloji

Leishmania türlerinin yaşam döngüsünde, insan ve diğer memelilerde amastigot, kum sineklerinde promastigot olmak üzere aseksüel olarak çoğalan iki şekil bulunmaktadır. Amastigotlar 2- 5 µm boyunda yuvarlak veya oval şekildedir. Omurgalı konakta monositler, polimorf çekirdekli lökositler ve endotel hücrelerinde kümeler halinde, bu hücrelerin parçalanmasıyla tek tek dağılmış şekilde bulunurlar. Makrofajların içindeki amastigotlar hücrenin asidik fagolizozomlarınca alınmalarına rağmen bunların içinde yaşamlarını devam ettirebilir ve çoğalabilirler (5). Makrofajların içinde çoğalan amastigotlar buldukları hücreden serbest kaldıktan sonra, hemen ardından başka makrofajları infekte edip, oralarda çoğalmaya başlarlar. Wright veya Giemsa ile boyanmış preparasyonlarda; sitoplâzma ve kamçı mavi, nükleus ve nükleusa çok yakın kinetoplast parlak kırmızı renkte görülür. Parazit makrofajlarda parazitofor vakuolun içindedir. *Leishmania*'ların amastigot şekilleri elektron mikroskobu incelemesinde; nükleus, nükleus içinde nükleolus, parabazal cisim, blefaroblasttan çıkan kamçı (rizoblast), sitoplâzmadaki mitokondri, lizozom ve golgi aygıtı da görülür.

Promastigot, 22- 26 °C'de NNN besiyerinde ve *Phlebotomus*'un bağırsaklarında görülen morfolojik şekildir. Mekik şeklinde, bir ucu küt, 15- 20 µm uzunlukta 1,5- 2,5 µm genişlikte ve ön uçtan 15- 28 µm uzunluğundaki bir kamçısı ile karakterizedir. Promastigotun elektron mikroskobik incelemesinde; ortada 0.6- 1 mikron çapında nükleus, nükleus içinde nükleolus, parabazal cisim, blefaroblasttan oluşan kinetoplastik kitle, blefaroblasttan çıkan fibriler yapı gösteren kamçı, sitoplazmada endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi yapılardan oluştuğu gözlenmiştir (81, 135).

Kinetoplastida sınıfındaki tüm protozoonlar bir kinetoplasta sahiptir. Kinetoplast, şekli daha çok çubuğa benzetilebilecek mitokondrial bir yapıdır. İçerisinde sayısı 10 bin civarında

olan çok küçük DNA halkaları (minicircle) ve 50 civarında olan büyük DNA halkaları (maxicircle) bulunmaktadır. Bunlara topluca kinetoplastik DNA denmekte ve kDNA şeklinde kısaltılmaktadır. Kinetoplastın hücre içindeki işlevi tam olarak aydınlanmamakla birlikte, büyük halkaların mitokondrial ribozomal RNA'yı kodladığı; küçük halkaların ise mRNA'nın edisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Parazitin tüm glikolitik enzimleri de burada yer almaktadır (26).



Şekil 1. *Leishmania* parazitinin iki formunun şekilsel gösterimi (128)

1.4. Yaşam Döngüsü

Yine *Leishmania* türlerinin yaşam döngüsünde, omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki tür konak vardır. Omurgalı konaklar; insan, köpekler, köpekgiller ve daha önemsiz olarak kemiricilerdir. Omurgasız konaklar; Eski Dünya'da *Phlebotomus*, Yeni Dünya'da ise *Lutzomyia* cinsinde yer alan kum sinekleridir (59, 81, 135).

İnfekte kişilerden kan emen dişi kum sinekleri kanla birlikte *Leishmania*'nın amastigot şekillerini de alırlar. Orta bağırsağa gelen kan besininin etrafı peritrofik membran ile sarılır, amastigot formlar burada promastigot şekline dönüşüp peritrofik membranın ön kısmını kitinaz enzimi yardımıyla eriterek torasik mideye geçerler. Özel bir tropizm ve kemotaksis ile göç ederek özofagus ve farinks duvarına tutunurlar. Özofagustan

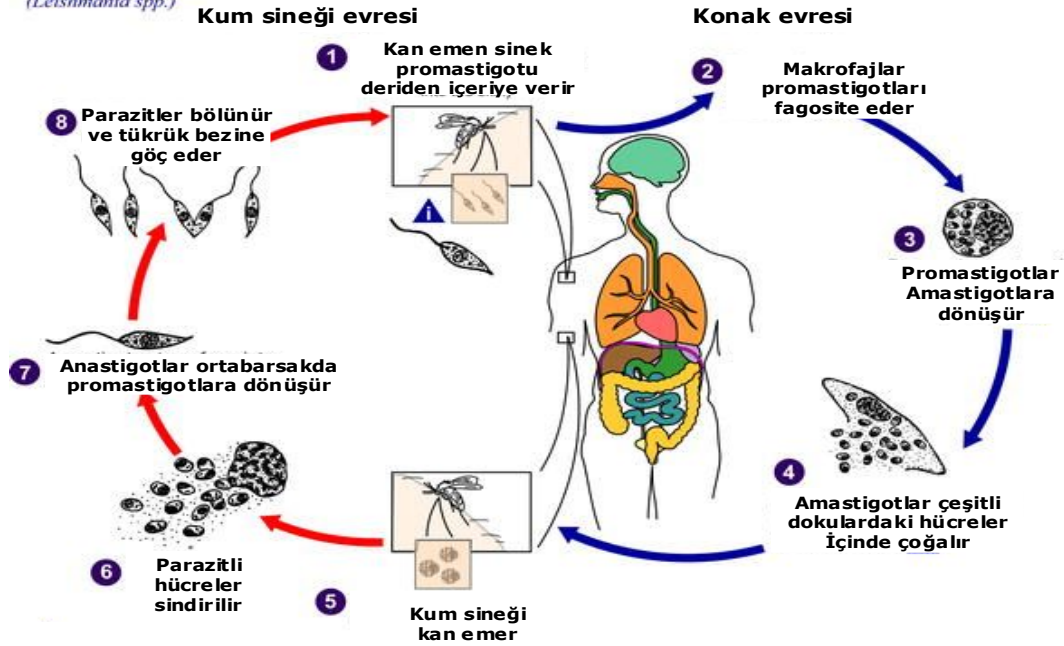
ayrılarak ağız parçalarına gelir ve 4-7. günde ağız parçaları ve hortumda görülürler. Kum sinekleri kan emmek için memeli derisini sokunca tükrük salgısı ile birlikte promastigotları içeri verirler. Kısa sürede makrofajlar tarafından fagosite edilen promastigotlar parazitoforus vakuolünde amastigot şekle dönüşür ve burada çoğalırlar. Makrofajda çoğalan amastigotlar hücreyi parçalar ve yeni hücreleri infekte ederler (59, 81, 135).

İnfeksiyon, infekte dişi bir kum sineğinin çiftleşme öncesi veya hemen sonrasında beslenmek ve üremek amacıyla memeli rezervuardan kan emmesiyle başlar. Erkek sinek sadece bitki özuları beslendiği için hastalığın yayılımında rol oynamaz. Eğer kan emmenin ardından sineğin gastrointestinal kanalında yeterli zaman geçmezse, parazitin döngüsünün sağlanması imkânsızlaşır. Bu ilk emilen kanın ardından sinek doğada başka yerlerde bitki özuları ile beslenmeye devam eder. Böylece parazit çoğalmak için gereken zamanı bulur. Eğer sinek, hasta rezervuardan kan emdikten hemen sonra başka bir memeliden de kan emerse, parazit gelişmeye zaman bulamaz ve bunların hepsi sadece sindirilir (174).

Son zamanlara kadar vektörde başlayan gelişme döneminde *Leishmania*'ların morfolojik olarak homojen olduğu sanılmaktaydı, oysa yapılan çalışmalarla bu gelişme sırasında 3 farklı morfolojik dönemin ayırt edildiği bildirilmiştir (149). *Phlebotomus* tarafından alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken, diğer bir kısmı şekil değiştirmeksizin yaklaşık 43 saat içinde bölünerek çoğalırlar. Bundan sonra "nektomonad" denilen uzun ve zayıf formlara dönüşüp, ikiye bölünerek çoğalmayı sürdürürler. Tekrar form değiştirerek, kısa ve geniş olan "haptomonad" veya "paramastigot" (kinetoplast lateral halde) formunda orta bağırsağın ön kısmına doğru ilerleyerek burada farinksi tıkayacak kadar çoğalırlar.

Leishmaniasis

(*Leishmania spp.*)



Şekil 2. Parazitin yaşam döngüsü

Parazitin yaşam döngüsündeki promastigot evresi sineğin orta bağırsak ve toraks bölümünde gerçekleşir. Bitki özsularıyla beslenmeye devam eden sineğin orta bağırsağında parazitler öylesine yüksek bir sayıya ulaşırlar ki, sonunda sineğin gastroözofajeal sfinkterini felce uğratırlar. Ve bunun ardından regürjitasyon başlar. Buralardaki promastigotlar sineğin farinksine ve yanak kavitesine göç etmeğe son derece meyillidirler ve bu bölgelerde yerleşirler. Kan emmenin altıncı ile dokuzuncu günleri arasında sinek ağır bir farenjit geçirmektedir. Bu esnada bir sonraki kan emme sırasında promastigotların regürjite edilmeleri sürmektedir (38, 148, 174). Infekte kanın alınmasından 3- 7 gün sonra ilk metasiklik (enfektif) safhalar orta bağırsakta, hortumda ve az sayıda cibarium ve farinksde görülür. (84). Bu safhada artık bölünmezler, çok hareketli, küçük ve zayıf görünürler (10 µm), kamçıları vücutlarının yaklaşık 2 katı uzunluğundadır.

Promastigotlar ayrıca hücre dışı kültürlerde de üreyebilmektedirler. Bu kültürler bifazik, yarı katı ve sıvı olmak üzere 3 ayrı kategoride toplanır. Bifazik ve yarı katı ortamlar defibrine omurgalı kanına, sıvı ortamlar da Fetal Sığır Serum'una (FSS) gereksinim gösterirler. Bu ortamlarda 22-26 °C'de üreyen promastigotların üreme hızının %5 CO₂ kullanılması durumunda daha da arttığı bildirilmiştir (9). Kültürde parazitin değişik formlarının görülmesi ve virülanslarındaki değişiklikler, metasiklik promastigotların *in vitro* da geliştiğini, yani metasiklogenezisin sonuçlanabildiğini göstermiştir (147).

Parazitler konak derisinden içeriye sineğin tükürüğüyle birlikte girmektedirler. Isırık yerinden vücuda giren ve ekstrasellüler alanda toplanan promastigotların makrofajlar tarafından fagosite edilmelerinin ardından, hücre yüzeylerinde bol miktarda bulunan lipofosfoglikanlar (LPG) sayesinde hücre yüzeyine tutundukları, ayrıca makrofajlardaki C3 reseptörlerinin de tutunmada rol oynadıkları bilinmektedir. Enfektif promastigotlar, vektör tarafından kana verildikten sonra omurgalı konağın çeşitli savunma mekanizmalarına karşı koyarlar. Özellikle komplemanın, sitotoksik ve eritici etkilerine karşı koymanın yanında, bu etkileri kendi lehine kullanarak konağın makrofajlarını işgal ederler. Bu işgal işlemi özellikle promastigot yüzey antijenleri olan ve 63 kDa ağırlığındaki gp63 ile LPG (lipofosfoglikan)'nin rol oynadığı, *Phlebotomus*'ların tükürüklerinde bulunan maddelerin de bu işleme yardımcı oldukları bildirilmiştir (23, 166).

Vücut savunma mekanizmalarından kurtulan ve olasılıkla lektin–ligand etkileşimleri sayesinde hücre dışı sahada tutunan parazitler makrofajlar tarafından alınır. Parazit içeren bu makrofajlar ya o bölgede kalmaya devam ederler ya da mukokutanöz bileşkelere taşınırlar veya retikuloendotelial dokuya giderler. Parazit her üç durumda da hücre içinde süratle amastigot formuna dönüşüp replikasyonunu başlatır. Bu replikasyon konak

hücrenin tamamen amastigotlarla dolup en sonunda patlamasıyla son bulur. Serbest kalan amastigotlar başka makrofajları infekte etmeye hazırdırlar. Bu şekilde kanda veya lezyonun hemen altında hem serbest amastigotlar, hem de infekte makrofajlar görünmektedir. Sinek tekrar kan emmek için soktuğunda hem bu serbest amastigotları, hem de tekrar infekte makrofajları alır. Parazit sineğin mide kanalında bir dizi karmaşık gelişim süreci geçirir. Bu döngü sineğin beslenmek için bir başka konak bulmasıyla devam eder. Tüm bu döngü özellikle çevre ısısına bağımlı olarak 4–25 gün (ortalama 7–12 gün) sürer (175).

Bölgede bulunan herhangi bir *Phlebotomus* türünün *Leishmania* vektörü olabilmesi için bazı özellikler taşıması gereklidir. Bu özellikleri şöyle sıralamak mümkündür: (i) bölgede o türün iyi yerleşmiş olması ve diğer türlerden daha çok sayıda bulunması, (ii) kuvvetli insansever özelliğinin olması, (iii) parazitin gelişmesine izin verecek yapıda olması ve dişinin ağız parçaları ve farinks yapısının promastigotlarla tam olarak dolmasına izin verecek düzeyde olması, (iv) paraziti omurgalı konağa aktaracak kadar canlı kalabilmesi (117, 183).

1.5. Vektör

Nematocera grubunda bulunan *Phlebotomidae* ailesi içinde yer alan *Phlebotomus* cinsi, eski dünyada olduğu gibi ülkemizde de *Leishmania* cinsi protozoonların biyolojik vektörlüğünü yapmaları nedeniyle tıbbi açıdan önem taşımaktadır. Kum sineklerinin sınıflandırması phylum *Arthropoda*, sınıf *Insecta*, takım *Diptera*, alt takım *Nematocera*, aile *Phlebotomidae* alt aile *Phlebotominae* şeklindedir. Her ne kadar bütün kum sinekleri genel görünümde birbirlerine benzese de kuzey ve güney yarımkürede, eski ve yeni dünyada farklı epidemiyolojik durumlardan kaynaklanan biyolojik farklılıkları da bulunmaktadır. *Phlebotomidae* ailesinin alt cinsi içinde yaklaşık 700 tür tanımlanmıştır. Bu

türlerin yarısı *Lutzomyia*, üçte biri *Sergentomyia*, bir kısmı *Phlebotomus*, ve küçük bir kısmı ise *Brumptomyia*, *Warileya*, *Chinius* cinsleri içinde yer almaktadır. Bunlar; Yeni Dünya'da üç cins; *Brumptomyia*, *Warileya* ve *Lutzomyia*, Eski Dünya'da üç cins; *Chinius*, *Phlebotomus* ve *Sergentomyia*'dır (47).

Phlebotomus türünden ancak 30 civarındaki sayıda tür leishmaniasis için vektör olarak tanımlanmıştır. Bu türler de dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde yaşarlar. Kum sineklerinin konak seçimi türlere göre değişir; *Phlebotomus*, *Lutzomyia* ve *Sergentomyia* gibi cinsler omurgalılarından beslenir (149). Bazı türler sadece memeli hayvanlardan kan emerken (zoofil), bazı türler hem hayvan hem insanlardan (zoo-antropofil), bazı türler ise sadece insanlardan (antropofil) kan emmektedirler. Örneğin Eski Dünya türlerinden olan *P. papatasi*'nin antropofilik olmasına rağmen sığır, köpek ve kuş üzerinden de beslendiği tespit edilmiştir (74).

Sergentomyia'ya ait türler ise genellikle sürüngenler üzerinden beslenmektedirler. Bununla birlikte az sayıda tür de amfibiler ve kuşlar üzerinden beslenmektedir (149).

Phlebotomus'ların tekrar tekrar kan emmeleri, enfeksiyon bulaştırmaları açısından önem taşımaktadır ve bu konuda türler arasında değişiklikler bulunmaktadır. *P. longipes* gibi bazı türlerin yumurtaları kan olmadan gelişmemektedir. *P. perniciosus* bir kez kan emdikten sonra yumurtalayana kadar tekrar kan emmemektedir. *P. papatasi* ise yumurtalama ile ilişkili olmadan birçok kez kan emebilmektedir.

Phlebotomus (13 altcins); *Phlebotomus* cinsine ait olan türler memelilerden beslenmekte *Sergentomyia* (9 altcins) ise reptil (kertenkele vb) ve amfibiler üzerinde nadiren memelilerden beslenmektedirler (182). *Lutzomyia* (14 altcins, 11 tür); cinsi ise yeni dünyada yaşayan ve tıbbi önemi olan grubu oluşturmaktadır. Hem memelilerden hem de sürüngenlerden beslenmektedirler.

Phlebotomus'lar kum sinekleri (sandfly) adı verilen grup içinde yer almakta, yurdumuzda ise tatarcık, yapyakan, çetisineği veya yakarca diye adlandırılmaktadır. *Phlebotomus*'lar leishmaniasis dışında bartonellosis ve birçok arboviral hastalıkların etkenlerini de taşımaktadırlar (19).

Phlebotominae'yi ilk kez 1691'de Phillippo Bonnani (bilinmeyen bir türün erkeğini) tanımlamıştır. *Phlebotomus papatasi* ise 1786'da Scopoli tarafından tanımlanmıştır (19). Ülkemizdeki yayılışlarının saptanması üzerinde yapılan çalışmalar Akdeniz, Ege, İç Anadolu, Güney Anadolu Bölgelerinde toplam 20 türün varlığı bildirilmiştir (37, 45, 128)



Şekil 3. Kum sineğinin erkeği (solda) ve dişisi (sağda)

Phlebotomus'lar, kahverengimsi, küçük ve dar vücuda sahip, uzun bacaklı, vücudun üzerinde dik duran kanatları olan, uzun antenli, 5 segmentli, sarkık palplı 3mm civarında büyüklüğü olan sineklerdir (85). Tüylü vücutları ve ağız parçaları, pronotumun çıkık olması ve dinlenme halindeyken kanatların vücuda dik, "V" şeklindeki duruşu ayırt edici özelliklerindedir.

Kum sinekleri krepuskular ya da nokturnal davranış gösterirler, çok azı gündüzleri sokma faaliyeti gösterir. Gündüz dinlenme alanları; karanlık kuytu yerlerde, bodrumlarda, hayvan barınakları, kümesler, duvar çatlakları, kayalık alanlar, mağaralar, ağaç kovukları, rodent ve diğer küçük memelilerin kazdıkları yuvalar, kuş yuvaları ve termit dağları gibi serin ve nemli yerlerdir (85). Geceleri aktif duruma geçmektedirler. Erişkin dişi *Phlebotomus*'lar 3 hafta yaşayabilirken erkeklerin yaşam süresi ortalama 2 haftadır (125). Dişi kum sineği, yumurtalarını bina yıkıntıları, duvarlardaki çatlaklar, hayvan barınakları, ev atığı yığınları ve benzeri gelişmekte olan larvanın organik gıda bulabileceği, sıcak ve nemli yerlere bırakmaktadır.

Yumurtaları iki ucu yuvarlak 300- 400 µm uzunluğunda, 90-150 µm genişliğinde olup bir tarafı düz, diğer tarafı konkav şekildedir. Yumurtalar ilk yumurtlandığında beyazdır, ancak birkaç saat içinde türüne göre kahverenginden siyaha değişik renklerde görünebilir. Yumurtadan çıkan larva 2.5- 3.5 mm uzunlukta, 12 segmentli olup, pupaya dönüşmeden önce 4 gömlek değiştirmektedir. Larvanın baş kısmında çiğneyici ağız parçaları bulunmakta ve yaprak küfleri, böcek parçaları, hayvan dışkısı gibi organik maddelerle beslenebilmektedir. Dördüncü evre larvadan pupa gelişir. Larva ve pupalar karada yaşam göstermelerine rağmen kuruluğa çok duyarlıdırlar. Pupa evrimini tamamladıktan sonra erişkin dışarı çıkmaktadır. (80).

Sadece dişiler, yumurta oluşturmak için kanla beslenirler. *Phlebotomus*'lar diğer kan emen artropodlarda olduğu gibi, kan emerken konağın derisinde oluşturdukları yara üzerine tükrüklerini salgılamaktadırlar. Bu tükrük pıhtılaşmayı önleyici (Apyraz), damar genişletici (Prostoglandin E2) ve iltihap giderici (Anti-histamin, Anti-serotonin) özellikleri olan maddeler içermektedir (144, 170).

Phlebotomus'ların tükürüğünde bulunan bazı maddeler parazitin infeksiyon oluşturmaya yardımcı olur. *P. papatasi*'nin tükürüğü makrofajlardaki protein fosfataz 1 ve 2 ile nitrik oksit yapımını inhibe ederken, aynı zamanda Th-1 yanıtını azaltır, Th-2 yanıtını da artırır. Hücresel ve moleküler düzeydeki bu durum konağın aleyhinedir.

Phlebotomus'ların aktivitelerine meteorolojik koşulların etkili olduğu ispatlanmıştır. Erişkin *Phlebotomus*'ların en aktif oldukları ısı derecesi 25 -28 °C'dir, ideal nem oranı ise %50'nin üstündedir bazı türlerde ise bu oran %75-85'e kadar çıkabilmektedir. Kum sinekleri, iyi uçucu değildir (19).

Sivrisineklere benzemelerine rağmen, onların aksine, konaklarına sessizce ve zigzag çizerek ve küçük zıplamalarla yaklaşımları karakteristiktir. Uçuş mesafeleri genelde 80-200 m civarındadır, fakat sıcak ve durgun havalarda bu mesafe 1 km'ye kadar çıkabilmekte. *Phlebotomus*'ların 10 m'den daha uzaktaki insanları seçemedikleri belirtilmektedir. Dinlenerek her uçuşta bir öncekinden daha yükseğe çıkan *Phlebotomus*'lar yaklaşık 25- 30 m yüksekliğe kadar çıkabilmektedirler. Rüzgâr aktivitelerinde önemli rol oynamaktadır. En aktif oldukları zaman durgun havalardır. Suni ışığın *Phlebotomus* aktivitesinde rolü vardır ve bazı türlerde suni ışığa karşı pozitif fototaksi bulunmaktadır (73, 85).

Phlebotomus cinsine ait bazı türlerin çeşitli parazitik ve viral hastalıkları taşıdıklarının anlaşılması, bu cinsin son yıllarda üzerinde en çok çalışılan gruplardan biri olmasına sebep olmuştur. Özellikle hastalığın epidemiyolojisinde hangi türün vektör olduğunu tespit etmek çok önemlidir. Morfolojik olarak birbirine çok yakın türlerin, çoğu zaman farklı biyolojik özellikler gösterdikleri ve hastalıkları taşımada değişik roller üstlendikleri bilinmektedir. Bu nedenle türlerin doğru biçimde tanımlanarak, birbirlerinden ayrılmaları gerekmektedir.

Phlebotomus genellikle Avrupa'nın güneyi, Asya, Afrika, Avustralya ve Orta ve Güney Amerika gibi tropik ve subtropik bölgelerde görülmekle birlikte dağılımları tam olarak 50° kuzey enleminin hemen altından, Kanada'nın güneybatısından başlar ve Fransa'nın kuzeyinde sona erer. Güney yarı küre dağılımları yaklaşık 40° güney enlemine kadar gelir. Ancak Yeni Zelanda ve Pasifik kıyılarında görülmezler (75, 85).

Tablo 2. Türkiye'de tespit edilen kum sineği türleri

Cins	<i>Phlebotomus</i>		
Alt cins	<i>Phlebotomus</i>	Alt cins	<i>Larroussius</i>
Tür	<i>Ph. papatasi</i>	Türler	<i>Ph. major</i> <i>Ph. neglectus</i> <i>Ph. syriacus</i> <i>Ph. tobbi</i> <i>Ph. kandelakii</i> <i>Ph. perfiliewi</i> <i>Ph. galilaeus</i> <i>Ph. mascittii</i>
Alt cins	<i>Paraphlebotomus</i>	Alt cins	<i>Adlerius</i>
Türler	<i>Ph. alexandri</i> <i>Ph. jacusieli</i> <i>Ph. sergenti</i> <i>Ph. similis</i> <i>Ph. caucasicus</i>	Türler	<i>Ph. balcanicus</i> <i>Ph. halepensis</i> <i>Ph. kyrenia</i> <i>Ph. brevis</i> <i>Ph. simici</i>
Cins	<i>Sergentomyia</i>		
Türler	<i>S. minuta</i> <i>S. dentata</i> <i>S. fallax</i> <i>S. theodori</i>		

Anadolu havzasında *Larroussius*, *Adlerius*, *Paraphlebotomus* ve *Phlebotomus* alt cinslerine ait önemli türler bulunmaktadır. *Larroussius* ve *Adlerius* alt cinslerine ait bazı türler visseral leishmaniasis etkeni *L. infantum* vektörleri oldukları için son zamanlarda önem kazanmışlardır. *Paraphlebotomus* alt cinsine ait 14 türün 7 tanesi kanıtlanmış veya

şüpheli *L. major* vektörleridir. *P. alexandri*, *P. caubaudi*, *P. jacusieli*, *P. kazeruni*, *P. riouxi*, *P. sergenti* ve *P. similis* bu türlerdendir.

1.6. Rezervuarlar

İnsanı infekte edebilen *Leishmania* türlerinin rezervuar konakları memeli hayvanların geniş bir bölümünü kapsamakta ve insan da bu grubun içine dâhil edilmektedir. Özellikle immün sistemi çeşitli nedenlerle baskılanmış kişilerin periferik kanlarında normalden çok fazla parazit bulunmakta ve bunlar *Phlebotomus* tarafından kolaylıkla alınabilmektedir.

Akdeniz bölgesi, Çin, Güney Amerika'da *L. infantum*'un rezervuar konağı olarak köpekler gösterilmektedir (112, 127). Eski Dünya'da köpeklerde görülen leishmaniasisin etkeni *L. infantum* ile Yeni Dünya'daki etken *L. chagasi*'nin aynı parazit olduğu artık kabul edilmektedir (58).

Leishmaniasis, hayvan rezervuarların rol oynadığı ve oynamadığı klinik şekilleri ve ekoepidemiolojik açıdan; (1). zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL), (2). antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL); (3). zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL); (4) antroponotik visseral leishmaniasis (AVL) olmak üzere dört gruba ayrılabilir:

1.6.1 Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL)

ZKL için ana odak Latin Amerika, Orta ve Güneybatı Asya ve Kuzey Afrika'dır. Yeni Dünya'da başlıca etken *L. (viannia) braziliensis* ve *L. (leishmania) mexicana* kompleksleridir. Buralarda vektör (*Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. umbratilis*) çok geniş bir alana yayılmıştır. Rezervuarlar daha çok insansız bölgeler ile orman ve kırsallarda yaşayan kemirgenler ve büyük memelilerdir. Eski Dünya'da hastalığın sorumlusu *L. major*'dur. Şehirler *P. papatasi* gibi vektörlerle *Psammomys obesus* gibi kemirgen rezervuarların bir arada buldukları doğal habitata doğru kaymaktadır. Ortadoğu ve Kuzey

Afrika'da *Meriones* sp, Asya'da değişik bölgelerinde *Rhombomys opimus* yaşamakta ve *L. major* için iyi birer rezervuar görevi görmektedirler. ZKL için en önemli risk faktörü kentleşme, ormanların yok edilmesi nedeniyle hastalık yayılımının insanlı alanlara kayması; yeni barajların inşası, sulama kanalları ve tarımsal gelişim sonucu yeni odakların oluşmasıdır. Eski dünyada kentleşme en büyük risk faktörüdür. *Psammomys obesus* , *Nesokia indica* gibi hayvan rezervuarların yaşamalarına uygun yeni alanlar ortaya çıkmaktadır (42, 151).

1.6.2. Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis (AKL)

AKL Eski Dünya'da görülür ve rezervuarların neredeyse hepsi kentler veya kent çevresi kaynaklıdır. Parazit, *L. tropica* ve vektörü de çoğunlukla *P. sergenti*'dir. Ancak *L. aethiopica* rezervuarı olan küçük kemirgenlerden, köpeklerden ve bir fareden izole edilmiştir. Antroponotik form için en iyi önleyici çözüm hastaların olabildiğince erken tedavi edilip, insan rezervuar sayısının olabildiğince azaltılmasıdır. Kırsal alandan kentlere göç AKL için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır. Günümüzde Şanlıurfa (Türkiye); Tahran, Şiraz ve Bam (İran); Musul (Irak); Kabil, Kandahar ve Herat (Afganistan); Halep (Suriye); Taşkent (Özbekistan) gibi eski dünya şehirlerinde nüfus yoğunluğu çok yüksek, hijyenik ve kentsel alt yapı koşulları çok kötü, gecekondulaşma çok fazla olduğundan, vektörün yaşaması için son derece uygun ortamlar oluşmakta ve bu durum AKL'in yayılmasının da oldukça yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır (42).

1.6.3. Zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL)

Yeni dünyada sorumlu parazit *L. chagasi*, vektör *Lu. longipalpis*; eski dünyada parazit *L. donovani* kompleksi (*L. infantum*, *L. donovani*, *L. archibaldi*) ve vektör birden fazla *Phlebotomus* türüdür, ama Asya'da vektör olarak *P. argentipes* önde gelmektedir. Evcil rezervuar köpek, silvatic rezervuarlar tilki ve çakal gibi köpekgillerdir. Ancak köpekler aynı

zamanda VL hastasıdır ve en az 1/3'i tipik deri belirtileri sergilerler. Aynı şekilde Latin Amerika'da da *L. chagasi* insanın dışında köpeği de hastalandırır. Akdeniz havzası ve Ortadoğu'da *L. infantum*'un vektörü *Larrossius* alt cinsinde yer alan çeşitli türlerdir. Eskiden kırsal olan alanlar kente yakın duruma gelmesi, kum sinekleriyle rezervuar köpeklerin bir araya gelmesi ve bu alanların gittikçe artması kaçınılmaz sonucu doğurmaktadır. Bu durum hem eski, hem de yeni dünya için aynıdır. Ana risk faktörlerinden birisi yine kırsal bölgelerden kentlere göçtür. Bu faktör sosyal ve ekonomik faktörlere bağlı olduğu kadar, iklim değişiklikleri ve doğal afetler gibi şartlardan da etkilenmektedir (42).

1.6.4. Antroponotik Visseral Leishmaniasis (AVL)

Parazit genellikle *L. donovani* ve *L. archibaldi* olup, birçok *Phlebotomus* türü vektör rolünü üstlenmektedir. İnsanın tek rezervuar olduğu, özellikle de hastalık sonrasında Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) gelişen, olguların epidemiyolojik açıdan son derece önemli olduğu gruptur. AVL daha çok eski dünyada Doğu Afrika ile Hindistan ve çevresindeki ülkelerle sınırlıdır. Doğu Afrika ülkelerinde göçün rolü çok büyüktür. Özellikle AVL'in endemik olduğu bölgelerde yaşayan veya bu bölgelerden dönen mülteciler, mevsimlik işçiler, eski deniz aşırı askerler gibi geçici süre için buralara veya buralardan göç etmiş topluluklar risk gruplarını oluşturmaktadır (42).

Yapılan incelemelere göre; köpeklerin az olarak bulunduğu bir bölgede, bunların % 2'si bile infekte olsa parazitin canlılığını ve evrimini sürdürebildiği belirlenmiştir. Son yıllarda Akdeniz havzasındaki bazı bölgelerde köpeklerdeki VL'in tırmanışta olduğu; hastalığın seroprevalansının yer yer %30-40'lara ulaştığı bildirilmiştir (177). Bazı endemik bölgelerde belirlenen ve %63'e kadar dayanan seroprevalans değerleri söz edilen

tırmanışın en çarpıcı örneklerindendir (159). Üstelik Amerika kıtasında da tırmanışa geçtiği yolunda bildiriler bulunmaktadır (177).

Bu durum, köpek popülasyonunda esaslı bir azalmaya ihtiyaç olduğunu ve bütün sokak köpekleri elimine edilmedikçe tarama sonucu sadece infekte köpeklerin ortadan kaldırılmasının uygun olamayabileceğini göstermektedir. Ülkemizde de Ege bölgesinde yapılan çalışmalarda köpeklerde genel olarak %6 seropozitiflik saptanmış ve bunların bir kısmında parazit izolasyonu gerçekleştirilerek parazit türünün *L. infantum* MON-1 olduğu tespit edilmiştir (128).

Hasta bir köpeği kan emmek üzere ısırın diş yakarcanın hasta olmayan bir köpeği ısırmasıyla hastalığın doğrudan (köpekten köpeğe) taşınması gerçekleşir. Esasen insan bu zincirde araya kazara giren konaktır ve enjektör paylaşan ilaç bağımlıları dışında, kesinlikle *L. infantum* için rezervuar rolü yoktur. İnsandaki infeksiyon kontrolü köpek VL'ini kontrol etmekle çok yakından ilişkilidir (6, 112).

Köpektaki hastalık deri lezyonları, lokal veya generalize lenfadenopati, anemi ve pıhtılaşma bozuklukları, göz lezyonları, kilo kaybı ve ateş başta olmak üzere poliüri, polidipsi, hepatosplenomegali, konjunktivitis, ishal, kusma, melena, iştahsızlık, aşırı yorgunluk, burun akıntısı, depigmentasyonları ve kanaması, öksürük, tırnaklarda aşırı uzama, tüylerde dökülme, ekfoliyatif dermatit, eklem tutulumu, asit gibi pek çok klinik bulguya yol açar (11). Klinik bulgular hastalığın bulunduğu safha, köpeklerin bağışıklık durumu ve uygulanan tedaviye göre farklılıklar gösterir. İnfekte köpeklerin en az üçte birinde ise herhangi bir bulguya rastlanmaz (56, 130, 172, 178). Bu nedenle hastalığın klinik tanısının oldukça zor olduğu bildirilmiştir (172).

Köpeklerdeki infeksiyon yaş grubu, ırk, cinsiyet ayırımı yapmaksızın oluşmaktadır. Bununla birlikte, özellikle küçük köpeklerde semptomatik infeksiyon çok nadirdir.

Diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de insanlarda görülen VL'in doğadaki rezervuarlığını köpekler yapmakta ve hastalığın bir bölgede endemik veya sporadik olgularla devam etmesinde en önemli rolü oynamaktadırlar. Türkiye'de köpeklerdeki leishmaniasisin saptanmasına yönelik çalışmaların artmasıyla, çeşitli bölgelerimizdeki durum da açıklığa kavuşmaktadır. Başta kırsal kesimlerde olmak üzere hastalığın doğadaki kaynağı olan infekte köpeklerin prevalansının Akdeniz ülkelerinde %1.1 ile %37 olduğu, ancak insan ve köpek olguları arasında hastalığın görülme oranları açısından doğrudan bir ilişki olmadığı belirtilmektedir. Kala-azar olgularının sporadik olarak yayılım gösterdiği Manisa ilinin çeşitli köylerinde, köpekler arasındaki prevalans %3.6-19 arasında olduğu, Muğla ilinin Göktepe köyünde bu oran %3.8, Aydın Kuşadası ilçesinde %9.1, Bursa yöresinde ise %4.3 olarak saptanmıştır (91, 130, 172).

Bütün bu bilgiler gözönüne alındığında, köpeklerin infekte olmasının engellenmesinin oldukça önemli, ayrıca sosyal ve maddi açıdan gerekli olduğu açıkça görülmektedir. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalar köpeklerde kullanılacak aşuların üretilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların sonucunda gp63, dp72 gibi iki antijen köpek aşısı olarak halen denenmektedir. İster semptomatik, isterse asemptomatik olsun; parazitle karşılaşan köpeklerin önemli bir kısmında humoral bir yanıt oluşmaktadır (162).

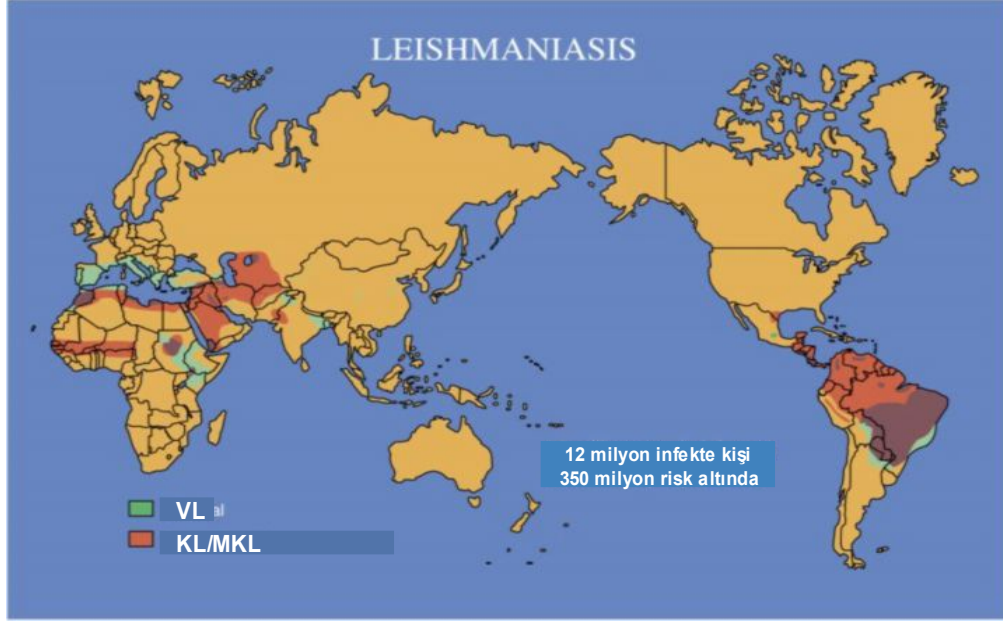
KanL'in etkensel tanısı karaciğer, kemik iliği, dalak ve lenf nodüllerindeki amastigot formların saptanmasıyla, buralardan alınan örneklerin NNN veya benzeri bir besiyerine ekilmesi sonucu üreyen promastigot formların görülmesiyle ya da örneklerin deney hayvanlarına ekimi yoluyla konulmaktadır. Bununla birlikte infekte olmuş köpeklerin ancak %20-30'unda etkeni göstermek mümkün olabilmektedir (178). Bu yüzden köpeklerdeki kesin tanı ancak serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler ile

konulabilmektedir. Bugün için en kullanışlı serolojik yöntemler IFA, ELISA, DAT ve rK39 immünokromatografik yöntemleridir. IFAT'ın duyarlılık ve özgünlüğü %100'e yakın olduğu bildirilmiştir (167, 178).

1.7 Epidemiyoloji

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsine ait 20 türün neden olduğu vektör kaynaklı paraziter hastalıklar grubudur. Tropikal ve subtropikal bölgelerin hastalığı olan leishmaniasis; Kuzey Afrika ve Güney Batı Asya'da özellikle 1- 4 yaş, Batı Afrika ve Hindistan'da 5- 9 yaş arası çocuklarda, Çin ve Avrupa'da ise hemen tüm yaş gruplarında görülebilecek şekilde epidemik karakter göstermektedir. Akdeniz havzası ve Avrupa için de bir sağlık problemi olan hastalık, Türkiye'den Portekiz'e kadar olan Avrupa kıyı bölgelerinde görülmektedir. VL'in bölgesel olarak saptanmış tipleri arasında; Akdeniz, Hindistan, Çin, Sudan ve Güney Amerika tipleri bilinmektedir (59).

DSÖ'nün verilerine göre VL görülen ülkelerin sayısı 88'dir. Bunların 66'sı Eski Dünya'da, 22'si Yeni Dünya'da yer almaktadır (42). Bu yaygınlık sadece ılıman ve sıcak iklimlerde yaygın olmakla kalmayıp topografik çeşitlilik de gösterir (159). DSÖ'ne göre dünya çapında 350 milyon insan leishmaniasis riski altındadır ve 12 milyon kişi de hastalıktan bir şekilde etkilenmiştir. Hastalığın yıllık insidansı 1-1.5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis, 500 bin civarında da visseral leishmaniasis olgusudur. Yıllık ortalama 600 bin bildirimden de anlaşılacağı gibi hastalanan insanların büyük bir kısmı bildirim dışı kalmaktadır (42, 159).



Şekil 4. Dünya'da leishmaniasis (65)

Son zamanlarda yeni endemik odaklar ortaya çıkmış, epidemiler tam olarak kontrol altına alınamamıştır. Epidemik bölgeler demografik değişkenlik ve hareketlere bağlı olarak yayılım göstermektedir. Güney Avrupa'da HIV sıklığına paralel olarak VL sıklığında bir artışın olduğu belirtilmektedir. Son yıllarda Güneydoğu Avrupa'da AIDS hastalarının %1,5–9,5'u leishmaniasisten etkilenmiş, bu da HIV–*Leishmania* ko–infeksiyonlarını bu bölgelerde çok önemli bir sorun haline getirmiştir. HIV/VL hastalarda ortalama yaşam süresi 13 ay olduğu bildirilmesine rağmen, sadece HIV'li hastalarda yaşam süresi daha uzundur. HIV–*Leishmania* ko–infeksiyonu hakkındaki bir başka kötü haber de endemik bölgelerde ilaca dirençli suşların ortaya çıkmış olması ve hastalığın epidemiyolojisinin tehlikeli biçimde değişime uğramasıdır. İlaç bağımlıları arasında görülen şırınga paylaşımı nasıl AIDS'in yayılımı için çok kuvvetli bir kolaylaştırıcı faktör ise, HIV/Leishmaniasis koinfeksiyonu için de aynısı geçerlidir (10).

Klinik formların yaygınlığına bakıldığında; VL olgularının %90'ı Bangladeş, Brezilya, Hindistan, Nepal ve Sudan'dan; MKL olgularının %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru'dan; KL olgularının %90'ı Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'den bildirilmektedir. Dünyadaki leishmaniasis haritasını Güney Avrupa'dan Afrika'ya, Güney Asya'dan Orta ve Güney Amerika'ya uzanan geniş bir kuşak oluşturmaktadır. Eski Dünya'da enfeksiyon oluşturan başlıca altı tür göze çarpmaktadır: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. archibaldi* (44). Son yıllarda bunların arasına, yedinci tür olarak da *L. killicki* girmiş ve bugün Afrika'daki diğer antroponotik KL etkeni olarak kabul görmektedir. (66).

L. donovani Hindistan'da çocuk ve genç erişkinlerde daha sık görülür. Rezervuar hayvan yoktur. Kuzey Çin'de ve Orta Asya'da endemik olarak görülür ve rezervuar köpeklerdir (81). Epidemik olarak Sudan başta olmak üzere Doğu Afrika'da çocuklarda ve genç erişkinlerde enfeksiyon sporodiktir. Akdeniz çevresi ülkeler (Türkiye dahil), Orta Doğu'da sporodik olgular şeklinde küçük çocuklarda nadiren erişkinlerde, immün sistemi baskılanmış kişilerde enfeksiyon görülür. Endemik bölgedeki AIDS'lilerin %1-5'inde VL belirtileri vardır (44).

Birçok ülkede endemik olan leishmaniasis zaman zaman epidemilere de neden olabilir. Hastalık rastlandığı ülkelerde bölgesel karakter gösterir. Bunda ısı, nem, bölgenin yüksekliği ve bitki örtüsü gibi faktörlere bağlı olarak vektör olan kum sineği türlerinin o bölgede fazlasıyla çoğalabilmesi ve rezervuar olan insan ve hayvanların bulunması rol oynar. Bu yüzden VL nehir vadilerinde, denizden yüksekliği 600- 700 m'yi geçmeyen ovalarda daha sık görülür. Fakat Orta Asya'da olduğu gibi denizden 2000 m yüksek yerlerde de VL görülebilmektedir. Köylerde şehirlerdekinden çok daha sıktır. VL'e kötü hijyen, düşük sosyo-ekonomik durumda olanlarda daha sık rastlanır. Hastalığa duyarlılıkta ırkın ve cinsiyetin

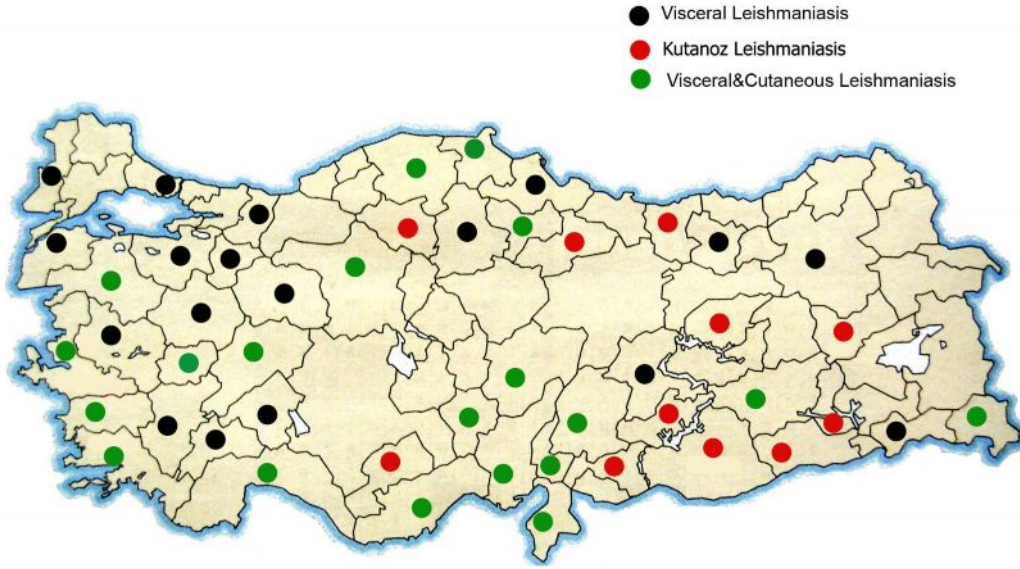
rolü yoktur. Kum sineği sokması olasılığı daha fazla olduğundan erkeklerde VL daha fazla görülür. 1993 yılından beri leishmaniasisin yayıldığı coğrafi alanlar önemli derecede artmıştır. Leishmaniasisin değişen epidemiyolojik özelliklerinin arkasında yatan faktörlerin her biri birer epidemiyolojik risk faktörü olarak tanımlanabilir. Bu risk faktörlerinin bir kısmı net olarak insan kaynaklıdır. Bunlar arasında göç, ormanların yok edilmesi, orman ürünleri ticareti, madencilik, baraj yapımı, tarım alanlarının genişletilmesi, yol inşaatları, artan kentleşme, mevsimlik işçi, dünyada ekonomik kriz, savaş, büyük göçler enfeksiyona duyarlılıktaki artış sayılabilir. Bir kısmı ise doğal çevreye ait değişikliklerdir, bunlar bile dolaylı yoldan insan ile ilişkilendirilebilir (16, 42).

1984- 94 yılları arasında Sudan'da ortaya çıkan epidemi, bölgedeki ilk epidemi olması ve insanların duyarlılığının yüksek olmasının da etkisiyle bölgedeki 300.000 kişiden 100.000'inin ölümüne yol açmıştır. 1997 de yine Sudan'da hastalık oranında %400 artış olmuştur. Bölgedeki kriz ve açlık nedeniyle oluşan büyük göçler ve hareketleri epidemiyi Eritre ve Etyopya'ya da taşımıştır. Brezilya'da da 1998 yılından beri VL olguları artmaktadır (42).

1996'da Afganistan'ın Kabil kentinde 270.000 KL olgusu olduğu hesaplanmıştır. Bu dönemde Kabil çok sayıda göç almış bir şehirdir ve nüfus hızla artarak 2 milyona ulaşmıştır. Hastalığın kentte bu şekilde artması da bu göçe bağlanmıştır. Ülkemizde paraziter enfeksiyonların geleceği konusunda uygun önlemler alınmazsa her zaman bir risk faktörü olacaktır. GAP projesini de buna örnek olarak verebiliriz. Leishmaniasis epidemiyolojisi, Türkiye'nin hem Asya hem de Avrupa kıtalarında toprağı bulunması nedeniyle, bir geçiş ülkesi olduğu, çeşitli bölgeleri arasında farklı topografik ve iklimsel özellikler gösterdiği unutulmadan değerlendirilmelidir. Türkiye'de hem zoonotik VL, hem de antroponotik KL görülmektedir. ZVL için başlıca rezervuar köpektir. Köpeklerdeki VL

odakları ile insanlarda hastalığın görüldüğü yerler birbirleriyle büyük ölçüde örtüşmekle birlikte, hastalığın köpeklerdeki insidansı ile insanlardaki insidansı arasında çok belirgin bir fark bulunmaktadır.

Türkiye’de görülen VL hastalığı zoonotik orijinlidir. Hastalıktan kesin olarak *L. infantum* sorumludur. Olgular bu güne dek sporadik bir seyir izlemiş, Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden hastalara rastlanmıştır. Ege ve Akdeniz bölgelerinin iklim özellikleri vektör ve hastalık için daha uygunmuş gibi görünmekle birlikte, VL’in dünya üzerindeki epidemiyolojik sınırının ancak iklim kuşaklarıyla çizilebildiği; oldukça geniş bir topografik spektruma sahip olduğu düşünüldüğünde; Orta Anadolu bölgesinin görece olarak daha sert sayılabilecek iklim koşullarının önemli bir sorun oluşturmadığı sonucuna varılabilir. Sonuçta, ülke kuşak olarak ılıman kuşakta olması itibariyle VL endemik bir bölge sayılmaktadır. Türkiye Sağlık Bakanlığı’nın verilerine göre 1988–1993 yılları arasında yıllık ortalama KL hastasının sayısı 1951, 1994–1996 arasında ise 4.466’dır. 1996–2000 yılları arasında yıllık ortalama 1204’e düşmüş, bunda Şanlıurfa’da 1996 yılında başlatılan, evlerin ve hayvan barınaklarının yoğun biçimde ilaçlanması şeklinde uygulanan kum sineği kontrol programının etkisi büyük olmuştur. 1994–2000 yılları arasında tüm Türkiye’den bildirilen KL olgularının %61,6’sının Güneydoğu Anadolu bölgesinden olduğu düşünülürse, bu kontrol programının ülke ortalamasına olan etkisi daha iyi anlaşılabilir (120, 121).



Şekil 5. Türkiye'de KL ve VL'nin görüldüğü iller (Özbel Y., orijinal)

1.8. Leishmaniasis Klinik Şekilleri

Oluşan klinik tabloya göre, DSÖ'nün leishmaniasis etkenlerini sınıflandırması şöyledir (90): *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* (Visseral Leishmaniasis); *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana mexicana*, *L. m. garnhami*, *L. m. venezulensis* (Kutanöz Leishmaniasis - Şark çıbanı ve Şiklero); *L. braziliensis guyanensis*, *L. b. panamensis* (Pian bois - Orman Çıbanı); *L. peruviana* (Uta), *L. b. braziliensis* (Mukokutanöz leishmaniasis - Espundia). Ayrıca lepramatoz lepraya benzer klinik tablo yapan *L. amazonensis* ve *L. pifanoi* türleri de bulunur.

1.8.1. Kutanöz (Deri) Leishmaniasis

KL, parazitin derideki makrofajlar içinde çoğalması ile meydana gelir. Tropik ve subtropik ülkelerde sık görülen deri leishmaniasisinin etkeni *L. tropica*'dır. Eski Dünya'daki endemik bölgelerde "Şark çıbanı, Halep çıbanı, güzellik izi, yıl çıbanı, Bağdat çıbanı, Delhi çıbanı" gibi isimlerle bilinen KL, ilk olarak kendisini vücudun açık bölgelerinden birinde; sıklıkla yüz, boyun, kollar veya bacaklarda; daha çok da yüzde,

sınırları belirgin, kenarları yüksek, papül veya nodül tarzında bir deri lezyonu oluşur. Zamanla çapı birkaç santimetreye ulaşabilir. Lezyonun olduğu yerde makrofajların toplanması ve proliferasyonu sonucu bazı patolojik değişiklikler gözlenir. Promastigotlar, bu bölgeye gelen makrofajlara girerek amastigota dönüşürken, amastigotlar çoğalarak makrofajları patlatır ve yeni makrofajları infekte eder. Mononükleer fagositler, lenfositler ve plazma hücreleri toplanarak granümatöz bir yangı oluşturur. Büyüdükçe ortasında altın rengi veya kahverengi bir kabuk oluşur. Büyük olasılıkla etrafında daha küçük “satellit” lezyonlar da ortaya çıkacaktır. Bu ülser ortalama 3–4 ay kadar varlığını koruyacak, bazen bu süre bir yılı da geçecek, sürenin sonunda sekonder infeksiyon oluşmadıkça lezyon kendiliğinden gerileyecektir. Eğer sekonder bakteriyel infeksiyon varsa lezyon ağrılıdır. Bunun dışında lezyon ağrısızdır. Papül şeklinde başlayan lezyon, zamanla ülserleşir, nekroz ve kabuk oluşumunun ardından, sonunda hipopigmente, düz ve atrofik bir skar bırakarak iyileşir veya yara nekrozlaşmadan kronik hale geçip tüberküloid karakter kazanır. İyileşen lezyon, etkeni olan türe karşı hayat boyu bağışıklık ile kalır (24, 90, 130, 139, 173).

Yeni dünyada lezyonlar en erken birkaç hafta içinde ortaya çıkarken lenfadenopati varlığının *Leishmania* enfeksiyonlarını destekleyici olarak kabul edilebileceği, *L. braziliensis* enfeksiyonuna göre *L. mexicana* enfeksiyonunun genellikle daha hızlı iyileştiği bildirilmiştir. (18, 160).

L. major enfeksiyonları *L. tropica* enfeksiyonlarına göre daha ciddi olmaya meyillidir. Üstelik çok az da olsa küçük çocuklar ve immün sistemi baskılanmış kişilerde visseralize olma potansiyeli taşıdıkları bildirilmiştir. Buna karşın Tunus, Lübnan, Irak ve İran’dan da *L. infantum*’un yol açtığı KL olguları bildirilmiştir (8, 101).

Saptanan *L. infantum* ile oluşan deri lezyonlarında ise kuluçka döneminin bir yıl kadar olduğu, genelde yüzde, ülserleşmeden nodüler formda kaldığı ve 1-3 yılda iyileştiği belirtilmiştir (48).

L. major ile oluşan lezyonlarda kuluçka dönemi bir haftadan iki aya kadar değişebilir ve lezyon hızla gelişip, enflamasyonlu ve eksudalı bir yapı kazanır; 2-3 ayda 3-6 cm boyutlarına ulaşır, 3-5 ayda iyileşebilir. Dudak ve burundaki lezyonların mukozalara yayılmadığı halde bölgesel lenf nodüllerine yayıldığı bildirilmiştir (88, 118). Özellikle epidemiler sırasında fazla sayıda ve deriyi derinlere doğru invaze etmiş mukozayı tutmayan lezyonlar görülür. Lezyonlarda hızlı gelişen nekroz sonrasında eksudasyon oluşumu sık olduğu için yaş tip olarak da değerlendirilir.

L. tropica ile oluşan KL lezyonları ise daha yavaş ilerler ve prognoz daha yavaş ve daha sakin seyreder. Kuluçka döneminin, genellikle 2-4 ay iken, 2 yıla kadar uzayabildiği gözlenmiş, lezyonun 8-12 ayda 1-2 cm'lik boyuta ulaşır, 10-14 ayda genellikle iyileşme ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (88). Lezyonda belirgin bir eksudasyon oluşmadığı için kuru tip olarak değerlendirilir. *L. tropica*'nın neden olduğu lupoid leishmaniasis, KL'in kronik bir formudur.

L. aethiopica'nın neden olduğu lezyonlar ise genelde yüzde lokalize ve tektir, satellit oluşursa nodüllerle etrafa yayılarak ilerler, ülserleşmemekle birlikte genelde 2-5 yıldan önce iyileşmez. Burun ve ağız mukozasına yakın yerde yerleşenler mukokütanöz yayılım gösterme eğilimindedir ve genellikle organlarda ciddi bir yıkım yapmazlar. Bu haliyle Güney Amerika'da görülen mukokütanöz hastalığa benzer. Ancak bundan önemli bir farkı asla oronazal kaviteye atlamamasıdır.

Yeni dünyada etken *L. braziliensis* ve *L. mexicana* kompleksleridir. *L. braziliensis*, genelde ekstremitelerde yerleşen, tek, derin ve kenarları yüksek bir ülser yapma

eğilimindedir; bu olguların % 80'inin bir yılda iyileştiği, geri kalan olgularda ise 10 yıla kadar uzayabilen bir süreçte lezyonun devam edebildiği bilinmektedir. *L. braziliensis*'in yol açtığı enfeksiyon daha sonra mukokütanöz leishmaniasise dönüşme konusunda yüksek risk taşır. 1991'de Ponce ve arkadaşları, 1997'de Noyes ve arkadaşları Honduras'tan; 1999'da Belli ve arkadaşları Nikaragua'dan atipik KL olguları bildirmişlerdir (51, 100, 132, 135, 139, 140).

L. guyanensis ile oluşan lezyonlar "Pian Bois" olarak adlandırılır; gövde veya ekstremitelerde birden fazla sayıda oluşan bu lezyonlar genelde lenfatik yayılım gösterirken, *L. panamensis*'in neden olduğu lezyonların, lenfatik yayılım ve ayrıca lenf nodları tutuluşu ile seyretmekte olduğu, lezyonların uzun yıllar kalabildiği bildirilmektedir (179).

"Uta" etkeni olarak da bilinen *L. peruviana* ile oluşan lezyonlar ise genelde çocuklarda, yüzde tek olarak görülür, 3-6 ayda iyileşen bu lezyonlar genellikle mukozalara yayılım göstermez. (27).

L. mexicana'nın daha çok yüzün yan kısımlarında lezyon yaptığı, kulakta tutuluş olduğunda kıkırdak doku harabiyeti ile birlikte, düzgün sınırlı ve komplikasyonsuzdur. Lezyonun uzun yıllar kalabildiği bildirilmiştir. Bu enfeksiyona özel olarak Chiclero ülseri adı verilir (27).

Diffüz KL (DKL), *L. aethiopica* ile oluşan 10.000 lezyondan birinde veya daha sık olarak *L. amazonensis* enfeksiyonlarında gözlenir (33).

Genellikle ilk lezyon ülserleşmezken, ciltteki lezyonun, kenarları yüksek ve içerisi parazitlerle dolu makrofajlar yanında granümatöz reaksiyona ait hücreleri de taşıyan nekrotik doku ile kaplı, yıllar içinde yavaş yavaş yayılan enfeksiyon, kan dolaşımı ile özellikle derinin soğuk olduğu yerlere taşınır (27). *In vitro* çalışmalarda ortama IL-2 ilavesi

ile bu hastaların T lenfositlerinin proliferasyon cevabı verdiği, ayrıca direkt olarak lezyona IL-2 ilavesi ile iyileşmenin hızlandığı da bildirilmiştir (3).

Yeni dünyadaki etiyolojik ajan *L. amazonensis*'tir. *L. amazonensis* infeksiyonları %30 olasılıkla diffüz KL ile sonuçlanır. İmmün sistemi baskılanmış kişilerde etyolojik olarak herhangi bir türe bağlı olmaksızın diffüz KL meydana gelir. Bu anlamda en sık HIV–*Leishmania* koinfeksiyonlu olgularda rastlanır (64, 76, 96, 142).

1.8. 2. Visseral (İç Organlar) Leishmaniasis (VL)

Ülkemizde özellikle 2-6 yaş arası çocuklarda daha sık gözlenen; erkeklerde kızlara göre daha fazla rastlanan VL, genellikle ılımlı, asemptomatik ya da çok az bulgu veren yapıda seyrederek, bunlara rağmen oldukça ciddi bir sistemik hastalıktır. Özellikle Akdeniz havzasında hastalığın hedefi daha ziyade küçük çocuklar ile immün sistemi baskılanmış kişilerdir. İnfekte kişilerin yalnızca küçük bir kısmında akut hastalık gelişir (111, 180, 181).

Kuluçka döneminin 2-3 haftadan iki yıla kadar değişebildiği, ortalama 2-4 ay sürdüğü belirtilmiştir (78). Bir olguda, endemik bölgeye ulaşması ile ateşin ortaya çıkışı arasındaki sürenin 10 günden az olduğu bildirilmekle birlikte, 34 aya kadar uzayabildiği de rapor edilmiştir (78, 161).

Ancak Kala-azar'ın spesifik bir semptomu yoktur ve kolaylıkla malaria, bruselloz, bakteriyel endokardit, tifo, tüberküloz ve hemopoetik maligniteler ile karışabilir (27). VL hastasının muayenesinde karşılaşılan bulgular hastalığın ciddiyeti ve kronik olup olmadığı ile doğrudan ilişkilidir. Hastalığı geçirmiş kişilerde yıllar sonra oluşabilecek bir immün supresyon durumunda sekonder özellikte yeni olgular ortaya çıkabilir. Eğer hasta endemik bölgeye yeni gelmiş ise hastalığın gelişimi akut olabilir. Bazı hastalarda üşüme ve titreme ile ani başlayan ateş, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, iştahsızlık, öksürük, burun

kanaması, diyare, ödem gibi belirtiler görülebilir (27). Ancak endemik bölgede yaşayan insanlarda hastalığın başlangıcı çok daha sessizdir.

VL, ateşin ani olarak 39-40 °C'ye çıkması ile başlayabildiği gibi, genellikle sessiz ve sinsî bir başlangıç gösterir. Başlangıç döneminde iştahsızlık, halsizlik, solukluk, baş ağrısı, baş dönmesi, öksürük veya diyare gibi belirtiler gözlenir. Akdeniz VL'sinde kum sineğinin soktuğu yerde, nadiren granülomatöz reaksiyon sonucu mercimek büyüklüğünde bir sertlik oluşur. Başlangıç dönemindeki subfebril ateş, ortalama iki hafta içinde yerini günde iki kez yükselen bol terleme ile düşen ateşe bırakır. Her ateş atağından sonra dalağın biraz daha büyüdüğü gözlenir ve buna bağlı olarak sinüzoidlerde kanın staz yapması ile kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin yıkımı sonucu anemi ortaya çıkar. Organlar bazen pelviste bile palpe edilebilir. Karın ağrısının nedeni büyümüş dalaktır. Bu hastalarda karın ağrısı ve kilo kaybı belirgindir. Buna ek olarak kemik iliğinin, içi amastigotlarla dolu makrofajlar tarafından istila edilmesi de anemiye körükleyen bir faktördür. Karaciğerin dalağa göre daha yavaş büyüdüğü bildirilmiştir (173).

Hint yarımadası ve çevresinde hiperpigmentasyon önemli bir bulgu iken, Afrika için periferik lenfadenopati ön plana çıkmaktadır. Hastalık ilerledikçe yakınmalar ve bulgular artmaya başlar. Eğer öksürük, diyare gibi belirtiler söz konusu ise ikincil infeksiyon akla gelmelidir. Sarılık varsa Kala-azar'a bağlı hepatit veya başka bir sekonder hepatit düşünülmelidir. Olguların 1/4'ünde deride, kıllarda değişikliklere eşlik eden ve görünümü adeta kwashiorkoru anımsatan abdominal ödem görülür. *L. infantum*'un neden olduğu olgularda deri ve kıl değişiklikleri pek yoktur (27). Hindistan'da ise neredeyse hastaların tamamının derisi kararır. Bazen hastada üveit ve retinal kanama da görülebilir. Hasta endemik bölgede yaşıyorsa bütün bu semptom ve bulgulardan daha çok halsizlik, kilo kaybı ve zaman zaman ortaya çıkıp zaman zaman kaybolan daha hafif ve nonspesifik

bulgularından fazlasına rastlamak zordur. Bunların da bir kısmı 3–4 yıl içinde iyileşir. Geri kalanlar ise VL prognozunu izlerler. Hasta yavaş yavaş daha halsiz bir hale gelir; zamanla adeta bir deri bir kemik kalır. Abdominal distansiyon organomegaliler nedeniyle iyice belirginleşir. Tedavi edilmeyen olguların %80–90'ı ölümlü sonuçlanır. Tedavi edilenlerden ise iyice terminal döneme gelmiş olanlarda başarısızlık söz konusudur. Tedavi edilenler için her hangi bir sekel beklenmemekle birlikte, siroz bildirilen bir olgu da olmuştur (27).

VL klinik olarak farklı şekillerde bulunur (173):

1.8.2.1. Akut VL

Akut VL'te şiddetli burun, dişeti, bağırsak kanamaları gözlenir ve kemik iliği baskılanmasına bağlı çok hızlı gelişen lökopeni, anemi, trombositopeni ile karakterize pansitopeni, tabloyu daha da ağırlaştırır. Bu tabloya gastrointestinal sisteme ait, özellikle diyare, kusma gibi yakınmaların eklenmesi ile hastanın genel durumu bozulur ve hasta 2-3 ay içinde kaybedilebilir.

1.8.2.2. Subakut VL

Klinik olarak en sık rastlanan şekil subakut formdur ve akut forma göre daha hafif seyreder. Klasik klinik tablosu, ateş, splenohepatomegali ve pansitopeni ile karakterizedir. Başlangıçta günde iki kez inip çıkan ateş tipiktir. Fizik muayenede karaciğerden daha büyük olan dalak, sol kosta sınırını 5-15 cm aşar. Genellikle hastalarda hemogloblin konsantrasyonu 5-9 gr/dl, lenfosit sayısı 2000-4000/mm³, trombosit sayısı 100.000-200.000/mm³ civarındadır (21).

Ateş yükselişleri ile dalağın başlangıçta yumuşak, daha sonraki dönemlerde ise sert olarak fizik muayenede ele gelecek şekilde büyüdüğü gözlenir. Karaciğer birinci ayın sonundan itibaren büyümeye başlarken, fizik muayenede genellikle sola sarkık, kenarları künt, kapsülü gergin ve duyarlı olarak palpe edilir. Çocuklarda boyun lenf bezleri

büyüyebilir. Akut şekle göre diyare nadirdir. Ancak zaman zaman romatizmal ağrıları gözlenebilir. Hastalık ilerledikçe kilo kaybı ve anemi belirginleşir, ancak tüm bunlar hastanın normal yaşamını etkileyecek düzeyde olmaz. Tedavi edilmeyen semptomatik olgularda genellikle ölüm görülür. Ancak, yapılan çalışmalarda uygun sağaltıma rağmen de %1 ile %11 arasında değişen oranlarda hasta kaybı bildirilmiştir (68, 153, 169). Ayrıca, bağırsak kanaması, anemiye bağlı gelişen kalp ve karaciğer yetmezliği, ülserli stomatit, pnömoni, bağırsak gangreni, enterokolit, nefrit, kanlı ishal hastalarda ölümlere neden olan en önemli komplikasyonlardır. Vücut direncinin düşmesi sonucu pnömoni, dizanteri ve tüberküloz gibi sekonder enfeksiyonlar ile de ölüm gözlenebilir (12, 54, 153).

1.8.2.3. Kronik VL

Kronik olgularda subakuttan daha silik bir tablo gözlenirken, zayıflama, karaciğer ve dalak büyüklüğü dışında yakınmaları olmayan hastalar, yaşantılarına normal olarak devam edebilirler (21).

1.8.2.4. AIDS/VL İkili Enfeksiyonu

Son yıllarda Avrupa'da AIDS/VL ikili enfeksiyonunu özellikle İspanya, İtalya, Fransa ve Portekiz gibi Akdeniz ülkelerinde yoğunlaşmakta ve bu ülkeler için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (43, 137).

İspanya'da VL hastalarının yarısı HIV pozitifdir. HIV pozitif hastalarının %3'ünde VL gelişmesi beklenmektedir (27). 1994 yılında Avrupa'da HIV enfeksiyonlarına eşlik eden toplam VL olgu sayısının yaklaşık 300 olduğu tahmin edilirken, bu sayının 1997 yılında 1000'e ulaştığı öne sürülmüştür (21).

HIV ile infekte olmayan normal erişkinlerde gözlenen tablo ile karşılaştırıldığında, HIV ile infekte VL olgularında konağın immün direncinin azalmasına veya baskılanmasına bağlı olarak, özefagustan rektuma kadar yaygın gastrointestinal sistem tutuluşları, solunum

sistemi, santral sinir sistemi, periton, eklem ve deri gibi normal dışı organ yerleşimleri görülebildiği, hepatosplenomegalinin genelde tespit edilemediği, CD4⁺ T lenfosit sayısının diğer fırsatçı enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında normalin altında olmakla beraber, aşırı düşmediği tespit edilmiştir (121, 136). HIV ile infekte olmadığı halde, immün sistemi organ nakli, kortikosteroid kullanımı gibi nedenlerle baskılanan başka olgularda da VL, fırsatçı enfeksiyon olarak saptanmıştır (68, 92). Olguların önemli bir kısmında pozitif antikor yanıtı oluşmayabilir. Olguların %90'ında CD₄ lenfositlerinin sayısı litrede 300 binin altındadır. CD₄/CD₈ oranı ise 1'in altına düşmüştür (27). Hastalığın tedaviye yanıtı oldukça yavaş gerçekleşir. Ancak büyük olasılıkla daha sonra yeniden alevlenecektir.

1.8.2.5. Konjenital VL

VL'li bir gebe bebeğine inutero yaşamda hastalığı bulaştırabilmektedir. Buna konjenital VL denmektedir. Parazitler fetusa infekte makrofajlar yoluyla taşınırlar. Yenidoğanın konjenital VL'inde klinik özellikler yetişkinlerde görülen semptom ve bulgulara benzemektedir (189).

1.8.2.6. Post Kala–Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL)

Bazen VL tedavi olduktan yıllar sonra da, uzun bir latent fazın ardından bir takım lokal veya yaygın deri lezyonlarıyla yeniden kendini gösterebilir. *L. donovani* enfeksiyonunun bir sekeli olarak meydana geldiği, hastaların çoğunun önceden VL tanısı alıp sağaltım uygulanmış hastalar olduğu; bir kısmının sadece ateşli bir enfeksiyon tablosu tarif ettikleri, bir grup hastada ise hiçbir yakınma olmaksızın PKDL'in meydana gelebildiği belirlenmiştir. Tedavi edilmiş VL olgularından sonra Sudan'da görülme oranı %50, Hindistan'da %6-20 civarında, Doğu Afrika'da %2-5'inde, Çin'de ise nadiren görüldüğü

rapor edilmiştir. Sudan’da iyileşmeyi takiben 0–6 ay içinde, Hindistan’da 2–3 yıl içinde başlar. Lezyonlarda bol miktarda parazit bulunur. Bu yüzden PKDL’nin epidemiler arasındaki periyotlarda rezervuar görevini sürdürmesi bakımından epidemiyolojik önem kazanmaktadır. Patogenezinde immünolojik bir mekanizma yer almakta, periferik kanlarında yüksek IL-10 bulunan VL hastalarında PKDL beklenmektedir. VL esnasında monositlerde interferon γ (IFN- γ) sentezlenmez. Ancak PKDL’de bu durum değişmiştir. VL tedavisinin ardından deride bulunan bir miktar parazite karşı monositlerde sentezlenen IFN- γ derideki inflamasyon reaksiyonunu artırır. Hindistan PKDL’sinde tedavi şarttır. Ancak Sudan’da kronikleşip kronikleşmediğine göre karar verilir. (27, 114, 188).

1.8.2.7. Sudan Tipi VL

Sudan’da endemik olarak gözlenen VL’in insidansı %4 olarak tespit edilmiştir (186). Yapılan çalışmalarda 1995’ten önceki 10 yılda Sudan’da 100.000 kişinin bu hastalıktan öldüğü bildirilmiştir (153).

Enfeksiyon bu hastalarda, klasik bulgulara ek olarak ayaklarda yanma gibi nörolojik belirtiler, kolesistit gibi atipik klinik tablolar ve olguların %56’sında PKDL gözlenmiştir. Ayrıca bölgede konjenital leishmaniasisin de görüldüğü bildirilmiştir (49, 67). PKDL’in kliniği Hindistan’da gözlenen şekle benzerlik göstermekle beraber, farklı olarak tedavinin bitişinden yaklaşık 1,5-2 ay sonra makül ve papül olarak başlayan lezyonların nodüller halinde tüm yüz, göğüs, kollara ve zamanla tüm vücuda yayılabildiği yayımlanmıştır (67).

1.8.3. Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)

MKL etkenleri *L. braziliensis* başta olmak üzere, *L. braziliensis* kompleksine ait türlerdir. *L. braziliensis* ile infekte hastaların %2-40’ında, *L. guyanensis* ve *L.*

panamensis'le infekte olgularda ise daha nadir olarak, derideki lezyonlar mukozal yayılım gösterir. *L. guyanensis*'in yol açtığı enfeksiyona “pian bois” adı da verilir. Pian bois'in multilezyoner bir kliniği vardır. Birkaç ay içinde kendiliğinden iyileşen ve “uta” olarak da adlandırılan *L. peruviana* olguları daha selim karakterlidir. *L. braziliensis* enfeksiyonlarında lenfadenopati sık görülen bir bulgudur. Neredeyse tamamen Orta ve Güney Amerika'da görülür. Kronik ve çok ciddi bir durumdur. En sık nazal mukozaya tutuluşu gözlenirken, bunu farinks, larinks ve üst ekstremitelerin tutuluşunun izlediği, burundaki lezyonların genelde nodül olarak başlayıp, burunda tıkanıklık ve zaman zaman epistaksis şikayetlerine neden olduğu bilinir. Bundan kısa bir süre sonra burun septumu perforasyon olarak lezyonların oronazofaringeal mukozaya ve kemiklerine ciddi bir yıkım ve yayılım gösterdiği, Portekizce'de “sünger” anlamına gelen “Espundia” olarak bilinen bu enfeksiyonda, şiddetli mukozal hasar gelişir. Hipertrofik bir ağız, dudak ve burun yapısı oluşabilir. genellikle hastaların sekonder sepsis, aspirasyon pnömonisi ve beslenme bozukluğu ile kaybedildiği yayımlanmıştır (105, 179) .

1.9. Tanı

Leishmaniasis tanısında epidemiyolojik veriler, klinik ve laboratuvar bulguları ile serolojik tanı yöntemleri önem taşımaktadır. Etkensel tanı ise her zaman için en değerlidir. Tipik belirti ve bulguların tümünün genellikle bulunmamasının yanında atipik yerleşimler ve klasik VL bulgularına uymayan semptomlar da görülebilmektedir. HIV ile infekte olgularda serolojik testler olguların ancak yaklaşık yarısında pozitif olabilmektedir (53, 180).

VL tanısında eğer olanak varsa birden fazla tanı yönteminin kullanılması önerilmektedir. Böylelikle diğer hastalıklardan ayırıcı ve doğru tanı konulması mümkün olabilmektedir. Leishmaniasisin laboratuvar tanısı özellikle VL tanısında, klinik tabloyu

kanıtlayacak ve bizi kesin tanıya götürecektir etkensel ve indirekt laboratuvar yöntemleri önem taşımaktadır. VL'in laboratuvar tanısı tedavi edilmemiş hastalarda oldukça basit, nükslerde ve yetersiz tedavi uygulanmış hastalarda ise daha zordur (81, 132, 135).

1.9.1. Klinik Tanı

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmada ve önemli bir yer tutmaktadır. Endemik bölgelerde sürekli düzensiz ateş, splenomegali, hepatomegali, kilo kaybı, zayıflık, pansitopeni ve hipergamaglobulinemi bulguları ile hekime başvuran olgularda öncelikle hekimlerin VL'yi akıllarına getirmeleri gerekmektedir. Endemik bölgede yaşayan ve bu bölgelere yolculuk eden insanların VL açısından daha fazla risk altında olduğu unutulmamalıdır. Ateş, splenomegali ve hipergamaglobulinemi bulguları olmayan ve endemik bölgeden ayrıldıktan haftalar veya aylar sonra semptomları ortaya çıkan olgularda tanı çok zor konulmaktadır.

Klinik tanıda en sık görülen bulgular, başlangıçta günde iki kez yükselen sonra düzensiz olan ateş, dalak ve karaciğer büyümesi, lökopeni, taşikardi, kansızlık zayıflama ve halsizlik olmakla birlikte, yaygın lenfadenopati, trombositopeniye bağlı kanama diyatezi ve sekonder enfeksiyonlar da görülebilmektedir. AIDS ve diğer immün yetmezlik durumlarında klinik belirtiler değişmektedir.

1.9.2. Etkensel Tanı

Hastalardan direkt alınan veya doku kültür, deney hayvanı inokülasyonu, *in vitro* kültür gibi yöntemlerle elde edilen materyalin, lam üzerine yayılıp, boyandıktan sonra ışık mikroskopu altında incelenerek doğrudan parazitin görülmesi esasına dayanır.

1.9.2.1. Direkt Bakı

VL olgularında örnek alınacak dokular enfeksiyonun yerleştiği RES organlarından dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlardan elde edilen doku sıvısıdır. Kesin tanısı ise;

buralardan alınan aspirasyon materyallerinden yayma preparatları hazırlanması, Giemsa veya Wright boyası ile boyanması ve bu materyallerin Novy–McNeal Nicolle (NNN) besiyerindeki kültürü ile konulmaktadır.

Direkt mikroskopik bakı amacıyla; kazıntı, tedavi edilmemiş yoğun parazitemili olgulardan alınan direkt kan “buffy coat-beyaz hücre”, aspirasyon (dalak, kemik iliği, karaciğer, deri lezyonu, lenf düğümü gibi) veya biyopsilerden hazırlanan preparatlar metanol ile fikse edildikten sonra Giemsa veya Wright boyası ile boyanarak mikroskopta immersiyon objektifi altında amastigotlar açısından araştırılır. Özellikle dalak ve kemik iliğinden alınan örneklerde monositlerin bazen de polimorf nüveli lökositlerin içinde amastigotları saptama daha kolaydır. Tanıda kemik iliği aspirasyonu en güvenli ve değerli yöntemdir. Kemik iliği aspirasyon materyalinde amastigotların görülme şansı ilk enfeksiyonda %94, relapslarda ise %64 oranındadır. Tedavi sonrası yapılan aspirasyonda ise çok azaldığı rapor edilmiştir (1).

En yüksek pozitif sonuç, dalaktan ponksiyonla alınan materyalden elde edilir. Son derece riskli bir invaziv girişim olan ve DSÖ tarafından tavsiye edilmeyen dalak ince iğne biyopsisi uygun protrombin zamanı ve trombosit sayısı yanı sıra, deneyimli ekipler tarafından yapılmalıdır. Bu örnekle hazırlanan yaymaların mikroskopik incelemesi %96-98’in üzerinde duyarlılık değerine ulaşabilmektedir. Ancak son derece frajil, büyük ve yumuşak dalağın öldürücü kanamalara yol açma riski çok fazladır. Bunun için; dalak aspirasyonu uygulanacak kişilerde trombosit sayısı 40.000’in, protrombin zamanı ise %50’nin üzerinde olmalıdır. Karaciğer ponksiyon materyalinde ise hastaların %77’sinde olumlu sonuç alındığı belirtilmektedir (1, 81, 163).

Kemik iliği ponksiyonu; lokal anestezi altında steril kemik iliği aspirasyon iğnesi ve 10 ml’lik şırınga kullanılmak suretiyle *Crista iliaca*’dan, vertebra çıkıntısından veya

sternumdan 1 ml. kadar örnek alınır. Güvenilir, en az riskli ve kolay olduğundan, çocuklarda çok sık uygulanan yöntemdir. Burada *Leishmania*'ların görülmesi dalak ponksiyonuna oranla daha az sayıda olmakla beraber vakaların %90'ında pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir (173). Ayrıca tedavi görmüş vakalarda *Leishmania*'ların en son kemik iliğinden kayboldukları belirtilmektedir.

Lenf nodu ponksiyonu; inguinal lenf nodlarının daha uygun olduğu belirtilmiştir. Lenf nodu parmaklar aspirasyonu arasında tutulur ve 5 ml'lik şırıngaya takılmış 21G numaralı iğneyle girilir. Lenf nodu hafifçe sıkıldıktan veya iğne ileri-geri hareket ettirildikten sonra çıkartılır. Yayma yapılır, eğer yeterli örnek varsa kültüre alınır.

Kültür amaçlı besiyerleri monofazik ya da difazik olabilirler. Monofazik besiyerlerine Schneider besiyeri, M199, Grace besiyeri, difazik besiyerlerine NNN besiyeri, Tobies besiyeri gibi besiyerleri örnek verilebilir. Genelde difazik besiyerleri çalışmalarda tercih edilmektedir. Biyopsi ile alınan materyal ya da sitratlı kan örneği NNN besiyerine inoküle edilmesinden sonraki ortalama 7-12 günde hareketli promastigotlar üremeye başlarlar. Kültür sonucunun negatif kabul edilmesi için 1 ay süre ile besiyeri kontrol edilmelidir.

Leishmania promastigotları %10-20 Fetal Sığır Serum (FCS) ve antibiyotik eklenmiş bazı sıvı besiyerlerinde de çok hızlı ve fazla miktarda üremektedir. Bunlar arasında RPMI 1640, M199, Schneider's Drosophila Medium ve Nutrient Broth sayılabilir. Besiyerlerinin haftada bir kez olmak üzere 4 hafta süreyle takip edilmesinin uygun olduğu bildirilmiştir (1, 119, 129, 139).

Ekim yapıldıktan sonra besiyerleri 24- 27°C'lik etüvde saklanır Ancak etkenin izolasyonu için NNN besiyeri kullanılması daha uygundur. Üremeyi takiben istenirse diğer sıvı besiyerlerine aktarılır. İzole edilen parazitin kültürde sürekliliğinin salanması ile

üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmasına olanak sağlanabilmektedir. Ayrıca bu suşların kriyopreserve edilerek virulansları bozulmadan saklanabilirler (119).

KL düşünülen lezyonun kazınması ve özellikle sağlam doku ile birleşme yerine küçük bir insizyon uygulanarak, epidermis dermis bileşkesinden materyal alınması veya lezyonun kenarından enjekte edilen fizyolojik suyun geri aspire edilmesi ile amastigot elde etme şansının arttığı ve lezyon bu işlem öncesinde temizlendiğinde amastigotların daha rahat olarak görüldüğü belirtilmiştir (119).

1.9.2.2. Hücre Kültürü

Makrofaj ile amastigot arasındaki ilişkilerin incelendiği çalışmalarda amastigot doku kültüründe ya da hücre kültüründe üretilir (164).

Hücre kültürü serileri; insan periferik kanında bulunan monositler, daha önceden hazırlanmış makrofaj hücre kültürü serileri (örn: fareden hazırlanan P388D ve J774G8 gibi seriler) ve Köpek sarkoma hücreleridir.

1.9.2.3. Deney Hayvanları

Deney hayvanlarına inokulasyon aslında tanısal olarak pek de kullanışlı bir yöntem değildir, çünkü sonuç alınması aylar sürebilir. Deney hayvanı olarak özellikle hamster başta olmak üzere, kobay ya da fare kullanılabilir (164).

Deney hayvanlarına inokulasyon muköz membranlar yoluyla, intraperitoneal, intrasplenik gibi çeşitli şekillerde uygulanabilir: İnokulasyonun ardından hayvan haftalık olarak izlenmeye alınır. Deri lezyonları, organomegali, metastatik lezyonlar bu incelemede aranacak bulgulardır.

1.9.3. Moleküler Tanı

İnfekte organlardan elde edilen örneklerde, genelde parazitin az miktarda veya atipik morfolojide bulunması, kültür yöntemindeki kontaminasyon riski gibi nedenlerle

Leishmania parazitlerinin saptanmasında güçlükler olabilmektedir. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Bu nedenle hastadan kan gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulanabilir (163).

1.9.3.1. Parazit DNA'sının Gösterilmesi

1980'lerin başından bu yana parazit DNA'sının gösterilmesi için hibridizasyon ve benzeri çeşitli teknikler kullanılmıştır. Bu yöntemlerin duyarlılığı göz önüne alındığında, hibridizasyonun karışık bir prosedürü olması nedeniyle rutin uygulamalara dâhil edilmemiştir. PZR tekniği *Leishmania*'nın moleküler biyolojisine ve tanı yöntemlerine büyük bir katkı sağlamıştır. Kinetoplast DNA'sının (kDNA) seçimi bu konuda son derece isabetli olmuştur. kDNA içinde yer alan "minicircle" bölümünün binlerce kopyası bulunduğu için, PZR için ideal bir hedef haline gelmiştir. Son yıllarda tanı amaçlı PZR yöntemi için bir çok yeni hedef DNA bölgeleri tanımlanmış, yüksek duyarlılık ve özgünlük değerleriyle önem kazanmıştır (81, 180).

Sudan'da yapılan bir çalışmada kDNA PZR'nun duyarlılığı, lenf düğümü ve kemik iliği biyopsileriyle elde edilen materyalin mikroskopik incelemelerine göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak VL olgularında, perifer kandan alınan örneklerle yapılan çalışmada duyarlılık değeri sadece %70 olarak saptanmıştır (36, 164).

VL'li kişilerden alınan bir damla kan filtre kağıdı üzerinde saklanabilir ve bu test materyali olarak kullanılabilir. Bu kişilerin kanları kullanılarak, mikroskopik inceleme duyarlılığı (%26,3), kan kültürünün duyarlılığının (%42,3) ve PZR-ELISA yönteminin duyarlılığı (%75) bulunmuştur, bu tür bir toplulukta tarama testi olarak da son derece yararlı olabileceği vurgulanmaktadır (164). Bu yöntem biyopsi materyali elde etmenin riskli olduğu durumlarda kullanışlıdır (46).

Diagnostik amaçlı PZR hedef bölgeleri şöyle sıralanabilir:

- kDNA minicircle sabit bölgesi
- Nükleusta ssu rRNA geni ile lsu rRNA genleri arasındaki ITS operonunun ITS-1 bölgesi
- Gp63 proteinini kodlayan gp63 geni
- Nükleustaki, ribozomun küçük alt ünitesini kodlayan ve türden türe polimorfizm gösteren ssu rRNA geni

1.9.4. Serolojik Tanı Yöntemleri

VL'in bir protozoon enfeksiyonu olarak tanımlanmasından sonra, Kompleman Fiksasyon Testi, İndirekt Hemaglutinasyon(IHA), İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT), Direkt Aglutinasyon Testi (DAT), Formol-jel reaksiyonu, ELISA gibi serolojik testler geliştirilmiştir. Bağışıklık sistemi sağlam VL olgularının %90'ında anti-*Leishmania* antikor titresi oldukça yüksektir. VL'den şüphelenildiği durumlarda, tanıda yardımcı olmak amacıyla yüksek duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testler uygulanmaktadır. Serolojik yöntemlerde amaç akut fazda artan anti-paraziter antikorların titrelerini saptayarak tanıya yardımcı olmaktadır. Serolojik testlerin pozitif olması leishmaniasisde çok değerli olmakla birlikte seronegatif vakalarda diğer parazitolojik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır, dolayısı ile birden fazla test uygulamanın serolojik tanının değerini arttırabileceği bildirilmektedir.

Uzun zamandır uygulanan IFA testine ek olarak ELISA, jel difüzyonu, rK39 antijeninin kullanıldığı dipstick testi, DAT rutinde ve seroepidemiolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda tanıya yardımcı olmak üzere Western Blotting testi de kullanılmaya başlanmıştır (50, 62, 81, 89, 91, 124, 132, 135, 163).

Hastaların idrarlarındaki antijeni belirlemek için yeni bir lateks aglütinasyon testi (KATEX) geliştirilmiştir. Bunun duyarlılığı %68–100 arasında değişmekte olup, özgünlüğü de %100 değerindedir. Bu antijen enfeksiyonun çok erken dönemlerinde saptanabilir. Bu yöntem kolaylıkla saha koşullarında kullanılabilir (163).

1.9.4.1. İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT)

IFAT, uygulaması kolay olduğundan, kısa zamanda sonuç alındığından, sonuçları çok duyarlı ve spesifik bulunduğu dolayısı etki tanı zor olan parazit hastalıklarının tanısına büyük katkı sağlayan serolojik tanı yöntemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemden antijeni elde edilebilen bütün parazit hastalıklarının tanısında yaygın olarak yararlanılmaktadır.

Toplamda 290 köpek serumu kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ELISA ve IFAT teknikleri için duyarlılık değerlerini sırasıyla %99,5 ve %98,4 olarak buldular. Ancak IFAT tekniğinin özgünlük değeri (%100) ELISA'ninkinden (%97,1) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (91, 132). Bu gün özellikle VL tanısında kullanılan bu teknik hemen tüm immünoparazitoloji laboratuvarlarında uygulanmaktadır. IFAT özellikle Akdeniz bölgesindeki köpek, tilki ve kemiricilerdeki leishmaniasisin konak rezervuarlarının çok güvenli bir şekilde tanımlanması için de kullanılmaktadır.

1.9.4.2. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT)

DAT, 1986 yılından beri görece olarak uygulaması daha kolay, ekonomik, güvenilir ve özellikle saha çalışmalarında kolaylıkla uygulanabilecek bir aglütinasyon yöntemidir. Hasta serumundaki antikorların işaretli promastigotlarla plak kuyucuğunda aglütinasyon oluşturması ilkesine dayanır. Bu yöntemde konjuge, substrat gibi pahalı ve belli koşullarda saklanması gereken maddeler kullanılmamasına karşın antijen hazırlanmasında oldukça titiz davranılması gerekmektedir. Konjuge kullanılmadığı için

insan, köpek, keçi, tavşan, fare veya koyun serumları ile bu test rahatlıkla uygulanabilmektedir (163).

1.9.4.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Duyarlılığı oldukça yüksek olmakla birlikte, özgünlüğü tamamen kullanılan antijene bağlıdır. ELISA-VL'in tanısında ve seroepidemiolojik araştırmalarda kullanılan hassas ve önemli yöntemler arasında gösterilmektedir. Esas olarak oluşturulan antijen antikor kompleksine enzim ile işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor varsa renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır (129, 141).

Sıklıkla kullanılan antijen ham eriyik antijendir (crude soluble antigen, CSA). CSA parazitlerin defalarca dondurulup eritilmesinin ardından çok yüksek devirlerde santrifüj edilmeleriyle hazırlanır. Öte yandan 66, 72, 116 kDa'luk antijenlerle gerçekleştirilen ELISA testlerinin özgünlükleri %100'e çıkmış, ancak duyarlılıkları %37,5'ta kalmıştır (163).

Son senelerde daha spesifik olan rekombinant leishmanial antijenler (Antijen gp63, antijen rK39, antijen gp70-2 ve dp 72 gibi) kullanılmaktadır. Bu testlerle yanlış pozitif sonuç veren olguların tespitinin mümkün olduğu görülmüş. Palatnik de Souza ve arkadaşları, 36 kDa'luk fukoz-mannoz ligand glikoproteinini antijen olarak kullandıkları ELISA testinde %100 duyarlılık ve % 96 özgünlük değerlerini elde etmişlerdir (163). Son çalışmalara göre ise eğer CSA'nın elde edileceği promastigotlar proteinsiz bir besiyerinde çoğaltılırlarsa, ELISA testinin VL tanısında %95'e varan duyarlılık ve özgünlük değerleri bulunmaktadır.

VL'nin tanısında rK39 antijeni kullanılarak hazırlanan "rK39 Dipstik®" kullanımı kolay, hızlı ve görsel bir test olarak piyasada mevcuttur, ve saha çalışmalarında kullanışlı

bir test haline gelmiş, VL hastalarını içeren ilk geniş kapsamlı saha çalışmasında %100 duyarlı ve %98 özgünlüğü bulunmuştur (163, 165). Anti-rK39 antikorlarının titreleri doğrudan hastalığın ne kadar aktif olduğuyla ilişkilidir. Bu sayede VL'li hastaların tedaviye verdikleri yanıtı değerlendirmek açısından da değerlidir ve hastanın takibi açısından önem kazanır (157, 146, 163).

1.9.4.4. Western Blotting (WB) Yöntemi

Western Blotting (WB) yöntemiyle belli antijenlere spesifik olan özgün antikorlar tespit edilir. Bu yöntemin avantajı çok küçük antijenik yapıları ve çapraz reaksiyon veren antijenleri bile gösterebilmesidir. Ancak zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir.

Eriyik leishmanial antijen ve moleküler standartlara Sodium dodecyl sulfate (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi uyguladıktan sonra jeldeki polipeptidler nitrosellüloz membrana geçirilmektedir. Bu membran 3 mm genişliğinde uzunlamasına kesilerek normal ELISA işlemi uygulanmaktadır. ELISA da olduğu gibi spesifik antijenler kullanılabilir. Western Blot'ın IFAT ve ELISA'ya oranla daha hassas olduğu kabul edilmektedir. VL hastalarının serumları 12- 120 kD arasında moleküler ağırlıktaki bir çok antijeni kapsamaktadır. 14- 16 kD antijenleri leishmaniasis için en yüksek hassasiyeti göstermektedirler. Bazı vakalarda 14 kD bantı bulunmasa da 16 kD'luk bant mutlaka saptanmaktadır. AIDS'li hastalarda IFAT ve ELISA testleri negatif bile olsa Western Blot spesifik antikorları sınıflandırabilmektedir. Endemik bölgelerdeki VL hastalarının tanımlanmasında 14- 16, 22, 24 kD antijenlerine karşı antikorlar kullanılırken epidemiyolojik çalışmalarda 14 kD ve 16 kD antijenlerine karşı antikor taramanın değerli bir tanı aracı olduğu belirtilmektedir (155, 163).

1.9.4.5. Leishmanin Deri Testi (Montenegro)

L. donovani kültür antijenlerinin deri içine inokülasyonu ile yapılan allerjik bir test olarak bildirilmektedir (124). VL esnasında negatif olup genellikle başarılı bir tedaviden sonra pozitifleşir ve gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterir. Epidemiyolojik çalışmalarda belli bir bölgede insanların parazitle karşılaşma oranlarını saptamak amacıyla kullanılır (52).

Leishmanin deri testinin, özellikle KL ve MKL tanısında oldukça duyarlı ve özgül olduğu, ancak yararlı bir antijen için oluşturulan kombinasyonunun çapraz reaksiyon veren antijenlerden oluşmaması gerektiği, böylece hatalı negatif sonuçların önlenmiş olabileceği bildirilmiştir (163).

Ayırıcı tanıda VL; sıtma, malta humması, Raci Humması, bruselloz, verem, tüberküloz, döneke humma, tifo, paratifo, sepsis, dizanteri, histoplazmoz gibi hastalıklarla karıştırılabilir. Hodgkin enfeksiyöz, hepatit, enfeksiyöz mononükleoz, lösemi, chagas hastalığı, akut şistozomiyaz, hepato-splenik şistozomiyaz, PKDL, lepra ve sifilisten ayırt edilmelidir (81, 120, 135).

1.8. Sağaltım

Dünyada 88 ülkede (16 gelişmiş, 72 gelişmekte olan) endemik olduğu bildirilen leishmaniasisin, kontrol altına alınmasında en önemli nokta, hastaların etkin olarak tedavi edilmesinden geçmektedir. Uygun tedavi uygun ilaç seçimine bağlı olduğundan uygun ilaç seçiminde birkaç faktörü göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Örneğin; enfeksiyon deri veya iç organlarda görülebileceğinden, kullanılan ilacın farmakokinetik özellikleri, *Leishmania* türlerinin endemisi ve özellikleri, toplumun beslenme ve immünitisi, ilaç direncinin paterni ve düzeyi, ilacın fiyatı önemlidir. İnsanda enfeksiyon etkeni olabilen 15'den fazla *Leishmania* türünün ilaçlara duyarlılığın farklı olduğu izlenmiştir. Deneysel

çalışmalarda, pentamidin aktivitesinin T hücre aktivitesinden etkilendiği saptanmıştır. İlaç direnci, tedavi başarısızlığından sorumlu en temel faktörlerden biridir (34, 145).

1.8.1. Visseral Leishmaniasis Tedavisinde İlaç Kullanımı

1.8.1.1. Beş Değerlikli Antimon Bileşikleri (Sb^V)

Leishmaniasis sağaltımında ilk kez 1927 de Chopra tarafından önerilen bu ilaçlar ağır metaldir ve *Leishmania* amastigotlarında glikolitik enzimleri, yağ asidi oksidasyonunu, DNA ve RNA sentezini inhibe ederler (53).

Günümüzde beş değerlikli antimon bileşiklerinin iki formu kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi, sodyum stiboglukonat (Pentostame[®]) 100 mg/ml antimon içermekte, 20 mg/kg/gün dozunda 30 gün süre ile IV ve IM uygulanmaktadır. İkincisi ise meglumin antimoniyat (Glucantime[®]) 85 mg/ml antimon içermekte, 30 gün süre ile IV ve IM uygulanmaktadır (128). Her iki ilacın ucuz olmaları ve yararlanımlarının yüksek olması ile hala çok değerli ilaçlardır. Sağaltım süresinin sonunda dalak boyutlarının yaklaşık %50 azaldığı ve bunu takip eden 2 ay içinde de normal boyutlarına döndüğu gözlenmiştir (106).

Direnç, VL'te klinik ve ekonomik yönden önemli bir sorundur. Son yıllarda Sb^V'a karşı primer veya sekonder direnç görülebildiği, ancak primer direncin yaygın olmadığı bildirilmiştir. Sudan ve Hindistan'dan antimon bileşiklerine dirençli olgular bildirilmiştir. HIV-*Leishmania* koinfeksiyonu bulunan hastalarda relaps sık görülür. paromomisin ya da IFN- γ ile birlikte kullanıldığında oldukça etkilidir. Dünya üzerindeki endemik bölgelerin ekonomik koşulları göz önüne alındığında, tedavi maliyetleri en az olan beş değerlikli antimon bileşikler tercih edilmektedir. Sistemik yan etkileri genellikle doza bağımlıdır. Halsizlik, polinevrit, cilt hastalıkları ve T dalgasında basıklık, ST dalgasında uzama ile karakterize EKG değişiklikleri, kas ve iskelet sistemi ağrıları, Aminotransferaz seviyesinde artma, pankreatit,

böbrek fonksiyonlar bozulması gibi ola bilmekte, aşırı dozlarda (60 mg/kg) ölümcül aritmilerin gelişebildiği bildirilmiştir (79, 95, 145, 156).

1.8.1.2. Pentamidin

Antimonlara dirençli VL tedavisinde kullanılmaktadır. 6 hafta boyunca haftada 3 kez olarak 2-4 mg/kg IM uygulanmaktadır. Etki mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, kinetoplast DNA-mitokondrial kompleksi bozduğu belirtilmiştir. Dirençli bölgelerde beş hafta uygulandığında %77, dokuz hafta sonunda ise %94 başarı elde edildiği, ancak 1990'lardan itibaren yine aynı bölgede ilaca direnç gelişebildiği belirtilmiştir. Miyalji, kusma, baş ağrı, hipoglisemi, hipotansiyon, bulantı, enjeksiyon bölgesinde ağrı, bazen ağızda metalik tat hissi, yanma hissi, karın ağrısı ve diabet gibi yan etkileri görülmektedir (156).

1.8.1.3. Paromomisin (Aminosidin)

Aslında bir aminoglikozid antibiyotiktir. Anti-leishmanial etkisi 1960'larda bildirilmiştir. Hindistan'da dirençli olan bölgelerde tek başına kullanılmaktadır. Günde bir kez 21 günlük 12- 20 mg/kg dozlarda tedavi uygulanmakta. Kenya'da yapılan çalışmada VL'tedavisinde 14 -16 mg/kg paromomisin ile %79 başarı elde edilirken, Hindistan'da %82 ve Sudan'da %90 başarı sağlanmıştır. KL hastalarında ise yüksek doz tek başına kullanımlarda bile istenen sonuç alınamamıştır. İsrail'de özellikle *L. major* sonucu gelişen KL hastalarında %15 paromomisin ve %12 metilbenzotium klorid içeren pomat günde 2 kez lezyon üzerine uygulanmış ve %100 başarının yanında, tedavi olmadan kendiliğinden iyileşen gruba göre %50 daha kısa sürede ve skar bırakmadan iyileşme sağlandığı gözlenmiştir. Ototoksik ve nefrotoksik gibi yan etkiler izlenmektedir (77, 156).

1.8.1.4. Allopürinol

Hipoksantin analogu olan allopürinol, *Leishmania* parazitinde purin bazlarının yerine geçip, RNA sentezine katılmakta, normal protein sentezini bozup, purin

anabolizmasını inhibe etmektedir. Dirençli VL olgularında kombine şekilde pentavalanla 30 gün süreyle 20 mg/kg/gün kullanıldığında daha etkili olduğu izlenmiştir. VL'e karşı tek başına kullanımı yetersiz kalmaktadır (61, 156).

1.8.1.5. Amfoterisin B ve Lipozomal Amfoterisin B (AmBisome®)

Amfoterisin B'nin vücuttaki temel hedefi ergosterol yapısındaki steroller, *Leishmania* türleri ve mantarlardaki hedefi ise hücre zarındaki sterollerdir. Antileishmanial ilaç olarak antimon bileşiklerine göre 400 kat daha güçlü olduğu bildirilmektedir. Çünkü amastigotların en önemli membran sterolu olan ergosterole bağlanır ve membranın bozulmasına sebep olur. 500 ml %5'lik dekstroz içine 5 gün boyunca 1-2 mg/kg dozunda 4-6 saat içinde infüzyon şeklinde uygulanmaktadır. Konvansiyonel Amfoterisin B'ile dirençli vakalarda hindistanda %98 iyileşme elde edildiği bildirilmiştir (25, 79, 145).

İnfüzyona bağlı ateş, anemi, titreme, kemik ağrıları, anaflaksi, trombositopeni, konvülziyon, flebit, renal toksisite, hipokalemi, anemi ve nadiren gözlenen kardiyak arrest gibi, ciddi yan etkiler izlenmektedir. Bu sebeplerden toksisitesi daha az ve daha çok etkin olan Lipozomal Amfoterisin B'nin 3 değişik şeklinin ortaya çıkmasına neden olmuştur:

- a) Lipozomal AmB (L-AmB, AmBisome®)
- b) AmB Kolloid Süspansiyonu (ABKS, Amphocil®)
- c) AmB Lipid Kompleksi (AMLK, Abelcet®)

Lipozomal Amfoterisin B 3 mg/kg dozuyla gün aşırı beş enjeksiyonu takiben %100 başarı elde edilmiş, infüzyon sırasında %95 olguda titreme ve ateş gözlenmekle beraber, ilacın renal fonksiyonlarda belirgin bir değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir. Amfoterisin B'ye göre on kat daha az yan etki ve toksisiteye sahiptir. Antimonlu ilaçlara dirençli Hindistan gibi ülkelerde L-AmB'nin kullanımı önerilmektedir. HIV pozitifli VL olgularda L-AmB, antimon bileşiklerinden daha etkili olduğu izlenmiştir, hatta beş günlük

3-4 mg/kg intravenöz L-AmB (Ambisome®) sağaltımının ilk planda kullanılması gerektiği öne sürülmüştür (21, 108, 109, 113, 116).

1.8.1.6. Miltefosine (Impavido®)

Oral yoldan uygulanabilen, yarı ömrü 150 ile 200 saat arasında değişen, Alkilofosfokolinler grubuna ait, antineoplastik ajan olarak kullanılmaktadır. *Leishmania*'ların proliferasyonunu, membran oluşumunu engellemekte ve yağ metabolizmasının değişmesine sebep olmaktadır. Bu ilaç sadece sitotoksik etki ile sınırlı değil ve hücrel immünite aktivasyonunu güçlendirmektedir. Araştırmaların sonucunda HIV/Leishmaniasis koenfeksiyonu tedavisinde hastaların yarısından fazlasında iyileşme sağlanmıştır. Bu ilacın kullanımı 2002 yılında ilk kez Hindistan'da, 2004 yılında ise Almanya'da onaylanmıştır ve günümüzde birçok ülkede kullanıma geçmiş durumdadır. Hindistan'da bir araştırma sonucuna göre 120 VL hastaya 2,5 mg/kg ilaç verilmiş (100mg/gün) ve 2 hafta sonunda hastaların hepsinde iyileşme izlenmiştir. Bu ilaç diğer ilaçlara nazaran daha iyi tolere edilmektedir. Afrika'da bu ilacın çok etkili olduğu izlenmiştir, Etiyopya'da yapılan faz III araştırmalarında %95 klinik tedavi sağlanmıştır (100- 150 mg/gün, 4 hafta, PO). Yan etki bakımından kabul edilecek kadar az ishal ve kusma görülebilmektedir (145, 163).

1.8.1.9. İnterferon gamma (IFN- γ)

Bazı ağır vakalarda kombine interferon tedavisinin, antimonların cevabını hızlandırmaktadır. Badaro ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarında IFN- γ 'nın antimonlarla kombine kullanıldığında daha önce tedavi edilmemiş, tedaviye yanıtız veya ileri derece infekte olguların sağaltımında başarılı olduğu bildirilmiştir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada antimonlara dirençli 8 hastada 100 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ interferon γ ile 20 mg/kg Sb^V kombinasyonu uygulandığında 6'sında, 10 ile 40 gün arasında tamamen iyileşme sağlandığı,

diğer 2 hastada ise relaps geliştiği ve bu 2 hasta AmB ile iyileştiği bildirilmiştir. KL'te, interferon γ intralezyonel olarak kullanılmış, *L. braziliensis guyanensis*'e bağlı gelişen 13 KL olgusunun 12'sinde lezyonda küçülme sağlanırken, *L. tropica*'lı 37 hastanın sadece 14'ünde (%38) lezyonun iyileştiği izlenmiştir (17, 95, 145).

1.8.1.8. Diğer İlaçlar

Ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, terbinafil ve metronidazol gibi ilaçlarla yapılan çalışmalar sonucunda leishmaniasis tedavisinde çok etkin olmadıkları bildirilmesine karşın ön çalışmalarda Sitamakin'in (Aminokinolin türevi) etkin olabileceği söylenmekte ve daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (145).

***L. infantum*'un neden olduğu Akdeniz VL tedavisinde;** dört farklı sağaltımdan söz etmek mümkündür (145).

1. Sodyum stiboglukonat veya meglumin antimonyat solüsyonları formundaki organik pentavalan antimon bileşiklerinin kullanılması (20mg/kg/gün, 20-28 gün)
2. Beş değerlikli antimon bileşiklerin (20mg/kg /gün), Allopürinolle (15mg/kg/gün) kombine kullanımı
3. Lipozomal Amfoterisin B'nin 3mg/kg/gün 0, 1, 2, 3, 4, 10. günlerde kullanımı
4. Paramomisin 14- 63 gün boyunca 12-16 mg/kg tek başına veya beş değerlikli antimon bileşiklerle kombine kullanımı

Türkiye'de uygulanan ve DSÖ tarafından kabul edilen tedavi protokolü aşığıdaki tabloda verilmiştir. Türkiye'de VL tedavisinde Antimonyal ilaçlardan olan Glucantime® sağlık bakanlığından ücretsiz sağlanmaktadır.

Tablo 3. Türkiye'de uygulanan VL tedavi protokolü

İlk Seçenek	5 değerlikli antimon bileşikleri	20 mg/kg/gün İV/İM	28 gün
Alternatif	Amfoterisin B	0.5-1 mg/kg/gün	20 gün
		0.5-1 mg/kg/gün aşırı	15 uygulama gün
	Lipozomal Amfoterisin B (AmBisome®)	2-5 mg/kg/gün	0, 1, 2, 3, 4 ve 10 gün

Leishmania- HIV koenfeksiyonu tedavisi: Beş değerlikli antimon bileşikleri (28 gün tedavi yerine 35 gün tedavi önerilmekte) veya Amfoterisin B kullanımının etkili olduğu bildirilmektedir. Özellikle lipozomal Amfoterisin B kullanımı daha uygundur. Sekonder profilaksi (tedavi sonrası bir yıl içinde %20-60) için aylık 20 mg/ kg beş değerlikli antimon bileşiklerin verilmektedir. CD4 sayısının 200 hücre/mm'nin üzerine çıkarsa sekonder profilaksi sonlandırılır (10, 122, 134).

Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis Tedavisi: Ağır PKDL hastalar tedavisinde 2-3 aya kadar uzatılmış 20 mg/kg/gün Sodyum stiboglukonat (Pentostame®) önerilmektedir. Direnç varsa antimona kombine olarak ketokonazol, amfoterisin B veya miltefosin gibi ilaçlar denenebilmektedir (163, 187).

1.8.2. Kutanöz Leishmaniasis Tedavisinde İlaç Kullanımı

KL tedavisinde, *Leishmania* türü, klinik, lezyon yeri, şiddeti, sayısı ve hastanın immün durumuna bağlı olarak, sistemik ilaç tedavisi, intralezyoner tedavi, topikal tedavi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaç birlikte uygulanmaktadır. Genel olarak VL tedavisinde kullanılan ilaçların büyük bölümü KL sağaltımında lokal veya aynı dozda sistemik olarak kullanılmakta ve bu olgularda 20 günlük sağaltım yeterli olmaktadır.

Temel olarak Yeni Dünya KL'sinin (*L. mexicana* ve *L. braziliensis*) Eski Dünya KL'ileri (*L. tropica* ve *L. major*) karşılaştırıldığında, hastalığın daha ağır ve uzun seyirli olduğu bilinmektedir. *L. major*'un yol açtığı KL genellikle tedavi edilmeden iyileşir ve bu şekilde kalıcı bağışıklık da kazanılmış olur. Sadece eğer kozmetik ya da fonksiyonel olarak

önemli vücut bölgeleri tutulmuşsa sağaltım gereklidir. *L. tropica* infeksiyonları çoğunlukla tedavi edilir (69, 70, 71, 72).

1.8.2.1. İntralezyonal Tedavi

Yüksek konsantrasyonda antimon bileşikleri, ketokonazol, kriyoterapi, sıvı nitrojen veya ısı lezyon içine derin ve geniş bir biçimde verilmesi ile olmaktadır. Bu yöntem sistemik tedaviler karşılaştırıldığında daha ucuz ve yan etkileri daha az olduğu bilinmektedir. Eğitimli hekimler gerekmektedir. Enjeksiyonlar gün aşırı 18-20 kez yapılmalıdır (69, 70).

Aşağıdaki durumlarda tercih edilebilir:

1. Eski Dünya KL'nin endemik olduğu bölgelerde
2. Az sayıda, yeni, sınırlı, sekonder infekte olmayan lezyon
3. Eklem hareketlerini kısıtlamayan veya estetik açıdan riskli olmayan bölgeler
4. Lenf nodul tutmayan lezyonlar
5. Sistemik antimonların kontrendike olduğu durumlar

1.8.2.2. Sistemik İlaç Tedavisi

Multipl, yaygın, dirençli, lenfanjitle birlikte seyreden veya mukozal tutulum gösteren lezyonlarda endikedir. Topikal tedavilerden çok, intralezyonal ilaç kullanımı halen tercih görmektedir. İlk tercih beş değerlikli antimon bileşikleridir. Yeni Dünya KL'lilerde 20 mg/kg/gün 20 gün verilirse %90 iyileşme sağlanabilmektedir. Bu ilaç etkili değilse ikinci tercih Amfoterisin B'dir (72, 115).

1.8.2.3. Topikal Tedavi

İmidazol ve ketokonazol kremler KL sağaltımında çok etkin olmamasına karşın paromomisin pomadı 10 gün sürede 2 kez uygulanmasının etkili olduğu bildirilmektedir.

Son yıllarda imikuiomod pomad antimonlarla birlikte kullandığında antimonlara dirençli hastaların %90'ında iyileşme izlenmiştir. Topikal olarak paromomisinin beyaz yumuşak parafin baz içindeki %15 üreli %15'lik pomatı eğer düzenli olarak on iki haftadan fazla uygulanırsa, *L. major*'un sebep olduğu eski dünya KL'ini tedavi edebilmektedir (72).

1.8.2.4. Fiziksel Yöntemler

Küretaj ve cerrahi eksizyon, skar tedavisinde, plastik cerrahi uygulanmalarda başvurulabilir yöntemdir. Sonuçta skar izinin küçülmesine sebep olmaktadır (69). Kriyoterapi ve sıcak uygulama; *Leishmania* türleri sıcağa duyarlıdırlar. İdeal olarak 12 saat boyunca intralezyoner ısının 40 °C'de tutulması. Kriyoterapi ise %27- 100 arasında değişik etkinlik göstermiştir (70). Radyoterapi maligniteye sebep olabileceğinden tercih edilmemektedir. Lazer, kriyoterapi ve cerrahi eksizyon ile karşılaştırıldığında daha çabuk iyileşme daha iyi kozmetik cevap alındığı gösterilmiştir (69).

1.8.2.5. Bitkisel Tedavi

Son yıllarda özellikle yöresel bazı bitkisel ajanlarla birçok çalışmalar yapılmış ve yenileri de yapılmaktadır (86).

1.9. Korunma

1.9.1. Vektör Kontrolü

Phlebotomus cinsi kum sineklerinden en iyi ve etkili korunma yöntemi kişisel önlemler almakla sağlanmaktadır. Hindistan'da hala kum sineklerine karşı organoklorin DDT insektisit kullanılmaktadır. Evlerde uygulanan ilaçlama özellikle KL için kapalı ortamlarda yerleşen kum sineklerine karşı insanları koruyabilir. Ancak ilaçlama programları başarısını yitirmektedir. Kum sineklerine karşı endemik bölgelerde cibinlik kullanımı yararlı bir uygulamadır. Ancak cibinliklerin ve hatta perde tülleri'ni belirli aralıklarla insektisitle muamele etmek gerekir. Günümüzde daha uzun insektisit özelliğini

koruyabilen bu tür cibinlikler kullanılmaktadır. Ancak bu tür uzun dayanan insektisitli tüller oldukça pahalı olduğundan, endemik bölgelerde kullanım açısından sorun oluşturmaktadır (31, 39, 115).

1.9.2. Rezervuar Kontrolü

VL'nin zoonotik orijinli olduğu bölgelerde rezervuara yönelik önlemler tercih edilir. Bunlar arasında köpeklerin tedavi edilmesi ve aşılması ve hatta hasta köpeklerin uyutulması KanL'nin önlenmesini sağlayabilmektedir ve bu seçeneklerden hangisinin uygulanması gerektiği hala tartışılmaktadır. Bu aşamada hasta köpeklerin tanınmasında bir çok sorun çıkabilmektedir. Örneğin; hasta köpeklerin belirlenmesi, ekip çalışmalarında oluşan zorluklar ve zorlamalar, tanının konulması, tedavide kullanılan ilaçların maliyetinin yüksek olması ve beş değerli antimon bileşikleri, köpeklerde çok etkili olmaması, etik açıdan hasta köpeklerin uyutulması, hedef kitlenin çok geniş olması gibi faktörler rezervuara yönelik çalışmalarda başarısızlığa sebep olabilmektedir. Ayrıca köpeklerde tedavinin denenmesinin antimonlara dirençli *Leishmania* suşlarının oluşmasına yol açabileceğini unutmamak gerekir (60, 115).

Köpeklerin insektisitli solüsyonlar uygulanarak infeksiyondan korunmaları yararlı olarak görünmekle birlikte, düzenli olarak uygulama gerekliliği zorluk yaratmaktadır. Bu ortamda, ticari olarak kullanıma sunulmuş olan ve deltametrin içeren tasmaların sekiz aya varabilen sürelerde köpekleri koruması bir umut ışığı yaratmıştır. Bu tasmaların İtalya'daki kullanımı sonucunda kum sineklerinin köpeklerden kan emerek beslenmesinin %90'a varan ölçülerde azaldığı, buna paralel olarak *L. infantum* infeksiyonlarında da azalma görüldüğü bildirilmiştir. İran'da yapılan bir başka çalışmada tasma kullanımı sonucu köpeklerdeki VL insidansında %54'lük bir azalma olduğu, daha da önemlisi çevre bölgelerde çocuklarda görülen VL insidansında %40'lara varan bir düşüş kaydedildiği

bildirilmiştir. Korunmada rezervuara yönelik önlemlerin yanısıra kesin vektörlerin saptanması ve kontrolü sırasında değişik zorluklar karşımıza çıkmaktadır. Örneğin; maliyetinin yüksek olması, insektisitlerin kullanımı esnasında devam etmesinin zor hatta imkânsız olması, tüm *Phlebotomus* popülasyonuna ulaşmamak gibi sorunlar olabilmektedir. Doğal olarak en önemli zorluklardan, halkın eğitilmesi ve onlar tarafından eğitilenlerin kabullenmesini sağlamaktan geçmektedir (115, 168, 185).

1.9.3. Aşı Çalışmaları

İlk aşı denemeler gluteal bölgeye leishmanizasyon ile sağlanmıştır. Aşı çalışmaları 1970'li yıllarda başlamıştır. Bu güne kadar bir çok aşı modeli denenmiş, şu ana kadar yapılan insandaki etkisi kanıtlanmış tek *Leishmania* aşısı KL'e karşı leishmanizasyondur (115). Aşı çalışmaları birçok merkezde günümüzde de devam etmektedir.

1. *Leishmania*'nın promastigotunun bütün olarak kullanıldığı aşılar: Otoklavlanmış promastigot ile kombine edilen BCG aşılar hazırlanmış ve aşılanmıştır. Başarı ise Ekvator'de aşılanan çocuklarda yeni KL oranı %2,1 bulunurken sadece BCG ile aşılananlarda ise %7,5 bulunmuştur. İran'da ise faz III çalışmalar yapılmaktadır. Sonuçta %55'lik korunma elde edilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda ise KL'e karşı korunma %0-76, VL'e karşı ise %6'nın altında izlenmiştir.
2. Tanımlanmış spesifik moleküllerin kullanıldığı aşılar: Glikoprotein 63 (gp63), membran glikoprotein 46, reseptörle aktive olan kinaz c, sistein proteinaz B ve A, histone H1, tükrük proteini 15, promastigot yüzey antijeni, *Leishmania* uzama ve başlangıç faktörü, ökaryotik stres uyaran protein 1.

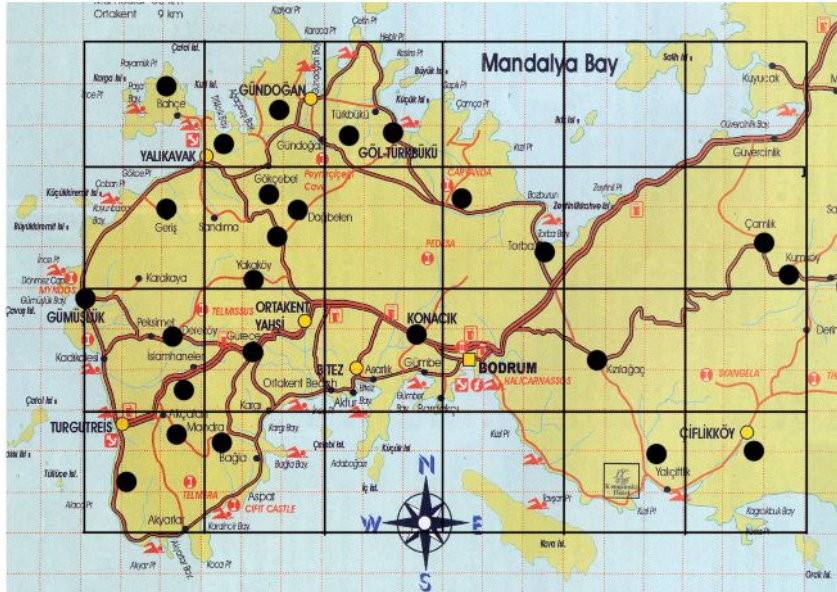
İKİNCİ BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma Alanı

Daha önceki yıllarda hem kutanöz hem de visseral leishmaniasisin bildirildiği Bodrum yarımadasının tamamı çalışma kapsamına alınmıştır. Ege Bölgesi'nin güneybatısında yer alan Bodrum yarımadasında Güvercinlik-Derince hattının (37 08 13 K; 27 08 13 D – 36 59 39 K; 27 35 15 D) batısında yer alan bölgede çalışma gerçekleştirilmiştir (Şekil 6). Bodrum yarımadası, yeryüzü şekilleri bakımından çok engebeli, iç kısımları ovalık, kıyıları çok girintili çıkıntılı olup en yüksek yeri Kalkan (873 m) dağıdır. İklim itibariyle tipik Akdeniz iklimi özelliğine sahiptir.

Çalışma başlangıcında, Bodrum yarımadası 8x8 km²'lik gridlere bölünmüş ve herbir kareye en az bir ışıklı tuzak gelecek şekilde kum sineklerinin toplanması gerçekleştirilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Bodrum yarımadasındaki çalışma lokaliteleri

2.2. Materyal Toplanması

Çalışmamız sırasında 2005 ve 2006 yılları yaz aylarında ışıklı tuzaklar ile kum sinekleri toplanmış ve 2005 yılının haziran ayında da Bodrum Yarımadasında köpek evlerindeki ve köylerdeki köpeklerden örnekler alınmıştır.

2.2.1. Köpeklerden Örnek Toplanması

Çalışma alanında yer alan köpek evleri (Bodrum Merkez ve Turgutreis Barınakları) ve köylerde (Yalıkavak, Dağbelen ve Çiftlikköy) yaşayan köpeklerden toplam 124 adet kan örneği alınmıştır.

2.2.1.1. Kan Örneği Alınması (Şekil 7):

- Köpeklerin her biri numaralandırılıp kimlik bilgileri ve tanımlanabilen özellikleri formlara kaydedilmiştir.
- Köpeklerin fizik muayenesi yapılarak patolojik bulgular formlara kaydedilmiştir.
- Köpeklerin ağızları 3cm en ve 2 m boyundaki sağlam bir kumaştan dikilen köpek bağları ile özel bağlama yöntemi ile bağlanıp kontrol altına alındıktan sonra diğer bir kişinin yardımı ile ön kolundaki *Vena brachialis* damarı fikse edilip, alkol ile silinip, 10 ml'lik enjektör ile 5-6 ml kan alınmıştır.
- Alınan kan, birisi EDTA'lı diğeri serum ayırıcı jelli olmak üzere iki tüpe paylaştırılmıştır. EDTA'lı tüplere kan konulduktan sonra düzenli bir şekilde karıştırılarak kanın pıhtılaşması önlenmiştir. Tüpler numaralandırılıp, laboratuvara ulaşıncaya dek +4°C'de tutulmuştur.
- Jelli tüpler 3000 devirde santrifüj edilerek serumlar ayrılmıştır.
- Elde edilen serumlar, gerektiğinde testin sağlıklı olarak tekrarlanabilmesi için 2 ayrı eppendorf tüpüne paylaştırılmış ve tüpler numaralandırılmıştır.

- Örnekler hızlı ve güvenli bir şekilde soğuk zincir uygulanarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalına ulaştırılmıştır.
- EDTA'lı tüpteki kan örneğinden çalışılmak üzere 200 µl eppendorf tüpe aktarılmış, kalan miktar buffy coat ayırımı için +4°C'de saklanmıştır.
- Buffy coat ayırımından sonra hazırlanan tüm örnekler (serum, kan, buffy coat) moleküler ve serolojik testlerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.1.2. Lenf Bezi Aspirasyon Örneği Alınması (Şekil 8):

- Fizik muayenede arka ayaklarında popliteal lenf bezlerinde büyüme (LAP) saptanan köpeklerden ince iğne aspirasyon biyopsisi yapılmıştır.
- Kontrol atındaki köpeğin lenf bezi iki parmak arasında fikse edilip alkol ile temizlendikten sonra popliteal lenf bezinden 20 ml'lik 21G steril enjektör ile aspirasyon yapılarak lenf sıvısı elde edilmiştir.
- İlk olarak steril şartlarda NNN besiyerine ekim yapılmıştır.
- Daha sonra önceden hazırlanmış lam üzerine alınan materyalin geri kalan kısmı damlatılarak direkt yayma preparatları hazırlanıp metanol ile tesbit edildikten sonra boyama işlemine kadar preparat kutularına yerleştirilmiş ve lamlar numaralandırılmıştır.

2.2.1.3. NNN Besiyeri hazırlanması:

- Agar : 5 gr
- Bakteriyolojik pepton : 2 gr
- NaCl : 1 gr
- Distile su : 200 ml
- Yukarıda verilen maddeler karıştırılarak otoklavda 120°C'de 20 dk sterilize edildikten sonra 55 °C'ye kadar soğutulmuştur. Üzerine steril koşullarda alınarak defibrinize edilmiş ve antibiyotik eklenmiş 40 ml tavşan kanı

konulmuş ve bu karışım her tüpe 3 ml gelecek şekilde dağıtılarak 60⁰ eğimle katılaştırılmıştır. Kullanılana dek +4 ⁰C’de bekletilmiş ve kullanılmadan önce her tüpe 1 ml serum fizyolojik eklenmiştir. Besiyerleri sahaya buz aküsü içerisinde transfer edilmiştir.



Şekil 7. Köpeklerin ön bacağından kan örneği alınması



Şekil 8. Köpeğin popliteal lenf nodundan aspirasyon örneği alınması. A: Lenf nodu iki parmakla fiks edilir, B: 20 ml'lik enjektör ile lenf yumrusuna girilir, C: lenf sıvısı alınır, D: NNN besiyerine ekilir ve E: lam üzerine yayılır.

2.2.2. *Phlebotomus*'ların Toplanması

Çalışma alanının kum sineği faunasının yüksek oranda belirlenebilmesi amacıyla, CDC ışık tuzakları kullanılmıştır. Bodrum yarımadası 8x8 km²'lik gridlere bölünerek her kareye en az bir ışık tuzağı gelecek şekilde toplama işlemi yapılmıştır.

Yaz aylarında farklı dönemlerde (10-11 Temmuz 2005, 21-22 Haziran 2006 ve 04-05 Ağustos 2006) 3 kez gerçekleştirilen örnekleme çalışmaları, her gün farklı lokalitelere ışık tuzaklarının yerleştirilmesi, ertesi sabah bu tuzakların toplanması ve örneklerin alkol içerisinde muhafaza edilmesi şeklinde gerçekleşmiştir. Öğleden sonraları ise seçilmiş olan diğer lokalitelere tuzak yerleştirilmiş ve çalışmalar bu şekilde devam etmiştir. Çalışma süresince toplam olarak 50 adet ışık tuzağı ile 6 gece toplama yapılmıştır (Tablo 4).

CDC ışık tuzakları genellikle kum sineklerinin üremeleri için uygun bir ortam olan organik materyalce zengin, nemli ve karanlık ahırlara, koyun çiftliklerine, kümeslere, köpek barınaklarına ayrıca mağara ve terkedilmiş barınaklara yerleştirilmiştir. Kum sineği erginlerinin beslenmek ve çiftleşmek üzere aktive oldukları zaman aralığı 19:00-06:00 saatleri arasındadır. Bu nedenle, örnekleme için kullanılan ışık tuzakları çalışmalarımız boyunca 18:00-07:00 saatleri arasında çalıştırılmıştır. Yeteri kadar tuzak kurabilmek ve mümkün olan en yüksek sayıda örnekleme yapabilmek amacıyla, örnek toplamak için kullandığımız her evde yaşayan en az bir kişi, ışık tuzaklarının çalışma prensipleri üzerine bilgilendirilmiş, tuzakların aktif duruma getirilmesinde ve kapatılmasında çoğunlukla bu kişilerden yararlanılmıştır. Bu yöntemde, ev halkının katılımı ve başarısı %90'a yakın bir oranda sağlanmıştır. Işıklı tuzaklar ile birlikte zaman zaman CO₂ ve UV ışıkları da kum sineklerini çekmek amacıyla kullanılmıştır. Yakalanan örnekler aspiratör yardımıyla vakit kaybedilmeden tuzaklar içinden alınarak %96'lık etil alkol içeren şişelerde saklanmıştır.

Toplama alanlarında sıcaklık, nem, bitki örtüsü, beslenen hayvanlar, yetiştirilen ürünler ve ilaçlama yapılıp yapılmadığı, yapıldıysa ne zaman ve nerelere yapıldığı gibi

kum sineği dağılımlını ve örneklemesini direkt olarak etkileyen faktörler ile ilgili bilgiler kayıt edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde laboratuvara getirilen kum sinekleri öncelikle Olympus binoküler ışık mikroskobu (Olympus SZ40) altında erkek ve dişi olarak ayrılmış, daha sonra %5-10'luk KOH içinde erkekler genital organların fazla yumuşamaması için 3-4 saat, dişiler ise bir gece tutularak şeffaştırılmış ve 5-10 dakika kadar distile suda yıkanmıştır.

Daha sonra ince diseksiyon iğneleri ile erkek ve dişilerin baş kısımları, erkeklerin dış genital organı ve dişinin genital organının bulunduğu abdomenin son üç segmenti ayrılarak başka bir lam üzerine yerleştirilmiştir. Baş, farinks armatr görülebilecek şekilde (*Sergentomyia*'da ventral kısım, *Phlebotomus*'da dorsal kısım üstte olacak şekilde), erkek organlar ise aedeagus ve klasperler ayrı ayrı görülebilecek şekilde monte edilmiştir.

Kalıcı preparat yapılması için Berlese zeltisi kullanılmıştır. zeltinin hazırlanması için 5 ml dekstroz şurup, 10 ml distile su ve 3 ml glacial asetik asit içinde eritildikten sonra, 8 gr gum arabik eklenmiş ve tamamen eriyene kadar (bir hafta kadar) beklendikten sonra 75 gr kloral hidrat ilave edilmiştir.

Tablo 4. Işıklı tuzakların yerleştirildiği 50 lokalitenin özellikleri

Tarih	Kod No	Lokalite	Latitude	Longitude	Rakım
21.06.2006	BOD-01	Çiftlikköy-1	37 01 03 K	27 34 04 D	130
	BOD-02	Çiftlikköy-2	37 00 54 K	27 33 57 D	83
	BOD-03	Çiftlikköy-3	37 01 23 K	27 33 57 D	85
	BOD-04	Çiftlikköy-4	37 01 05 K	27 33 44 D	73
	BOD-05	Yalıçiftlik	36 59 42 K	27 31 52 D	6
	BOD-06	Kızılağaç-1	37 02 12 K	27 29 44 D	100
	BOD-07	Kızılağaç-2	37 02 15 K	27 29 45 D	111
	BOD-08	Eski Gölköy	37 06 24 K	27 21 54 D	91
	BOD-09	Gündoğan	37 07 04 K	27 20 50 D	39
	BOD-10	Gökçebel-1	37 06 41 K	27 18 58 D	31
	BOD-11	Gökçebel-2	37 06 14 K	27 19 01 D	49
	BOD-12	T.Reis-1	37 01 20 K	27 17 31 D	64
	BOD-13	T.Reis -2	37 01 20 K	27 17 31 D	64
	BOD-14	T.Reis -3	37 01 20 K	27 17 31 D	64
22.06.2006	BOD-15	T.Reis -4	37 01 20 K	27 17 31 D	64
	BOD-16	Akçaalan	37 00 32 K	27 16 39 D	33
	BOD-17	Yalıkavak-1	37 05 57 K	27 16 49 D	8
	BOD-18	Yalıkavak-2	37 05 44 K	27 16 55 D	36
	BOD-19	Yalıkavak-3	37 04 52 K	27 19 59 D	45
	BOD-20	Ortakent-Yalıkavak Yolu-1	37 04 59 K	27 19 53 D	163
	BOD-21	Ortakent-Yalıkavak Yolu-2	37 04 59 K	27 19 53 D	163
	BOD-22	Ortakent-Yalıkavak Yolu-3	37 04 59 K	27 19 53 D	163
	BOD-23	Yakaköy-1	37 04 00 K	27 19 40 D	120
	BOD-24	Yakaköy-2	37 04 11 K	27 19 37 D	130
	BOD-25	Dereköy-1	37 02 29 K	27 17 37 D	56
	BOD-26	Dereköy-2	37 02 29 K	27 17 37 D	56
04.08.2006	BOD-27	Bahçe	37 07 20 K	27 17 25 D	17
	BOD-28	Peksimet -1	37 02 28 K	27 16 25 D	67
	BOD-29	Peksimet-2	37 02 28 K	27 16 31 D	55
	BOD-30	Peksimet-3	37 02 12 K	27 16 50 D	33
	BOD-31	Dereköy-3	37 02 36 K	27 17 00 D	55

Tablo 4. Devamı

	BOD-32	Dereköy-4	37 02 35 K	27 17 14 D	40
	BOD-33	Dereköy-5	37 02 29 K	27 17 37 D	54
	BOD-34	Güreçe-1	37 02 27 K	27 19 19 D	163
	BOD-35	Güreçe-2	37 02 26 K	27 19 20 D	171
	BOD-36	Güreçe-3	37 02 18 K	27 19 24 D	153
	BOD-37	T.Reis -5	37 01 20 K	27 17 31 D	64
	BOD-38	T.Reis -6	37 01 20 K	27 17 31 D	64
05.08.2006	BOD-39	Göltürbükü-1	37 07 01 K	27 23 21 D	6
	BOD-40	Göltürbükü-2	37 07 06 K	27 22 54 D	45
	BOD-41	Torba-1	37 04 58 K	27 27 26 D	15
	BOD-42	Torba-2	37 04 38 K	27 27 35 D	11
	BOD-43	Çamlık-1	37 04 10 K	27 32 10 D	204
	BOD-44	Çamlık-2	37 04 05 K	27 32 18 D	213
	BOD-45	Çamlık-3	37 04 13 K	27 32 22 D	197
	BOD-46	Çiftlikköy-5	37 01 23 K	27 33 57 D	79
	BOD-47	Çiftlikköy-6	37 01 23 K	27 33 57 D	79
	BOD-48	Konacık	37 03 34 K	27 23 57 D	118
10.07.2005	BOD-49	Gümüşlük	37 03 13 K	27 14 19 D	30
11.07.2005	BOD-50	Dağbelen	37 05 15 K	27 20 31 D	241

2.2.2.1. *Phlebotomus* Türlerinin Tayini:

Tür teşhisleri Olympus binoküler ışık mikroskobu (Olympus SZ40) kullanılarak yapılmıştır. Toplanan kum sinekleri teşhis edilirken erkeklerde koksit, stil, paramer, penis pompası ve aedeagus'un şekilleri incelenmiş ayrıca, koksit, penis pompası ve filamentin uzunluğu, koksitte bulunan bazal lob ve üzerindeki kılların sayıları, surstilin koksite göre uzunluğu, antenin 3. segmentinin epifarinkse oranı (A3/E) ölçülmüştür. *Adlerius* türlerinde anten formülü çıkarılmıştır.

Sergentomyia dişilerinin tür ayrımında varsa sibirium ve sibirial armatür, sibiriumdaki pigmentli bölge, farinks, farinks armatürü ve spermateka gözden geçirilmiştir. Spermatekanın bazal kısmı ve furca şekli incelenmiştir.

Türlerin tayininde ilgili literatürlerin (4, 94, 13, 14, 15, 40, 41, 82, 83, 98, 99) teşhis anahtarları ve çizimlerinden yararlanılmıştır.

2.3. Laboratuvar Çalışmaları

Laboratuvar çalışmalarının tümü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.3.1. Direkt Tanı ve Kültür Yöntemleri

Direkt parazitolojik tanıda, lenf bezi aspirasyon biyopsi örneklerinden hazırlanan ve metanol ile fiske edilmiş preparatlar Giemsa boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda x100 immersiyon objektifi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca olası yanlış değerlendirmelere imkan vermemek için farklı iki araştırmacı tarafından da incelenmiştir.

NNN besiyerine sahada ekimleri yapılan örnekler, etüvde 22 - 26 °C'de 28 gün inkübe edilmiş, haftada bir kültürden preparat hazırlanarak *Leishmania* promastigotlarının üreyip üremediği kontrol edilmiştir.

2.3.2. IFAT (İmmunfluoresan Antikor Testi)

Daha önceki VL hastalarından NNN besiyerinde izole edilen, RPMI-1640+%10 FCS içeren besiyerinde çoğaltılan *Leishmania infantum* (MON-1) promastigotları santrifüj edilerek çoklaştırılmış ve besiyerini ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla 8 kez PBS (Fosfat Buffer Saline) ile yıkanmıştır. Konsantrasyonu 2×10^6 olacak şekilde sulandırılmış ve IFAT lamalarının her çukuruna 10 µl gelecek şekilde aktarılmış ve kuruduktan sonra, pelur kağıtlara sarılarak kullanılabilecek kadar -20 °C'de saklanmıştır. Köpek serumları 1:16 – 1:8000 arası sulandırmalarda çalışılmış ve konjuge olarak 1:150 sulandırımındaki FITC-anti-dog IgG (A9042, SIGMA) kullanılmıştır. 1:128 dilüsyon ve üzeri pozitif olarak değerlendirilmiştir.

2.3.2.1 Fluoresan Antikor Tekniğinin Uygulanması

- Antijen kaplı lamalar derin dondurucudan çıkartılmış ve oda ısısında çözülmesi için bekletilmiştir. Çalışılacak serum örnekleri, pozitif ve negatif kontroller fosfat tamponu PBS (Phosphate Buffer Saline) ile; 1/16, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 ve 1/4096 oranında sulandırılmıştır. Sulandırılmış serum örneklerinden 15 µl, içinde ıslak süzgeç kağıdı bulunan petri kutuları içinde önceden hazırladığımız antijenli lamalar üzerine konulmuş ve 37 °C' lik etüve kaldırılarak 30 dakika bekletilmiştir.
- Daha sonra lamalar ve üzerindeki serumlar PBS ile hafifçe 3 kez yıkama küvetinde yıkanmış ve suyu akıtılmıştır. İlk yıkamada, lamalar PBS ile doldurulmuş yıkama küveti içine konulduktan hemen sonra uzaklaştırılmış, ikinci yıkama 3 dk bekledikten sonra ve üçüncü yıkama ise 5 dk beklenerek yıkanmıştır. Bu şekilde yıkanan lamalar yıkama küveti içinden alınıp oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.
- PBS ile 1/150 oranında sulandırılmış köpek IgG konjugesi (A9042, SIGMA) hazırladıktan sonra, ıslak süzgeç kağıdı bulunan petri kutuları içine konulan lamaların üzerindeki çukurlara 15 µl konularak 37 °C'lik etüvde 30 dk bekletilmiştir. Etüvden çıkarılan lamalar yukarıda anlatıldığı gibi tekrar 3 kez PBS ile yıkanmış ve lamaların üzerine kurumadan serum fizyolojikle 1/9 oranında sulandırılmış gliserinden 3-4 damla konularak lamel ile kapatılmıştır. Hazırlanan lamalar fluoresan mikroskopunda (Olympus BH2) incelenerek değerlendirilmiştir. Pozitif olgularda promastigotların özellikle çevreleri ve kinetoplastın bulunduğu kısım parlak sarı yeşil renkte görülmektedir. Promastigotların sitoplazması ise çevreden biraz daha az parlak sarı yeşil renge

boyanmaktadır. Negatif olgularda ise, promastigotlar soluk yeşil renkte görülmektedir.

2.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.3.3.1. “Buffy Coat” (Beyaz hücre) Eldesi:

EDTA’lı tüpteki kanın beyaz hücrelerini ayırmak amacı ile önce 10 ml’lik steril tüp içine 3 ml Separation solüsyonu (Biochrom® AG) konulmuştur. Daha sonra bu sıvı üzerine EDTA’lı tüpteki kan çok yavaş bir şekilde karıştırılmadan eklenmiş ve sonuçta üstte kan altta ise separation solüsyonu olacak şekilde iki tabaka oluşmuştur. Bu tüpler soğutmalı santrifüjte 1500 devirde 25 dk çevrilmiştir. Tüpler santrifüjden çıkarılmış ve en üst tabakanın (serum tabakası) altındaki mononükleer hücrelerin bulunduğu bulanık tabakadan 200 µl bir ependorf içine alınmış ve numaralandırılmıştır. Hazırlanan bu ependorf tüpleri DNA ekstraksiyonu yapılana dek -20 °C’de saklanmıştır.

2.3.3.2. Klinik Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için Genomic DNA Purification Kiti kullanılmıştır. Klinik örneklerde standardizasyon amacıyla kit kullanımı tercih edilmiş ve yöntem kitin içindeki kurallara göre uygulanmıştır.

Gerekli Malzemeler:

- Daha önce hazırlanan 200 µl EDTA’lı kan örnekleri
- Daha önce hazırlanan 200 µl buffy coat (beyaz hücre) örnekleri
- Laboratuvarda pasajı sürdürülen kültür örneklerinden 200µl (pozitif kontrol)
- Kit içinde bulunan lizis tampon çözeltisi
- Kloroform
- Kit içinde bulunan Presipitasyon solüsyonu
- Steril bidistile su
- Kit içinde bulunan 1,2 M NaCl solüsyonu
- Absolü soğuk ethanol (-20 °C’de tutulmuştur)

- %70 ethanol (+4 °C’de tutulmuştur)

Ekstraksiyon Protokolü:

- Tüplerde daha önceden hazırlanan 200 µl’lik EDTA’lı kan örnekleri ve beyaz hücre solüsyonları üzerine 400 µl lizis tampon çözeltisi konulmuştur. Bütün eppendorf tüpleri 65°C’ye ayarlanmış ısıtıcı blok üzerinde 5 dk inkübe edilmiştir. Bu süre içinde yavaş hareketlerle alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Her tüp kapağı açılıp üzerine 600 µl kloroform eklenmiş ve kapatılmıştır. Bir kaç kez yavaşça alt üst edilerek karıştırılmış ve 2 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin en üst kısmındaki sıvı hiç karıştırılmadan alınıp steril eppendorf tüpüne konmuş ve etiketlenmiştir. Bunu yaparken kullanılan pipet uçlarının ara faza dokunmamasına özen gösterilmiştir.
- Her eppendorf tüpü için 720 µl steril bidistile su ile 80 µl presipitasyon solüsyonu olacak şekilde karışım hazırlanmış ve bu solüsyondan her tüpe 800 µl eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1- 2 dk yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Tüpler 2 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve üst sıvı yavaşça dökülerek uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan pellet, tüpler ters çevrilerek havada kurumaya bırakılmıştır.
- 1,2 M NaCl solüsyonundan her tüpe 100 µl konmuş ve pellet tamamen çözülene kadar yavaşça karıştırılmıştır.
- -20 °C’de saklanan absöü ethanolden her tübe 300 µl konulup bir gece -20 °C’de saklanmıştır.
- Ertesi gün eppendorf tüplerindeki karışımlar dolaptan çıkarılmış ve 4 dk boyunca 10.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Üst sıvı yavaşça dökülerek uzaklaştırılmıştır.

Dipte kalan pellet üzerine +4 °C'de sakladığımız %70 etanolden 1 ml konulmuş, pelletin dökülmemesine dikkat edilerek bir kez yıkanmış ve alkol dökülerek uzaklaştırılmıştır. Tüpler ters çevrilerek çeperde bir damla bile kalmayınca kadar havada kurumaya bırakılmıştır.

- Dipteki pellet üzerine 100 µl steril bidistile su konmuş ve pellet çözülene dek yavaşça karıştırılmış ve böylece DNA süspansiyonu edildikten sonra PZR'de kullanılana dek -20 °C'de saklanmıştır.

2.3.3.3. PZR Amplifikasyonu

Gerekli Malzemeler:

- Laboratuvarda pasajı sürdürülen kültür örneklerinden ekstrakte edilen DNA örnekleri (pozitif kontrol)
- Negatif kontrol (bidistile su)
- dNTP miks; 10 mM (Fermentas[®])
- 10X PCR Buffer (- MgCl₂); (Fermentas[®])
 - Tris-HCl; 100 mM (pH 8,8 oda sıcaklığında)
 - KCl; 500 mM
 - Nonidet P40; %0,8 (Nonilfenil–Polietilen Glikol)
- MgCl₂ ; 25 mM (Fermentas[®])
- Primer çifti
 - 13A; 50 pmol/µl
 - 13B; 50 pmol/µl
- Taq DNA Polimeraz; 5 U/µl (Fermentas[®])
- Bidistile su

Primer sulandırımı

Kullanılan primer çifti ve sekansları:

13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT- 3'); 143 pmol/μl (Stok)

13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT- 3'); 129 pmol/μl (Stok)

Sulandırım için $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülünden yararlanılmıştır:

13A için 350 μl stok + 650 μl ddH₂O = 1000 μl 13A (50 pmol/μl)

13B için 389 μl stok + 611 μl ddH₂O = 1000 μl 13B (50 pmol/μl)

Böylece kullanma solüsyonları elde edilmiştir.

Master Miks hazırlanması ve PZR:

- Tüm PZR solüsyonlarının bir araya konulduğu ana karışım olan Master miks (MM) 10 ml'lik tüp içerisinde sürekli soğuk tutularak hazırlanmıştır. MM'in hazırlanışı Tablo 5'te gösterilmiştir.
- 0,2 μl'lik 39 adet (37 örnek, 1 negatif kontrol, 1 pozitif kontrol) steril PZR tüpleri etiketlendikten sonra MM'deki sıvı karışımdan bunların her birine 90 μl konmuştur.
- Her bir etiketli PZR tüpüne aynı etikete sahip DNA ekstraksiyon tüplerinden 10'ar μl DNA eklenerek, toplam her tüpün içinde 100 μl'lik PZR karışımı oluşturulmuştur. Negatif ve Pozitif kontrol de aynı şekilde eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önceden hazırladığımız promastigotlardan elde edilen ekstraksiyon ürünlerinden kullanılmıştır. Negatif kontrol ise MM e 10 μl ddH₂O eklenerek elde edilmiştir. Sıvı aktarma sırasında tüplerin soğuk tutulmasına özen gösterilmiştir.
- Bütün tüpler Thermocycler (Biometra®) termal siklus cihazına yerleştirilmiştir. Tablo 6'teki PZR protokolü programlanarak çalıştırılmıştır.

- Ardından termal siklus cihazından çıkarılan tüpler görüntüleninceye kadar +4 °C'ye kaldırılmıştır.

Tablo 5. Master miks hazırlanışı

No.	Malzeme	İlk Konsantrasyon	İstenen Konsantrasyon (100 µl'de)	Miktar	Toplam miktar (42)
1	PCR Buffer	10X	1X	10 µl	420 µl
2	MgCl ₂	25 mM	4 mM	16 µl	672 µl
3	dNTP	10 mM	200 µM	2 µl	84 µl
4	13A	50 pmol/µl	500 nmol	1 µl	42 µl
5	13B	50 pmol/µl	500 nmol	1 µl	42 µl
6	Taq Pol.	5 U/µl	2.5 U	0,5 µl	21 µl
7	ddH ₂ O	-	-	59.5 µl	2499 µl
Toplam DNA miktarı		= 420			
1281+420		=1701			
Reaksiyon : 42x100		= 4200			
4200-1701		= 2499			

(Hesaplamalar toplam 42 örneğe göre yapılmıştır. PZR toplam 100 µl de gerçekleştirilmiştir.)

Tablo 6. PZR protokolü

Siklus No.	Denatürasyon	Tutunma	Uzama
Başlangıç	10 dk, 94 °C	0	0
30 siklus	60 sn, 94 °C	60 sn, 60 °C	60 sn, 70 °C
Son siklus	0	0	7 dk, 70 °C
Sonuna dek		4 °C	

2.3.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez ile PZR ürünleri, görüntülenmek için, agaroz ile hazırlanan jele eklenerek, elektrik alanında belirli bir süre boyunca boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. PZR ürünlerini görüntülemek için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır.

Gerekli Malzemeler:

- PZR ürünleri
- Agaroz (Sigma®)
- TAE (Tris Asetat EDTA) tampon çözeltisi; 50X
- Loading dye (yükleme boyası); 6X (Fermentas®)
- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas®)
 - Jel elektroforezlerinde DNA ölçeği olarak kullanılan GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder'ın içerdiği bant uzunlukları: Sırasıyla 50, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 bp (prospektüs bilgisi)
- Etidyum Bromid; 10 mg/ml
- Distile su

Eriyikler ve tampon çözeltileri:

- TAE; 50X
 - Tris baz : 121 g
 - Glasiyal asetik asit : 28,55 ml
 - EDTA; 0.5 M : 50 ml

Yukarıdaki kimyasallar karıştırıldıktan sonra bidistile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra manyetik karıştırıcı ile tamamen homojenize oluncaya kadar düşük devirde karıştırılmıştır. En son pH'sı 8,5'a ayarlanmıştır. Bu eriyik stok solüsyon olarak hazırlanmış ve elektroforez uygulanacağı zaman 50 kat sulandırılarak kullanılmıştır.

Etidyum bromid (0,5 µg/ml çalışma solüsyonu): 10 mg/µl'lik stok solüsyonundan 1 lt'lik soğuk su banyosuna 50 µl konularak homojenize olması beklenmiştir. Kanserojen olması nedeniyle çalışırken özen gösterilmiş ve kullanıldıktan sonra nötralize edilerek tıbbi atık çöpüne aktarılmıştır.

Elektroforez ve görüntüleme:

- 2 g toz agaroz tartılarak 250 ml'lik bir cam şişeye konmuştur. Bunun üzerine 100 ml TAE 1X solüsyonu eklenmiştir.
- Bu karışım mikrodalga fırınına konularak, 180 Watt güçte 3-4 dk boyunca homojenize edilmiştir. Tamamen berraklaştıktan sonra soğumaya bırakılmıştır.

- El yakmayacak kadar soğuyuncaya dek beklenmiştir (50-55 °C). Jelin polimerize olmaması için oda sıcaklığına kadar beklenmemiş ve sürekli olarak yavaşça karıştırılmıştır.
- Orta boy jel hazırlama tepsisinin “stoper” ları takılarak, 40 dişli tarak uygun pozisyonunda yerine yerleştirilmiştir. Bunun üzerine ılınmış olan %2’lik sıvı agaroz yavaşça boşaltılmıştır. Bunu yaparken hava kabarcığı oluşmaması için azami dikkat gösterilmiştir. Yine de oluşan hava kabarcıkları bir pipet ucu yardımıyla uzaklaştırılmıştır.
- Oda sıcaklığında jelin iyice soğuyarak tamamen polimerize olması beklenmiştir. Ardından taraklar dikkatle ve çok yavaş hareketlerle jelin içinden çıkarılmıştır.
- En son olarak “stoper” lar da çıkarıldıktan sonra jel tepsi elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Üzerine jelin üst yüzeyini 2-3 mm geçecek şekilde TAE 1X solüsyonu dökülmüştür.
- PZR ürünlerinin ve DNA ölçeğinin yüklenmesine geçilmiştir. DNA ölçeği yüklenirken 4 µl ladder, 2 µl yükleme boyası ile karıştırılıp, jeldeki birinci çukura konmuştur. Örnekler ise 10 µl PZR ürünü, 2 µl loading dye ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Çukurlara tüm DNA-boya karışımları 10’ar µl konmuştur. Her bir karışımdan jeldeki çukurlara 10’ar µl konmuştur.
- Elektroforez tankının kapağı kapatılmış, elektrotlar kırmızı ve siyah renkler birbirini tutacak şekilde güç kaynağına bağlanmıştır.
- Voltaj, 1-5 V/cm (anot ve katot arasındaki mesafe ölçülerek) ilerleme sağlayabilmek için yaklaşık 105-115 Volt olarak ayarlanmış ve güç kaynağı çalıştırılmıştır.

- Yükleme boyasının açık mavi fraksiyonu jelin 2/3'üne ulaştığında elektroforez durdurulmuştur. Kapak açılıp jel tepsiyi sıvının içinden çıkarılmış ve jel tepside ayrılarak etidyum bromid (EB) çalışma solüsyonunun içine konulmuştur.
- Boyanma aşaması 20 dk sürdürülmüştür. 20 dk sonra jel EB içinden çıkarılarak distile su içine konularak fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır (destainisation) . Bu aşama 10 dk sürdürülmüştür.
- Süre bitince jel distile su içinden alınarak transilluminatör cihazının üzerine konularak ultraviyole ışığı altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler bilgisayara kaydedilmiştir.

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

BULGULAR

Akdeniz Bölgesi ikliminin hakim olduğu Bodrum yarımadasında çalışma yapılan lokalitelerde bitki örtüsü, kırsal alanlarda evlerin önemli bir kısmının tahta veya taştan yapılmış olması, evlerin altında veya yakınında büyükbaş ve küçükbaş hayvan barınaklarının bulunması vektör *Phlebotomus*'ların yumurta-larva-pupa evrelerini tamamlayabilmeleri için uygun ekolojik koşulları oluşturmaktadır. Köylerin ekolojik durumunun ülkemizdeki birçok yerde olduğu gibi *Phlebotomus*'ların gelişmesi için uygun ekolojik ortama sahip bulunduğu ve rezervuarlık yapabilecek köpeklerin olduğu görülmüştür.

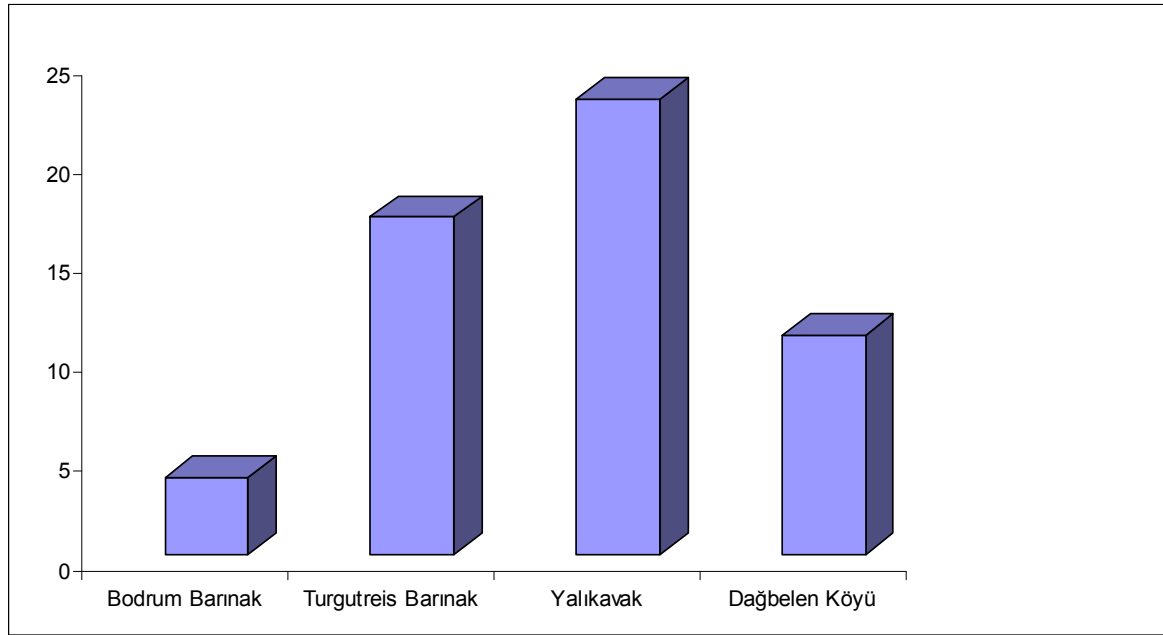
3.1. Köpeklerde Yapılan Çalışmaların Sonuçları:

Toplam olarak 124 adet köpek serumuna IFA testi ve PZR yöntemi uygulanmış, 15 (%12,09) köpek testlerden en az biriyle pozitif olarak bulunmuştur. Çalışma sırasında 4 ayrı bölgedeki köpeklerden örnekleme yapılmış ve kanin leishmaniasis açısından pozitiflik oranının %3,92 ile %23,07 arasında değiştiği görülmüştür (Tablo 7, Şekil 9). Ayrıca, sadece bir örnek alınabilen Çiftlikköy'deki köpeğin de bütün testlerle pozitif olduğu belirlenmiştir. IFA testiyle 15 pozitif köpeğin bir tanesi negatif olarak, iki tanesi ise eşik değerinin altında (1/64) bulunmuştur. Yayma prepatların incelenmesi ile de 15 köpeğin sadece 7'sinde amastigotlar görülebilmektedir.

Uygulanan PZR testinde de kullanılan örneğe göre hassasiyette farklılık olduğu, kandan elde edilen beyaz hücrelerin kullanılması durumunda hassasiyetin %100'e kadar çıkabileceği görülmüştür (Tablo 8, Şekil 11).

Tablo 7. Çalışma alanındaki 4 lokalitede saptanan KanL prevalansı

Bölge	Rakım (m)	Örneklenen Köpek Sayısı	Pozitif Bulunan Köpek	
			Sayı	%
Bodrum Barınak	143	51	2	3,92
Turgutreis Barınak	52	41	7	17,07
Yalıkavak	34	13	3	23,07
Dağbelen Köyü	248	18	2	11,11
Toplam	-	123	14	11,38

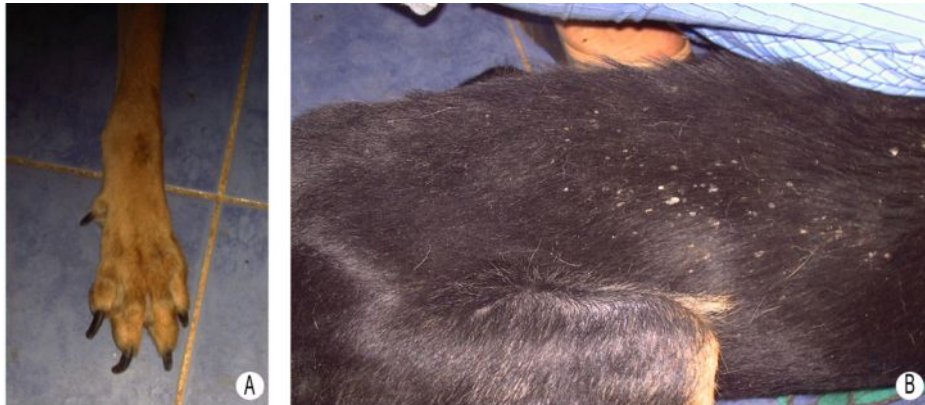


Şekil 9. Bodrum yarımadasında örnekleme yapılan 4 lokalitedeki KanL prevalansı (%)

Pozitif olarak saptanan 15 köpeğin 10 tanesinin en az bir klinik semptom gösterdiği ve hiçbir bulgusu olmayan 5 köpeğin (%33,33) de pozitif olduğu (Tablo 8), tırnak uzaması, kepeklenme, deri lezyonu, tüy dökülmesi gibi deri belirtilerinin pozitif köpekler arasında daha sıklıkla görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 10).

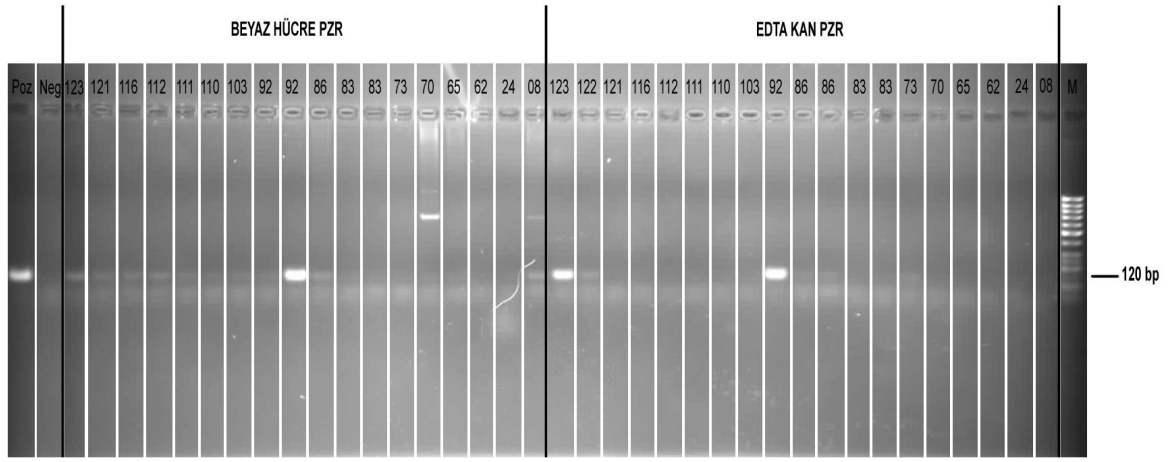
Tablo 8. Testlerden herhangi biriyle pozitif olarak saptanan köpeklerin sonuçları

No	Lokalite	Cinsiyet	IFAT 1/	EDTA Kan PZR	Beyaz Hücre PZR	Yayma	Klinik	
1	BOD-008	Bodrum Merk	E	Neg	POZ	POZ	Neg	Tüy dök.
2	BOD-024	Bodrum Merk	E	512	Neg	POZ	POZ	Tırnak uzaması
3	BOD-070	Turgutreis	D	128	Neg	POZ	Neg	Deri lezyonu, kepeklenme
4	BOD-073	Turgutreis	D	128	POZ	POZ	Neg	Zayıflama
5	BOD-110	Turgutreis	D	128	Neg	POZ	Neg	yok
6	BOD-111	Turgutreis	D	128	POZ	POZ	POZ	Tırnak uzama
7	BOD-112	Turgutreis	D	128	Neg	POZ	Neg	LAP +1
8	BOD-116	Turgutreis	D	64	Neg	POZ	Neg	Yok
9	BOD-121	Turgutreis	D	64	Neg	POZ	Neg	Yok
10	BOD-083	Yalıkavak	E	4096	POZ	POZ	POZ	LAP+3
11	BOD-086	Yalıkavak	E	256	POZ	POZ	Neg	Kepeklenme
12	BOD-123	Yalıkavak	E	1024	POZ	POZ	POZ	Tırnak uzama
13	BOD-092	Dağbelen K.	E	4096	POZ	POZ	POZ	yok
14	BOD-103	Dağbelen K.	D	1024	Neg	POZ	POZ	Tüy dökülmesi, anemi
15	BOD-122	Çiftlikköy	D	4096	POZ	POZ	POZ	Burun kan., iştahsızlık, zayıflama
Pozitiflik			12/15 %80	8/15 %53,3	15/15 %100	7/15 %46,6	-	



Şekil 10. KanL'deki deri belirtilerinden; **A:** tırnak uzaması ve **B:** kepeklenme

Kan örneklerinin toplanması sırasında lenf aspirasyonu yapılan 10 köpekten diğer testleri de pozitif olan sadece bir tanesinde (BOD-024) kültürde üreme olduğu görülmüştür. Bu suşun Montpellier, Fransa'da zimodem analizi yaptırılmış ve *Leishmania infantum* MON-1 olduğu saptanmıştır. Kültür sonucu negatif olan diğer 9 köpekten sadece bir tanesinin diğer testlerle pozitif olduğu belirlenmiştir.



Şekil 11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi ile alınan sonuçlar

3.2. Kum Sinekleri ile Yapılan Çalışmaların Sonuçları

Işıklı tuzakların yerleştirildiği toplam 50 lokalitenin özellikleri Tablo 9'da verilmiştir. Bu lokalitelerin 43'ünde bir veya birden fazla türde kum sineği saptanmıştır (Tablo 10). Çalışma süresince toplam 985 *Phlebotomus* örneği, 53 *Sergentomyia* örneği yakalanmıştır. Tür tayini çalışmalarıyla yarımada 10 *Phlebotomus* türünün bulunduğu ve bunların *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi* (Scopoli, 1786); *P.* (*Paraphlebotomus*) *alexandri* (Sinton, 1928); *P.* (*Paraphlebotomus*) *similis* (Perfil'ew, 1963); *P.* (*Paraphlebotomus*) *jacusieli* (Theodor, 1947); *P.* (*Adlerius*) *brevis* (Theodor&Mesghali,

1964); *P. (Adlerius) simici* (Nitzulescu, 1931); *P. (Larrousius) tobbi* (Adler&Theodor, 1934); *P. (Larrousius) neglectus* (Tonnoir, 1921); *P. (Larrousius) mascittii* (Grassi, 1908); *P. (Larrousius) perfiliewi* (Parrot, 1930) olduğu görülmüştür. Yarımada yakalanan bütün türler gözönüne alındığında, *Phlebotomus tobbi*'nin %35,93 oranıyla dominant tür olduğu, 4 lokalite dışında bütün lokalitelerde bulunduğu, bu türü *P. similis*'in %10,15 oranıyla izlediği belirlenmiştir (Tablo 10, Şekil 12). Çalışmada saptadığımız KanL prevalansı ile *P. tobbi*'nin dağılımının karşılaştırılması Şekil 13'de verilmiştir. KanL açısından pozitiflik saptanan her yerde *P. tobbi*'nin dominant tür olarak bulunduğu ve olasılıkla vektör tür olduğu saptanmıştır.

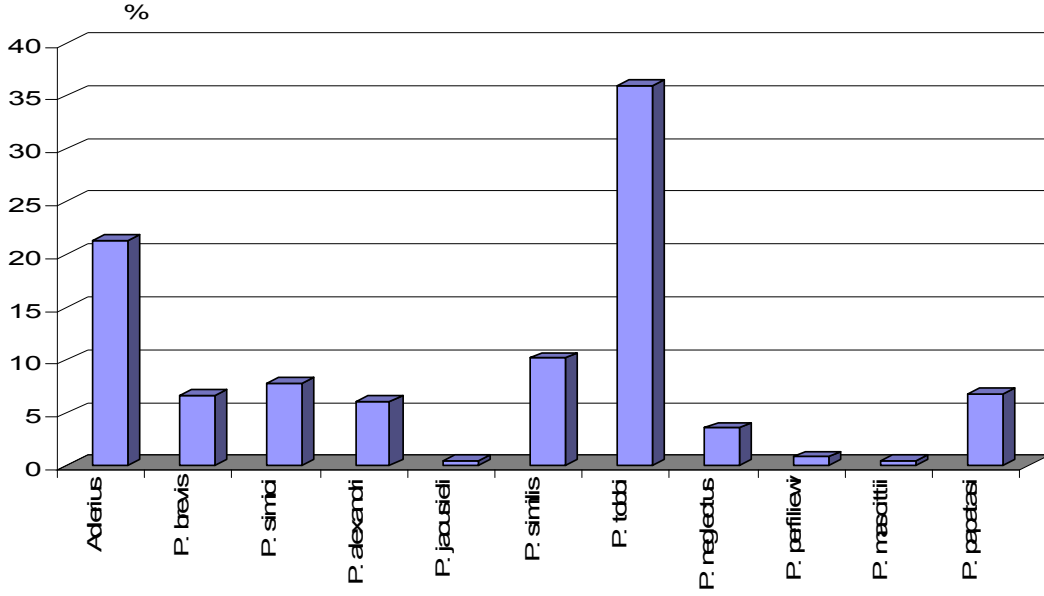
Çalışma alanında toplam 3 *Sergentomyia* türünün bulunduğu ve bunların *Sergentomyia theodori*, *S. minuta* ve *S. dentata* olduğu ve *Sergentomyia theodori*'nin %67,92 oranı ile dominant tür olduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

Tablo 9. Bodrum yarımadasında ışıklı tuzakların yerleştirildiği lokalitelerin özellikleri ve toplama süresince kaydedilen sıcaklık ve nem değerleri

Kod No	Lokalite	Kum sineği (Toplam)	Temp (Min- Max)	Nem (Min – Max)	Tuzak yeri	Tuzak yerinde bulunan hayvan ve sayısı	Tuzak yerinin tipi
BOD-01	Çiftlikköy-1	2	26.5-43.6	24-49	Ahır içi	Siğir (2)	Taş
BOD-02	Çiftlikköy-2	156	22.8-41.0	24-57	Ahır içi	Siğir (1), Tavuk (>10)	Ağaç
BOD-03	Çiftlikköy-3	44	24.7-39.3	28-55	Kümes içi	Tavuk (>10)	Taş
BOD-04	Çiftlikköy-4	2	20.4-37.9	24-64	Ahır içi	Siğir (2), Tavuk(>5)	Beton
BOD-05	Yalıçiftlik	1	20.6-38.8	24-72	Ahır içi	Keçi (8-10)	-
BOD-06	Kızılağaç-1	0	26.2-39.3	28-61	Ahır içi	keçi(1), İnek(1), Koyun(2)	Beton
BOD-07	Kızılağaç-2	0	Nd	nd	Açık hava	Yok	-
BOD-08	Eski Gököy	0	Nd	nd	Kümes dışı	Tavuk	Ağaç
BOD-09	Gündoğan	0	Nd	nd	Kümes içi	Tavuk	Ağaç
BOD-10	Gökçebel-1	33	19.8- 35.9	32-82	Kümes dışı	Tavuk	Ağaç
BOD-11	Gökçebel-2	59	Nd	nd	Kümes içi	Tavuk	Demir
BOD-12	T.Reis-1	16	28.3-29.4	53-57	Açık hava	Siğir (7)	Beton
BOD-13	T.Reis -2	18	18.5-43.3	28-92	Külübe	Köpek (>20)	Beton
BOD-14	T.Reis -3	5	22.3-32.2	38-69	Açık hava	Köpek (>20)	Beton
BOD-15	T.Reis -4	0	Nd	nd	Açık hava	Köpek (>20)	Beton

BOD-16	Akcaalan	6	21.8-33	40-55	Ahır içi	Sığır (2)	Taş
BOD-17	Yalıkavak-1	1	22.3-32.2	38-69	Ahır içi	Sığır (2)	Taş
BOD-18	Yalıkavak-2	27	21.6-30.4	26-40	Açık hava	Köpek	Taş
BOD-19	Yalıkavak-3	3	22.-31.2	29-63	Açık hava	Köpek	Beton
BOD-20	Ortakent- Yalıkavak Yolu-1	12	22.5-31.9	59-84	Sera içi	Kedi	Naylon
BOD-21	Ortakent- Yalıkavak Yolu-2	16	22-31.7	34-75	Ev harici Kafes	Sığır (15)	Biriket
BOD-22	Ortakent- Yalıkavak Yolu-3	1	24.5-38.8	29-63	Ahır içi	Sığır (2)	Biriket
BOD-23	Yakaköy-1	9	25.8-31.8	31-53	Ahır içi	Sığır (3)	Taş
BOD-24	Yakaköy-2	35	24.2-38.5	32-56	Ahır içi	Sığır (2)	Taş
BOD-25	Dereköy-1	65	21.2-41.2	34-50	Ahır dışı	Sığır (2)	Taş
BOD-26	Dereköy-2	0	21.2-41.2	34-50	Ahır dışı	Sığır (2)	Taş
BOD-27	Bahçe	13	18.9-42.9	34-87	Ahır dışı	Sığır ve Tavuk	Ağaç, Tel
BOD-28	Peksimet -1	0	25.5-26.3	81-51	Ahır içi	Sığır (3)	Tuğla
BOD-29	Peksimet-2	58	18.4-38.0	29-86	Ahır içi etrafı açık	Sığır (1)	Ağaç
BOD-30	Peksimet-3	4	28.6-29.4	54-60	Ahır içi hayvan yok	Sığır 50 m uzakta	Taş
BOD-31	Dereköy-3	3	19.7-37.2	33-82	Ahır içi	Sığır (1)	Tuğla
BOD-32	Dereköy-4	15	17.0-34.5	31-88	Ahır içi duvarı yok	Sığır (2), Keçi (3), Köpek (1), Tavuk	Ağaç
BOD-33	Dereköy-5	9	15.8-34.6	25-93	Ahır içi	Hayvan yok	Taş
BOD-34	Güreçe-1	0	30.6-30.1	63-nd	Ahır içi	Keçi (2)	Beton
BOD-35	Güreçe-2	1	24.4-31.7	36-77	Ahır içi	yok	Taş
BOD-36	Güreçe-3	0	22.5-31.9	37-84	Ahır içi	yok	Taş
BOD-37	T.Reis -5	1	nd	nd	Kulübe	Köpek (>20)	Beton
BOD-38	T.Reis -6	44	nd	nd	Kulübe	Köpek (>20)	Beton
BOD-39	Göltürbükü- 1	2	18.5-43.3	28-92	Ahır içi Açık hava	Sığır (4), Tavuk	Açık havada
BOD-40	Göltürbükü- 2	2	20.7-39	24-92	Ahır içi Açık hava	Sığır (1)	Açık havada
BOD-41	Torba-1	0	18.2-41.5	33-99	Ahır içi	Tavuk	Ağaç, Tel
BOD-42	Torba-2	0	18.6-45.5	24-99	Ahır dışı	Sığır (2)	Beton
BOD-43	Çamlık-1	0	23.0-38.9	31-57	Ahır içi	Keçi (2)	Taş
BOD-44	Çamlık-2	7	21.7-34.5	24-76	Ahır içi	Sığır (20)	Beton
BOD-45	Çamlık-3	6	22.5-37.6	24-52	Ahır içi	Sığır (2)	Taş
BOD-46	Çiftlikköy-5	28	23.8-39.0	30-56	Ahır içi	Sığır (1)	Taş
BOD-47	Çiftlikköy-6	5	nd	nd	Kümes	Tavuk	Tahta
BOD-48	Konacık	126	nd	nd	Ahır içi	Keçi, Koyun	Ağaç

BOD-49	Gümüşlük	47	24.4-31.7	36-77	Ahır içi	Sığır (2)	Açık havada
BOD-50	Dağbelen	62	21.6-26.3	42-81	Ahır içi	Keçi (4)	Taş



Şekil 12. Bodrum yarımadasında saptanan kum sineği türlerinin % yoğunlukları

Çalışmada dişi *Phlebotomus*'ların erkeklerden daha fazla yakalandığı ve erkek/dişi oranının 1/1.63 (611/374) olduğu belirlenmiştir (Tablo 10). Tuzakların çalıştıkları süre içinde genel olarak ölçülen minimum sıcaklığın 15.8 °C, maksimum sıcaklığın 43.3 °C olduğu, ölçülen minimum nemin %24 olduğu, maksimum nemin ise %99 olduğu görülmüştür (Tablo 9).



Şekil 13. Bodrum yarımadasında farklı bölgelerde saptanan KanL prevalansı ile olası vektör tür olan *P.tobbi*'nin dağılım ve yoğunluklarının karşılaştırılması

Tablo 10. Bodrum yarımadasındaki lokalitelerde yakalanan *Phlebotomus* türleri (aynı lokalitedeki birden fazla tuzaktan alınan sonuçlar birleştirilerek verilmiştir)
D: Dişi; E: Erkek; T: Toplam

Lokalite	Toplam	Larrousius									Paraphlebotomus									Adlerius			Phlebotomus											
		Adlerius			<i>P. tobbi</i>			<i>P. neglectus</i>			<i>P. perfiliewi</i>			<i>P. mascittii</i>			<i>P. alexandri</i>			<i>P. jacusieli</i>			<i>P. similis</i>			<i>P. brevis</i>			<i>P. simici</i>			<i>P. papatasi</i>		
		D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T	D	E	T
Çiftlikköy	230	53	26	37	63	1	1	2	-	-	-	4	-	4	6	12	18	-	-	-	26	19	45	8	2	10	-	12	12	11	12	23		
Çamlık	12	4	1	-	1	1	1	2	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	2	3	-	-	-		
Konacık	126	3	30	47	77	1	4	5	-	-	-	-	-	-	6	28	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	2	2	4			
Yalıçiftlik	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1			
Eski Gölköy	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2			
Gündoğan	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Gökçebel	88	39	15	11	26	1	-	1	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	1	15	16	-	-	-	-			
Turgutreis	111	25	31	18	49	1	2	3	-	4	4	-	-	-	1	-	1	1	-	1	1	-	1	14	1	15	2	3	5	5	2	7		
Akçalalan	6	2	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2			
Yalıkavak	28	18	3	1	4	3	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	-			
Orta-Yalı Yol	65	24	4	1	5	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	19	6	25	4	-	4	2	2	4			
Yakaköy	43	12	14	5	19	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	2	2	-	5	5	3	-	3	-			
Dereköy	92	17	27	9	36	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	10	33	-	-	-	-	2	2	3	-	3	-			
Bahçe	13	-	3	2	5	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	4			
Peksimet	63	7	19	20	39	4	5	9	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	2	1	3			
Güreçe	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Göltürkbükü	4	-	2	1	3	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Gümüslük	40	2	14	10	24	1	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2	-	2	5	-	5	3	-	3	-	-	-		
Dağbelen	60	4	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	5	1	2	3	9	6	15	1	2	3	11	7	18	7	3	10		
Genel Toplam	985	210	191	163	354	13	22	35	2	6	8	4	-	4	18	42	60	3	2	5	63	37	100	47	18	65	22	55	77	38	29	67		
%	100	21,31			35,93			3,55			0,81			0,4			6,09			0,5			10,15			6,6			7,81			6,8		

Tablo 11. Bodrum yarımadasındaki lokalitelerde yakalanan *Sergentomyia* türleri (aynı lokalitedeki birden fazla tuzaktan alınan sonuçlar birleştirilerek verilmiştir). D: Dişi; E: Erkek; T: Toplam

Lokalite	Toplam	<i>S. dentata</i>			<i>S. minuta</i>			<i>S. theodori</i>		
		D	E	T	D	E	T	D	E	T
Çiftlikköy	20	1	0	1	5	2	7	10	2	12
Çamlık	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Konacık	2	0	0	0	1	1	2	0	0	0
Yalıçiftlik	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eski Gölköy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gündoğan	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Gökçebel	3	0	0	0	2	0	2	1	0	1
Turgutreis	12	0	0	0	1	0	1	10	0	10
Akçaalan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Yalıkavak	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ortakent-Yalıkavak Yolu	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Yakaköy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dereköy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahçe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Peksimet	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Güreçe	4	0	0	0	1	0	1	3	0	3
Göltürbükü	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gümüslük	5	0	0	0	1	0	1	3	1	4
Dağbelen	2	0	0	0	1	1	2	0	0	0
Genel Toplam	53	1	0	1	12	4	16	30	6	36
	%	100		1,88			30,18			67,92

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

TARTIŞMA

Ülkemizin birçok kırsal kesimlerinde olduğu gibi Bodrum yarımadasının da kırsal bölgelerinde bitki örtüsü ve iklim durumu, evlerin çoğunun tahta, taş veya biriketten yapılmış olması, evlerin yakınında büyükbaş/küçükbaş hayvan barınaklarının bulunması vektör *Phlebotomus*'lar için uygun üreme ve dinlenme alanları oluşturmaktadır. Çalışmamız sonucunda yarımada rezervuarlık yapan köpeklerdeki KanL oranının %12,09 olduğunun ve paraziti bulaştırabilecek *Phlebotomus* türlerinin bulunduğu saptanmasıyla bu bölgede gerekli önlemlerin alınmasının zorunlu olduğu görülmüş ve durum ilgili yerlere bildirilmiştir. Ülkemizde leishmaniasisin visseral ve deri formunun endemik ve sporadik olarak görülmesi, visseral forma rezervuarlık yapan köpeklerde enfeksiyonun insanlara göre çok daha yüksek oranda saptanması, bu hastalığın hem insanlarda hem de köpeklerdeki ayırıcı tanısının önemini arttırmaktadır. Leishmaniasisin bazı bölgelerimizde sporadik olarak görülmesi, visseral ve deri formunun diğer bir çok hastalıkla aynı bulguları vermesi nedeniyle ayırıcı tanıda öncelikle düşünülmemektedir. Endemik bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu açıdan da önem taşımaktadır.

Kala-Azar hastalarının bulunduğu Manisa, Muğla, Kuşadası, Karaburun, Urla gibi diğer bölgelerde köpekler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, mutlaka köpeklerde önemli ve insan leishmaniasisi ile kıyaslanmayacak ölçüde yüksek oranlarda (%3,8-%27) seropozitifliğe rastlanmıştır (126, 131, 132). Bu çalışmada da, Bodrum Merkez'de ve Turgutreis'de bulunan iki köpek barınağında bulunan ve yarımada birçok yerinden geldiği belirtilen köpeklerden ağırlıklı örnek alınması tercih edilmiş, böylelikle

yarımadaanın önemli bir kısmını temsil edeceği düşünülmüştür. Alınan sonuçlar da göstermektedir ki özellikle turizm açısından son derece hareketli bir bölge olan Bodrum yarımadasının her yerinde kanin leishmaniasisi yaygın olarak (%3,92 ila %23,07) bulunmaktadır. Bu durum, paraziti taşıyan köpeklerin ortamda bulunmasının insanlar için olan potansiyel tehlikeyi de gözönüne sermesi açısından önemli olarak değerlendirilmiştir. Bu bölgemizde halk sağlığı yönünden mutlaka önlem alınmasını gerektiren bir durumun ortaya çıkması yanısıra, ülkemizde köylerdeki insanlarla yakın ilişkide bulunan Tarım İl Müdürlüğü'nde görevli olan veteriner hekimler ile Bodrum'un bütün köylerinde bulunan özel kliniklerdeki veteriner hekimlerin konuyu bilmelerinin ne kadar önem taşıdığı da bu çalışma ile gösterilmiştir.

Ayrıca elde edilen sonuçların ülkemizin birçok bölgesinde olduğu gibi bu bölgede de görev yapan birinci basamak hekimlerimize duyurulması da bölgede görev yapan hekimlerin ayırıcı tanıda visseral leishmaniasisi düşünmesini sağlaması açısından önem taşımaktadır. Köylüler için önem taşıyan köpeklerin aynı zamanda bu hastalığa rezervuarlık da yapabildiklerinin ve vektör *Phlebotomus*'lar aracılığıyla paraziti her zaman insanlara bulaştırma olasılığı bulunduğunun yeniden vurgulanması gerektiği bir kez daha ortaya konulmuştur.

Güvenirlikleri nispeten daha düşük olmasına rağmen, serolojik yöntemler endemik alanlarda bulunan insan ve köpeklerdeki leishmaniasisin insidansını ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için sıklıkla kullanıldığı, IFAT testinde pozitif bulunan köpeklerin tedavisi veya ortamdan uzaklaştırılmasının her zaman insanlar için potansiyel riski azalttığı belirtilmektedir (154). IFAT, DAT ve konvasiyonel ELISA testlerinin kullanıldığı çalışmalarda asemptomatik köpeklerde spesifik antikorların bulunduğu ve onaylanmış sonuçlara göre her üç test arasındaki uyumun %81,25 ile %96,66 arasında değiştiği

belirtilmiştir (154). Bu çalışmada da sadece IFAT testi uygulanmış ve toplamda 15 olan KanL açısından pozitif olan köpeklerin 12 tanesinde (%80) seropozitiflik saptanmıştır. Geri kalan 3 köpekten ikisinin 1/64 sulandırımında pozitif olduğu diğerinin ise negatif olduğu görülmüştür. IFA testinde KanL için spesifik antikorların klinik belirtilerin ortaya çıkmasından önce saptandığı ve bunun da uzun süreli asemptomatik periyodu işaret eden diğer çalışmaların bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür (158). Çalışmamızda eşik değerin altında bulunan köpeklerin bir süre sonra seropozitif olacakları ve bu nedenle de, eğer uygulanabilecek başka bir alternatif test yoksa, ara değer olarak değerlendirilebileceğimiz 1/64 sulandırımında pozitiflik saptanan köpeklerin mutlaka takibe alınması gerektiği düşünülmektedir. Bu çalışmada serolojik yöntem ek olarak moleküler bir yöntem olan PZR'nun uygulanmış olması ile bu 3 köpeğin de KanL yönünden pozitif olduğu belirlenebilmiştir.

Köpeklerin klinik bulgularının incelenmesi sonucunda, pozitif bulunan 15 köpekten 10'unda (%66,6) en az bir klinik semptom bulunduğu belirlenmiş, pozitif olduğu halde asemptomatik olan köpeklerin %33,33 oranında olması, KanL'li köpeklerin %50'den fazlasının herhangi bir belirti göstermediği yani asemptomatik olduğu şeklindeki bulguları da (50, 56, 102) desteklemektedir. Kanin leishmaniasisde genel bir durum olan bu bulgu, köpek asemptomatik olduğu için, vektörlere paraziti bulaştırabildiği halde, herhangi bir belirti göstermemesi (110) ve böylece de veteriner hekimlerin hastalığı atlayabilmesi durumunu ortaya çıkarmakta ve potansiyel riski büyütmektedir. Bu kadar fazla sayıda infekte köpeğin klinik bulgu göstermemesi veya klinik olarak ayırt etmeye yardımcı olacak şekilde kliniği olmaması, özellikle yaşlı köpeklerin yaşamları boyunca fazla oranda Leishmania paraziti ile karşılaşması sonucu gelişen koruyucu immünite ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (138).

Bu sonuçlar leishmaniasis endemik bölgelerde bulunan veterinerlerin leishmaniasisin klinik bulgularından bir veya birkaç tanesine sahip olan köpeklerden şüphelenmeleri gerektiğini ortaya koymaktadır. Tanı koymak için öncelikle ucuz, hızlı ve invaziv olmayan serolojik testler önerilmektedir. Özellikle serolojik testlerle sınırda pozitif olarak bulunan köpeklerin incelenmesinin belli aralıklarla tekrar edilmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu süre içinde Deltametrin emdirilmiş köpek tasmalarının kullanılması bu köpeklerin vektör *Phlebotomus*'lara olan bulaştırıcılığını önlemesi ve onların rezervuarlığını ortadan kaldırması açısından son derece önem taşımaktadır (103).

Yapılan çalışmalarda parazitin direkt olarak görülmesi altın standart olma özelliğini hala korumaktadır. Buna karşın örnek alınımındaki hatalar veya preparatı inceleyen kişinin deneyiminden kaynaklanan nedenler yüzünden hassasiyeti düşük olabilmektedir. Bu çalışmada pozitif köpeklerden alınan lenf aspirasyon örneklerinin sadece 7 tanesinde (%46,6) yayma preparatlarda parazitin amastigot formları görülebilmektedir. Bu hassasiyetin artırılması için bu çalışmada da uyguladığımız polimeraz zincir yönteminin (PZR) uygulanması ile tanıda hassasiyet artırılabilir (28, 132). Tunus'ta gerçekleştirilen KanL ile ilgili epidemiyolojik bir çalışmada KanL seroprevalansı %6 olarak bulunmuş, PZR ile de bu seropozitif köpeklerin hepsi pozitif olarak saptanmıştır. Bunun yanısıra direkt incelemede hassasiyetin bizim çalışmamızdakine benzer şekilde %33, kültürde ise %55 olduğu belirtilmiştir (30). Çalışmamızda, PZR yönteminin uygulanması ve kullanılan DNA örneğinin iki ayrı şekilde elde edilmesi ile hassasiyet arttırılmıştır. EDTA'lı kandan elde edilen DNA ile uygulanan PZR'de %53,3 oranında pozitiflik saptanırken, beyaz hücrelerden elde edilen DNA ile uygulanan PZR'de %100 oranında pozitiflik saptanmıştır. Serolojik yöntemler de özellikle IFAT ve rK39 hızlı tanı testi başta olmak üzere yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermektedirler (128). Ancak eşik değerin altındaki olgularda da

direkt bakıda parazit görülebilmekte ya da PZR ile parazit DNA'sı saptanabilmektedir. Buna karşın nadir de olsa uygun örnek alınamamasına ve örnekteki PZR inhibitörlerine bağlı olarak PZR ile yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde *ssrRNA* gen sekansı ile uygulanan PZR ile kültür sonuçları ile karşılaştırılmış, yalnızca bir örnekte PZR ile yanlış negatif sonuç alındığı ve bunun da örneğin uygun alınamamasına bağlı olduğu bildirilmiştir (107). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da serolojik testler ve direkt bakı ile karşılaştırdığımızda PZR ile çok daha hassas sonuçlar almamıza karşın DNA örneğinin çeşitlendirilmesinin PZR'da çok önemli olduğu çalışmamız sırasında görülmüştür. Reale ve ark. (143) da bizim de çalışmamızda kullandığımız 13A ve 13B primerleri ile köpek lenf nodu aspirasyon örneklerinde PZR uygulamışlar ve direkt bakıyı altın standart olarak aldıklarında %100 hassasiyet ve özgüllük saptamışlardır. Aynı çalışmada IFA testi ile yüksek oranda yanlış negatif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir (143). Bunun yanısıra, PZR yöntemi ile parazitolojik yöntemleri (direkt bakı ve kültür) karşılaştıran bir çalışmada da iki yöntem arasındaki uyumun %92 gibi yüksek oranda olabileceği de bildirilmiş, özellikle ayırıcı tanıda ve VL kontrol programlarında PZR yöntemlerinin uygulanmasının son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (55).

Bu nedenlerle PZR'nin diğer yöntemlere alternatif olması yerine, diğer yöntemlerle birlikte uygulanmasının veya bu çalışmamızda da uyguladığımız gibi kullanılan örneğin niteliğinin artırılmasının hem insan hem de köpek olgularında leishmaniasis tanı ve takibinde daha yararlı olacağını düşünmekte ve önermekteyiz.

Ülkemizde leishmaniasisin vektörü olan *Phlebotomus*'lar üzerindeki çalışmalar Akalın tarafından 1940 yılında başlatılmış ve bugüne kadar sürdürülen çalışmalarla toplam 18 tür bulunduğu bildirilmiştir (2, 7, 37, 50, 176). Günümüzde, leishmaniasis görülen

hemen bütün ülkelerde kesin ve olası vektörler tanımlanmış ve çeşitli ülkelere ait tür anahtarlarının yapılmış olmasına karşın Türkiye’de henüz bu gerçekleştirilememiştir.

Bodrum yarımadasının tamamı gözönüne alındığında, *Leishmania infantum*’un kanıtlanmış vektörlerinden olan *Phlebotomus tobbi*’nin %35,32 oranıyla dominant tür olduğu, 4 lokalite dışında yarımadanın her yerinde bulunduğu belirlenmiştir. Bu bulgunun, leishmaniasis açısından pozitif saptanan köpeklerin bulunduğu yerlerle örtüşmesi nedeniyle yarımada da olası vektörün *P. tobbi* olduğu kanaatine varılmıştır. Yunanistan’da ve Türkiye’ye yakın adalarda yapılan çalışmalarda, leishmaniasis vektörünün *P. neglectus* olduğu belirlenmiş (29), ayrıca ülkemiz Ege bölgesinde denize yakın bölgelerde yapılan diğer çalışmalarda da *P. neglectus* dominant olarak bulunmuş ve olası vektör tür olarak saptanmıştır (130, 171). Ancak bu çalışmamızda, Bodrum yarımadası için bu durumun geçerli olmadığı, iki farklı zamanda yapılan toplama işlemlerinde de *P. neglectus* popülasyonunun çok zayıf olduğu görülmüştür. Ege Bölgesi’nde *P. neglectus* dışında yine aynı altcins, Larrousius, içinde yer alan *P. tobbi*’nin olası vektör olduğu belirlenmiştir. Bu Ege Bölgesi için yeni bir veri olmakla birlikte aynı zamanda da ülkemizin Doğu Akdeniz Bölgesi’ndeki duruma (87) benzerlik göstermektedir.

P. similis’in ikinci dominant tür olarak bulunması, bölgede rastlanan lokal kutanöz leishmaniasis olgularında vektör rolünü bu türün oynadığını düşündürmüştür. Bodrum yarımadasındaki benzer bir durum Aydın ilimizde de söz konusudur. Aydın’da yapılan çalışmalarda kutanöz leishmaniasis etkeninin *Leishmania tropica* olduğunun belirlenmesine rağmen, kanıtlanmış vektörü olan *P. sergenti* bulunmadığı buna karşılık *P. similis*’in yayılımının Aydın’daki lokal KL olguları ile örtüştüğü görülmüştür (yayınlanmamış bilgi). Daha geniş anlamda bu durum ülkemizin batısındaki lokal KL

olgularının etkeni olan *L. tropica*'nın olası vektörünün *P. similis* olduğunun yeni bir kanıtı olarak görülebilmesi anlamına gelmektedir.

Çalışma alanımızdaki *Phlebotomus* faunasında parazite vektörlük yapan türlere ait popülasyonların kuvvetli ve yaygın olması bu bölgelerdeki potansiyel tehlikenin yüksek boyutlarda olduğunu göstermektedir. Ortamdaki hasta köpeklerin de fazlalığı gözönüne alındığında bu yöremizdeki potansiyel tehlikenin daha da büyüdüğü düşünülmektedir.

İnfekte köpeklerde *L. infantum*'un yok edilmesi özellikle seropozitif olan asemptomatik köpeklerdeki durmun saptanmasına yönelik etkili önlemler alınmadıkça olanaksız olacaktır. Temel olarak, infekte olanların elimine edilmesi önerilse de (133) etik ve sosyal nedenlerden dolayı evrim zincirini kırabilecek KanL aşısı (57) gibi mutlaka alternatif kontrol önlemlerinin de alınması gerekmektedir.

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan inceleme ve araştırmalarla, Bodrum yarımadasının insan kutanöz (KL) ve visseral leishmaniasisi (VL) açısından ülkemizdeki birçok bölgede olduğu gibi sporadik olduğu, ancak %12,09 oranıyla kanin leishmaniasis yönünden endemik bir bölge olduğu saptanmıştır. Vektör *Phlebotomus*'larla ilgili olarak yapılan çalışmalar sonucunda, yarımada hem visseral leishmaniasisin kanıtlanmış vektörü olan *Phlebotomus tobbi*'nin hem de kutanöz leishmaniasisin olası vektörü olan *Phlebotomus similis*'in hemen hemen bütün bölgede yaygın olarak bulunmuştur. Bölgede her ne kadar insan visseral leishmaniasisi sporadik olsa da, *Leishmania infantum*'un doğadaki rezervuarlığını yapan köpeklerde önemli oranda seropozitiflik bulunması, bulaşım için gerekli vektörün bulunması parazitin evrim halkasını tamamlaması için gerekli koşulların oluştuğunu göstermektedir. Kala-Azar'ın endemik olduğu diğer Akdeniz ülkelerinde de görüldüğu gibi, insan olgularının köpek olgularına göre daha az olması beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmektedir.

Gerek ülkemizde gerekse diğer Akdeniz ülkelerinde *L. infantum* öncelikle çocuklarda enfeksiyona yol açmaktadır. Bölgedeki bir köpekten izole edilen *Leishmania* suşunun izoenzim analizi ile *Leishmania infantum* MON-1 olarak bulunması ve bunun insanlardan izole edilen suşlarla aynı grupta bulunması nedeniyle köpeklerin rezervuarlığı kanıtlanmıştır.

Epidemiyolojik tarama sırasında kullandığımız IFA Testi ile 15 köpeğin 13'üne (%86,6) tanı konulabilmiştir. Uygulanan klasik PZR'nda, direkt EDTA'lı kan ve beyaz hücreler ayrı ayrı örnekler olarak kullanılmış ve beyaz hücrelerden çok daha hassas sonuçlar alındığı görülmüştür.

Çalışmalarımız sırasında yardımcı olan bölgedeki gerek özel ve gerekse barınakların sorumlu veteriner hekimleri aracılığıyla Tarım İl Müdürlüğü'nde görevli veteriner hekimlerle ayrıntılı olarak görüşülerek konudan bölgedeki ilgili herkesin haberi olması sağlanmaya çalışılmıştır. Ayrıca, Sağlık Müdürlüğü bütün hekim ve veteriner hekimlere yönelik bir seminer düzenlemesi durumunda gerekli katkının sağlanacağı konusunda bilgilendirilmiştir. Bölgede aşağıda sıraların önlemlerin alınması için çalışılması gerektiği vurgulanmıştır.

1. Visseral leishmaniasis hakkında özellikle Çocuk Hastalıkları uzmanlarına ve Sağlık Ocaklarında çalışanlar başta olmak üzere diğer hekimlere ayrıntılı bilgi verilmesi gerekmektedir. Bu eğitimde, VL'in diğer enfeksiyon hastalıkları ile karışabileceğinden yola çıkarak ayırıcı tanı için VL'in düşünülmesinin önemi belirtilmelidir. Bölgede potansiyel risk fazla olduğu için uzman ve pratisyen hekimlerinin konuyla ilgili olarak bilgilendirilmesi önem taşımaktadır.
2. Yeni Bulaşıcı Hastalıklar Bildirim Sistemi ile bundan sonra saptanacak olan VL olgularının daha iyi ve doğru bir şekilde takip edilebileceği düşünülmektedir.
3. Kişisel olarak *Phlebotomus*'lardan korunmada sivrisineklerden korunma yöntemlerinin uygulanması önerilir. Bu iş için kişisel korunma yöntemlerini içeren ve Sıtma Savaş teşkilatı tarafından bastırılmış broşürler kullanılabilir. Ayrıca köylerdeki ahır sahiplerinin ahırlarını kireç badana ile badana yapmalarının sağlanması vektör *Phlebotomus*'ların popülasyonunda önemli derecede azalma sağlayabileceği gibi Sıtma

Savaş elemanlarınca uygulanacak kalıcı insektisitlerin etki süresini de uzatacaktır. Dikkat edilecek nokta, cibinlik kullanılması durumunda delikleri en küçük olan cibinliklerin tercih edilmesi gerektiğidir.

4. Turistik bir bölge olan çalışma alanımızda vektörlerle yapılacak mücadelenin iki kat daha fazla önem taşıdığı düşünülmektedir. Vektör *Phlebotomus*'ların azaltılması için bölgedeki Sıtma Savaş elemanlarınca kalıcı insektisit uygulanabilir. Sisleme yöntemi ile yapılacak mücadele etkili değildir. Kalıcı insektisit, köydeki ahırların duvarlarına, köy yollarına paralel uzanan taş duvarlara, organik materyallerin biriktiği yerlere uygulanabilir. *Phlebotomus*'ların sivrisinekler gibi su birikintilerinde değil de çok nemli ve organik besin açısından zengin topraklarda larvalarını bırakması nedeniyle larva mücadelesi yapma imkanı yoktur. Bu nedenle yukarıda belirtilen kişisel korunma önlemleri ve kalıcı ilaçlama ile popülasyonun azaltılması ve dolayısıyla da bulaşım riskinin azaltılması mümkündür. Bu uygulamalar aynı zamanda hem kum sineklerinin hem de sivrisinek popülasyonlarının azalmasına da yol açacaktır.
5. Çalışma sonucunda kesin tanı konan köpeklerin tedavi edilmeleri çok zor ve pahalı olduğundan yetkili veterinerler tarafından uyutulmaları önerilir. İnsanlarda dramatik iyileşme sağlayan beş değerli antimon bileşikler köpeklerde aynı sonucu vermemektedir. Liposomal amfoterisin-B ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir ancak ilacın son derece pahalı olması bu şans azaltmakta ayrıca uygun tedavinin uygulanamaması sonucunda dirençli suşların gelişme tehlikesi ortaya çıkmaktadır. Ayrıca tedavi esnasında köpeğin izole edilmesi ve destek tedavisinin bir veteriner hekim gözetiminde yapılması gerekmektedir.
6. İldeki resmi kurumlarda bulunan veya özel olarak çalışan Veteriner Hekimlere de bölgedeki köpeklerde "leishmaniasis" in bulunduğu duyurulmalıdır. Yapılacak taramalarda klinik olarak leishmaniasisten şüphelenilen köpeklerden alınacak 4-5 ml düz kanın EÜTF

Parazitoloji AD'na ulaştırılması durumunda gerekli incelemeler ücretsiz olarak yapılacak ve sonuçlar bildirilecektir. Bu iletişim Sağlık M¼d¼rl¼ę¼ aracılığıyla olabileceği gibi ildeki Belediye Veteriner Őubesi, Veterinerler Odası veya uygun g¼r¼len bir kurum yada kişiyle Parazitoloji AD arasında tesis edilebilir. B¼ylece insan olgularına g¼re daha fazla oranda g¼rd¼ę¼m¼z k¼pek leishmaniasis olguları erken teşhis edilebilir ve potansiyel bulaşımlar ¼nlenbilir.

7. Gerek epidemiyolojik taramalarda gerekse kliniklerde Ő¼phelenilen k¼peklerde infeksiyonun g¼sterilmesi açısından PZR y¼nteminin uygun olduğu ve ¼rnek olarak da beyaz h¼creleri kullanmanın son derece hassas sonuçlar verdiği g¼r¼lm¼řt¼r. Bu nedenle ¼nerilebileceęi d¼ř¼n¼lmektedir.

ÖZET

BODRUM YARIMADASINDA LEISHMANIASIS EPİDEMİYOLOJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Türkiye’de diğer Akdeniz havzası ülkelerinde olduğu gibi, insan kutanöz ve visseral leishmaniasisi ile kanin leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunudur. Çalışmamızda, daha önceki yıllarda hem kutanöz (KL) hem de visseral leishmaniasis (VL) olgularının bildirildiği fakat gerek kanin leishmaniasis (KanL) prevalansı gerekse vektör *Phlebotomus* türlerinin yaygınlığı ve yoğunluğu hakkında bilgi bulunmayan Bodrum Yarımadası’nda bu verilerin oluşturularak epidemiyolojik parametrelerin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bodrum yarımadası 8x8 km²’lik gridlere bölünerek örneklemelerin yapılacağı lokaliteler belirlenmiştir. KanL prevalansının belirlenmesi için yarımada da bulunan iki köpek barınağı ve 3 köyden toplam 124 köpekten düz ve EDTA’lı kan örnekleri toplanmış, ayrıca lenfadenopatisi olan 10 köpekten lenf aspirasyonu yapılarak parazit üretilmeye çalışılmıştır. Serolojik olarak IFAT, direkt kan örneği ve beyaz hücrelerden elde edilen DNA örneklerine ise PZR (Primer: 13A – 13B) uygulanmıştır. 124 köpekten 15’i testlerden herhangi biriyle pozitif bulunmuş ve genel KanL prevalansının %12,09 olduğu belirlenmiştir.

Kum sineklerinin toplanması işlemi 50 lokalitede gerçekleştirilmiş ve toplanan örneklerden yapılan tür tayinleri sonucunda, bölgede 10 *Phlebotomus* (*Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi*, *P.* (*Paraphlebotomus*) *alexandri*, *P.* (*Paraphlebotomus*) *similis*, *P.* (*Paraphlebotomus*) *jacusieli*, *P.* (*Adlerius*) *brevis*, *P.* (*Adlerius*) *simici*, *P.* (*Larrousius*))

tobbi, *P. (Larroussius) neglectus*, *P. (Larroussius) mascittii*, *P. (Larroussius) perfiliewi*) ve 3 *Sergentomyia* türü (*Sergentomyia theodori*, *S. minuta* ve *S. dentata*) bulunduğu saptanmıştır. *Phlebotomus* türlerinden, VL'in kanıtlanmış vektörü olan *P. tobbi* (%35,93) ve kutanöz leishmaniasis olası vektörü olan *P. similis*'in (%10,15) dominant türler olduğu görülmüştür.

Bodrum yarımadasında KanL prevalansının yüksek olması ve uygun vektör türün dağılımının KanL ile paralellik göstermesi, bu bölgede VL açısından önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiş ve önlem alınması için gerekli yerlere bilgi verilmiştir. Çalışmamızda iki ayrı örnekten elde edilen DNA ile uyguladığımız PZR'de, beyaz hücrelerle daha hassas sonuçlar alınmış ve 13A-13B primerlerinin kullanılması durumunda beyaz hücrelerden DNA eldesinin daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EPIDEMIOLOGY OF LEISHMANIASIS IN BODRUM PENINSULA

Human cutaneous and visceral leishmaniasis and canine leishmaniasis are important public health problems in Turkey like other Mediterranean countries. In our study we aimed to collect data base on epidemiological parameters in Bodrum Peninsula, where human cutaneous and visceral cases were reported in the past without any data on prevalence of canine leishmaniasis and distribution of vector *Phlebotomus* species

Bodrum peninsula was divided into 8x8 km² grids (sections) in order to determine the sampling localities for collecting sandflies. Venous blood samples were collected into sera tubes and EDTA tubes from 124 dogs living in two dog shelters and 3 villages and lymph node aspiration samples for parasite isolation were collected from 10 dogs in order to determine canine leishmaniasis prevalence in peninsula.

IFAT and blood and buffy coat PCR using 13A – 13B primers were performed. Fifteen dogs out of 124 were found to be positive with at least one of the tests and canine leishmaniasis mean prevalence was determined as 12,09% in peninsula.

Sandflies were collected from 50 different localities and identification results were as follows: There was 10 *Phlebotomus* (*Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi*, *P. (Paraphlebotomus) alexandri*, *P. (Paraphlebotomus) similis*, *P. (Paraphlebotomus) jacusieli*, *P. (Adlerius) brevis*, *P. (Adlerius) simici*, *P. (Larroussius) tobbi*, *P. (Larroussius) neglectus*, *P. (Larroussius) mascittii*, *P. (Larroussius) perfiliewi*) and 3 *Sergentomyia* species (*Sergentomyia theodori*, *S. minuta* ve *S. dentata*). *P. tobbi* (%35,93), the proven

vector of visceral leishmaniasis and *P.similis* (%10,15), probable vector of cutaneous leishmaniasis were found to be dominant species.

The parallellism of high prevalance of canine leishmaniasis and dominance of suitable vector species in Bodrum peninsula suggested as an important data on visceral leishmaniasis and reported to public authorities in order to give more importance on control measures of the disease.

In our study, more sensitive results were obtained with buffy coat PCR in comparison with blood PCR and buffy coat DNA samples were suggested in order to perform PCR with 13A-13B primers.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Ak, M., Özbel, Y., Özensoy Töz, S., Turgay, N. (1995). Visseral Leishmaniasis. In: Özcel, M.A. (Ed). "İmmun Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları". İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, s:69-119.
2. Akkafa, F., Taşcı, S. (1999). Şanlıurfa'nın *Phlebotomus* faunası. Türkiye Parazitol Derg, 23: 417-422.
3. Akuffo, H. O. (1992). Non-parasite-specific cytokine responses may influence disease out-come following infection. Immunol Rev, 127: 51- 68.
4. Alexander, B. (2000). Sampling methodes for *Phlebotomus* sand flies. Med. Vet. Entomol. 14: 109-122.
5. Alexander, J., Satoskar, A. R., Russel, D. G., (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci, 112(18): 2993-3002.
6. Almeida, M. A. O., Jesus, E. E. V., SousaAtta, M. L. B., Alves, L. C., Berne, M. E. A., Atta, A. M. (2005). Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, 106; 151- 58.
7. Alptekin, D., Kasap, M., Lüleyap, Ü., Kasap, H., Aksoy, S., Wilson, M. L. (1999). Sand flies Diptera: Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey. J Med Entomol, 36: 277-81.
8. Alten, B., Çağlar, S. (1998). Tatarcıklar, Vektör Ekolojisi ve Mücadelesi. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, s.192-208.
9. Altıntaş, N., Özbel, Y. (1992) *Leishmania infantum* promastigot formlarının üremesi üzerine CO₂'nin etkisi. Türkiye Parazitol Derg, 16(1): 38-42.

10. Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez, S. B., Jimenez, M., et al. (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: Clin Microbiol Rev, 10: 298-319.
11. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. (2004). Canine Leishmaniasis. Advances in Parasitology. 57; 1-88.
12. Andrade, T. M., Carvalho, E. M., Rocha, H. (1990). Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. J Infect Dis, 162: 1354-59.
13. Artemiev, M. M. (1980). A revision of sand flies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, *Phlebotominae*, *Phlebotomus*). Zool. Zhurnal 59: 1177-92.
14. Artemiev, M. M. and Neronov, V. M., (1984), Distribution and Ecology of Sandflies of the Old World (Genus *Phlebotomus*), Institute of Evolution, Morphology and Animal Ecology, USSR, Moscow, p.208.
15. Artemiev, M. M. (1980). A revision of sand flies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, *Phlebotominae*, *Phlebotomus*). Zool. Zhurnal 59: 1177-1192. (in Russian; English translation edited by R. Killick-Kendrick available on request to the senior author.
16. Ashford, RW., (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, 30;1269- 1281
17. Badaro, R., Falcoff, E., Badaro, F. S., et al. (1990). Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. N Engl J Med., 322: 16-21.
18. Barral, A., Guerreiro, J., Bomfim, G., Correia, D., Barral-Netto, M., Carvalho, E. M. (1995). Lymphadenopathy as the first sign of cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg; 53: 256-59.
19. Beaty, B. J., Marquardt, W. C. (1996). The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado, p.117-12

20. Berman, J. (2003). Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 16: 397-401
21. Berman, J. D. (1997). Human leishmaniasis: Clinical, diagnosis and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, 24: 684-703.
22. Bern, R. S. (1986). Note on the history of cutaneous leishmaniasis in the Mediterranean and Middle East area. *Parassitologia* 29(2-3);179-9.
23. Bodgan, C., Röllinghoff, M., Solbach, W. (1990). Invasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today*, 6(6): 183- 87.
24. Bodur, H., Korkmaz, M., Akıncı, E., Çolpan, A., Eren, S. S., Erbay, A. (2003). Visceral Layşmanyoz. *Klimik Dergisi*, 2: 95-7.
25. Bowden, R. A., Cays, M., Gooley, T., Mamelock, R. D., Van Burik, J. A. (1996). Phase I study amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of invasive fungal infections after marrow transplant. *J Infect Dis*, 173: 1208-15.
26. Brewser, S., Aslett, M., Barker, D. C. (1998). Kinetoplast DNA minicircle database. *Parasitology Today*. 14(11): 437-438.
27. Bryceson, A. D. M. (1996). Leishmaniasis. In: Cook G.C. (Ed). "Manson's Tropical Diseases". 20th Ed. WB. Saunders Comp, 1213- 45.
28. Burns, J. M., Shreffler, W. G., Benson, D. R., Ghalib, H. W., et al. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 775-779.
29. Chaniotis, B., Spyridaki, I., Scoulika, E., Antoniou, M. (2000). Colonization of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: *Psychodidae*), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. *J Med Entomol*, 37(3): 346–348

30. Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Akrou Messaidi, F., Zribi, M., Babba, H. (2007). Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite*, 14(3):247-51.
31. Chicarro, C., Morales, M. A., Serra, T., Ares, M., Salas, A., Alvar, J. (2002). Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96; 93-99
32. Christine, F. (1990). Immunological and Biochemical identification of human *Leishmania* strains isolated in Greece.
33. Convit, J., Kerdel-Vegas, J. (1965). Disseminated cutaneous leishmaniasis. *Arch. Dermatol.* 91: 439-47
34. Croft, SL., Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*, 19:502-8
35. Crum, NF., Aronson, N. A., Lederman, E. R., Rusnak, J. M., Cross, J. H. (2005). History of US Military Contributions to the Study of Parasitic Diseases. *Military Medicine*. 170, 4;17.
36. Da Silva, ES., Gontijo, C. M. F., Da Silva Pacheco, V., Pechanha, R. (2002). Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Online Journal Genetics and Molecular Research*. http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol2-3/gmr0082_full_text.htm
37. Daldal, N., Üner, A., Yaşarol, Ş., Karacasu, F., Yurdagül, C. (1989). Ege ve Akdeniz bölgesinde görülen *Phlebotomus* türleri. *T Parazitoloji Derg*, 13(1):71- 84
38. Davies, C. R., Cooper, A. M., Peacock, C., Lane, R. P., Blackwell, J. M. (1990). Expression of LPG and gp63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, 101: 337-343

39. Davies, C. S., Kaye, P., Croft, S. L., Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*, 15; 326(7385); 377-82.
40. Depaquit, J., Leger N, Ferte, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Michaelides, A., Economides, P., (2001). Les Phlebotomes de l'île de Chypre. III. Inventaire Faunistique, *Parasite*, 8 :11-20.
41. Depaquit, J., Leger, N., Ferté, H., Rioux, J. A., Gantier, J. C., Michaelides, A. et Economides, P., (2001). Les Phlébotomes de l'île de Chypre. III. Inventaire Faunistique, *Parasite*, 8 :11-25
42. Desjeux, P., (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95; 239-43.
43. Desjeux, P., UNAIDS, (1998). *Leishmania* and HIV in Gridlock: WHO/CTD/LEISH/98.9 Add. 1 UNAIDS/98.23: 5-27.
44. Despommier, D. D. (2000). Introduction to the *Leishmania*, *Parasitic Diseases*, 4. Baskı. Apple Trees Corporation LLC, p.13-30
45. Doğan, F. (1981). *Leishmania* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, *Leishmania*'ların rezervuar ve vektörleri. Yaşarol Ş Ed. *Leishmaniasis*, T Parazitoloji Der Yay No:2, 25-50.
46. Doncker, S., Huste, V., Abdellati, S., Rijal, S., et al. (2005). A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 25-31.
47. Dujardin, J. P., Le Pont, F., Martinez, E. (1999). Quantitative phenetics and taxonomy of some *Phlebotominae* taxa. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(6); 735-41.

48. El-Safi, S. H., Peters, W., El-Toam, B., El-Kadarow, A., Evans, D. A. (1991). Studies on the leishmaniasis in the Sudan: Clinical and parasitological studies on cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85: 457- 64.
49. Eltoun, I. A., Zijlstra, E. E., Ali, M. S., et al. (1992). Congenital Kala-azar and leishmaniasis in placenta. *Am J Trop Med Hyg*, 46:57-62.
50. Ertabaklar, H., Ozensoy Toz, S., Taylan, Ozkan, A., Rastgeldi, S., Balcioglu, I. C., Ozbel, Y. (2005). Serological and Entomological Survey in a Zoonotic Visceral Leishmaniasis Focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum Province. *Acta Tropica*, 93(3): 239-246.
51. Ertabaklar, H., Özkan, T. A., Özensoy, S., Özbel, Y., et al. (2003). Çorum’da Çocuklarda Visseral Leishmaniasis İncelenmesi. *Türkiye Parazitol Derg*, 2003: 27(4): 233-6
52. Fissore, C., Delaunay, P., Ferrua, B., Rosenthal, E., et al. (2004). Convenience of Serum for Visceral Leishmaniasis Diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol*, 42: 5332-3
53. Gaeta, G. B., Gradoni, L., Gramiccia, M., Di Martino, L., et al. (1994). VL in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recent Prog Med*, 85(6): 340-7.
54. Garces, J. M., Tomas, S., Rubies-Prat, J., Gimeno, J. L., Drobnic, L. (1990). Bacterial infections as a presenting manifestation of visceral leishmaniasis. *Rev Infect Dis*, 12: 518-19.
55. Gomes, A. H. S., Ferreira, I. M. R., Lima, M. L. S. R., Cunha, E. A., et al. (2007). PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 144 (2007) 234–241.

56. Gradoni, L. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceeding of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum*, 7.
57. Gradoni, L. (2000). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol*, 100: 87–103
58. Gramiccia, M., Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35;1169- 80.
59. Gramiccia, M., Gradoni, L. (2007). The leishmaniasis of Southern Europe. In: *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*, Takken W and Knols B. G. J. (eds). Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, p.75-95.
60. Groggl, M., Thomason, T. N., Franke, E. D. (1992). Drug resistance in VL: its implication in systematic chemotherapy of CL and MCL. *Am J Trop Med Hyg*, 47:117-26.
61. Guderian, R. H., Chico, M. E., Rogers, M. D., Pattishall, K. M., Groggl, M., Berman, J. D. (1991). Placebo controlled treatment of Ecuadorian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 45: 92-7.
62. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., et al. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2(8): 494-501
63. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Wasunna, M. K., Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a (Nur) proposed research and development agenda. *The Lancet Infect Dis*, 2: 494-501.

64. Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(2): 229-43.
65. Handman, E. (2007). Walter and Elisa Hall Institute, Infection and Immunity Laboratory. www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.html, Erişim: 09 Ocak 2008.
66. Haouas, N., Chargui, N., Chaker, E., Ben Said, M., et al. (2005). Anthroponic cutaneous leishmaniasis in Tunisia: Presence of *Leishmania killicki* outside its original focus of Tataouine. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99: 499- 501
67. Hashim, F. A., Ahmed, A. E., El-Hassan, M., El-Mubarrak, M. H., et al. (1995). Neurological changes in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 52(2): 149-54.
68. Hashim, F. A., Ali, M. S., Satti, M., El-Hassan, A. M., et al. (1994). An outbreak of acute Kala-azar in a nomadic tribe in western Sudan: features of the disease in a previously non-immune population. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 88: 431-432.
69. Hepburn, N. C., Omer, A. H. S. (1999). Old world cutaneous leishmaniasis: pathology, clinical feautres, differential diagnosis, and therapy. In Gilles HM. *Protozoal Diseases* 10th. Ed., London, Oxford University Pres, 471-80.
70. Hepburn, N. C. (2000). Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol*, 25: 363-70.
71. Hepburn, N. C. (2003). Cutaneous leishmaniasis. An overview. *J Postgrad Med*, 49:50-54.
72. Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191-99
73. Hohlhorn, E. (1992). *Parasitology in Focus*, Springer-Verlag Pub.
74. Humber, D. P. Introduction to Leishmaniasis. <http://hompages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/intro.htm>.

75. Ibrahim, M. E. (2002). The epidemiology of visceral leishmaniasis in East Africa: hints and molecular revelation, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96, Supp 1; 25-29.
76. Jacobson, R. L. (2003). *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) perplexing parasite. *Folia Parasitologica*.50:241-250
77. Jha, T. K., Olliaro, P., Yhakur, C. P. N., Kanyok, T. P., et al. (1998). Randomised controlled trial of aminosidine versus sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *BMJ*, 316:1200-05
78. Jopling, W. H. (1955). Long incubation period in Kala-azar. *Br Med J*. 2(4946): 1013.
79. Kager, P. A. (1999). Section 6: Visceral Leishmaniasis. In: Gilles HM. *Protozoal Diseases 10th.*, London, Oxford University Pres, 455-462
80. Kettle, D. S. (1995). *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd Ed. CAB International, London.
81. Kılıç, S. S. (2002). Visseral Leishmaniasis ve Diğer Leshmania İnfeksiyonları. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Editörler: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s.685-96
82. Killick-Kendrick, R., Tang, Y., Killick-Kendrick, M., Sang, D. K., et al. (1991). The identification of female sand flies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts. *Parassitologia*, 33(Suppl. 1): 335-347
83. Killick-Kendrick, R., Tang, Y., Killick-Kendrick, M., Sang, D. K., Sirdar, M. K., Ke, L., Ashford, R. W., Schorscher, J., Johnson, R. H., (1991). The identification of female sand flies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts. *Parassitologia* 33(Suppl. 1): 335-347

84. Killick-Kendrick, R., Wallbanks, K. R., Molyneux, D. H., Lavin, D. R. (1988). The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis *Phlebotomus papatasi*. Parasitol. Res. 1988, 74: 586-590
85. Killik-Kendrick R. (1999). The biology and control of *Phlebotominae* sand flies. Clin Dermatol, 17; 279-89
86. Kkalid, F. A., Abdalla, N. M., Mohomed, H. E., Toum, A. M., Magzoub, M. M. A., Ali, M. S. (2004). Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with some Local Sudanese Plants. Türkiye Parazitol Derg, 28(3): 129-32
87. Koltaş, I. S., Demirkazık, M., Kocaçiftçi, I., Aktaş, H., Alptekin, D., Özerdem, D., Eroğlu, F., Elgün, G. (2006). Çukurova Bölgesinde Kutanoz Leyişmanyoz Epidemiyolojisi. 3. Ulusal Tropikal Hastalıklar Kongresi, 6-9 Kasım 2006. Özet kitabı, s.17.
88. Kozevkinov, P. V. (1963). Two nosological forms of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 12: 719-24.
89. Kuman, H. A. (2002). *Leishmania* Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Editörler. Editörler. Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 2: 1870-78
90. Kuman, H. A., Altıntaş, N. (1996). "Protozoon Hastalıkları". İzmir, Ege Ün. Basımevi., s.79-100.
91. Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., et al. (2001). Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. J Clin Microbiol, 39 (2):613-17

92. Laguna, F., Samaniego, J. G., Soriano, V., Valencia, E., et al. (1994). Gastrointestinal leishmaniasis in HIV infected patients report of five cases and review. *Clin Infect Dis*, 19: 48-53.
93. Lainson, R., Shaw, J. J., Silveira, F. T. (1987). Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(4):702-3.
94. Lane, R. P., 1986, Recent Advances In the Systematics of Phlebotomine Sandflies, *Insect. Sci. Appl.*, 7(2): 225-230
95. Leandro, C., Campino, L. (2003). Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int Antimicrob Agents*, 22(3): 352-7
96. Lesho, E. P., Wortman, G., Neafie, R. C., Aronson, N. E. (2004). Cutaneous Leishmaniasis: Battling The Baghdad Boil. *Federal Practitioner*.59-67.
97. Lewis, D. J. (1971). Phlebotomid sandflies. *Bull Org Mond Sante*, 44: 535- 51.
98. Lewis, D. J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). *Bull Br Mus Nat Hist (Ent)*, 45(2):121-209.
99. Lewis, D. J., (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera, Psychodidae). *Bull Br Mus Nat Hist (Ent)*, 45(2):121-209.
100. Llanos-Cuentas, E. A., Marsden, P. D., Lago, E. L., Barreto, A. C., Cuba, C. C., Johnson, W. D. (1984). Human mucocutaneous leishmaniasis in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*; 17: 169-77.
101. Magill, A. J., Grogl, M., Gasser, R. A. Jr, Sun, W., Oster, C. N. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in a veterans of Operation Desert Storm who presented 2 years after leaving Saudi Arabia (letter). *N Engl J Med*, 328: 1383-7.
102. Maia, C., Ramada, J., Cristo, JM., Goncalves, L., Campino, L. (2007). Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and Diagnosis of canine leishmaniasis:

- Conventional and molecular techniques using different tissues. The Veterinary Journal (article in press). doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.009.
103. Maroli, M. (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution. Proceeding of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, s.81.
 104. Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M. (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Vet Parasitol. 30: 145(3-4): 357-60
 105. Marsden, P. D. (1986). Mucocutaneous Leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 80: 859-76.
 106. Marsden, P. D., Johnson, W. D. (1992). *Leishmania*. In: Gorbach S.L., Bartlett J.G. and Blocklow N.R. (Eds). "Infectious Disease". W.B.Saunders Comp., 1978-84.
 107. Mathis, A., Deplazes, P., (1995). PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. J Clin Microbiol, 33(5): 1145-1149
 108. Minodiera, P., Retornazb, K., Horelta, A., Garnierb, J. M. (2003). Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients Fundamental, Clinical Pharmacology, 17;183-188
 109. Mishra, M., Biswas, U. K., Jha, A. M., Khan, A. B. (1994). Amphotericin versus sodium stibogluconate in first line treatment of India Kala-azar. Lancet, 10, 344(8937):1599-600
 110. Molina, R., Amela, G., Nieto, J., San-Andres, M., et al. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88, 491–493.

111. Montalban, C., Calleja, J. L., Erice, A., et al (1990). Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. Co-operative Group for the study of leishmaniasis in AIDS. *J Infect*, 21: 261- 70.
112. Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*.18(9); 399- 405.
113. Moreno-Camacho, A., Lopez-Velez, R., Munoz Sanz, A., Labarga-Echevarria, P. (1998). Intestinal parasitic infections and leishmaniasis in patients with HIV infection. *Enferm. Infect Microbiol Clin*, 16 (Suppl 1): 52-60.
114. Munro, D. D., Vivier, A., Jopling, W. H. (1972). Post Kala-azar dermal leishmaniasis. *Br J Dermatol*, 87: 374-78
115. Murray, HW., Berman, J. D., Davies, C. R., Saravia, N. G. (2005). Advances in Leishmaniasis. *Lancet*, 366:1561-77
116. Murray, HW. (2001). Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2185-2197
117. Musa, S. A. (1986). Studies on *Phlebotomine* sandflies in relation to cutaneous leishmaniasis in active focus of visceral leishmaniasis. University of Khartoum, Sudan, Ph.D. Thesis,
118. Nadim, A., Faghieh, M. (1968). The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in the Isfahan province of Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 61:534- 49.
119. Navin, T. R. (1988). Leishmaniasis. In: Balows A., Hauster W.J., Ohashi M. and Turano A. (Eds).“Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice.” Springer-Verlag Comp., I: 904-10.
120. Ok, Ü. Z., Balcioğlu, I. C., Özkan, A. T., Özensoy, S., Özbel, Y. (2002). Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica*, 84:43-8

121. Ok, Ü. Z. (1999). *Leishmania* HIV/AIDS. 4. AIDS Kongresi (8-10. Nisan) Kongre Kitabı. Kuşadası, 1999, 156-62.
122. Orlando, G., Sorbo, F. D., Corbellino, M., Schiavini, M., Cargnel, A. (1998). Secondary prophylaxis for *Leishmania* infection in an HIV-pozitive patient AIDS. 12:2086-87.
123. Osman, O. F. (1998). VL: The PCR and DAT for diagnosis and management. Royal Tropical Institute, Amsterdam, Ph.D. Thesis, , 49-56
124. Öner, Y. A., Sahip, N., Keskin, C., Palandüz, A. (2003). Bir Visseral Leishmaniasis Olgusu. Türkiye Parazitol Derg: 27(3): 176-78
125. Özbel, Y. (1993). İzmir ve civarındaki *Phlebotomus* sp'lerde ELISA ve izoenzim elektroforezi kullanılarak *Leishmania* promastigotlarının saptanması. Doktora Tezi, Ege Ü. Tıp Fak. Parazitoloji AD. Bornova İzmir.
126. Özbel, Y., Oskam, L., Özensoy, S., Turgay, N., Alkan, M. Z., Jaffe, C. L., Özcel, M. A. (2000). Epidemiology of canine leishmaniasis in western Turkey: comparison of serological, molecular biological and parasitological procedures. Acta Tropica 74(1):1-6.
127. Özbel, Y., Turgay, N., Özensoy, S., Özbilgin, A., et al. (1995). Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediteranean region. Ann Trop Med Parasitol, 89; Suppl 1:89- 93.
128. Özbel, Y., Özensoy Töz, S. (2007). Leishmaniasis. Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği yayınları No: 22, META Basım, İzmir, s.197-241.

129. Özdener, N., Kayar, B., Köksal, F., Akbaba, M. (2005). *Leishmania* Sempozyumu Kursu Değerlendirme ve Öneri Formuna Verilen Yanıtlar. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet kitabı, 167-68.
130. Özensoy, S., Korkmaz, M., Balcıoğlu, I. C., Özbel, Y., Ertabaklar, H., Rastgeldi, S. (2002). Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis. Türkiye Parazitol Derg, 26(3):234-38.
131. Özensoy, S., Özbel, Y., Turgay, N., Alkan, M. Z., Gül, K., Gilman-Sachs, A., Chang, K. P., Reed, S. G., Ozcel, M. A. (1998). Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. Am J Trop Med Hyg, 59(3): 363-369.
132. Özensoy Töz, S., Özbel, Y., Gül, M. A., Ertabaklar, H., et al. (2002). İnsan ve Köpeklerden Alınan Klinik Örneklerle Leishmaniasis Tanısı İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulanması. Türkiye Parazitol Derg, 26(3):239-44.
133. Palatnik-de-Sousa, C. B., dos Santos, W. R., Franca Silva, J. C., Dacosta, R. T., et al. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg, 65, 510–517.
134. Paredes, R., Munoz, I., Diaz, I., Domingo, P., Gurgui, M., Clotet, B. (2003). Leishmaniasis in HIV infection. J Postgrad Med, 49:39-49.
135. Pearson, R. D., Sousa, A. D. Q., Jeromino, S. M. B. (2000). *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Eds: Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth Ed, Philadelphia: Churchill Livingstone:2831-44.)
136. Perello-Roso, A., Lopez-Aldeguer, J., Garcia-Gasco, P., Blanes, M. (1996). Polyarthritıs caused by *Leishmania* in a patient with AIDS. Clin Infect Dis, 22: 1113-4.

137. Pineda, J.A., Gallardo, J.A., Macias, J., et al. (1998). Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients in southern Spain. *J Clin Microbiol*, 36: 2419-22.
138. Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenburg, J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immunol.* 62, 229–235.
139. Polat, E., Aygün, G., Aslan, M., Aksın, E. D., Yıldırım, A., Altaş, K. (2003). Bir Visseral Leishmaniasis Olgusu. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27(1):4-5.
140. Polat, E., Çakan, H., Aslan, M., Yakar, H. (2005). Viseral Leishmaniasis Şüpheli 26 Vaka. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 168.
141. Polat, E. (2003). Visseral Leishmaniasis Tanısı. XIII.Ulusal Parazitoloji Kongresi.Özet Kitabı, 105.
142. Puig, L., Pradinaud, R. (2003). *Leishmania* and HIV co-infection: Dermatological Manifestation. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(1);107- 14.
143. Reale, S., Maxia, L., Vitale, F., Glorioso, N. S., Caracappa, S., Vesco, G. (1999). Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *J Clin Microbiol*, 37(9): 2931-2935.
144. Riberio, J. M. C. (1989). Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol*, 69:104-106
145. Rosenthal, E., Marty, P. (2003). Recent understanding in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Postgrad Med*, 49; 61-68
146. Ryan, J. R., Smithyman, A. M., Rajasekariah, G. H., Hochberg, L., et al. (2002). ELISA based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and

- IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40(3);1037-43
147. Sacks, D. L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, 69:100-3.
148. Sacks, D. L., Perkins, P. V. (1985). Developmental of infective stage *Leishmania* promastigotes within *Phlebotomine* sandflies. *Am J Trop Med Hyg*, 34(3): 456-459.
149. Sadlova, J. (1999). The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soc Zool Bohem*. 63;331-366.
150. Schallig, H. D. F. H., Schone, G. J., Koron, C. C. M., Hailu, A., Veeken, C. F. (2001). Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol*:190:69-1.
151. Schlein, Y., Warburg, A., Schnur, L. F., Gunders, A. E. (1982). Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area, *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 76(5); 582-600.
152. Schnur, L. F., Chance, M. L., Ebert, F., Thomas, S. C., Peters, W. (1981). The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, 75(2): 131- 44
153. Seaman, J., Mercer, A. J., Sondorp, H. E., Herwaldt, B. L. (1996). Epidemic visceral leishmaniasis in Southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med*, 124: 664-72.
154. Semião-Santos, S. J., Harith, A. E., Ferreria, E., Pires, C. A., Sousa, C., Gusmão, R. (1995). Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res*, 81: 235-239

155. Singh, S., Sivakumar, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med, 49;55-60
156. Singh, S., Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemoter, 10; 307-15
157. Singh, S. (2006). New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian J Med Res 123; 311-30
158. Slappendel, R. J. (1988) (Abstract). Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. Tijdsch Diergen, 113: 3-18.
159. Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. (2001). Prevalance of *Leishmania infantum* infection in dogs living in az area of Canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol, 39(2); 560- 563
160. Sousa, A de Q., Parise, M. E., Pompeu, M. M., et al. (1995). Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. Am J Trop Med Hyg, 53:380- 85.
161. Stone, H. H., Toll, C. D., Pugsley, W. S. (1952). Kala-azar (Visceral Leishmaniasis): Report of a case with 34 month incubation period and positive Doan-Wright test. Ann Intern Med, 36: 686- 93.
162. Strauss-Ayali, D., Baneth, G., (2001). Canine Visceral Leishmaniasis. International Veterinary Information Service. Ithaca, NY (www.ivis.org)).
163. Sundar, S., Rai, M. (2002). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 951-958
164. Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med Health, 6(11); 849-54.

165. Sundar, S., Reed, S.G., Singh, V.P., Kumar, P.C., Murray, H.W. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*. 351(9102);563-565
166. Tait, A., Sacks, D. L. (1988). The cell biology of parasite invasion and survival. *Parasitol. Today*, 4: 228-33.
167. Taylan, A., Babur, C., Kılıç, S., Ögeve, C., Özensoy Töz, S. (2003). Sakarya Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis'in İndirekt Fluoresan Antikor (IFAT) Yöntemi ile Araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27(2):97- 101.
168. Tesh, R. B. (1995). Control of ZVL: Is it time to change strategies. *Am J Trop Med Hyg*, 52(3):287-92.
169. Thakur, C. P., Sinha, G. P., Pandey, A. K., Barat, D., Sinha, P. K. (1993). Amphotericin B in resistant Kala-azar in Bihar. *Natl Med J India*, 6: 57-60.
170. Titus, R. G., Riberio, J. M. C. (1990). The rol of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today*, 6(5):167-160
171. Tok, H. (2008). Çanakkale İli Ayvacık Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasisin Serolojik ve Entomolojik Olarak Araştırılması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü. Yüksek Lisans Tezi.
172. Tosun, C., Handemir, E., Çam, Y., Öztapak, K., Keskin, O., Kırmızı, E. (2001). Bir Köpekte Visseral Leishmaniasis Olgusu ve Amphotericin-B ile Tedavisi. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 25(2): 115- 122.
173. Unat, E. K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M. (1991). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Yay, İstanbul, 570- 9
174. Van Den Enden, E. (2002). Leishmaniasis. http://www.itg.be/itg/Distancelearning/LectureNotesVandenEndenE/Teksten/sylabus/05_Leishmaniasis.doc

175. Vidyashankar, C., Agrawal, R. (2002). Leishmaniasis.
<http://users.ugent.be/aviester/principles/pcr.html>
176. Volf, P., Özbek, Y., Akkafa, F., Svobodová, M., Votýpka, J., Chang, K. P. (2002). Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey. Relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of Anthroponotic cutaneous leishmaniasis. J Med Entomol, 39(1): 12-15
177. Vouldoukis, I., Dugas, B., Rougier, S., Pino, P., Mazier, D., Woehrle, F. (2006). Canin visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Veterinary Parasitology. 135;137-146.
178. Voyvoda, H., Paşa, S., Özensoy Töz, S., Özbek, Y., Ertabaklar, H. (2004). Aydın’ın bazı ilçe ve köyleriyle İzmir’in Selçuk ilçesindeki köpeklerde leishmaniasis ve dilofilariasisin prevalansı. Turk J Vet Ani Sci, 28: 1105- 11.
179. Walton, B. C. (1987). American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In: Peters W. & Killick Kendrick R. (Eds). “The Leishmaniasis in Biology and Medicine”. Orlando: Academic Press, Vol 2: p.638-61.
180. WHO. (1994), “Report on consultative meeting on HIV/ *Leishmania* co-infections”, cosponsored by the Istituto Superiore di Sanita and the World Health Organization, Rome, 95.35.
181. WHO “Report of a WHO expert committee” (1990). Control of the Leishmaniasis, 793.
182. WHO Report, (1988). Phlebotomine sandflies. WHO/VBC/71.255.
183. WHO Technical Report (1984). "Leishmaniasis", Report No:701.
184. WHO web sayfası, www.who.int, 2007

185. Whopes. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of longlasting insecticidal mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP.
186. Zijlstra, E. E., El-Hassan, A. M., Ismael, A., Ghalib, H. W. (1994). Endemic Kala-azar in Eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg, 51: 826-36
187. Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M., El Hassan, A. M. (2003). Post Kala-azar dermal leishmaniasis. The Lancet Infect Dis. 3: 87-98
188. Zijlstra, E. E., Nur, Y., Desjeux, P., Khalil, E. A., El-hasan, A. M., Groen, J. (2001). Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. Trop Med Int Health, 6(2):108-13.
189. Zucca, M., Millesimo, M., Giovarelli, M., Diverio, D., et al. (1996). Protective role of the pefloxacin IFN- association in *Leishmania major* infected mice. Microbiologica, 19: 39-46.

ÖZGEÇMİŞ

23.09.1964'de İran'ın Urumiye şehrinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi bu şehirde tamamladıktan sonra 1994 yılında Türkiye'ye gelerek Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitimime başladım. 2000 yılında mezun oldum. 2003 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime başladım.

Halen aynı Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimime devam etmekteyim. Evli ve bir erkek çocuk babasıyım.