

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**VİSSERAL LEİSHMANİASİS EPİDEMİYOLOJİSİNİN  
KÖPEKLERDE REAL TIME-PCR YÖNTEMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**ŞAFAK BAYIRLIOĞLU**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. Y. ALİ ÖNER**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2011**

**TEZ ONAYI****TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Şafak Bayırlıoğlu tarafından hazırlanan "Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Köpeklerde Real Time-PCR Yöntemi İle Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

28 / 01 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof Dr Bülent Gürler	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
2.Prof Dr Y.Ali Öner (Danışmanı)	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
3.Prof Dr Emel Bozkaya	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
4.Prof Dr Zayre Erturan	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
5.Prof Dr Ömer Küçükbasmacı	İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 

**BEYAN**

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

**ŞAFAK BAYIRLIOĞLU**

## **İTHAF**

*Aileme ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı' nda yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilgi ve sabırla bana her konuda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Y. Ali Öner' e teşekkür ederim.

Yüksek lisans süresi boyunca yardımlarını aldığım Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Bülent Gürler' e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Prof. Dr. Nezahat Gürler, Prof. Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Prof. Dr. Betigül Öngen, Prof. Dr. M. Derya Aydın, Dr. Selim Badur, Prof. Dr. Emel Bozkaya, Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Prof. Dr. Gülden Yılmaz, Prof. Dr. Salih Türkoğlu, Prof. Dr. Ali Ağaçfidan, Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Prof. Dr. Meltem Uzun, Prof. Dr. Zayre Erturan, Prof. Dr. Mine Anğ Küçüker, Prof. Dr. Şengül Derbentli, Doç. Dr. Özden Boral' a teşekkür ederim.

Dr. Hayriye Kırkoyun Uysal, Bil. Uz. Kevser Karaman, Bil. Uz. Sezer Sepetçioğlu ve Laborant Selvi Erçikti' ya çalışmalarım sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim. Yüksek lisans boyunca yanımda olan tüm Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğrencileri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında yardımlarını aldığım Vet.Hek. Ülken Tunga Babaoğlu' na teşekkür ederim.

Tez projem için gerekli olan örneklerin alınması sürecinde bana yardımcı olan İstanbul Büyükşehir Belediyesi Veteriner İşleri Müdürü Hasan Gençdal ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 6832

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN .....	iii
İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Sınıflandırma .....	5
2. 2. Tarihçe .....	6
2. 3. Morfoloji .....	8
2.4. Yaşam Döngüsü.....	10
2.5. Vektör .....	12
2.6. Rezervuarlar .....	14
2.6.1. Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL) .....	15
2.6.2. Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis (AKL) .....	15
2.6.3. Zoonotik visseral leishmaniasis (ZVL).....	15
2.6.4. Antroponotik Visseral Leishmaniasis (AVL).....	16
2.7. Epidemiyoloji .....	18
2.9. Tanı .....	23
2.9.1. Klinik Tanı.....	23
2.9.2. Etkensel Tanı .....	23
2.9.2.1. Mikroskopik Tanı .....	24
2.9.2.2. Hücre Kültürü .....	25
2.9.2.3. Mikrokültür.....	25
2.9.2.4. Deney Hayvanları.....	25

2.9.3. Moleküler Tanı .....	26
2.9.3.1. Parazit DNA'sının Gösterilmesi .....	26
2.9.4. Serolojik Tanı Yöntemleri .....	26
2.9.4.1. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) .....	27
2.9.4.2. Direkt Aglütinasyon Testi (DAT) .....	27
2.9.4.3. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	27
2.9.4.4. Western Blot (WB) Yöntemi .....	28
2.9.4.5. Leishmanin Deri Testi (Montenegro) .....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	29
3.1. Köpeklerden Kan Örneği Alınması .....	29
3.2. Klinik Örneklerden DNA Ekstraksiyonu .....	29
3.2.1. Kit İçeriği .....	29
3.2.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar .....	30
3.2.3. Testin Prensipleri .....	30
3.3. Örneklerin Toplanması ve Saklanması .....	31
3.3.1. DNA Ekstraksiyonu Prosedürü .....	31
3.4. Real Time PCR Uygulaması .....	32
3.4.1. Kit İçeriği .....	32
3.4.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	33
3.4.3. Real Time PCR Çalışma Prensipleri .....	33
3.4.4. Pozitif Kontrol .....	35
3.4.5. Negatif Kontrol .....	35
3.4.6. İnternal DNA Ekstraksiyon Kontrolü .....	36
3.4.7. Patojen Belirleme Karışımının Hazırlanması .....	36
3.4.8. Standart Eğri Seyreltme Serilerinin Hazırlanması .....	36
3.4.9. Amplifikasyon Protokolü .....	37
3.5. Negatif Örneklerin Değerlendirilmesi .....	37
3.6. Pozitif Örneklerin Değerlendirilmesi .....	38
4. BULGULAR .....	39
5. TARTIŞMA .....	44
KAYNAKLAR .....	48
ETİK KURUL KARARI .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	57

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 2-1: Leishmania cinsinin sınıflandırması .....	5
Tablo 3-1: Qiagen Rotor-Gene Q cihazında kullanılabilen kanallar .....	35
Tablo 3-2: Patojen Belirleme Karışımı.....	36
Tablo 3-3: Standart Eğrinin Hazırlanması.....	37
Tablo 3-4: Amplifikasyon Protokolü .....	37
Tablo 4-1: Köpeklerden Alınan Örnekler.....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Leishmania</i> parazitinin iki formu. ....	9
Şekil 2-2: Parazitin Yaşam Döngüsü.....	12
Şekil 2-3: <i>Phlebotomus</i> spp. ....	13
Şekil 2-4: Eski ve Yeni Dünya’ da Visseral Leishmaniasis’ in coğrafi dağılımı .....	18
Şekil 2-5: Kutanöz ve Mukokutanöz Leishmaniasis’ in Yeni Dünya’ da coğrafi dağılımı .....	19
Şekil 2-6: <i>L. tropica</i> ile bağlantılı türler ve <i>L. aethiopica</i> ’ ya göre Eski Dünya’ da Kutanöz Lesihmaniasis’ in coğrafi dağılımı.....	19
Şekil 2-7: <i>L. major</i> ’ e göre Eski Dünyada Kutanöz Leishmaniasisin coğrafi dağılımı .	20
Şekil 2-8: Türkiye’ de KL ve VL’ in görüldüğü iller( Özbel Y., orjinal).....	22
Şekil 3-1: Qiagen Dneasy Blood&Tissue Kiti.....	30
Şekil 3-2: Qiagen Rotor Gene Q Real Time PCR Cihazı.....	32
Şekil 3-3: PrimerDesign <i>Leishmania infantum</i> patojen belirleme karışımı reaktifleri. .	33
Şekil 3-4: Pozitif Kontrol Kalıbı. ....	33
Şekil 3-5: Qiagen Rotor-Gene Q Optik sisteminin Gösterimi. ....	34
Şekil 4-1: Real Time PCR Sonuçları pozitif olan örneklerin grafikleri .....	43

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

**AIDS:** Acquired Immune Deficiency Syndrome

**AKL:** Antroponotik kutanöz leishmaniasis

**DAT:** Direkt Aglütinasyon Testi

**DKL:** Diffüz (yaygın) kutanöz Leishmaniasis

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**ELISA:** Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**EF:** Excreted factor

**FL:** Feline Leishmaniasis

**FSS:** Fetal Sığır Serum

**GPI:** Glucose-6-phosphate isomerase

**HIV:** human immunodeficiency virus

**IFAT:** İndirekt Floresan Antikor Testi

**IHA:** İndirekt Hemaglütinasyon

**KanL:** Kanin Leishmaniasis

**kDa:** Kilodalton

**kDNA:** Kinetoplastik DNA

**KL:** Kutanöz leishmaniasis

**LPG:** Lipofosfolikanlar

**MKL:** Mukokutanöz Leishmaniasis

**NNN besiyeri:** Novy- MacNeal Nicolle besiyeri

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PKDL:** Post Kala Azar dermal leishmaniasis

**RES:** Retikuloendotelial sistem

**ssrRNA:** Small subunit ribosomal RNA

**VL:** Visseral leishmaniasis

**WB:** Western Blot

**ZKL:** Zoonotik kutanöz Leishmaniasis

**ZVL:** Zoonotik visseral leishmaniasis

**µl:** Mikrolitre

**µm:** Mikrometre

## ÖZET

Bayırlıoğlu, Ş. (2011). Visseral Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Köpeklerde Real Time PCR Yöntemi İle Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) belirlediği zoonozlar arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilmektedir. Leishmaniasisde klinik olarak 3 farklı tablo ortaya çıkmaktadır: Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL), Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL). Daha sonraları, Diffüz (yaygın) kutanöz Leishmaniasis (DKL) ve Post Kala Azar dermal leishmaniasis (PKDL) de bu gruplara eklenmiştir. Dünyada yaklaşık her yıl 500.000 yeni insan olgusunun eklendiği visseral leishmaniasis (VL) tropikal ve subtropikal bölgelerde endemik olarak görülmektedir. Türkiye'de özellikle Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde endemik, diğer bölgelerinde sporadik olarak insan visseral leishmaniasis (VL) olguları gözlenmektedir. Hastalığın Akdeniz ülkelerinde prevalansı %1-37 arasında değişmektedir. Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre yıllık ortalama 40 yeni VL vakası bildirilmektedir. Köpeklerdeki leishmaniasis infeksiyonu ile insanlardaki hastalık arasında ilişki olduğu saptanmış ve köpeklerin *Leishmania infantum* için rezervuar oldukları kanıtlanmıştır. Ülkemizde genelde endemik özellik gösteren leishmaniasisin rezervuarı olan köpeklerdeki epidemiyolojisinin belirlenmesi ve kontrol altına alınması insanların bu zoonozdan etkilenmemesi için gereklidir. Bu çalışmada İstanbul Büyükşehir Belediyesine bağlı iki sokak hayvanları rehabilitasyon ve tedavi merkezindeki 93 köpekten kan alınarak paraziti taşıyıp taşımadıkları Real Time PCR yöntemi ile araştırılmış ve beş köpekte (%5,4) pozitif *Leishmania infantum* DNA'sı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Leishmania infantum*, Visseral Leishmaniasis, Köpek, Real Time PCR, İstanbul.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 6832

## ABSTRACT

Bayırlioğlu, Ő. (2011). Research of Visceral Leishmaniasis Epidemiology in Dogs by Real Time-PCR Assay. Istanbul University, Institute of Health Science, Microbiology and Clinical Microbiology. Master of Science Thesis. Istanbul.

World Health Organization (WHO) has determined that Leishmaniasis is considered one of the most important zoonotic diseases. Leishmaniasis consists of three main clinical syndromes: cutaneous leishmaniasis (CL), visceral leishmaniasis (VL; also known as kala-azar), muco-cutaneous leishmaniasis (MCL). Later post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) and diffuse cutaneous leishmaniasis added to these clinical syndromes. Each year, 500,000 new cases of visceral leishmaniasis are reported worldwide. Visceral leishmaniasis is endemic along the tropical and subtropical regions in the world while in Turkey VL is endemic along the Aegean and Mediterranean coasts, it occurs sporadically in other regions. In epidemic mediterranean countries, prevalence is changing between 1-37% percentages. In our country, according to data from the Ministry of Health annually average 40 new cases of VL have been reported. A relationship between canine leishmaniasis (CanL) and human visceral leishmaniasis has been detected and dogs have been found to be the reservoir of *Leishmania infantum*. Clinical symptoms of the disease and zoonotic characteristics makes CanL is a serious public health and veterinary problem. In our country, Leishmaniasis usually shows endemic properties therefore determination and control of epidemiology of the reservoirs is necessary. In this research, bloods from 93 dogs in two rehabilitation and treatment centers of Istanbul Metropolitan Municipality examined that whether they carry parasites or not with the Real Time PCR assay and five dogs (5.4%) had a positive *L. infantum* DNA.

**Key Words:** *Leishmania infantum*, Visseral Leishmaniasis, Canine, Real Time PCR, Istanbul.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 6832

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen bir parazit enfeksiyonudur. Bundan 60 yıl önce sadece belirli bölgelere sınırlı olduğu düşünülürken, günümüzde Avustralya ve Antarktika hariç bütün kıtalarda bilinen bir hastalıktır (85). 88 ülkede 12 milyon insanı etkilemekte ve yaklaşık 350 milyon insanı tehdit etmektedir. Yılda 1,5 milyon yeni kutanöz leishmaniasis, 500 bin visseral leishmaniasis olgusu kayıtlara geçmektedir. Bu enfeksiyona bağlı yaklaşık yıllık ölüm sayısının 57.000 civarında olduğu bildirilmektedir (11).

Leishmaniasis, memelilerin zorunlu hücre içi parazitleri olan *Leishmania* cinsi protozoonların retikuloendotelial sistem (RES) organlarına yerleşerek meydana getirdiği hastalık grubudur (38).

Etken, infekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri tarafından kan emme işlemi sırasında bulaştırılmaktadır.

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 olabileceği gösterilmiştir (44). Kedilerde görülebilen hastalığa ise “Feline Leishmaniasis” (FL) adı verilmektedir.

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 (53, 86). VL kliniğinin ana bulguları splenomegali, sürekli veya düzensiz ateş, hepatomegali ve pansitopenidir. Çocuklarda daha sık görülmesi nedeniyle çocuk sağlığı açısından da büyük önem taşıyan VL, tedavi edilmediğinde yüksek ölüm oranına sahiptir. Yurdumuzda İzmir, Aydın, Denizli, Manisa, Muğla gibi kıyı illerinin yanı sıra Bilecik, Karabük, Kars, Tokat, Kastamonu ve İstanbul gibi farklı coğrafi bölgelerde bulunan illerde de visseral leishmaniasis bildirimlerinin olması bu hastalığın subtropikal iklimde yer alan ülkemizin her bölgesinde görülebileceğini düşündürmektedir (25).

VL, sosyoekonomik düzeyi düşük, kötü hijyen şartlarında yaşayan bireylerde daha sık görülmektedir. Beslenme bozuklukları, vücut direncinin düşmesi de infeksiyonun ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (25). Ülkemizde Sağlık Bakanlığı verilerine göre yıllık ortalama 40 yeni VL vakası bildirilmektedir (50).

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 mikroskopik tanı 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 Fluoresan Antikor Testi), DAT (Direkt Aglütinasyon Testi) ve rK39 hızlı tanı testi kullanılmaktadır. Nükleik aside dayalı Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemleri de tanıda hızlı ve güvenilir olması nedeniyle laboratuvar tanısında yer almaktadır (63, 68).

KL ise daha çok, uzun sürede geçmeyen, özellikle yüz ve ellerde görülen ülser ile kendini gösterir. 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 infeksiyondan korunmaktadır (38, 61, 83).

Akdeniz ülkelerinde insan vakalarının sporadik olarak saptandığı köylerde bile köpeklerde %8-19 gibi bir oranda infeksiyon saptanabilmektedir. Bu nedenle Türkiye'de genelde çocuklarda rastlanılan VL'nin kontrol altına alınması için köpek leishmaniasisinin kontrol edilmesine öncelik verilmelidir. VL'nin kontrolünde çok önemli yeri olan bu konuda uygulamaya geçilebilmesi için öncelikle VL'nin görüldüğü bölgelerdeki durumun saptanması gerekmektedir.

Bu hastalığın kontrolü için harcanan çabalar yetersiz kaldığı için günümüzde Leishmaniasis önemli bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında, hastalığın klinik formları arasında geniş farklılık olması ve bu klinik formların epidemiyolojik durumlarının her bölgeye özgü kontrol prensip ve yöntemlerine ihtiyaç duyması etkili olmaktadır.

Leishmaniasis çok eskilere dayanan bir geçmiři olmasına raėmen hala hastalarla ilk karřılařıldığında dűřünűlmemesi temel tanı sorunlarından biridir. Tanıda hızlı ve güvenilir laboratuvar metotlarının yerinde uygulanmasının önemi de bűyűktűr.

Dűnyada leishmaniasis űzerine yapılan çalışmalar; tanı için yeni testlerin geliştirilmesi, HIV/AIDS arasındaki ilişkinin incelenmesi, KL ve VL'e karşı insan ve özellikle köpeklerde kullanılabilir aşılar, tedavi ve korunma yolları, KL için lokal, VL için genel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi alanlarında yoğunlaşmıştır (11).

Bu nedenlerle İstanbul Bűyűkřehir Belediyesi Veteriner Hizmetleri Műdűrlűė'ne baėlı rehabilitasyon merkezlerinde gerçekleřtirdiėimiz çalıřmamızda ařaėdaki amaçlara ulařmak planlanmıřtır; (i)KanL Leishmaniasis tanısında Real Time PCR yöntemini kullanarak yeni ve hızlı bir tanı yöntemini uygulamak, (ii) Real Time PCR yöntemini kullanarak KanL epidemiyolojisini belirlemek.

## 2. GENEL BİLGİLER

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 (80, 83).

Zoonotik bir infeksiyon olan visseral leishmaniasis, köpek ve diğer kemiricilerde de görülmektedir. Hastalığın başlaması ve klinik seyri, parazitin bulaşması ve patogenezi ile konağın bağışıklık sistemi arasındaki karmaşık etkileşimlere bağlı olmakta, klinik tablo asemptomatik şekilden, akut şekle değişebilmektedir.

*Leishmania* türlerinin yaşam devrelerinde iki farklı morfolojik form görülmektedir: Amastigot formu, 2-4mm 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 mm uzunluğunda kamçısı ve 10-20mm uzunluğunda iğ şeklinde vücudu bulunan hareketli formdur. Parazit kinetoplast organelinin bulunmasıyla karakterizedir. Kinetoplast, çekirdek DNA'sından ayrı bir DNA içermektedir(16, 83).

Leishmaniasisde klinik olarak 3 farklı tablo ortaya çıkmaktadır:

1. Visseral Leishmaniasis [VL, Kala Azar, İç organlar Leishmaniasisi, kara hastalık, dum dum fever(kara humma), öldüren ateş(death fever), tropikal splenomegali]

2. Kutanöz Leishmaniasis [CL, KL, lokal kutanöz Leishmaniasis, deri leishmaniosisi, cutaneous leishmaniosis, şark çıbanı(oriental sore, button of the east), güzellik çıbanı, Halep çıbanı(Aleppo button)]

3. Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)

Daha sonraları, Diffüz (yaygın) kutanöz Leishmaniasis (DKL) ve Post Kala Azar dermal leishmaniasis (PKDL) de bu gruplara eklenmiştir (53).

Yurdumuzda *L. infantum* ve *L. tropica* türleri ile oluşan infeksiyonlar görülmektedir. Bunlardan ilki insanlarda retiküloendotelyal 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. 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 önemsenmemiştir. Son 10 yılda hastalığın yayılışına paralel olarak olgu sayısında da bir artışın olduğu görülmektedir. Leishmaniasis; tedavi ve kontrolünde yaşanan zorluklar nedeniyle, paraziter hastalıklar içinde sıtmadan sonra ikincil önemli hastalık olarak anılmaktadır (25).

## 2.1. Sınıflandırma

*Leishmania* türlerinin ayırım ve sınıflandırmasında; yaptığı hastalıklar, coğrafik yayılış, biyolojik, immünolojik, biyokimyasal ve enzimatik özellikler gibi verilerden yararlanır. 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 (11, 42, 83).

DSÖ tarafından yapılan son çalışmalar doğrultusunda *Leishmania* türleri için şu sınıflandırma uygun görülmüştür;

**Tablo 2-1: Leishmania cinsinin sınıflandırılması (32, 54).**

**Regnum** : *Animalia*

**Superphylum** : *Protozoa*

**Phylum** : *Sarcomastigophora*

**Subphylum** : *Mastigophora*

**Classis** : *Zoomastigophorea*

**Ordo** : *Kinetoplastida*

**Subordo** : *Trypanosomatina*

**Familiya** : *Trypanosomatidae*

**Genus :** *Leishmania*

**Subgenus :** *Leishmania*

**Species**

: *L. donovani* kompleks (*L. donovani*, *L. archibaldi*)

: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*

: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. aristidesi*

**Subgenus :** *Viannia*

**Species**

: *L. braziliensis* kompleks (*L. braziliensis*, *peruviana*)

: *L. guyanensis* kompleks (*L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*)

: *L. naiffi*, *L. lainsoni*

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 de dahil edilebileceğini göstermiştir (70).

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 (11).

## 2. 2. Tarihçe

Tarihin eski zamanlarından beri bilinmesine rağmen Leishmaniasis için ilk tıbbi kayıtlar Hindistan, Kalkuta'da Avrupa Genel Hastanesinde çalışan Twining' in 1835 de "Bataklıklardan çıkan kokulara maruz tropikal ülkelerin endemik kaşeksi" adını

verdiği bir hastalığı tarif etmesiyle başlar. Hastalığın klinik tablosunun sporadik 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 (34). “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 (17).

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 (83, 91). Nicolle ve Compte 1908 yılında köpekte buldukları hastalık etkenini *Leishmania infantum* olarak adlandırmışlardır (38).

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 (84).

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 (64, 83).

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 (83).

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 (36).

Unat'a göre Türkiye'de ilk vaka bildiri 20. yüzyıl başlarında Doğu Karadeniz Bölgesi'nden yapılmıştır. Dr. Vefik Vassaf'a 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 (83).

Hastalığın deri formu aslında Anadolu'da yüzyıllardır bilinmesine ve değişik yöresel adlarla isimlendirilmesine rağmen, Unat'a göre 1833 yılı bilinen ilk bildirim yapıldığı yıldır. 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. 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 (25, 77).

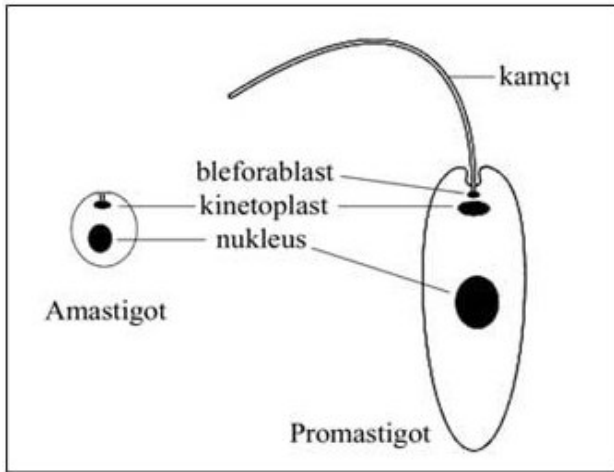
### 2. 3. Morfoloji

*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 (3).

Makrofajların içinde çoğalan amastigotlar buldukları hücreden serbest kaldıktan sonra, hemen ardından başka makrofajları infekte edip, oralarda çoğalmaya başlarlar. Wright veya Giemsa ile boyanmış preparasyonlarda; sitoplazma 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, blefaroplasttan çıkan kamçı (rizoplast), sitoplazmada mitokondri, lizozom ve golgi aygıtı da görülür (11).

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, blefaroplasttan oluşan kinetoplastik kitle, blefaroplasttan çıkan fibriler yapı gösteren kamçı, sitoplazmada endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi yapılardan oluştuğu gözlenmiştir (38, 58).

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 (kDNA) denilmektedir (11).



**Şekil 2-1: *Leishmania* parazitinin iki formu (53).**

## 2.4. Yaşam Döngüsü

*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 (32, 38, 60).

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 (32, 38, 60).

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 beslediği için hastalığın yayılımında rol oynamaz. Eğer kan emmenin ardından sineğin gastrointestinal kanalında yeterli zaman geçmezse, parazitin döngüsünün sağlanması imkansızlaşır. 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 (84).

Parazitin yaşam döngüsündeki promastigot evresi sineğin orta bağırsak ve toraks bölümünde gerçekleşir. Bitki özuları ile beslenmeye devam eden sineğin orta bağırsağında parazitler öylesine yüksek bir sayıya ulaşırlar ki, sonunda sineğin gastroözofajeal sfinkterini felce uğrattırlar. 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 (19, 66, 84).

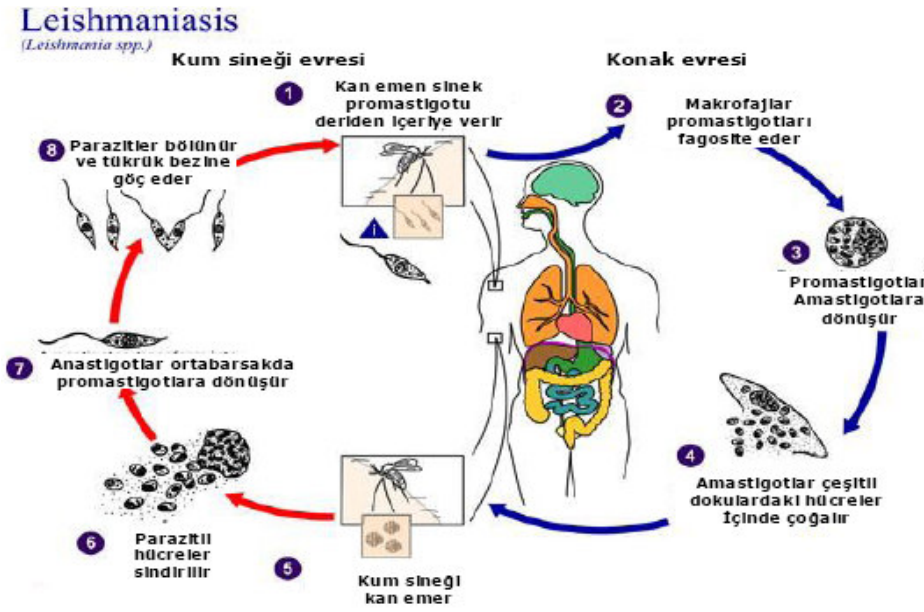
İnfekte kanın alınmasından 3- 7 gün sonra ilk metasiklik (enfektif) safhalar orta bağırsakta, hortumda ve az sayıda cibarium ve farinksde görülür (39). Bu safhada artık bölünmezler, çok hareketli, küçük ve zayıf görünürler (10 µm), kamçıları vücutlarının yaklaşık 2 katı uzunluğundadır.

Promastigotlar ayrıca hücresiz sıvı 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 (6). Kültürde parazitin değişik formlarının görülmesi ve virülanslarındaki değişiklikler, metasiklik promastigotların *in vitro* da geliştiğini, yani metasiklogenezisin sonuçlanabildiğini göstermiştir (65).

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 lipofosfolikanlar (LPG) sayesinde hücre yüzeyine tutundukları, ayrıca makrofajlardaki C3 reseptörlerinin de tutunmada rol oynadıkları bilinmektedir. İnfektif 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 işleminde özellikle promastigot yüzey antijenleri olan ve 63 kDa ağırlığındaki gp63 ile LPG'nin rol oynadığı, *Phlebotomus*'ların tükrüklerinde bulunan maddelerin de bu işleme yardımcı oldukları bildirilmiştir (14, 76).

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 (86).



Şekil 2-2: Parazitin Yaşam Döngüsü (11).

## 2.5. Vektör

*Phlebotomus* cinsi, *Leishmania* cinsi protozoonların biyolojik vektörlüğünü yapmaları nedeniyle tıbbi açıdan önem taşımaktadır. Kum sineklerinin sınıflandırılması phylum *Arthropoda*, sınıf *Insecta*, takım *Diptera*, alt takım *Nemotocera*, aile *Phlebotomidae* alt aile *Phlebotominae* şeklindedir. *Phlebotomus* cinsinden yaklaşık 30 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 (67). 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 (35).

*Phlebotomus* cinsine ait olan türler memelilerden beslenmekte *Sergentomyia* (9 altcins) ise reptil (kertenkele vb) ve amfibiler üzerinde nadiren memelilerden beslenmektedirler (87). *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 (13).

*Phlebotominae* ilk kez 1691'de Phillippo Bonnani tarafından tanımlanmıştır. *Phlebotomus papatasi* ise 1786' da Scopoli tarafından tanımlanmıştır (13).

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. Dördüncü evrede larvadan pupa gelişir. Larva ve pupalar karada yaşam göstermelerine rağmen kuruluğa çok duyarlıdırlar. Pupa evrimini tamamladıktan sonra erişkin dışarı çıkmaktadır (37).

Ülkemizdeki yayılışlarının saptanması üzerinde yapılan çalışmalar Akdeniz, Ege, İç Anadolu, Güney Anadolu Bölgelerinde toplam 20 türün varlığı bildirilmiştir (18, 23, 53).



**Şekil 2-3: Phlebotomus spp.**

## 2.6. Rezervuarlar

Rezervuarlar doğal rezervuar ve raslantısal rezervuar olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Raslantısal rezervuarda infeksiyon uygun olmayan koşullarda nadiren gelişmekte ve bunlar leishmaniasisin epidemiyolojisinde önemli rol oynamamaktadır. İyi bir rezervuarın dağılım alanında insan leishmaniasis olgularının varlığı, antropofilik phlebotomine vektörlerle sıkı temas halinde olması ve vektörün sokması ile hastalığın bulaşabilmesi için kronik, ileri derecede hasta olmasının gerekliliği vurgulanmış, rezervuarın yeterince fazla sayıda olması ve uzun yaşaması, rezervuarın %20 kadarının yaşamları boyunca infekte olmaları, insandaki parazitlerle konaktaki parazitlerin aynı olmaları gerektiği belirtilmiştir (11).

Leishmaniasisin omurgalı rezervuarları arasında insan, evcil kanid(köpek), yabani canid' ler (çakal, kurt, tilki) bulunmaktadır. Kemirgenler ve diğer hayvanlar hakkında literatür bilgisi yetersiz olup rastantısal konak oldukları düşünülmektedir. İtalya' da, çoğu ülkede bulunan şıçan türü *Rattus rattus*' un *L. infantum* için rezervuar olduğundan kuvvetle şüphelenilmektedir. Tilki (*Vulpes spp.*), çakal (*Canis aureus*), kurt (*Canis lupus*) ver racoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) Eski Dünya' da *L. infantum* ile infekte olmuşlardır. Bu hayvanların rezervuar konak oldukları düşünülmektedir fakat bu konuda henüz yeterli veriler bulunmamaktadır (53).

İnsanı infekte edebilen *Leishmania* türlerinin rezervuarları memeli hayvanların geniş bir bölümünü kapsamakta ve insan da bu grubun içine dahil edilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi çeşitli nedenlerle baskılanmış kişilerin periferik kanlarında normalden çok fazla parazit bulunmakta ve bunlar *Phlebotomus* tarafından kolaylıkla alınabilmektedir (11).

Akdeniz bölgesi, Çin, Güney Amerika'da *L. infantum*'un rezervuarı olarak köpekler gösterilmektedir (46, 54). Eski Dünya'da köpeklerde görülen leishmaniasisin etkeni *L. infantum* ile Yeni Dünya'daki etken *L. chagasi*'nin aynı parazit olduğu artık kabul edilmektedir (31).

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:

### 2.6.1. 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 (21, 69).

### 2.6.2. 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 (21).

### 2.6.3. 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, vahşi hayvanlar arasındaki 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 (21).

#### 2.6.4. 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 (21).

Yapılan araştırmalara 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 (87). Bazı endemik bölgelerde belirlenen ve %63'e kadar dayanan seroprevalans değerleri söz edilen tırmanışın en çarpıcı örneklerindedir (74). Üstelik Amerika kıtasında da tırmanışa geçtiği yolunda bildiriler bulunmaktadır (87). 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 saptanmıştır (53).

Hasta bir köpeği kan emmek üzere ısırın dişi yakarcanın hasta olmayan bir köpeği ısırmasıyla hastalığın doğrudan (köpekten köpeğe) taşınması gerçekleşir. İnsan

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 (5, 47). Köpektaki hastalık deri lezyonları, lokal veya genel 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 (8).

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. Bu nedenle hastalığın klinik tanısının oldukça zor olduğu bildirilmiştir (30, 57, 82, 88).

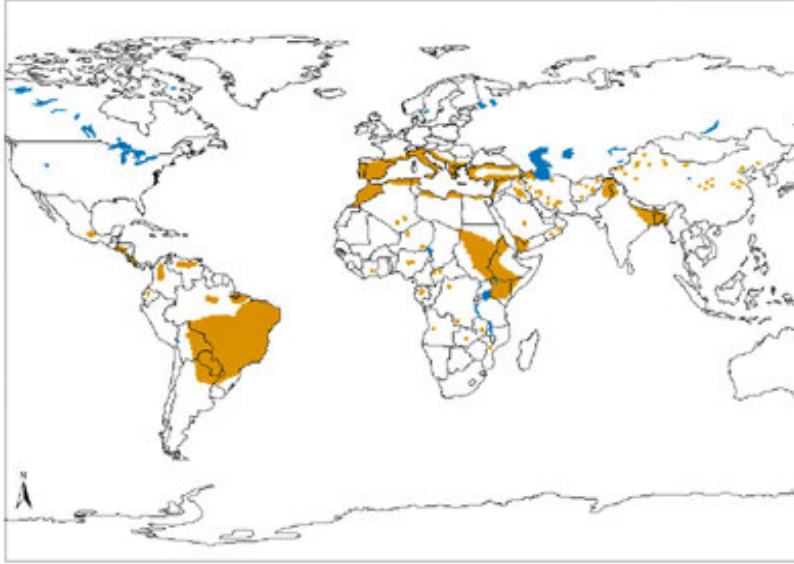
Köpeklerdeki infeksiyon yaş grubuna, ırka, cinsiyete bağlı değildir. Bununla birlikte, özellikle küçük köpeklerde semptomatik infeksiyon çok nadirdir. Diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de insanlarda görülen VL'in doğadaki rezervuarı köpeklerdir ve hastalığın bir bölgede endemik veya sporadik olgularla devam etmesinde en önemli rolü oynamaktadırlar. Türkiye'de köpeklerdeki leishmaniasisin saptanmasına yönelik çalışmaların artmasıyla, çeşitli bölgelerimizdeki durum da anlaşılmaya başlanmıştır. 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 (41, 57, 82).

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 çalışmalarda köpeklerde kullanılabilir aşılarda üretilmesi üzerine amaçlanmaktadır. 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 (75).

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 (88). Bu yüzden köpeklerdeki kesin tanı ancak serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler ile konulabilmektedir.

## 2.7. Epidemiyoloji

DSÖ'nün verilerine göre leishmaniasis görülen ülkelerin sayısı 88'dir. Bunların 72'si gelişmekte olan ülkeler, 13'ü ise az gelişmiş ülkelerdir. VL, 65 ülkede görülür. VL olgularının %90'ı Bangladeş, Hindistan, Nepal, Sudan ve Brezilya'nın fakir kırsal ve banliyo bölgelerinde görülür. KL'nin %90'ı ise Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Sudi Arabistan ve Suriye'de görülür. 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 (20, 21, 74).



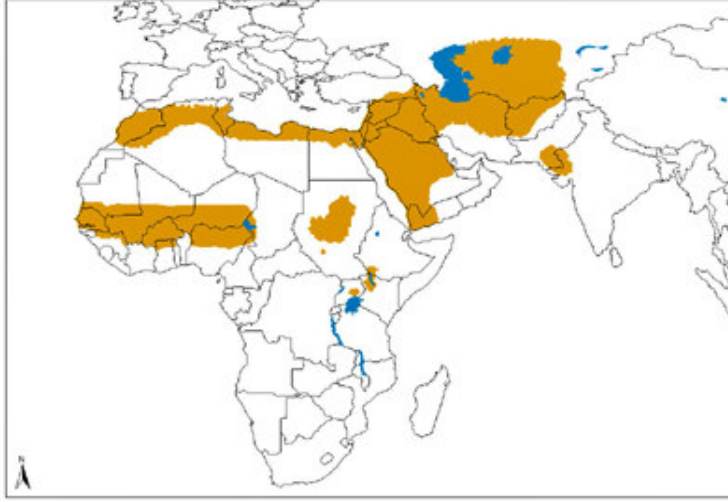
Şekil 2-4: Eski ve Yeni Dünya' da Visseral Leishmaniasis' in coğrafi dağılımı(89).



Şekil 2-5: Kutanöz ve Mukokutanöz Leishmaniasis' in Yeni Dünya' da coğrafi dağılımı(89).



Şekil 2-6: *L. tropica* ile bağlantılı türler ve *L. aethiopica*' ya göre Eski Dünya' da Kutanöz Leishmaniasis' in coğrafi dağılımı (89).



**Şekil 2-7: *L. major*' e göre Eski Dünyada Kutanoz Leishmaniasisin coğrafi dağılımı (89).**

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 bildirilmektedir. 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 aynı geçerlidir (7).

*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 (34). Epidemik olarak Sudan başta olmak üzere Doğu Afrika'da çocuklarda ve genç erişkinlerde infeksiyon sporadiktir. Akdeniz çevresi ülkeler (Türkiye dahil), Orta Doğu'da sporadik olgular şeklinde küçük çocuklarda nadiren erişkinlerde, immün sistemi baskılanmış kişilerde infeksiyon görülür. Endemik bölgedeki AIDS'lilerin %1-5'inde VL belirtileri vardır (22).

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 2000m 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. Erkeklerde kum sineği sokması olasılığı daha fazla olduğundan VL erkeklerde 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 işçiler, dünyada görülen ekonomik krizler, savaşlar, büyük göçler enfeksiyona duyarlılıktaki artış sayılabilir. Bir kısmı ise doğal çevreye ait değişikliklerdir, bunlar bile dolaylı yoldan insan ile ilişkilendirilebilir (10, 21).

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 (21).

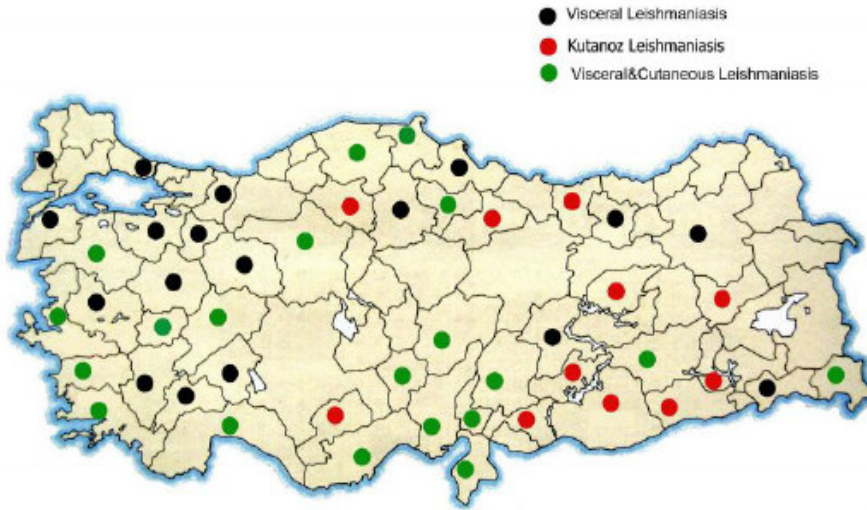
1996'da Afganistan'ın Kabil kentinde 270.000 KL olgusu olduğu hesaplanmıştır. Bu dönemde Kabil çok sayıda göç almış bir şehirdir ve nüfus hızla artarak 2 milyona ulaşmıştır. Hastalığın kentte bu şekilde artması da bu göçe bağlanmıştır (11).

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. Özellikle GAP, Güneydoğu Anadolu bölgesinin iklimini ve coğrafyasını değiştirerek yeni gelişecek parazit enfeksiyonları için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (11).

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 *L. infantum* sorumludur. Olgular bu güne dek sporadik bir seyir izlemiş, Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu bölgelerinden hastalara rastlanmıştır (11).

Ülkemiz ılıman kuşakta olması itibariyle VL için 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 (49, 50).



Şekil 2-8: Türkiye' de KL ve VL' in görüldüğü iller( Özbel Y., orjinal).

## 2.8. Hastalığın Ekonomik Etkisi

Leishmaniasis gibi endemik hastalıklar, popülasyonları güçten düşürdüklerinden iş gücü azalır, bu da kalkınmanın önüne geçen bir durum yaratır. Leishmaniasisin ekonomik etkisi karşılaşılan olgu sayısından daha önemlidir. Üretime ve sosyal refaha etki eder. Yaklaşık 350 milyon insanın sağlığına ciddi bir tehdit olmanın yanında Leishmaniasis’ in neden olduğu maliyet(tedavi ve iş gücü kaybı) tarımda ve kırsal bölgelerdeki endüstri gelişimi programlarında büyük kayıplarla sonuçlanır.

Leishmaniasis salgınları, Sudi Arabistan, Brezilya' da Amazon havzası ve And Ülkelerindeki topikal alanlarda olduğu gibi önemli projelerin tamamen durmasına yol açabilir. Leishmaniasis genellikle gelişmekte olan ülkelerde yaşayanları etkiler. Bunların içinde hükümetlerin kararlarını etkileme şansı en az olan, hastalığın ortaya çıkardığı maliyet(tanı, hastaneye yatış, tedavi) ile başa çıkma imkanları kısıtlı, sosyo-ekonomik olarak düşük düzeydeki insanlar en fazla etkilenirler (20).

## 2.9. Tanı

Leishmaniasis tanısında epidemiyolojik veriler, klinik ve laboratuvar bulguları ile serolojik tanı yöntemleri önem taşımaktadır. Etkensel tanı ise her zaman için en değerlidir. HIV ile infekte olgularda serolojik testler olguların ancak yaklaşık yarısında pozitif olabilmektedir (11, 27).

VL tanısında eğer olanak varsa birden fazla tanı yönteminin kullanılması önerilmektedir. Böylelikle diğer hastalıklardan ayırıcı ve doğru tanı konulması mümkün olabilmektedir. VL'in laboratuvar tanısı tedavi edilmemiş hastalarda oldukça basit, nükslerde ve yetersiz tedavi uygulanmış hastalarda ise daha zordur (38, 56, 60).

### 2.9.1. Klinik Tanı

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmada ve önemli bir yer tutmaktadır. 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 Vücut direncinin düşmesi sonucu pnömoni, dizanteri ve tüberküloz gibi ölüme neden olabilecek sekonder enfeksiyonlar da gözlenebilir. AIDS ve diğer immün yetmezlik durumlarında klinik belirtiler değişmektedir (11, 71).

### 2.9.2. 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 mikroskobu altında incelenerek doğrudan parazitin görülmesine dayanır.

### 2.9.2.1. Mikroskopik Tanı

VL olgularında örnek alınacak dokular infeksiyonun 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 NNN besiyerindeki kültürü ile konulmaktadır. Mikroskopik tanı 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 infeksiyonda %94, relapslarda ise %64 oranındadır. Tedavi sonrası yapılan aspirasyonda ise amastigotların 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. Karaciğer ponksiyon materyalinde ise hastaların %77'sinde olumlu sonuç alındığı belirtilmektedir (1, 38, 77).

Kemik iliği ponksiyonu: 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 (82). Ayrıca tedavi görmüş vakalarda *Leishmania* ' ların en son kemik iliğinden kayboldukları belirtilmektedir.

Lenf nodu ponksiyonu; Alınan örnek yayma yapılır, eğer yeterli örnek varsa kültüre alınır. Kültür amaçlı besiyerleri monofazik ya da difazik olabilirler. Monofazi 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 (FSS) 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, 48, 55, 63).

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 (48).

### **2.9.2.2. Hücre Kültürü**

Makrofaj ile amastigot arasındaki ilişkilerin incelendiği çalışmalarda amastigot doku kültüründe ya da hücre kültüründe üretilir (76). 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.

### **2.9.2.3. Mikrokültür**

KL' in hızlı tanısı için duyarlı bir mikrokapiller kültür metodu geliştirilmiştir. Mikrokültür metodu, daha az miktarda inokulum yapılması, promastigotların belirlenmesinde daha yüksek duyarlılık ve promastigotların ortaya çıkmasının daha hızlı olması nedeniyle geleneksel kültür metoduna üstün görülmektedir. Geleneksel kültür metodunda 15-30 günde %20-40 pozitiflik görülürken mikrokapiller kültür metodunda 4-7 günde %83-97 pozitiflik ( $P=0.0001$ ) bulunmuştur. Mikrokültür yönteminin avantajı basitliği ve endemik bölgelerde tanı için kullanımının uygun olmasıdır (4).

### **2.9.2.4. Deney Hayvanları**

Deney hayvanlarına inokulasyon aslında tanısız 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 (74).

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 aranan bulgulardır.

### 2.9.3. 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 olmaktadır. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyetleri düşüktür. Bu nedenle hastadan kan gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) uygulanabilir (77).

#### 2.9.3.1. 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. PCR 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, PCR için ideal bir hedef haline gelmiştir. Son yıllarda tanı amaçlı PCR yöntemi için bir çok yeni hedef DNA bölgeleri tanımlanmış, yüksek duyarlılık ve özgünlük değerleriyle önem kazanmıştır (38, 11).

### 2.9.4. Serolojik Tanı Yöntemleri

Kompleman Fiksasyon Testi, İndirekt Hemaglutinasyon(IHA), İndirekt Floresan 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.

Serolojik yöntemlerde amaç akut fazda artan anti-paraziter antikorların titrelerini saptayarak tanıya yardımcı olmaktadır. Serolojik testlerin pozitif olması leishmaniaside 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 Blot testi de kullanılmaya başlanmıştır (24, 33, 38, 40, 41, 51, 56, 60, 77).

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 infeksiyonun çok erken dönemlerinde saptanabilir. Bu yöntem kolaylıkla saha koşullarında kullanılabilir (77).

#### **2.9.4.1. İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)**

IFAT, uygulanışı kolay olduğundan, kısa zamanda sonuç alındığından, sonuçları çok duyarlı ve spesifik bulunduğundan dolayı etkensel tanısı 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 (11).

#### **2.9.4.2. 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 (77).

#### **2.9.4.3. 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 (55, 62).

#### **2.9.4.4. Western Blot (WB) Yöntemi**

Western Blot (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.

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 (73, 77).

#### **2.9.4.5. Leishmanin Deri Testi (Montenegro)**

*L. donovani* kültür antijenlerinin deri içine inokülasyonu ile yapılan allerjik bir test olarak bildirilmektedir (51). VL esnasında negatif olup genellikle başarılı bir tedaviden sonra pozitifleşir ve gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonunu gösterir. Epidemiyolojik çalışmalarda belli bir bölgede insanların parazitlerle karşılaşma oranlarını saptamak amacıyla kullanılır (26).

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 (77).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Köpeklerden Kan Örneği Alınması

Bu araştırma için Mayıs 2010-Ekim 2010 tarihleri arasında İstanbul Büyükşehir Belediyesine bağlı Hasdal ve Üsküdar sokak hayvanları rehabilitasyon ve tedavi merkezlerinde bulunan 93 köpekten kan alınmıştır.

- Köpeklerin her biri numaralandırılıp yaş, cinsiyet 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 4-5 ml kan alınmıştır.
- Alınan kanlar EDTA' lı tüplere alınarak numaralandırılmış, laboratuvara ulaşıncaya dek +4° C' de tutulmuştur.
- Örnekler İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Parazitoloji Bilim Dalı'na ulaştırıldıktan sonra çalışma başlayana kadar -20°C' de saklanmıştır.

#### 3.2. Klinik Örneklerden DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için Qiagen(Almanya) Dneasy Blood&Tissue Kiti kullanılmıştır (Şekil 3-1). Klinik örneklerde standardizasyon amacıyla kit kullanımı tercih edilmiş ve yöntem kitin içindeki kurallara göre uygulanmıştır.

##### 3.2.1. Kit İçeriği

- 2 ml toplama tüpleri içinde DNeasy Mini Spin kolonları
- Toplama tüpleri(2ml)
- Proteinaz K
- ATL Tamponu
- AL Tamponu

- AW1 Tamponu(konsantre)
- AW2 Tamponu(konsantre)
- AE Buffer

### 3.2.2. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

- Etanol
- 20-200  $\mu$ l' lik Mikropipet
- 100-1000  $\mu$ l' lik Mikropipet
- 200  $\mu$ l' lik ve 1000  $\mu$ l'lik filreli pipet uçları
- Vorteks
- Su Banyosu

Proteinaz K +4°C' de saklanmıştır. Geriye kalan DNA ekstraksiyon kiti içeriği oda sıcaklığında (15-25°C) saklanmıştır.



**Şekil 3-1: Qiagen Dneasy Blood&Tissue Kiti.**

### 3.2.3. Testin Prensipleri

İlk adımda proteinaz K ile örneklerdeki proteinler parçalanır. Tamponlar ile DNA' ların DNeasy Mini spin kolonuna bağlanmaları sağlanır. Santrifüjler sırasında DNA seçici olarak DNeasy membranına bağlanırken kontaminantlar ortamdaki

uzaklaştırılır. İki yıkama basamağı ile kalan kontaminantlar ve enzim inhibitörleri de uzaklaştırıldıktan sonra DNA ayrıştırılır.

### 3.3. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

- Köpeklerden EDTA' lı kan tüplerine alınan kanlar, -20°C' de saklanmıştır.
- Tüm santrifüj basamakları oda sıcaklığında mikrosantrifüj cihazında gerçekleştirilmiştir.
- Karıştırma işlemleri vorteks cihazında 5-10 saniye boyunca darbeli olarak gerçekleştirilmiştir.
- AW1 ve AW2 tamponları konsantre olarak sağlanmaktadır. İlk kullanımdan önce gerekli miktarda etanol ile çalışmaya uygun hale getirilmiştir.
- Çalışmaya başlamadan önce 56°C' de bir su banyosu hazırlanmıştır.

#### 3.3.1. DNA Ekstraksiyonu Prosedürü

1. 20 µl Proteinaz K, 1,5-2 ml' lik santrifüj tüplerine konulmuştur. Üzerine 50-100 µl antikoagüle edilmiş kan eklenmiştir. Hacim PBS ile 220 µl' ye tamamlanmıştır.
2. Etanol eklenmemiş 200 µl AL Buffer eklenmiştir. Vorteks ile karıştırılmıştır ve 56°C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüpler kısa bir süre santrifüj edilmiştir.
3. Örneğe 200 µl absolut etanol eklenmiştir ve vorteks ile karıştırılmıştır. Homojenizasyon sağlandıktan sonra kısa bir santrifüj daha yapılmıştır.
4. Karışımlar 2 ml' lik toplama tüpleri içindeki DNeasy mini spin kolonlarına pipetlenmiştir.  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) ' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtre toplama tüpünden çıkarılmıştır.
5. DNeasy mini spin kolonu 2 ml' lik başka bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µl AW1 Buffer eklenmiştir.  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) ' de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Filtre toplama tüpünden çıkarılmıştır.
6. Mini spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. 500 µl AW2 Buffer eklenmiştir.  $20,000 \times g$  (14,000 rpm)' de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Membran kurutulmuştur. Filtre toplama tüpünden çıkarılmıştır.

7. 1,5-2 ml' lik mikrosantrifüj tüpü içerisine yerleştirilen mini spin kolonu içindeki membran üzerine doğrudan 200 µl AE Buffer pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir. Sonra  $\geq 6000x$  g(8000 rpm) ' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Örneklerden izole edilen DNA' lar real time PCR ile çalışılmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

### 3.4. Real Time PCR Uygulaması

Real Time PCR uygulaması PrimerDesign(Birleşik Krallık) *Leishmania infantum* patojen belirleme kiti kullanılarak Qiagen Rotor Gene Q Real Time PCR (Şekil 3-2) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kit prosedürüne uygun olarak kullanılmıştır.

Kit, *Leishmania infantum* dışında başka *Leishmania* türlerini tespit etmemektedir. Hedef sekans olan glukoz-6 fosfat izomeraz enzimini kodlayan genin(gpi) daha önceden yapılan real time PCR bazlı çalışmalarda *Leishmania infantum* için iyi bir genetik marker olduğu gösterilmiştir (90).



Şekil 3-2: Qiagen Rotor Gene Q Real Time PCR Cihazı.

#### 3.4.1. Kit İçeriği

- Patojen spesifik primer/probe karışımı(150 reaksiyon)
- Patojen pozitif kontrol kalıbı(standar eğri için)
- İnternal Ekstraksiyon kontrol DNA(150 reaksiyon)
- RNAz/ DNAz içermeyen su
- PrimerDesign 2X Precision MasterMix(150 reaksiyon)



**Şekil 3-3: PrimerDesign Leishmania infantum patojen belirleme karışımı reaktifleri.**



**Şekil 3-4: Pozitif Kontrol Kalıbı.**

### 3.4.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Qiagen Rotor Gene Q Real Time PCR cihazı
- 10-100 µl' lik Mikropipet
- 1-10 µl' lik Mikropipet
- 10 µl' lik ve 100 µl' lik filtrelili pipet uçları
- İnce çepirli 0.2 ml' lik PCR reaksiyon tüpleri

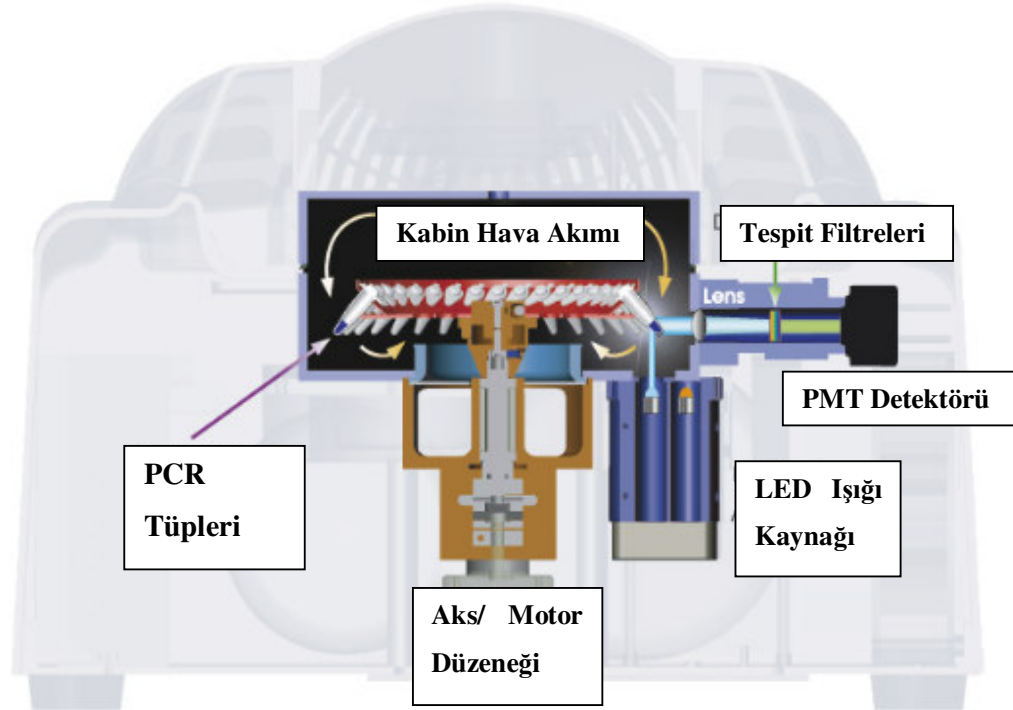
Kit tüm içeriği ile birlikte -20°C' de saklanmıştır.

### 3.4.3. Real Time PCR Çalışma Prensipleri

Rotor Gene Q kısa ve sabit optik yol ile birlikte 6' ya kadar uyarım kaynakları ve 6 tespit filtresi ile kalibrasyona gerek olmadan çoklu reaksiyonlar için kullanılabilir. Örnekler cihazın iç bölmesinin altındaki ışık yayan bir diyot tarafından uyarılır. Enerji tüpün dibindeki ince çepirde iletilir. Yayılan flüoresans bölmenin yan tarafındaki emisyon filtrelerinden geçer ve sonra bir foto çoğaltıcı tarafından toplanır. Örnekler bölmenin etrafında döndüğü sürece sabit optik yol tutarlı uyarım sağlar. Böylece ROX

gibi pasif dahili bir referans boyasına gerek kalmamaktadır. Rotor Gene Q optik sistemi şekil 3-5’ de, cihazda kullanılabilen kanallar tablo 3-1’ de gösterilmiştir.

Patojen spesifik primer ve probe karışımı sağlanır ve bu karışım FAM kanalı boyunca tespit edilir. Primer ve probe karışımı Taqman prensibi ile çalışır. PCR amplifikasyonu sırasında forward ve reverse primerler patojen DNA/cDNA’ sı ile hibridize olurlar. 5’ ucu boya, 3’ ucu flüoresans ışığı engelleyen materyal ile işaretlenmiş bir DNA probundan ibaret olan flüorogenik prob reaksiyon karışımında bulunmaktadır. PCR amplifikasyonu sırasında prob açılır ve raportör boya ve flüoresans ışığı engelleyen materyal birbirinden ayrılır. Her döngü sonunda flüoresansdaki artış Real Time PCR cihazı tarafından tespit edilir.



Şekil 3-5: Qiagen Rotor-Gene Q Optik sisteminin Gösterimi.

**Tablo 3-1: Qiagen Rotor-Gene Q cihazında kullanılabilen kanallar**

Kanal Adı	Uyarım / Tespit	Tespit Edilen Fluoroforlara Örnekler
Blue	365 nm / 460 nm	Biosearch Blue™, Marina Blue®, Bothell Blue®, Alexa Fluor® 350
Green	470 nm / 510 nm	FAM™, SYBR® Green 1, Fluorescein, EvaGreen™, Alexa Fluor® 488
Yellow	530 nm / 555 nm	JOE™, VIC™, HEX™, TET™, CAL Fluor® Gold 540, Yakima Yellow®
Orange	585 nm / 610 nm	ROX™, CAL Fluor® Red 610, Cy3.5™, Texas Red®, Alexa Fluor®568
Red	625 nm / 660 nm	Cy5™, Quasar™ 670, Alexa Fluor 633
Crimson	680 nm / 712 yüksek geçiş	Quasar™ 705, Alexa Fluor® 680
High Resolution Melt	460 nm / 510 nm	SYBR Green 1, SYTO®9, EvaGreen™

#### 3.4.4. Pozitif Kontrol

Kopya sayısını belirlemek ve PCR ayarı için bir pozitif kontrol olması için çalışmamızda kullandığımız kit bir pozitif kontrol kalıbı içermektedir. Böylece patojen kopya sayısının standart eğrisi hazırlanmıştır. Her çalışmada en az bir pozitif kontrol kullanılmıştır. Pozitif kontrolün doğru çalışması hedef patojen gen için primer ve problemlerin doğru çalıştığını gösterir. Pozitif kontrolün negatif sonuç vermesi test sonuçlarının geçersiz olduğunu ve testin tekrarlanması gerektiğini gösterir. Diğer kit bileşenlerinin pozitif kontrol tarafından kontamine edilmemesi için diğer tüm örnekler ve negatif kontrol pipetlendikten sonra pozitif kontrol tüpü hazırlanmıştır.

#### 3.4.5. Negatif Kontrol

Çalışmada kontaminasyon olmadığını göstermek için kit her kullanıldığında negatif kontrol kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak DNAz/RNAz içermeyen su kullanılmıştır. Negatif kontrolün pozitif sonuç vermesi halinde sonuçlar görmezden gelinerek çalışma tekrarlanmalı ve olası kontaminasyon kaynakları araştırılarak ortamdan uzaklaştırılmalıdır.

### 3.4.6. İnternal DNA Ekstraksiyon Kontrolü

Ekstraksiyon işleminin kontrolü için 4 µl kontrol DNA kullanılır. Kontrol DNA, örnek DNA' sını ile birlikte saflaştırılır. Saflaştırma ve Real Time PCR işlemlerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi ortamda yüksek konsantrasyonda PCR inhibitörlerinin bulunmadığını gösterir.

Kit ile birlikte internal kontrol DNA' sını için ayrı primer ve probe karışımı da gelmektedir. Primerler, hedef sekans primerleri ile birlikte hedef patojen DNA düşük kopya sayılarında bulunsada dahi Kontrol DNA' nın amplifikasyonu patojen DNA' nın bulunmasını engellemez. İnternal kontrol DNA, VIC kanalında tespit edilir.

### 3.4.7. Patojen Belirleme Karışımının Hazırlanması

**Tablo 3-2: Patojen Belirleme Karışımı**

Bileşenler	Hacim
2X Precision MasterMix	10 µl
Patojen Primer/Probe Mix	1 µl
İnternal Ekstraksiyon Kontrol Primer/Probe Mix	1 µl
RNAz/DNAz içermeyen su	3 µl
<b>Son Hacim</b>	<b>15 µl</b>

- Her tüpe 15 µl karışım pipetlenmiştir.
- Örneklerden ekstrakte edilen DNA' lardan tüplere 5 µl pipetlenmiştir.
- Negatif kontrol için tüplere 5 µl RNAz/DNAz içermeyen su kullanılmıştır. Tüm tüplerin son hacmi 20 µl olmuştur.

### 3.4.8. Standart Eğri Seyreltme Serilerinin Hazırlanması

1. 900 µl RNAz/DNAz içermeyen su 5 tüpe pipetlenmiştir ve 2-6 arasında numaralandırılmıştır.
  2. 100 µl pozitif kontrol kalıbı 2 numaralı tüpe pipetlenmiştir.
  3. Tüp iyice vortekslenmiştir.
  4. Pipet ucu değiştirilmiş ve 2. tüpten 100 µl 3.tüpe pipetlenmiştir.
  5. Tüp iyice vortekslenmiştir.
  6. 4. ve 5. adımlar seriyi tamamlamak için tekrar edilmiştir.
- 5 µl standart kalıptan her tüpe pipetlenmiştir. Tüm tüplerin son hacmi 20 µl olmuştur.

**Tablo 3-3: Standart Eğrinin Hazırlanması**

Standart Eğri	Kopya Sayısı/ µl
1.tüp (Pozitif Kontrol)	$2 \times 10^5$
2.tüp	$2 \times 10^4$
3.tüp	$2 \times 10^3$
4.tüp	$2 \times 10^2$
5.tüp	$2 \times 10^1$
6.tüp	2

### 3.4.9. Amplifikasyon Protokolü

PCR tüpleri, Rotor Gene Q cihazına yüklendikten sonra Real Time PCR Kitinde belirtilen amplifikasyon protokolü (Tablo3-4) bilgisayar yazılımında(Rotor Gene Q series software) ayarlanarak reaksiyon başlatılmıştır. Enzim aktivasyonu ilk döngüde gerçekleşmiş, denaturasyon ve bilgi toplanması evreleri 50 döngü boyunca sürdürülmüştür.

**Tablo 3-4: Amplifikasyon Protokolü**

Basamak	Zaman	Sıcaklık
Enzim Aktivasyonu(gerektiğinde)	15 dakika	95°
Denaturasyon	10 saniye	95°
Bilgi Toplanması	60 saniye	60°

### 3.5. Negatif Örneklerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonrasında, hasta örneklerinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçüm kanalı grafiğindeki bir örneği negatif olarak değerlendirebilmek için, PCR eğrisinin, threshold çizgisini kesmemiş olması, bir başka deyişle, pozitiflik sınırının altında kalmış olması gerekmektedir. Ancak bir örneğin PCR eğrisinin, threshold çizgini kesmemiş olması, o örneğin gerçekten negatif olarak değerlendirilmesi için yeterli değildir.

Olası bir inhibisyon, kimyasal reaksiyon, tüp kirlilikleri, pipetleme hataları gibi aksaklıklardan kaynaklanabilen yanlış negatifliklerin önüne geçebilmek ve doğru sonuç vermek için, bu gibi durumlarda internal kontrol kanalındaki PCR eğrisinin threshold çizgisini geçmiş, bir başka deyişle internal kontrolün pozitif olması gerekmektedir. Bu gibi bir durumda, örneğin herhangi bir inhibisyona maruz kalmadığı ve gerçek negatif olarak sonuçlandığı yorumlanabilir.

### **3.6. Pozitif Örneklerin Değerlendirilmesi**

Çalışma sonrasında, Hasta örneklerinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçüm kanalı grafiğindeki bir örneği pozitif olarak değerlendirebilmek için, PCR eğrisinin, threshold çizgisini kesmiş olması, bir başka deyişle, pozitiflik sınırının üzerine çıkmış olması gerekmektedir. Bir örneğin pozitifliği (barındırdığı kopya sayısı) ne kadar fazla ise, Internal Kontrol'ün baskılanması o derece fazlalaşır. Bir başka deyiş ile; örneğin PCR eğrisi ile, O örneğin internal kontrolünün eğrisi birbiri ile ters orantılıdır.

#### 4. BULGULAR

Barınak köpeklerinden alınan 93 kan örneğinin Real Time PCR ile incelenmesi sonucunda 1, 55, 59, 61 ve 71 numaralı örneklerde *L. infantum* DNA'sı saptanmıştır. 71 numaralı örnekte Çalışma sonucunda %5,4 oranında pozitiflik bulunmuştur. Pozitif bulunan köpeklerde örneklerin alımı sırasında herhangi bir klinik bulguya rastlanmamıştır. Köpeklerden alınan örneklerle ilgili bilgiler tablo 4-1' de gösterilmiştir.

1 numaralı örnekte 2 kopya, 55 numaralı örnekte 39 kopya, 59 numaralı örnekte 5 kopya, 61 numaralı örnekte 246 kopya, 71 numaralı örnekte ise 1 kopya *L. infantum* DNA'sı tespit edilmiştir. Real Time PCR sonuçları pozitif örnekler şekil 4-1' de gösterilmiştir.

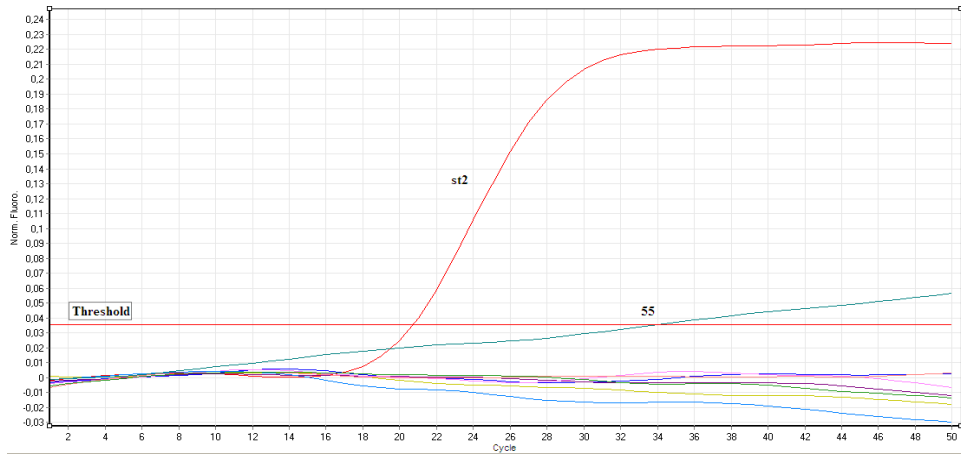
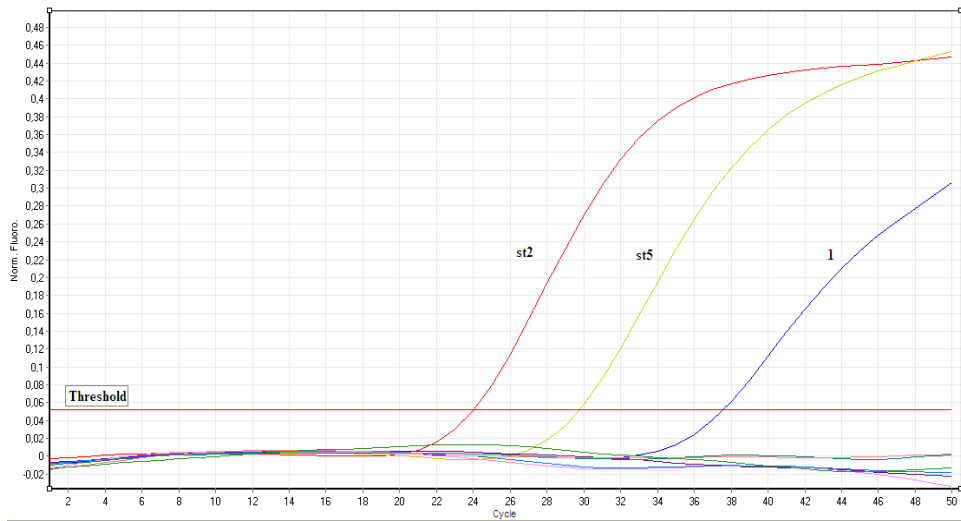
**Tablo 4-1: Köpeklerden Alınan Örnekler**

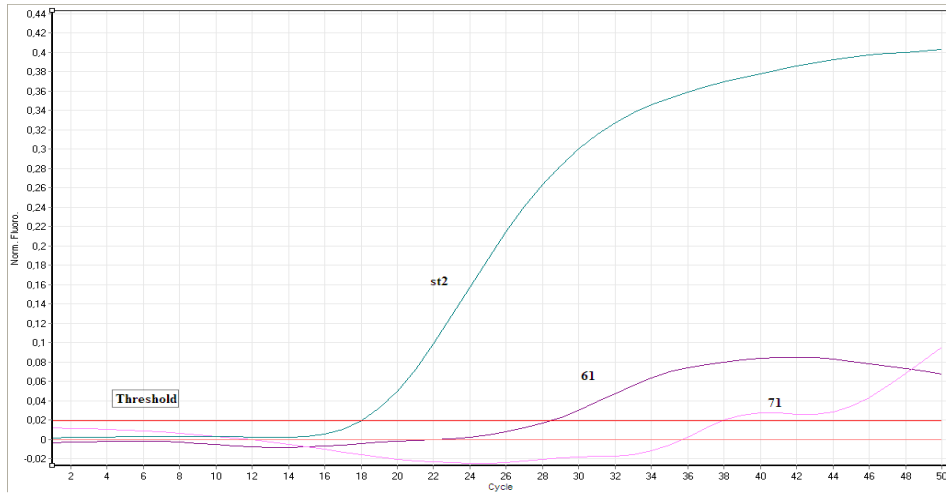
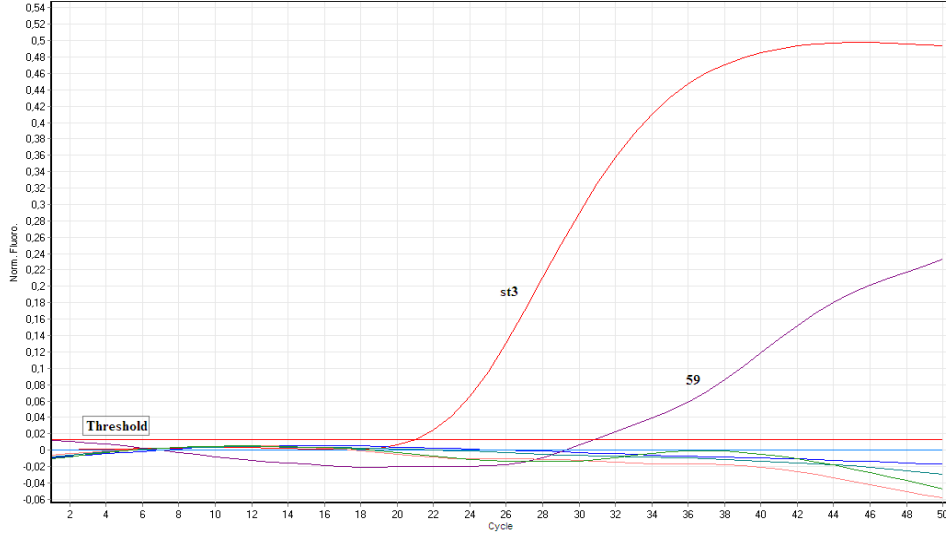
Örnek No	Cinsiyet	Yaş	Klinik Bulgu	Geldiği Bölge
1	Erkek	2		Gümüşyaka
2	Dişi	2-3	Uyuz	Gümüşyaka
3	Erkek	4		Gümüşyaka
4	Erkek	2	Mantar	Gümüşyaka
5	Dişi	1		Gümüşyaka
6	Dişi	8		Arnavutköy
7	Erkek	8		Arnavutköy
8	Dişi	8		Arnavutköy
9	Erkek	2		Arnavutköy
10	Dişi	1		Arnavutköy
11	Dişi	2		Arnavutköy
12	Dişi	2		Arnavutköy
13	Dişi	6		Arnavutköy
14	Dişi	4-6		Sultangazi
15	Erkek	3		Sultangazi
16	Erkek	2		Sultangazi
17	Erkek	5		Sultangazi
18	Erkek	4	Deri Lezyonları	Sultangazi

19	Dişi	1		Sultangazi
20	Dişi	1		Sultangazi
21	Dişi	1		Sultangazi
22	Erkek	>7		Sultangazi
23	Erkek	6-7	Ön kolda Tümör	Sultangazi
24	Dişi	1		Fatih
25	Dişi	>6		Arnavutköy
26	Erkek	4		Arnavutköy
27	Dişi	2		Arnavutköy
28	Dişi	2		Arnavutköy
29	Erkek	2		Arnavutköy
30	Dişi	3		Arnavutköy
31	Erkek	2		Arnavutköy
32	Erkek	1		Silivri
33	Erkek	2		Silivri
34	Dişi	>4		Silivri
35	Erkek	1		Eyüp
36	Dişi	2-3		Eyüp
37	Erkek	3		Eyüp
38	Erkek	1		Eyüp
39	Erkek	2-3		Eyüp
40	Erkek	2-3		Arnavutköy
41	Erkek	4		Arnavutköy
42	Erkek	3		Arnavutköy
43	Erkek	4		Arnavutköy
44	Erkek	6		Arnavutköy
45	Erkek	>6		Arnavutköy
46	Dişi	3-4		Arnavutköy
47	Erkek	4-6		Arnavutköy
48	Erkek	4-6		Arnavutköy
49	Erkek	4-6		Arnavutköy
50	Dişi	3		Arnavutköy

51	Dişi	3-4		Arnavutköy
52	Dişi	1		Arnavutköy
53	Erkek	1		Arnavutköy
54	Erkek	3		Arnavutköy
55	Erkek	2		Eyüp
56	Erkek	2		Arnavutköy
57	Erkek	4		Eyüp
58	Erkek	8		Eyüp
59	Erkek	2		Eyüp
60	Erkek	1		Eyüp
61	Erkek	2-3		Eyüp
62	Erkek	2		Eyüp
63	Dişi	1	Uyuz	Eyüp
64	Dişi	2		Eyüp
65	Dişi	2		Eyüp
66	Dişi	2		Eyüp
67	Dişi	6		Eyüp
68	Erkek	2		Eyüp
69	Dişi	2		Eyüp
70	Dişi	1		Eyüp
71	Dişi	1		Eyüp
72	Dişi	2		Eyüp
73	Dişi	1		Eyüp
74	Erkek	3-4		Üsküdar
75	Dişi	2		Üsküdar
76	Erkek	2-3		Üsküdar
77	Erkek	2		Üsküdar
78	Dişi	3		Üsküdar
79	Dişi	4-5		Üsküdar
80	Dişi	2		Üsküdar
81	Erkek	3		Üsküdar
82	Erkek	3		Üsküdar

83	Dişi	6		Üsküdar
84	Erkek	2		Üsküdar
85	Dişi	1-2		Üsküdar
86	Dişi	2		Üsküdar
87	Dişi	3-4		Üsküdar
88	Erkek	3		Üsküdar
89	Erkek	2		Üsküdar
90	Dişi	3		Üsküdar
91	Dişi	2		Üsküdar
92	Erkek	5-6		Üsküdar
93	Dişi	2		Üsküdar





**Şekil 4-1: Real Time PCR Sonuçları pozitif olan örneklerin grafikleri**

## 5. TARTIŞMA

Ülkemizde VL' in hem endemik hem de sporadik olarak görülmesi, VL rezervuarı köpeklerde infeksiyonun insanlara göre çok daha yüksek oranda saptanması köpeklerdeki ayırıcı tanısının önemini arttırmaktadır. Ancak Leishmaniasis, visseral ve deri formunun diğer bir çok hastalıkla benzer bulguları vermesi ve bazı bölgelerimizde seyrek olgular halinde görülmesi nedeniyle ayırıcı tanıda ilk anda düşünülmemektedir. Hastalığın görüldüğü bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar bu açıdan da önem taşımaktadır.

Dünyada VL üzerine yapılan çalışmalar genellikle Akdeniz havzasında yoğunlaşmaktadır.

İspanya' da *L. Infantum*' un endemik olduğu Barselona' da Otonom Barselona Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Hayvan Kan Bankasına Mayıs 2005 ile Temmuz 2007 tarihleri arasında gelen fiziksel olarak sağlıklı, *L. Infantum* açısından seronegatif 92 kan donörünün real time kantitatif PCR ile incelenen kan örneklerinde %19,2 oranında pozitiflik bulunmuştur (78).

*L. infantum*' un endemik olduğu güneydoğu Fransa' da köpeklerdeki asemptomatik taşıyıcılığı belirlemek üzere yapılan çalışmada Aralık 2007 ile Nisan 2008 tarihleri arasında 140 ordu köpeğinde ELISA ile 1(%0,71), western blot ile 19(%14) oranında pozitiflik bulunurken kantitatif PCR ile 58(%41,4) örnekte parazitemi bulunmuştur (9).

Tunus'ta gerçekleştirilen KanL ile ilgili epidemiyolojik bir çalışmada KanL seroprevalansı %6 olarak bulunmuş, PCR ile de bu seropozitif köpeklerin hepsi pozitif olarak saptanmıştır. Bunun yanısıra direkt incelemede hassasiyetin %33, kültürde ise %55 olduğu belirtilmiştir (15).

Türkiye'de VL ve KL tanıları klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik incelenmesi ile konulmaktadır. Parazit izolasyonu için NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleri uygulanmaktadır. In-house olarak hazırlanan IFAT ile tanı belirli merkezlerde gerçekleştirilmektedir. rK39 hızlı tanı testi ticari olarak satılmakta olup son yıllarda

giderek daha fazla sayıda merkezde kullanılırken moleküler tanı yöntemleri henüz araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır (42).

Ülkemizde Kala-Azar hastalarının bulunduğu Manisa, Muğla, Kuşadası, Karaburun, Urla gibi diğer bölgelerde köpekler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, köpeklerde önemli ve insan leishmaniasisi ile kıyaslanmayacak ölçüde yüksek oranlarda (%3,8-%27) pozitifliğe rastlanmıştır (52, 56, 58).

Handemir ve ark. eylül-kasım 2003 tarihleri arasında İstanbul'un farklı yörelerindeki sokak köpeklerinde visseral Leishmaniasis seroprevalansının araştırılması için yaptıkları çalışmada toplam 152 kan serumu IFAT ile anti-*Leishmania infantum* IgG antikorları yönünden incelemiş ve köpeklerin tamamı seronegatif bulunmuştur (34).

Tamer ve ark. Kocaeli' de 65 sokak köpeğinden alınan serum örneklerini indirekt flüoresan antikor testi (IFAT) ve ELISA ile değerlendirmiştir. IFAT ve ELISA ile iki (%3,07) köpek seropozitif olarak bulunmuştur (79).

Çanakkale' de Kepez ilçesine bağlı Kalabaklı köyünde ve Ayvacık ilçesi İlyasfaki Köyü' nde 2007 yılı Haziran ve Ağustos aylarında VL' in epidemiyolojik durumunu incelemek için yapılan çalışmada IFA testi ile 27 köpek serumu değerlendirilmiş ve hiçbir köpekte seropozitiflik tespit edilmemiştir. Sadece Kepez' den iki köpeğin serumlarında, eşik değerinin altında 1/16 ve 1/64 sulandırımalarında seropozitiflik görülmüştür (81).

Antalya ili ve ilçelerindeki 4 köpek barınağında yapılan çalışmada IFA testi ile incelenen 176 köpek serum örneğinin 14 (%7,95) tanesi seropozitif, 24 (%13,63) tanesi sınırda seropozitif, 138 tanesi ise negatif olarak saptanmıştır. Seropozitif bulunan köpeklerin sadece iki tanesinde (%14,2) zayıflama, alopesi, tırnak uzaması, burun çevresinde yara gibi klinik bulgular gözlenmiştir (12).

Erzurum'da barınak köpeklerinde listeriosis ve leishmaniasisin seroprevalansının araştırılması amacı ile yapılan çalışmada Örneklerin analizinde, Listeriosis için Osebold aglütinasyon testi ve leishmaniasis için IFAT testi uygulanmıştır. 72 köpek serumunun 19'unda (%26,3) *Listeria monocytogenes* seropozitifliği saptanmıştır. Örneklerin hiçbirinde leishmaniasis seropozitifliği bulunmamıştır (2).

Çalışmamızda İstanbul Büyükşehir Belediyesine bağlı iki sokak hayvanı rehabilitasyon merkezindeki köpeklerden toplanan 93 kan örneğinin Real Time PCR ile incelenmesi sonucunda beş tanesi (%5,4) *Leishmania infantum* DNA' sı açısından pozitif bulunmuştur. Bu sonuç Türkiye' de daha önce yapılan çalışmalarla uyumludur ve İstanbul' da real time PCR ile pozitif sonuç bulunan ilk çalışma olması yönünden önemlidir.

Güvenirlikleri nispeten daha düşük olmasına rağmen, serolojik yöntemler endemik alanlarda bulunan insan ve köpeklerdeki leishmaniasisin insidansını ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. IFA testinde pozitif bulunan köpeklerin tedavisi veya ortamdan uzaklaştırılmasının her zaman insanlar için potansiyel riski azalttığı belirtilmektedir. IFAT, DAT ve konvansiyonel 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 (72).

KanL ile ilgili genel bir durum olarak, asemptomatik köpekler, vektörlere paraziti bulaştırabildiği halde, herhangi bir belirti göstermezler (46) 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 olmamasının, özellikle yaşlı köpeklerin yaşamları boyunca fazla oranda *Leishmania* paraziti ile karşılaşması sonucu gelişen koruyucu immünite ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (61).

Yapılan çalışmalarda parazitin direkt olarak görülmesi altın standart olma özelliğini hala korumaktadır. Buna karşın örnek alınımındaki hatalar veya preparatı inceleyen kişinin deneyimsizliği gibi nedenlerle duyarlılığı düşük olabilmektedir.

Serolojik yöntemler de özellikle IFAT ve rK39 hızlı tanı testi başta olmak üzere yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermektedirler (53). Ancak eşik değer altındaki olgularda da direkt bakıda parazit görülebilmekte ya da PCR ile parazit DNA'sı saptanabilmektedir. Buna karşın nadir de olsa uygun örnek alınamamasına ve örnekteki PCR inhibitörlerine bağlı olarak PCR ile yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde ssrRNA(küçük alt ünite ribozomal RNA) gen sekansı ile uygulanan PCR ile kültür sonuçları karşılaştırılmış, yalnızca bir örnekte PCR ile yanlış negatif sonuç alındığı ve bunun da örneğin uygun alınamamasına bağlı olduğu

bildirilmiştir (45). Bunun yanısıra, PCR yöntemi ile parazitolojik yöntemleri (direkt mikroskopi ve kültür) karşılaştıran bir çalışmada da iki yöntem arasındaki uyumun %92 gibi yüksek oranda olabileceği de bildirilmiş, özellikle ayırıcı tanı ve VL kontrol programlarında PCR yöntemlerinin uygulanmasının son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (28).

Serolojik yöntemlerin problemleri asemptomatik hastalarda pozitif bulunabilmeleri, diğer *Leishmania* türleri, *Trypanosoma cruzi* ve *Mycobacterium* gibi diğer mikroorganizmalar ile çapraz reaksiyon verebilmeleri ve serolojik testlerin çoğunun geçirilmiş infeksiyon, aktif infeksiyon ve subklinik infeksiyonu ayıramamasıdır. HIV ile ko-infeksiyonda serolojik testler özellikle çok düşük hassasiyet göstermektedir (43).

PCR, *Leishmania* parazitini birçok değişik klinik örnekte ve tüm leishmaniasis klinik şekillerinde saptayabilecek kapasitededir. PCR, Leishmaniasis tanısında bir devrim yaratmıştır. Leishmaniasis tanısında evrensel bir PCR protokolünün geliştirilmesi çok faydalı olacaktır. Optimizasyon ve standardizasyon için izolasyon kontrolleri(patojen DNA' sının miktarı bilinen örnekleri, negatif kontrol), internal kontroller, standart bir *Leishmania* kontrolü kullanılması, yöntemin tekrarlanabilir olması ve eksternal bir kontrol programına dahil olması önerilmektedir (43).

*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 kişisel korunma önlemleri ve kalıcı ilaçlama ile vektör popülasyonunun azaltılması ve dolayısıyla da bulaşım riskinin azaltılması mümkündür (11).

İnfekte köpeklerde *L. infantum*'un yok edilmesi özellikle seropozitif olan asemptomatik köpeklerdeki durumun saptanmasına yönelik etkili önlemler alınmadığı sürece olanaksız olacaktır. Özellikle endemik bölgelerde Deltametrin emdirilmiş köpek tasmalarının kullanılması, köpeklerin paraziti vektör *Phlebotomus'*lara bulaştırmalarını önlemek ve onların rezervuarlığını ortadan kaldırmak için son derece önemlidir. İnfekte köpeklerin itlaf edilmesi önerilse de (59) etik ve sosyal nedenlerden dolayı evrim zincirinin kırılmasını sağlayacak KanL aşısının (29) geliştirilmesi gibi kontrol yöntemleri üzerinde çalışılmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Ak, M., Özbel, Y., Özensoy Töz, S., Turgay, N. Özcel, M.A.,editör. *Immun Yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1995. s.69-119.
2. Aktaş, M. S., Özkanlar, Y. E., Özkan, A. T., Babür, C., Balkaya İ. Erzurum İli Barınak Köpeklerinde Listeriosis ve Leishmaniasisin Seroprevalansının Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.*2010; **34** (2):76-80.
3. Alexander, J., Satoskar, A. R., Russel, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999; **112**(18): 2993-3002.
4. Allahverdiyev, A. M., Uzun, S., Bağirova, M., Durdu, M., Memişoğlu, H. R. A Sensitive New Microculture Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2004; **70**(3): 294–297.
5. Almeida, M. A. O., Jesus, E. E. V., SousaAtta, M. L. B., Alves, L. C., Berne, M. E. A., Atta, A. M. Antileishmanial antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; **106**: 151- 58.
6. Altıntaş, N., Özbel, Y. *Leishmania infantum* promastigot formlarının üremesi üzerine CO<sub>2</sub>'nin etkisi. *Türkiye Parazitol Derg.* 1992; **16**(1): 38-42.
7. Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez, S. B., Jimenez, M., et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection. *Clin Microbiol Rev.* 1997; **10**: 298-319.
8. Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., Nieto, J. Canine Leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 2004; **57**: 1-88.
9. Aoun, O., Mary, C., Roqueplo, C., Marie´, J. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification *Veterinary Parasitology* 2009; 166: 27–31.
10. Ashford, RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000; **30**: 1269- 1281.
11. Azizi (Sevil), N. R. *Bodrum Yarımadasında Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Araştırılması*. İzmir, 2008. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.

12. Balcıoğlu, İ. C., Ertabaklar, H., Paşa, S., Özbel, Y., Özensoy Töz, S., Antalya İli ve İlçelerindeki Dört Köpek Barınağında Leishmaniasis Seroprevalansının Araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2009; **33**(1):4-7.
13. Beaty, B. J., Marquardt, W. C. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, p.117-12; 1996.
14. Bodgan, C., Röllinghoff, M., Solbach, W. Envasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol Today* 1990; **6**(6): 183- 87.
15. Chargui, N., Haouas, N., Gorcii, M., Akrouit Messaidi, F., Zribi, M., Babba, H. (2007). Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite*, 14(3):247-51.
16. Christine, F. (1990). Immunological and Biochemical identification of human *Leishmania* strains isolated in Greece. Final Report, Hellenic Pasteur Institute, Athens, Greece, 12 p.
17. Crum, NF., Aronson, N. A., Lederman, E. R., Rusnak, J. M., Cross, J. H. History of US Military Contributions to the Study of Parasitic Diseases. *Military Medicine* 2005; **170**: 4-17.
18. Daldal, N., Üner, A., Yaşarol, Ş., Karacasu, F., Yurdağül, C. Ege ve Akdeniz bölgesinde görülen *Phlebotomus* türleri. *Türkiye Parazitol Derg.* 1989; **13**(1):71- 84.
19. Davies, C. R., Cooper, A. M., Peacock, C., Lane, R. P., Blackwell, J. M. Expression of LPG and gp63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology* 1990; **101**: 337-343.
20. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; **27**(5):305-18.
21. Desjeux, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; **95**; 239-43.
22. Despommier, D. D. *Introduction to the Leishmania, Parasitic Diseases*, 4. Baskı. Apple Trees Corporation LLC; 2000.
23. Doğan, F. *Leishmania* infeksiyonlarının epidemiyolojisi, *Leishmania*'ların rezervuar ve vektörleri. Yaşarol Ş Ed. Leishmaniasis, *Türkiye Parazitol Derg.* 1981; **2**: 25-50.

24. Ertabaklar, H., Ozensoy Toz, S., Taylan, Ozkan, A., Rastgeldi, S., Balcioglu, I. C., Ozbel, Y. Serological and Entomological Survey in a Zoonotic Visceral Leishmaniasis Focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum Province. *Acta Tropica* 2005; **93**(3): 239-246.
25. Ertabaklar, H., Özkan, T. A., Özensoy, S., Özbel, Y., et al. Çorum'da Çocuklarda Visseral Leishmaniasis İncelenmesi. *Türkiye Parazitol Derg.* 2003; **27**(4):233-6.
26. Fissore, C., Delaunay, P., Ferrua, B., Rosenthal, E., et al. Convenience of Serum for Visceral Leishmaniasis Diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 5332-3.
27. Gaeta, G. B., Gradoni, L., Gramiccia, M., Di Martino, L., et al. VL in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recent Prog Med.* 1994; **85**(6): 340-7.
28. Gomes, A. H. S., Ferreira, I. M. R., Lima, M. L. S. R., Cunha, E. A., et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2007; **144** :234–241.
29. Gradoni, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for canine *Leishmania* vaccine. *Vet Parasitol.* 2000; **100**: 87–103
30. Gradoni, L. The dignosis of canine leishmaniasis. *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution.* Proceeding of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum, 7. 2002.
31. Gramiccia, M., Gradoni, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; **35**:1169- 80.
32. Gramiccia, M., Gradoni, L. *The leishmaniasis of Southern Europe.* In: *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*, Takken W and Knols B. G. J. editörler. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2007; p.75-95.
33. Guerin, P. J., Olliare, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002; **2**(8): 494-501.
34. Handemir, E., Öncel T., Kamburgil, K. İstanbul Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2004;**28**(3): 123-125.
35. Humber,D.P. Introduction to Leishmaniasis. <http://homepages.uel.ac.uk/D.P.Humber/akhter/intro.htm>

36. Jacobson, R. L. *Leishmania tropica* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) perplexing parasite. *Folia Parasitologica* 2003; **50**: 241-250.
37. Kettle, D. S. *Medical and Veterinary Entomology*. 2nd Ed. London:CAB International; 1995.
38. Kılıç, S. S. Visseral Leishmaniasis ve Diğer Leshmania İnfeksiyonları. içinde Topçu WA, Söyletir G, Doğanay, Editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. M. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s.685-96; 2002.
39. Killick-Kendrick, R., Wallbanks, K. R., Molyneux, D. H., Lavin, D. R. The ultrastructure of *Leishmania major* in the foregut and proboscis *Phlebotomus papatasi*. *Parasitol. Res.* 1988; **74**: 586-590.
40. Kuman, H. A. (2002). *Leishmania* Türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 2: 1870-78
41. Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., et al. Comparision of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol.* 2001; **39** (2):613-17.
42. Lewis, D. J. Phlebotomid sandflies. *Bull Org Mond Sante* 1971; **44**: 535- 51.
43. M. A. Özcel, M. Tanyüksel, H. Eren *Moleküler Parazitoloji* İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri; 2009
44. Maroli, M., Pennisi, M. G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007; **30**: 145(3-4): 357-60.
45. Mathis, A., Deplazes, P., PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. *J Clin Microbiol.* 1995; **33**(5): 1145-1149
46. Molina, R., Amela, G., Nieto, J., San-Andres, M., et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994; **88**, 491–493.
47. Moreno, J., Alvar, J. Canin leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology.* 2002; **18**(9); 399- 405.

48. Navin, T. R. Leishmaniasis. içinde Balows A., Hauster W.J., Ohashi M. And Turano A. Editörler. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice*. Springer-Verlag Comp., I: 904-10. 1988.
49. Ok, Ü. Z. *Leishmania* HIV/AIDS. 4. AIDS Kongresi (8-10. Nisan) Kongre Kitabı. Kuşadası, 1999, 156-62.
50. Ok, Ü. Z., Balcıoğlu, I. C., Özkan, A. T., Özensoy, S., Özbek, Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica* 2002; **84**:43-8.
51. Öner, Y. A., Sahip, N., Keskin, C., Palandüz, A. Bir Visseral Leishmaniasis Olgusu. *Türkiye Parazitol Derg.* 2003; **27**(3): 176-78.
52. Özbek, Y., Oskam, L., Özensoy, S., Turgay, N., Alkan, M. Z., Jaffe, C. L., Özcel, M. A. Epidemiology of canine leishmaniasis in western Turkey: comparison of serological, molecular biological and parasitological procedures. *Acta Tropica* 2000; **74**(1):1-6.
53. Özbek, Y., Özensoy Töz, S. Leishmaniasis. İçinde M.A., Özcel editör. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği yayınları No: 22, META Basım; 2007. s.197-241.
54. Özbek, Y., Turgay, N., Özensoy, S., Özbilgin, A., et al. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediteranean region. *Ann Trop Med Parasitol.* 1995; **89**; Suppl 1:89- 93.
55. Özdener, N., Kayar, B., Köksal, F., Akbaba, M. *Leishmania* Sempozyumu Kursu Değerlendirme ve Öneri Formuna Verilen Yanıtlar. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi Özet kitabı. 2005. s.167-68.
56. Özensoy Töz, S., Özbek, Y., Gül, M. A., Ertabaklar, H., et al. İnsan ve Köpeklerden Alınan Klinik Örneklerle Leishmaniasis Tanısı İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulanması. *Türkiye Parazitol Derg.* 2002; **26**(3):239-44.
57. Özensoy, S., Korkmaz, M., Balcıoğlu, I. C., Özbek, Y., Ertabaklar, H., Rastgeldi, S. Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis. *Türkiye Parazitol Derg.* 2002; **26**(3):234-38.

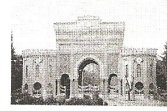
58. Özensoy, S., Özbel, Y., Turgay, N., Alkan, M. Z., Gül, K., Gilman-Sachs, A., Chang, K. P., Reed, S. G., Ozcel, M. A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; **59**(3): 363-369.
59. Palatnik-de-Sousa, C. B., dos Santos, W. R., Franca Silva, J. C., Dacosta, R. T., et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; **65**: 510–517.
60. 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.
61. Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenburg, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immunol.* 1994; **62**, 229–235.
62. Polat, E. Visseral Leishmaniasis Tanısı. XIII.Ulusal Parazitoloji Kongresi.Özet Kitabı. 2003. s105.
63. Polat, E., Aygün, G., Aslan, M., Aksın, E. D., Yıldırım, A., Altaş, K. Bir Visseral Leishmaniasis Olgusu. *Türkiye Parazitol Derg.* 2003; **27**(1):4-5.
64. Polat, E., Çakan, H., Aslan, M., Yakar, H. (2005). Viseral Leishmaniasis Şüpheli 26 Vaka. XIV Ulusal Parazitoloji Kongresi, İzmir, 168.
65. Sacks, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol.* 1989; **69**:100-3.
66. Sacks, D. L., Perkins, P. V. Developmental of infective stage *Leishmania* promastigotes within *Phlebotomine* sandflies. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; **34**(3): 456-459.
67. Sadlova, J. The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Acta Soz Zool Bohem.* 1999; **63**:331-366.
68. Schallig, H. D. F. H., Schone, G. J., Koron, C. C. M., Hailu, A., Veeken, C. F. Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis *Med Microbiol Immunol.* 2001; **190**:69-1.

69. Schlein, Y., Warburg, A., Schnur, L. F., Gunders, A. E. Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982; **76**(5): 582-600.
70. Schnur, L. F., Chance, M. L., Ebert, F., Thomas, S. C., Peters, W. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1981; **75**(2): 131- 44.
71. Seaman, J., Mercer, A. J., Sondorp, H. E., Herwaldt, B. L. Epidemic visceral leishmaniasis in Southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Ann Intern Med.* 1996; **124**: 664-72.
72. Semião-Santos, S. J., Harith, A. E., Ferreria, E., Pires, C. A., Sousa, C., Gusmão, R. (Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol Res.* 1995; **81**: 235-239.
73. Singh, S., Sivakumar, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med.* 2003; **49**:55-60.
74. Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L. revalance of *Leishmania infantum* infection in dogs living in az area of Canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**(2): 560- 563.
75. Strauss-Ayali, D., Baneth, G., (2001). Canine Visceral Leishmaniasis. International Veterinary Information Service. Ithaca, NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org))).
76. Sundar, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Health.* 2001; **6**(11): 849-54.
77. Sundar, S., Rai, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2002; 951-958.
78. Tabar, M. D. ve diğerleri. Detection of *Leishmania infantum* by Real-time PCR in a canine blood bank *Journal of Small Animal Practice.* 2008; **49**: 325–328.
79. Tamer, G. S. , Polat, E., Töz, S. Ö., Altaş, K. Kocaeli Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı. *Türkiye Parazitol Derg.* 2008; 32 (3): 183 -186.

- 80.** Tait, A., Sacks, D. L. The cell biology of parasite invasion and survival. *Parasitol. Today*. 1988; **4**: 228-33.
- 81.** Tok, H., Sevil, N., Özensoy Töz, S., Ertabaklar, H., Balcıoğlu, İ. C., Demir, S. ve ark. Çanakkale İli Ayvacık Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasisin Serolojik ve Entomolojik Olarak Araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2009; **33**(2):109-113.
- 82.** Tosun, C., Handemir, E., Çam, Y., Öztabak, K., Keskin, O., Kırmızı, E. Bir Köpekte Visseral Leishmaniasis Olgusu ve Amphotericin-B ile Tedavisi. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2001; **25**(2): 115- 122.
- 83.** Unat, E. K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M. (1991). Unat'ın Tıp Parazitolojisi. İÜ Cerrahpaşa Tıp Fak Yay, İstanbul, 570- 9.
- 84.** Van Den Enden, E. (2002). Leishmaniasis. [http://www.itg.be/itg/Distancelearning/LectureNotesVandenEndenE/Teksten/sylabus/05\\_Leishmaniasis.doc](http://www.itg.be/itg/Distancelearning/LectureNotesVandenEndenE/Teksten/sylabus/05_Leishmaniasis.doc)
- 85.** Varışlı, A. N., *Kutanöz leishmaniasis'li Hastaların Tanı ve Takibinde Real Time PCR Kullanımı*. Şanlıurfa, 2005. Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- 86.** Vidyashankar,C., Agrawal, R. (2002). Leishmaniasis. <http://users.ugent.be/aviester/principles/pcr.html>
- 87.** Vouldoukis, I., Dugas, B., Rougier, S., Pino, P., Mazier, D., Woehle, F. Canin visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*. 2006; **135**: 137-146.
- 88.** Voyvoda, H., Paşa, S., Özensoy Töz, S., Özbek, Y., Ertabaklar, H. Aydın'ın bazı ilçe ve köyleriyle İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde leishmaniasis ve dilofilariasisin prevalansı. *Turk J Vet Ani Sci*. 2004; **28**: 1105- 11.
- 89.** WHO 2010 [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index1.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html)
- 90.** Wortmann G. et al. Rapid Identification of *Leishmania* Complexes by A Real Time PCR Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2005; **73**(6): 999–1004.
- 91.** Zijlstra, E., E., Musa, A. M., Khalil, E. A. G., El Hassan, I. M., El Hassan, A. M. Post Kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infect Dis*. 2003; **3**: 87-98

**ETİK KURUL KARARI**

T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 134

02/11/2009

Sn. Prof. Dr. Y. Ali ÖNER  
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Karar No: 126  
Başvuru Tarihi: 21/10/2009

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Yüksek Lisans Öğrencisi Şafak BAYIRLIOĞLU'na ait "İstanbul Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis' In Seroepidemiolojik Araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ  
İ. Ü. HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL  
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN  
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV  
Üye

Doç. Dr. Alper YILMAZ  
Üye

Doç. Dr. Mehmet YALTIKIRIK  
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ  
Üye

Avukat Safiye ALTUN  
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI  
Üye

İstanbul Üniversitesi  
Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu Başkanlığı  
İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL  
TEL : (0 212) 440 00 00/ 10013  
E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı	ŞAFAK	Soyadı	BAYIRLIOĞLU
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	16.07.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	54355422246
Email	<a href="mailto:sbayirlioglu@gmail.com">sbayirlioglu@gmail.com</a>	Tel	535 715 66 53

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ	2010
Lisans	EGE ÜNİVERSİTESİ	2007
Lise	ÇAĞRI BEY ANADOLU LİSESİ	2003

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	iyi	77	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
2007 ALES Bahar Puanı	68.522	71.436	74.983
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office 2007	İyi

### Yayımları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):

