T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

KUTANÖZ LEYİŞMANYOZLU HASTALARDA ETKEN TÜRLERİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Fadime EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İ. Soner KOLTAŞ

ADANA-2008

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

KUTANÖZ LEYİŞMANYOZLU HASTALARDA ETKEN TÜRLERİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI

Fadime EROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İ. Soner KOLTAŞ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF.2006.YL.11 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No:TF.2006.YL.11

ADANA-2008

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan "Kutanöz Leyişmanyozlu Hastalarda Etken Türlerin PCR-RFLP Yöntemi ile Tanımlanması" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 28 / 01 / 2008

İmza
Prof. Dr. İ Soner KOLTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. M. Macit İLKİT
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza
Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun ……..tarih ve ……. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İ. Soner KOLTAŞ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK ve yüksek lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamda bilgi ve desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Biyolog Ahmet GENÇ ve tez çalışmama yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Gökhan KARACAOĞLAN'a teşekkür ederim.

Örneklerin toplanmasında bana yardımcı olan ve yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca Tez çalışmasını TF.2006.YL.11 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Biyolog Fadime EROĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY…..……...……..……i
TEŞEKKÜR ……...…….....ii
İÇİNDEKİLER……iii
ŞEKİLLER DİZİNİ…….……vi
ÇİZELGELER DİZİNİ……vii
ÖZET…….viii
ABSTRACT…….……...ix
1.GİRİŞ…….……...……1
2.GENEL BİLGİLER……..4
2.1.Leishmania…….……4
2.1.1.Leishmania morfolojisi……...5
2.1.2.Leishmania'nın moleküler yapısı……7
2.1.3.Leishmania'nın yaşam döngüsü……..8
2.2.Leyişmanyoz…….....9
2.3.Kutanöz Leyişmanyoz ……...…….……10
2.3.1.Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyozu…….....12
2.3.2.Yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyozu……...…….13
2.4.Kutanöz Leyişmanyoz Epidemiyolojisi..…….....14
2.5.Kutanöz Leyişmanyoz'un Türkiye'deki Dağılımı…….....15
2.6.Kutanöz Leyişmanyoz'da Bağışıklık…….....15
2.7.Kutanöz Leyişmanyoz'da Tedavi……16
2.7.1.İntralezyoner Tedavi…….....16
2.7.2.Sistemik İlaç Tedavisi……...……17
2.7.3.Topikal Tedavi…….....17
2.7.4.Fiziksel Yöntemler…….....17
2.8.Kutanöz Leyişmanyoz Olgularında Klinik Tanı……..18
2.9.Kutanöz Leyişmanyoz Olgularında Laboratuar Tanısı…….....18
2.9.1.Direkt Mikroskobi…….....20
2.9.2.Serolojik Yöntemler……..20
2.9.3.Kültür Yöntemleri…….20
2.9.4.Moleküler Yöntemler…….....21

2.10.Polimeraz Zincir Reaksiyonu…….....21
2.10.1.Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri…….....22
2.10.1.1.Enzim……..…….23
2.10.1.2.Deoksinükletotit Trifosfatları……..…….23
2.10.1.3.Magnezyum Derişimi……..…….....23
2.10.1.4.Tampon İçeriği……..……...24
2.10.1.5.Oligonükleotitler (Primer)…….....24
2.10.1.6.Hedef Diziler…….....25
2.10.1.7.Isılar ve Döngü Sayısı…….....25
2.11.Restriksiyon Fragment Uzunluk Polmorfizimi(RFLP)……..25
2.12.Leishmania genotiplerinin PCR ile belirlenmesi……....26
2.12.1.Kinetoplast DNA…….....27
2.12.2.Internal Transkript Spacer (ITS1)……...28
3.GEREÇ VE YÖNTEM……...30
3.1.Gereçler……30
3.2.Örneklerin Toplanması…….31
3.2.1.Aspirasyon Sıvılarının Alımı…….…….....32
3.2.2.Smear Örneklerinin Alımı…….....33
3.3.Aspirasyon sıvısı ve Smear Örneklerinden DNA İzolasyonu……..…….....34
3.3.1.Çözeltiler……..……...34
3.3.2.Yöntem……..…….35
3.4.Amplifikasyon İçin Gerekli Çözeltieler ve Kimyasal Maddeler…..……35
3.4.1.Çözeltiler…….....35
3.4.2.Yöntem…….....36
3.4.3.Amplifikasyon Koşulları…….....36
3.4.4.Termal Cyler İle PCR Protokolü…….....37
3.4.5.Agaroz Jel Elektroforezi ve Örneklerin Yürütülmesi……37
3.4.5.1.Çözeltiler…….37
3.4.5.2.Yöntem…….....38
3.5.Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizimi(RFLP)…….....38
4.BULGULAR…….....40
5.TARTIŞMA…….45

6.SONUÇ…….....49
7.KAYNAKLAR……50
8.EKLER…….....55
9.ÖZGEÇMİŞ……61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1.Leishmania'nın amastigot şekli…….....6
Şekil.1.2.Leishmania'nın giemza boyalı amastigot şekli…….6
Şekil.1.3.Leishmania'nın promastigot şekli……....6
Şekil.1.4.Leishmania'nın giemza boyalı promastigot şekli……..6
Şekil.2.Leishmania'nın yaşam döngüsü……...9
Şekil.3.Kutanöz Leyişmanyoz olgularının dağılımı…….....14
Şekil.4.Polimeraz Zincir Reaksiyonu…….22
Şekil.5.Restriksiyon Fragment Uzunluk Polmorfizmi……....26
Şekil.6.Leishmania'nın tekrar eden miniekzon gen bölgesi……...28
Şekil.7.Miniekzon PCR-RFLP genotipleri…….....29
Şekil.8.Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli hastalardaki lezyonlar…….....31
Şekil.9.Aspirasyon sıvısının alımı……..32
Şekil.10.Smear örneğinin alımı……..33
Şekil.11.13A-13B primerleri ile amplifiye olmuş aspirasyon sıvıarının PCR sonuçları…….....42
Şekil.12. 13A-13B primerleri ile amplifiye olmuş smear örneklerinin PCR sonuçları..42
Şekil.13.Fme-Rme primerleri ile amplifiye olmuş PCR sonuçları……43
Şekil.14.Eae I restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen RFLP sonuçları……44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Leishmania türleri ve neden oldukları hastalıklar……..11
Çizelge 2. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında kullanılan laboratuar tanı yöntemlerinin karşılaştırılması…….……...19
Çizelge 3. Leishmania cinsine spesifik primer dizilimi……..36
Çizelge 4. 13A-13B ve Fme-Rme primerleri için kullanılan PCR programı……..37
Çizelge 5. Enterobacter aerogenes restriksiyon enzimi ……..39
Çizelge 6.Smear örneklerinin mikroskop bakısı ve PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırılması……...41
Çizelge 7.Aspirasyon sıvılarının mikroskop bakısı ve PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlarının karşılaştırlması……41

ÖZET

KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ HASTALARDA ETKEN TÜRLERİN POLİMERAZ ZİNCİR REKSİYONU (PCR) VE RESTRİKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLMORFİZİMİ (RFLP) YÖNTEMİ İLE TANIMLANMASI.

Leyişmanyoz, *Leishmania* cinsi zorunlu hücre içi protozoonların neden olduğu bir grup hastalıktır. Bunların üç faklı şekli vardır: Viseral Leyişmanyoz, Kutanöz Leyişmanyoz ve mukokutanöz leyişmanyozdur. Kutanöz leyişmanyoz enfekte tatarcık sineği ile bulaşan bir deri hastalığıdır. Kutanöz Leyişmanyoz tanısı sıklıkla klinik değerler ile konur ve tipik akut lezyonlar sporotrikoz gibi diğer dermatolojik problemler ile karışabilir. Kutanöz leyişmanyoz Çukurova bölgesinde *Leishmania tropica* ve *Leishmania major*'un neden olduğu önemli bir sağlık problemidir.

Serolojik testler, indirekt immunflorasan antikor testi (IFAT), enzim-sıvı immun sorbent assay (ELISA), direk mikroskop tanısı ve kültür Kutanöz Leyişmanyoz tanısı için kullanılan geleneksel yöntemlerdir. Bu teknikler Kutanöz Leyişmanyoz tanısı için kesin ve hızlı değildir. Ayrıca bu teknikler *Leishmania* türlerinin morfolojik benzerliklerden dolayı tiplendirme yapmak için de uygun değildir. Bu yüzden son zamanlarda çeşitli hastalığın tanımı ve tür tayini yapmak için özellikle Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'na dayalı yöntemler geliştirilmiştir.

Bu amaçla, bu çalışmada kliniği Kutanöz Leyişmanyoz'a uyan 64 smear örneği ve 50 aspirasyon sıvısı (toplam 114) PCR-RFLP yöntemi ile çalışıldı. Çalışma sonunda PCR smear örneklerinde 100% özgül, 58,8% duyarlı, aspirasyon sıvılarında 100% özgül, 68,4% duyarlı saptandı. Bu çalışmadaki en ilginç bulgu, Viseral Leyişmanyoz hikayesi olmaksızın Kutanöz Leyişmanyoz olgularında *Leishmania infantum* türü tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Kutanöz Leyişmanyoz, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Restriksiyon Fragment Length Polimorfizm (RFLP).

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF CAUSATIVE SPECIES IN PATIENTS WITH CUTENEOUS LEISHMANIASIS BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)-RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM (RFLP).

The group of disease the leishmaniasis is caused by obligate intracellular protozoa of genus *Leishmania*. These are present in 3 different forms: Visceral Lesihmaniasis (VL), Cutaneous Leishmaniasis (CL) and Mucocutaneous Leishmaniasis (MCL). The Cutaneous Leishmaniasis is skin disease transmitted by infected sand fly. Cutaneous leishmaniasis (CL) is most frequently diagnosed by clinical evaluation and is typical acute lesions can be confused with other dermatological problems, such as sporotrichosis. The Cutaneous Leishmaniosis caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major* is a health problem in Çukurova region.

Serological tests, Indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), the Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), direct microscopic examination of smears and culture are use conventional methods for diagnosis of Cutaneous Leishmaniosis. None of these techniques isn't a rapid and definite diagnosis metods for CL. Furtermore, these techniques are not adequate for species identification due to the morfological similarity of different *Leishmania* species. Therefore, recently several molecular methods, especially those based on the Polymerase chain reaction (PCR) have been developed for the diagnosis and identification of *Leishmania* species.

For this purpose,in this study it has studied 64 smear samples and 50 aspirate material (totally 114) whose clinical findings were positive for Cutaneous Leishmaniosis by PCR-RFLP. End of the study, it has been found that PCR is 100% sensitivite and 58.8% specific of smear sample and 100% sensitivite 68.4 % specific of aspirate material. Our most interesting finding is the presence of *Leishmania infantum* isolates in CL cases without Visceral Lesihmaniosis history.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis, Polymerase Chain Reaction (PCR), Restriction Fragment Lenght Polymorphısm (RFLP).

1.GİRİŞ

Protozoonların Mastigophara alt şubesinde bulunan Trypanosomatidae ailesinin iki cinsi insanların kan ve dokularında yerleşirler. Bu cinsler *Leishmania* ve *Trypanosoma'* dır. İki cinsinde türleri, yaşam döngülerini biri omurgalı diğeri omurgasız iki konakta tamamlarlar. Bu parazitlerin yaşam döngüsünde amastigot, promastigot, epimastigot ve tripo-mastigot denilen evrim şekilleri görülür. Parazitin cinsine ve türüne bağlı olarak bu dönemlerden ikisi ya da hepsi bir türün yaşam döngüsünde görülebilir. *Leishmania* cinsindeki parazitler kutanöz lezyonlar ile ölümcül sistemik hastalık arasında değişen çok çeşitli hastalıkların nedensel ajanlarıdır. Leyişmanyoz tatarcıkları (*Phlebotamus* cinsine ait türler) tarafından insanlara ve diğer memelilere bulaştırılmakta ve yayılmaktadır. Bununla beraber enfeksiyonun klinik seyri bulaştırılan *Leishmania* türüne bağlı olarak değişir. Leyişmanyozun Afrika, Amerika, Asya ve Avrupa'nın birçok ülkesinde endemik olduğu bilinmektedir. Kutanöz leyişmanyoz vakalarının çoğu (>%90) Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de görülmektedir[1,2,3].

Leishmania cinsine ait protozoonlar morfolojik olarak benzer bir grup parazittir. Bunlar insanlarda kutanöz, mukokutanöz ve visseral leyişmanyoza neden olurlar. Kutanöz Leyişmanyoz enfeksiyonu, dişi tatarcığın kan emdiği yerde küçük, sert ve kaşıntılı bir papül şeklinde başlar. Zamanla çevresi kızarır, 3-4 ay içinde etrafı sert ve kabarık üzeri kabuklu, hafif sızıntılı bir yara şekline dönüşür. Yaranın üzerindeki kabuk kanatılmadan kaldırılırsa alt yüzeyinde sivri bir takım çıkıntılar olduğu görülür ki buna "Hulusi Behçet'in çivi belirtisi" denir. Yavaş büyüyen ve 2-3 cm çapına gelen yaraya, bakteri enfeksiyonu eklenirse kişilerde ateş, titreme gibi belirtiler görülür. Bu tip yarada, komplikasyonlar olmazsa ağrı yoktur ve zaman içinde pigmentsiz bir yara (skar) bırakarak iyileşirse de izin etrafında büzülmeler ve yaranın yerine göre bazı şekil bozuklukları gözlenebilir[4].

Kutanöz Leyişmanyoz klinik olarak; akne, kan çıbanı, ekzama, lupus eritomatozus, lupus vulgaris, tuberculosis verrucosus, çeşitli frengi belirtileri, leptomlu lepra, yumuşak yara, psoriasis ve deri urları gibi bir çok deri hastalığını taklit edebilir. Bu yüzden Kutanöz Leyişmanyoz olgularının tanısında klinik bulgular yeterli değildir. Kesin tanı koymak için laboratuar tanısına ihtiyaç duyulmaktadır[3,4].

Kutanöz Leyişmanyoz'un laboratuar tanısında direkt mikroskobi, montenegro deri testi, serolojik testler, kültür yöntemleri ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Direkt mikroskobide amastigotların görülebilirliği zor ve tecrübe isteyen bir metoddur. Kutanöz Leyişmanyoz'un serolojik yöntemler ile tanısında çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için serolojik testler tercih edilmemektedir. Kültür yöntemleri ise çok zaman alıcı ve zahmetli bir metod olduğu için Kutanöz Leyişmanyoz tanısında çok az tercih edilmektedir[2,5].

Son yıllarda hastalığın tanısında kinetoplast DNA'sının yapısı, antijen incelemeleriyle türlerinin tanımlanması yoluna gidilmiştir. Çeşitli moleküler yöntemler ile enfeksiyon tanımı için *Leishmania* DNA'sını bulma ve türlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından *Leishmania*'ya özgü olarak belirlenen primerler ile PCR amplifikasyonu yapılarak (nükleer veya minicircle kinetoplast DNA, subunit suRNA veya miniekson DNA sekansları) tür tayini tespit edilmektedir. *Leishmania* türlerini tiplendirmek için kullanılan metodlar multiplex PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), single-strand konformasyon polimorfizmi, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) ve DNA dizi analizi kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu genotipik moleküler teknikler diğer tanı yöntemlerine oranla daha güvenilir ve spesifiktir[3,6,7].

Dünyanın birçok yerinde olduğu gibi ülkemizde de, özellikle Çukurova bölgesinde kutanöz leyişmanyoz halen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında lezyonlar, etken olan türlere bağlı olarak klinik seyir ve tedaviye cevap açısından farklılık gösterir. *L.tropica* ve *L.major* 'un etken olduğu Kutanöz Leyişmanyoz'da koruyucu immünite gelişir, tedavi edilmeksizin spontan iyileşme gerçekleşebilir. Bu türlerin enfeksiyonlarında ilaç kullanılmaksızın özellikle endemik bölgelerde takibi yeterli olabilmektedir. *L.mexicana* ve *L.braziliensis'in* neden olduğu kutanöz leyişmanyoz daha ciddi ve daha uzun sürelidir. *L.braziliensis* türü Mukokütanöz Leyişmanyozuna neden olduğu için bu türün tespit edildiği hastalara sistemik tedavi başlanılmalıdır[8,9,10,11]. Bu yüzden Kutanöz Leyişmanyoz olgularının tedavisinde tür tayini yapılması önemlidir.

Son yıllarda Kutanöz Leyişmanyoz olgularına neden olan türleri tanımlamak için moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında Kutanöz Leyişmanyoz etkenleri olan *Leishmania tropica* ve *Leishmania major'* e ek olarak *Leishmania*

infantum'un da Kutanöz Leyişmanyoz'a neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışma ile hem bölgemizdeki bu tür olguların varlığını saptmak hem de klasik metodlarla tanısı konulan ya da konulamayan Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli hastalarda Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) –Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizimi (RFLP) yöntemi ile hastalığa neden olan *Leishmania* türlerinin tanımlanması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Antartika dışında bütün kıtalarda yayılım gösteren leyişmanyoz, vektör aracılığı ile bulaştırılan zoonotik-antroponotik karakterli bir protozoon paraziter enfeksiyon hastalığıdır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* parazitleri ilk kez William B.Leishman tarafından 1901 yılında saptanmış ve isimlendirilmiştir. Morfolojik açıdan farklı olmayan çeşitli *Leishmania* türleri; göreceli olarak daha az öneme sahip öldürücü olmayan ve kendiliğinden iyileşebilen deri enfeksiyonlarından, iç organları tutan ve epidemilerle binlerce kişinin ölümüne neden olabilen sistemik enfeksiyona yol açmaktadır[12].

2.1. LEİSHMANİA

Leishmania, protozoanların *Mastigophara* alt şubesinde bulunan *Tryponosomatidae* ailesinde yer alan, insanların kan ve dokularında yerleşerek leyişmanyoz enfeksiyonuna neden olan kamçılı bir parazittir. İnsanlarda ve diğer omurgalılarda 21 *Leishmania* türü Leyişmanyoz enfeksiyonunu oluşturmaktadır. Bu farklı türler morfolojik olarak ayırt edilememektedir. Ancak izoenzim analizleri, monoklonal antikorlar ve PCR'a dayalı moleküler yöntemler kullanılarak *Leishmania* varlığı gösterilmekle beraber tür tayini de yapılmaktadır[2].

Dünya Sağlık Örgütünce *Leishmania* türleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır[1].

Alem: Protista

Altalem: Protozoa

Şube: Sarcomastigophora

Altşube: Mastigophora

Sınıf: Zoomastigophora

Ordu: Kinetoplastida

Aile: Tryponosomatidae

Cins: *Crithidia, Endotrypanum, Blastocrithidia, Herpetomonas, Leptomonas, Phytomonas*

Cins: *Leishmania*

Altcins: *Leishmania*

Tür: *Leishmania donovani, Leishmania infantum, Leishmania chagasi, Leishmnia tropica, Leishmnia major, Leishmania aetropica,*

Leishmania mexicana (L.mexicana, L.amazoensis, L.venezuelensis, L.pifanoi, L.enriettii)

Altcins: *Viannia*

Tür: *Leishmania braziliensis kompleksi (L.braziliensis, L.colombiensis, L.equatorensis, L.peruviana)*

Leishmania guyanensis (L.guyanenesis, L.panamensis, L.shawi),

Leishmania lainsoni, Leishmania naiffi[1].

2.1.1. LEİSHMANİA'NIN MORFOLOJİSİ

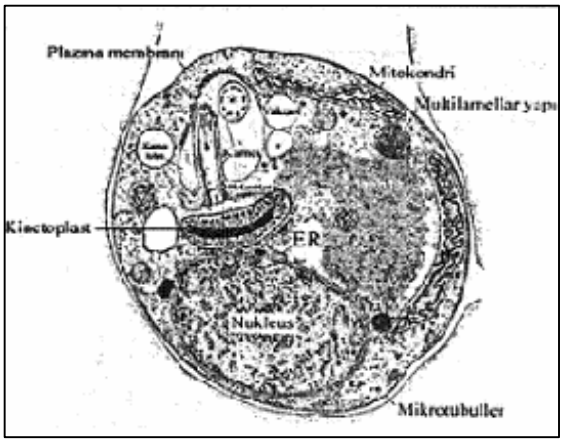
Leishmania cinsine ait türlerin yaşam evrelerinde morfolojik olarak, memeli konakta görülen "amastigot" ve vektörde görülen ''promastigot" şekli olmak üzere iki farklı şekli bulunmaktadır[3].

Leishmania'nın omurgalı vücudunda bulunan amastigot yani kamçısız şekli 2-4 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlak görünüme sahiptir. Amastigotlar genellikle monositler, polimorf çekirdekli lökositler ve endotel hücreler içinde, bazen kümeler halinde bulunur; bu hücrelerin parçalanmasından dolayı bu hücrelerin dışında tek tek görülebilir. Amastigot formundaki bir *Leishmania*'nın sitoplazmasında arka uca yakın büyük bir nükleus ve nükleusa bitişik kinetoplast bulunmaktadır. Sitoplazmada ayrıca vakuoller, nokta şeklinde bir bleforablast (kamçı kökü) ve bleforablasttan çıkıp ön kısımda sonlanan bir aksonem (kamçının sitoplazmada kalan kısmı) bulunmakta, ancak kamçı hücre dışına serbest olarak çıkamamaktadır. Bütün *Leishmania* türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondrium yer almakta, golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktiviteleri ile parazitin beslenmesine yardımcı olmaktadırlar **(Şekil.1.1 – Şekil.1.2)**[2,3,5].

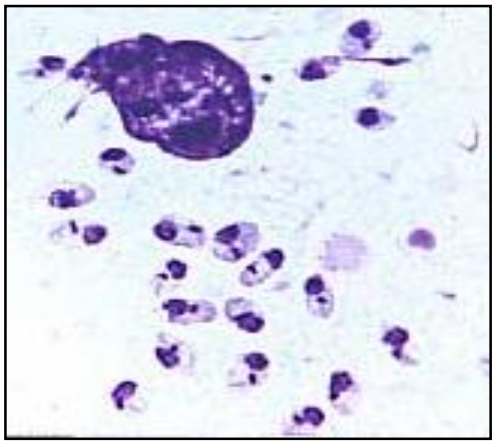
Leishmania'nın omurgasız vücudunda bulunan promastigot yani kamçılı şekli 15-20 µm boyunda, 1.5-5 µm genişlikte mekik şeklinde olup vektörde 27^0C'de uzunlamasına bölünerek çoğalmaktadır. Ön uçtan çıkan 18-20 mikron uzunluğunda serbest bir kamçısı ve kamçı kökünde yerleşmiş 9 çift periferik ve 1 çift merkezi liften oluşmuş bir aksonemi bulunmaktadır **(Şekil.1.3-Şekil.1.4)**. Kinetoplastın ön kısmında ve kamçının dip kısmında bleforoblast bulunmaktadır. Ön uçta yuvarlak veya at nalı

şeklinde bir kinetoplast, merkezi bir nukleus, nukleolus ve nukleus membranında da porlar bulunmaktadır. Ayrıca sitoplazma içinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır **(Şekil 1.3)**[5]**.**

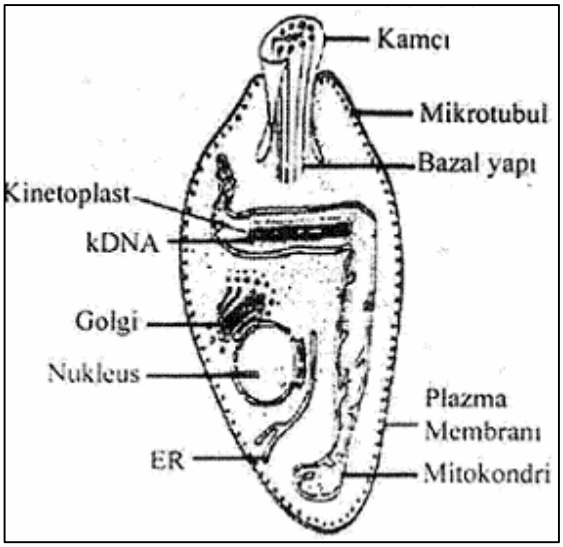
Şekil.1.1.*Leishmania* amastigot morfolojisi.



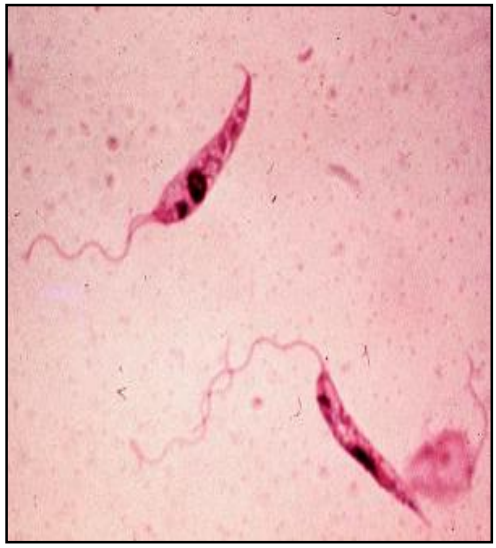
Şekil.1.2.*Leishmania* spp.amastigotları



Şekil.1.3.*Leishmania* promastigot morfolojisi[2]**.**



Şekil.1.4.*Leishmania* spp. Promastigotları



2.1.2. LEİSHMANİA'NIN MOLEKÜLER YAPISI

Leishmania'nın amastigot ve promastigot formlarında 2-4 nm genişliğinde, üç tabaka görünümünde plazma membranı ve bunun hemen altında da 20-22 nm subpelliküler mikrotübüller uzanmaktadır. Subpelliküler mikrotübüllerin sayıları, kalınlıkları, birbirinden uzaklıkları türlere göre değiştiği için Leishmania türlerinin ayrımında da kullanılmaktadır. Örn: *L.mexicana'da* 150-200; *L.donovani'de* 80-120; *L.tropica'da* ise 80-115 arasında mikrotübül bulunmaktadır[2].

Leishmania promastigotlarında ince, uzun, ip gibi, dışı hücre mebranından daha yapılı bir kılıf ile kaplı bir kamçı bulunmaktadır. Kamçı 200 nm kalınlığındadır ve parazitin boyundan daha uzundur[13].

Leishmania parazitinin ön kısmına yakın oval, 7 nm kalınlığında iki membrandan oluşmuş bir nükleusu bulunmaktadır. Membran üzerinde 80-90 nm çapında porlar bulunmaktadır. Parazitte bütün organizmayı saran büyük bir mitokondri vardır[2].

Leishmania parazitinde bulunan endoplazmik retikulumun (ER) hem düz hem de granüllü tipleri bulunmakta ve nükleusun etrafında yer almaktadır. Ribozomlar serbest halde, lizozomlar kamçı rezervuarı ile nükleus arasında ve golgi aygıtı kinetoplast ve nükleusa yakın bir yerde bulunmaktadır[2,13].

Leishmania türlerinin hepsinde kamçının bazal kısmında yerleşmiş kinetoplast adı verilen bir organel vardır. Kinetoplast büyük daire (maxicircle) ve küçük daire (minicircle) adı verilen iki gruptan oluşmuş bir DNA şebekesi içermektedir. Maxicircle, 20-35 kb büyüklüğünde, homojen dairesel DNA molekülüdür. Minicircle ise bunun tam tersine 0,5-1,5 kb kalınlığında heterojendir[13].

Leishmania kinetoplastalrındaki minicircle yapısı türden türe değişmektedir. Genellikle her minicircle 200 bp'lik 3 sabit bloktan oluşan korunmuş bir bölgeye sahiptir. Bu bölge "CSB (Conversed Sequence Block) 1-3" olarak adlandırılmaktadır. Adenin ve Timin bazları açısından zengin olan minicircle'ın geri kalan kısmını ise çok değişken olan RNA geni oluşturmaktadır[14].

2.1.3.LEİSHMANİA'NIN YAŞAM DÖNGÜSÜ

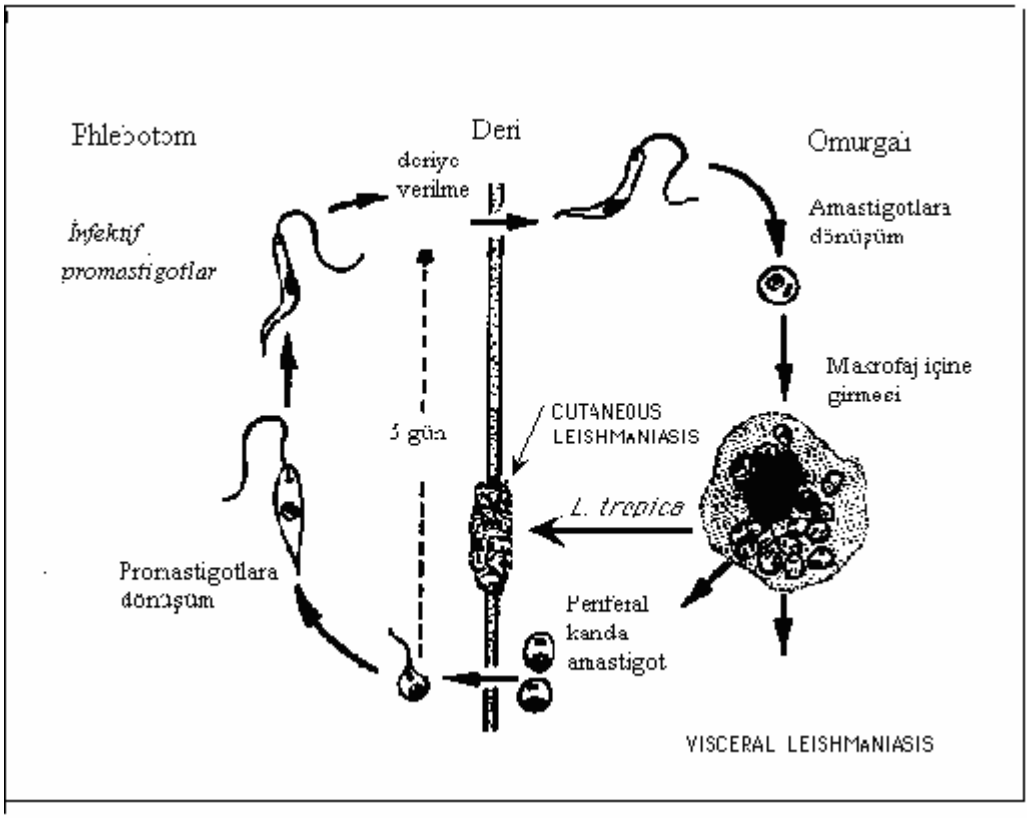
Leishmania türleri vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar, leyişmanyozlu bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan parazitin amastigot şeklini almaktadır. Emilen kan, orta midede "peritrofik membran'' adı verilen bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri ile bu membran içine salgılanmaktadır. *Leishmania*'ların bir kısmı makrofajların lizis olması esnasında sindirilirken kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot şekline dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlamaktadır[2].

Tatarcıkların kan emmesinden 1 saat sonra, abdominal midede amastigotlar, 12-24 saat sonra abdominal midenin peritrof zarının içinde promastigotlar görülmektedir. Nektomonadlar midede 36- 48 saat sonra, 3. günde torasik midede haptomonadlar, 6. günde bütün sindirim kanalında promastigotlar görülmeye başlar, 14. güne kadar gittikçe artar[15].

Enfektif promastigotları barındıran vektör tatarcık, kan emmek için bir omurgalı konağı soktuğu zaman belli bir miktardaki promastigotları da gidiş yönü kan akımının aksine olduğu halde inoküle etmemektedir. Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerdeki serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosite edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedirler. Enfekte hücre parazitin sayıca çoğalması sonucu parçalanmakta ve amastigotlar dağılmaktadırlar. Daha sonra bu amastigotlar tekrar diğer makrofajları enfekte edebilmektedirler[2,4].

Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabilmektedir (Ör; *L.tropica*) veya iç organlara göç edebilmektedir (Ör; *L.infantum*). Enfekte makrofajalar kan yoluyla deriden öncelikle dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere neden olmaktadırlar. Ancak bu hareket parazitle karşılaşan konağın immun sisteminin durumuna göre değişiklikler gösterebilmekte ve parazitler türüne uygun olmayan yerlere de göç edebilmektedirler. Bu durum türlerin visserotropizm/dermatropizm karakterlerine bağlı olarak meydana gelmektedir **(Şekil 2)[2].**

Şekil.2. Leishmania'nın yaşam döngüsü[16]



2.2.LEYİŞMANYOZ

Leyişmanyoz, *Leishmania* cinsi zorunlu hücre içi protozoonların neden olduğu farklı klinik belirtilerle ortaya çıkan hastalıkların genel adlandırılmasıdır. Parazit yaşamını sürdürebilmek için omurgalı ve omurgasız konaklara gereksinim duyar. İnsan, köpek, kemirgen, sırtlan, kobay gibi omurgalı canlılarda amastigot şeklinde bulunurken, omurgasız konağı olan *Phlebotomus* (tatarcık) ve *Lutzomyia* cinsi kum sineklerinde ve kültür ortamlarında promastigot şeklinde bulunurlar[16].

Leyişmanyozda klinik olarak beş faklı tablo ortaya çıkmaktadır[2]:

1. Visseral leyişmanyoz [VL, Kala azar, iç organlar leyişmanyozu, kara hastalık, dum dum fever (kara humma), öldüren ateş, tropikal splenomegali],
2. Kutanöz leyişmanyoz [KL, LCL (lokal kutanöz leyişmanyoz), deri leyişmanyozu, kutanöz leyişmanyoz, şark çıbanı, güzellik çıbanı, Halep çıbanı],
3. Mukokutanöz leyişmanyoz (MKL).
4. Diffüz (yaygın) kutanöz leyişmanyoz

5.Post Kala Azar dermal leyişmanyoz (PKDL) de şeklinde sınıflandırılmıştır[2].

Leyişmanyoz ekoepidemiyolojik açıdan sadece insandan-insana bulaşımı niteleyen ‘’Antroponotik Kutanöz Leyişmanyoz (AKL), hayvandan insana bulaşımı niteleyen Zootonotik Kutanöz Leyişmanyoz (ZKL) ve Zoonotik Visseral Leyişmanyoz (ZVL) olarakta ayrılabilmektedir[2].

2.3.KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ

Kutanöz Leyişmanyoz (şark çıbanı, Antep çıbanı, Halep çıbanı, Delphi çıbanı, Yıl çıbanı, güzellik çıbanı) genellikle deriyi ve bazen de deri ve mukozoları tutan ve iz (skar) bırakarak iyileşen lezyonlar ile karakterize bir deri hastalığıdır[3,17].

Kutanöz Leyişmanyoz, dişi tatarcığın kan emdiği yerde küçük, sert ve kaşıntılı bir papül şeklinde başlar, zamanla çevresi kızarır, 3–4 ay içinde etrafı sert ve kabarık üzeri kabuklu, hafif sızıntılı bir yara şekline dönüşür. Yaranın üzerindeki kabuk kanatılmadan kaldırılırsa alt yüzeyinde sivri bir takım çıkıntılar olduğu görülür ki buna “Hulusi Behçet’in çivi belirtisi” denir. Yavaş büyüyen ve 2–3 cm çapına gelen yaraya, bakteri enfeksiyonu eklenirse ateş, titreme gibi belirtiler görülür. Bu tip yarada, komplikasyonlar olmazsa ağrı yoktur ve zaman içinde pigmentsiz bir yara (skar) bırakarak iyileşirse de izin etrafında büzülmeler ve yaranın yerine göre bazı şekil bozuklukları gözlenebilir. Kutanöz Leyişmanyoz klinik olarak birçok deri hastalıklarını taklit edebilir. Örneğin akne, kan çıbanı, ekzama, lupus eritromatozus, lupus vulgaris, tuberculosis verrucosus, çeşitli frengi belirtileri, leptomlu lepra, yumuşak yara, psoriasis ve deri ur belirtilerine benzemektedir[3,4].

Dünya sağlık örgütünün verilerine göre her yıl 1,5 milyon insan Kutanöz Leyişmanyoz enfeksiyonuna yakalanmaktadır. Bu enfeksiyonların %90’dan fazlası Eski Dünya ülkelerinde; Afganistan, Cezayir, İran, Irak, Brazilya, Peru, Sudi Arabistan ve Suriye’de görülmektedir[18].

Leishmania tropica, Leishmania major, Leishmania aethiopica ve *L. infantum* Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyozuna yol açarken *L. brasiliensis, L. panamensis, L. peruviana* Yeni Dünya Leyişmanyozuna neden olmaktadırlar. Ayrıca *L. braziliensis* mukozaları da tutabilmekte ve Mukokutanöz Leyişmanyoz’a neden olmaktadır **(Çizelge 1)**[17,18].

Çizelge .1: *Leishmania* türleri ve neden oldukları hastalıklar[17].

HASTALIK	LEİSHMANİA TÜRLERİ	COĞRAFİK DAĞILIMI
Kutanöz Leyişmanyoz	*L.tropica kompleks*	Eski Dünya
	L.tropica	
	L.aethiopica	
	L.major	
	L.mexicana kompleks	Yeni Dünya
	L.mexicana	
	L.pifanoi	
	L.amozonensis	
	L.garnhami	
	L.venezuelensis	
	L.braziliensis kompleks	Yeni Dünya
	L.peruviana	
	L.guyanensis	
	L.panamensis	
	L.lainsoni	
	L.colombiensis	
	L.infantum	Eski Dünya
	L.chagasi	Yeni Dünya
Mukokutanöz Leyişmanyoz	*L.braziliensis kompleks*	Yeni Dünya
	L.braziliensis	
	L.guyanensis	
	L.panamensis	Yeni Dünya
	L.mexicana	Eski Dünya
	L.tropica	Eski Dünya
	L.major	
Visseral Leyişmanyoz	*L.donovani kompleks*	
	L.donovani	Eski Dünya
	L.infantum	Eski Dünya
	L.chagasi	Yeni Dünya
	L.tropica	Eski Dünya
	L.amazonensis	Yeni Dünya

2.3.1.ESKİ DÜNYA KUTANÖZ LEYİŞMANYOZU

Leishmania tropica, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* ve *Leishmania infantum* Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una neden olmaktadır[17].

Leishmania tropica enfeksiyonu kentlere yerleşik, insandan insana *Phlebotomus sergenti* ve *Phlebotomus papatasii* ile bulaştığı için ve başka rezervuarı olmadığı için "Antroponotik Kutanöz Leyişmanyoz''(AKL) olarak adlandırılmaktadır. *Leishmania tropica*'nın neden olduğu lezyonlar, ısırma yerinde kırmızı, küçük ağrısız bir papül halinde başlar. Papülün dibi kanlanmış görünür. Bazı hallerde papül düz fakat üzeri pullu halde kalır. Çoğunlukla yavaş yavaş büyür, çevresine yayılır, tüberkül veya nodül haline geçer[2,3,17].

Bazı ülserler çıplak olarak kalırlar ve ek enfeksiyonlara tutunabilirler. Lezyonlar genellikle 1 cm çapında olabilirler bazen daha büyük veya ufak olabilirler. Limfanjit ve piyodermitler gibi enfeksiyonlar eklenmezse lezyon ağrısızdır ve komşu limf bezlerini şişirmez. Birkaç ay sonra granülasyon dokusunun belirmesiyle şifa başlar ve genellikle 9-12. aylar arasında iz bırakarak iyi olur[3].

Leishmania major enfeksiyonu; kırsal bölgelerde daha fazla görülmektedir. Kuluçka dönemi dört aydan azdır ve lezyon genellikle bacaklarda görülür. *Leishmania,* ısırma yerinde ıslak, ülser benzeri bir deri lezyonuna sebep olmakta, papülle başlayan enfeksiyon hızlı akut bir seyir ile 1-3 hafta içinde etrafı iltihaplı olan bir ülsere dönüşmektedir. *L. tropica*, *Psammomys obesus* (İsrail), *Meriones crassus* (İsrail), *Meriones libycus* (İran), *Meriones sacramenti* (Mısır), *Rhombomys opimus* (İran), *Meriones sacramenti* (Mısır), *Rhombomys opimus* (İran) türü küçük kemirgenler, köpekler ve insanlarda diğer konaklara *Phlebotomus papatasi* türü vektör tatarcıklar ile bulaştığı için "Zoonotik Kutanöz Leyişmanyoz (ZKL) olarak adlandırılmıştır[19].

Leishmania infantum, Eski Dünya ülkelerinde sporadik Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olarak bildirilmektedir. Genellikle 0.5–1 cm çapında küçük ve tek ülsere bir lezyon oluşturmakta ve sıklıkla yüzde yerleşmektedir[20].

Leishmania aetropica enfeksiyonu, bazen deri, bazen muhant zarı bazen ise yaygın deri leyişmanyozları şeklinde kendini gösterir. Genellikle lezyonlar ağızda ve burunda görülmektedir. Lezyonlar çok yavaş gelişmekte, ülserasyon çok geç oluşmakta veya hiç olmamaktadır. İyileşme 1-3 yıl veya daha fazla sürebilmektedir[2,3].

2.3.2.YENİ DÜNYA KUTANÖZ LEYİŞMANYOZU

Leishmania braziliensis, Leishmania mexicana, Leishmani amazoensis, Leishmania guyanensis, Leishmania panamensis, Leishmania peruviana Yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyozuna neden olmaktadır[17].

Leishmania braziliensis ile oluşan hastalığa "Espundia'' adı verilmektedir. Metastatik lezyon, burun ve ağız mukozasını tutarak kıkırdak ve yumuşak dokuların harabiyeti ve şekil değiştirmelerine neden olmaktadır[3].

Leishmania mexicana enfeksiyonunda ağrısız lezyon genelde birkaç ayda iyileştirmektedir. Genelde lezyon tektir ve yaklaşık %60'ı kulak yerleşimlidir. Eğer vektör, kulak kepçesinden ısırırsa "Siklero yarası (Chiclero's Ulcer)'' adı verilen kronik lezyon ile sonuçlanmaktadır. Çünkü kulak kepçesinin kıkırdağında damarlanma az olduğu için bağışık yanıt zayıftır ve olguların %40'ında kulak kepçesi kaybedilmektedir[2].

Leishmania guyanensis enfeksiyonu; bütün vücutta, açık, sızıntılı ve düzleşmiş ülserli plaklar halinde bulunmaktadır. Bu enfeksiyona Uruguay ve Venezuela'da "pian bois''denilmektedir. Çok sık olarak mantar enfeksiyonları ile karşılaştırılmaktadır ve yanlış tanı almaktadır[21].

Leishmania amazonensis tek ya da çok sayıda ve nadiren kendiliğinden iyileşen lezyonlara neden olur. Orman kemirgenlerinde enfeksiyon yaygın olarak bulunmakta insanlar daha az enfekte olmaktadır[17].

Leishmania peruviana enfeksiyonu tek veya birkaç ağrısız lezyon şeklinde kendini göstermektedir. 4–5 ay içerisinde kendiliğinden iyileşmektedir ve bu enfeksiyona "uta'' adı verilmektedir[2,3].

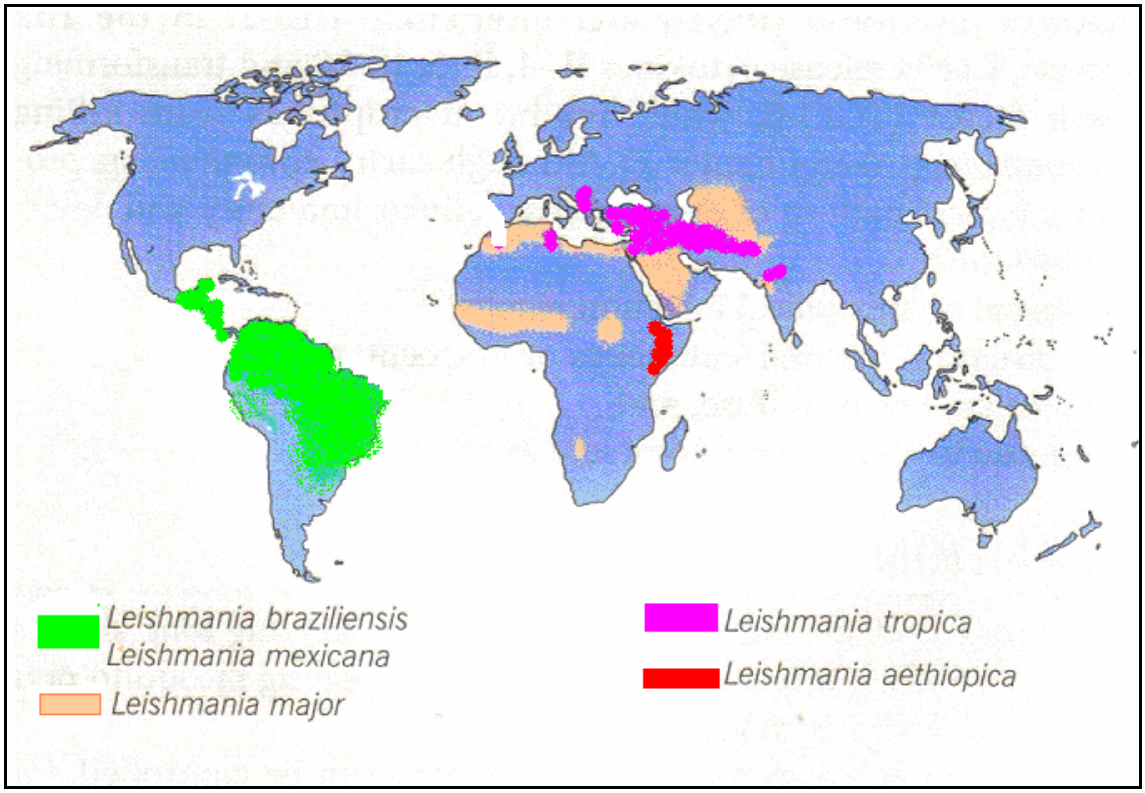
Leishmania panamensis, kendiliğinden iyileşemeyen ülserli lezyonlara sebep olmaktadır. Rezervuarı köpekler ve maymunlardır. *Leishmania venezuelensis,* genellikle tek ağrısız nodüler lezyonlara sebep olmaktadır. *Leishmania garnhami* genellikle altı ayda kendiliğinde iyileşebilen tek veya çok sayıda lezyonlara neden olmaktadır[2].

2.4.KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ EPİDEMİYOLOJİSİ

Kutanöz Leyişmanyoz'a ait bildirimler 9. yüzyıla kadar gitmekte olduğu halde bugün 21. yüzyılda hala bir dünya sağlık sorunu olarak karşımızda durmaktadır. Her yıl 1.5 milyon yeni olgu olduğu tahmin edilmekte, bunların 300 bini resmi olarak bildirilmektedir. Yeni olguların %90'ı Afganistan, Cezayir, Irak, Suriye, İran, Suudi Arabistan, Brezilya ve Peru'da rapor edilmektedir **(Şekil 3)**[22,23].

Akdeniz havzası, Orta Doğu, Pakistan ve Hindistan'ın bir kısmındaki şehirlerde Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una *L.tropica*; Orta Asya, Güney Rusya, Orta Doğu ve Afrika'da kuru çöl bölgelerindeki kırsal alanlardaki Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una ise *L.major* ve sporadik olarak *L. infantum* sebep olmaktadır. Meksika ve Güney Amerika'da görülen Yeni Dünya Leyişmanyoz'una ise *L.brazilensis* ve *L.mexicana* sebep olmaktadır[1].

Şekil.3. Kutanöz Leyişmanyoz olgularının dağılımı[24].



2.5. KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ'UN TÜRKİYEDEKİ DAĞILIMI

Türkiye'deki *L.tropica'nın* etken olduğu antroponik Kutanöz Leyişmanyoz zaman zaman epidemilerle karakterize olacak şekilde 1833 yılından beri bildirilmektedir. 1950'li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesinde olmak üzere Türkiye'nin endemik bir bölge olduğu 1950'den sonra sıtma kontrolünde kullanılan DDT nedeniyle azaldığı ancak 1960'dan sonra sıtma kontrol çalışmalarındaki yetersizlik sonucu tekrar olgu sayısının arttığı bildirilmektedir. Türkiye'de 1988–1999 yılları arasında bildirilen toplam olgu sayısı 27.960'dır[2].

Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde Şanlıurfa ilimiz bu hastalığın görüldüğü başlıca bölgedir. Güneydoğu Anadolu dışında kutanöz leyişmanyoz 1980'lerden sonra daha önceleri son derece nadir olguların görüldüğü Çukurova gibi yerlerde endemik bir durum gösterirken, daha önceleri son derece nadir olguların bildirildiği Ege, Marmara, Orta Anadolu, Batı Akdeniz gibi bölgelerimizde de düzenli olarak olguların görüldüğü yerler haline gelmiştir[2,3,4].

2.6.KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ'DA BAĞIŞIKLIK

İnsanlarda deri ve deri-muhat zarları leyişmanyozuna karşı bir doğa direnci yoktur. Bununla birlikte hastalıkların endemik oldukları bölgelerde söz gelimi Kutanöz Leyişmanyoz geçirmeyen insanlarda rastlanır. Yaşın ve cinsiyetin etkisi yoktur. Bununla birlikte enfeksiyon genellikle çocuklarda görülür[4].

Kutanöz Leyişmanyoz iyileştikten sonra kişilerde yaşam boyu süren kalıcı bir bağışıklık gelişir. Bu bağışıklık türe özgüdür ve bir türe bağışık olanlar diğer türe duyarlıdır. Bundan dolayı *L.donovani* enfeksiyonu *L.tropica* enfeksiyonuna karşı bağışıklık vermez, yalnız *L.major'*un *L.tropica'*ya karşı bağışıklık verebildiği, fakat *L.tropica'* nın bunu yapamadığı yine *L.braziliensis* ile *L.mexicana* arasında böyle bir ilişki olduğu kabul edilmektedir[25].

2.7.KUTANÖZ LEYİŞMANYOZDA TEDAVİ

Kutanöz Leyişmanyoz tedavisinde, leishmania türü, leyişmanyozun kliniği, lezyonun yeri, şiddeti, sayısı ve kişinin immun durumuna bağlı olarak, sistemik ilaç tedavisi, intralezyoner tedavi, topikal tedavi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmalıdır[6].

Farklı türlere bağlı lezyonlar klinik seyir ve tedaviye cevap açısından da farklılık gösterir. *L.tropica* ve *L.major* 'un etken olduğu kutanöz leyişmanyozda koruyucu immünite gelişir, tedavi edilmeksizin spontan iyileşme gerçekleşebilir. Bu yüzden bu türlerin enfeksiyonlarında ilaç kullanılmaksızın özellikle endemik bölgelerde takibi yeterli olabilmektedir. İyileşmenin bir yıl ya da daha fazla süre alabilmesi nedeni ile özellikle endemik bölgelerde iyileşme süresinin azaltılması amacı ile lezyonun tedavi edilmesi önerilmektedir. *L.mexicana* ve *L.braziliensis'in* neden olduğu kutanöz leyişmanyoz daha ciddi ve daha uzun sürelidir. *L.braziliensis* türü mukokütanöz hastalığına neden olduğu için bu türün tespit edildiği hastalara sistemik tedavi başlanılmalıdır[8,9,10,11].

Kutanöz Leyişmanyoz'unda tedaviye başlamadan önce yaranın ikincil bakteri ile enfekte olup olmadığı saptanmalıdır. Eğer varsa antimon bileşiklerine ek olarak antibiyotik ve antifungal ilaçların da tedaviye eklenmesi gereklidir. Kullanılan ilaçlar lezyon içine veya eğer lezyonun yeri içine enjeksiyon yapmaya uygun değilse veya fazla sayıda lezyon varsa kas içine uygulama tercih edilmektedir[8,26].

Kutanöz Leyişmanyoz standart tedavisinde Pentavalan antimon bileşikleri ilk tercih edilecek ilaçtır. Meglumin antimoniat ve sodium stiboglukonat olarak iki ayrı preparat kullanılır. Bunlara ek liposomal Amfoterisin B, ketokonazol, allopurinol kullanılır. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında lezyonun özelliliğine göre intralezyoner, sistemik ilaç tedavisi, topikal tedavi ve ya fiziksel yöntemler tercih edilebilir[8,26].

2.7.1.İntralezyoner Tedavi

İntralezyoner enjeksiyon, enfekte lezyonun içerisine yüksek konsantrasyonda sodyum stiboglukonat veya meglunim antimoniat şeklindeki antimon bileşiklerinin verilmesidir. Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'un endemik olduğu bölgelerde,

lezyonun az sayıda özellikle yeni, basit olduğu durumda, lezyonun eklem hareketlerini kısıtlamayacak veya estetik açıdan risk taşımayan vücut bölgelerinde olduğunda ve lokal lenf nodu tutulumunun olmadığı lezyonlarda intralezyoner tedavi tercih edilmektedir[8,9].

2.7.2.Sistemik İlaç Tedavisi

Sistemik tedavide ilk tercih edilen ilaç pentavalan antimoniyallerdir. Yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'unda 20 mg/kg/gün dozunda 20 gün uygulanan sistemik Sb^v tedavisi olguların %90'ında iyileşme sağlamaktadır. Antimon bileşiklerinin etkisiz olduğu durumlarda ikinci tercih edilen ilaç amfoterisib B'dir. Bu ilaç dozu 1.5-2 g olacak şekilde gün aşrı 0,5-1 mg/kg olarak uygulanır. Multipl, yaygını dirençli, lenfajitle birlikte sereden veya mukozal tutulumun olduğu lezyonlarda sistemik ilaç tedavisi tercih edilir[27].

2.7.3.Topikal Tedavi

Paromomisin pomadın (Beyaz yumuşak parafin içinde %15 paromomisin, %12 metil benzetonyum klorid) 10 gün boyunca günde iki kez uygulandığında *L.tropica* ve *L.mexicana* için etkilidir[8,9].

2.7.4.Fiziksel Yöntemler

Keskin bir alet vaya koterizasyon ile lezyonun kazınması çok eski yıllardan beri uygulanan bir tedavi yöntemidir. Ancak bu metodların tekrarlama olasılıkları yüksektir. Kritoterapi, scak uygulama, radyoterapi, lazer, küretaj ve cerrahi eksizyon Kutanöz Leyişmanyoz'da ugulanan diğer fiziksel yöntemlerdir[28].

2.8. KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ OLGULARINDA KLİNİK TANI

Sağlık bakanlığı'nın organizasyonunda Parazitoloji ve Dermatoloji uzmanları tarafından hazırlanan ''Kutanöz Leyişmanyoz (KL) Olguların'da Tanısal Yaklaşım'ın aşamaları aşağıdaki şekildedir[2,29]:

1. Genellikle vücudun giysi ile örtülmeyen açık olan kısımlarındaki deriye lokalize,
2. Uzun süredir (en az 1 ay) iyileşmeyen,
3. Sekonder olarak bakterilerle enfekte olmadıkça ağrısız,
4. Eritemli papül, nodül, nodülo-ülseratif, plak, ülsere plak şeklinde lezyon
5. Ülserleşmiş lezyonların üzerinde alta sıkıca yapışık krutlu, kenarları lastik silgi kıvamında endürasyon gösteren (merkezi krateri olan volkan biçiminde) lezyon,
6. Lezyonlar yaz aylarında ve geceleri aktif olan tatarcık sineğinin beslenmek için kan emdiği deri bölgesinde, 4-8 aylık inkübasyon döneminden sonra ortaya çıkan, ağrısız, eritemli bir papül şeklinde başlar. Lezyon, 1–2 ay içerisinde giderek büyüyerek 1-2 cm çaplı nodüle dönüşür. Nodüler lezyon zaman içerisinde merkezden ülserleşerek krutla kaplanır. Tedavisiz olgularda lezyon doğal seyri genellikle 1–1.5 yıllık süreç içerisinde ömür boyu süren depresif skar bırakarak iyileşir. İyileşmeden sonra kişiyi ömür boyu reenfeksiyonlara karşı koruyan doğal bir bağışıklık gelişir.
7.Endemik olmayan bölgelerde de yukarıdaki klinik tanımlamaya uyan lezyona sahip olgularda, özellikle yaz aylarında endemik bölgelere (Örneğin, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgesine) seyahat öyküsü açısından ayrıntılı anamnez alınmalıdır[2,29].

2.9. KUTANÖZ LEYİŞMANYOZ OLGULARINDA LABORATUAR TANISI

Kutanöz Leyişmanyoz klinik olarak birçok deri hastalıklarını taklit edebilir. Akneye, kan çıbanına, ekzamaya, lupus eritromatozusa, lupus vulgarise, tuberculosis verrucosusa, çeşitli frengi belirtilerine, leptomlu lepraya, yumuşak yaraya, psoriasise, deri urlarına benzeyen şekiller olabilir. Kutanöz leyişmanyoz deri tüberkülozu lezyonu üzerinde gelişebilir veya deri urlarına benzeyen şekiller olabilir. Kutanöz Leyişmanyoz

deri tüberkülozu lezyonu üzerine gelişebilir veya deri leyişmanyozu üzerinde lupus vulgaris oluşabilir[4].

Bu yüzden Kutanöz Leyişmanyoz tanısıyla uyumlu her olgu laboratuar tanısı ile doğrulanmalıdır. Laboratuar tanısı olarak sıklıkla mikroskobik bakı (smear) veya kültür yöntemleri yapılmaktadır. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında kullanılan laboratuar tanı yöntemlerinin karşılaştırılması Çizelge 2'de gösterilmektedir.

Çizelge.2. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında kullanılan laboratuar tanı yöntemlerinin karşılaştırılması[30,31].

Yöntem	**Avantajlar**	**Dezavantajlar**
Direk mikroskobi	-Basit -Direk yöntem -Maliyeti düşük	-Parazit sayısı yüksek olmadığında düşük duyarlılık göstermesi -Benzer yapıdaki organizmaları ayırt edilememesi -Deneyimli personele gereksinim
Serolojik yöntemler	-Basit ve hızlı -Çok sayıda örneğin incelenmesine elverişli	-Standardize ayıraçların gerekliliği -Aktif ve geçirilmiş yada latent enfeksiyonun ayırt edilememesi -Düşük özgüllük
Kültür Yöntemleri	-Canlı parazitlerin saptanabilmesi	-Pahalı ve yavaş -Örnekde parazitlerin canlılığının sürdürülmesi gerekli -Türler arasında varyasyonların saptanması
Moleküler Yöntemler	-Doğrudan parazitin türünün araştırılması ve ayrımı -Canlı-cansız her paraziti tanıyabilmesi -Parazit sayısı düşük olduğunda bile yüksek duyarlılık göstermesi	-Çok aşamalı ve pahalı -İnhibitörler ve kontaminasyon nedeniyle olası negatiflik

2.9.1.DİREKT MİKROSKOBİ

Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyonun kenarından, sağlam deriyle birleştiği sınır çizgisinden alınan örneğin giemsa ile boyama sonrası, mikroskopta 100'lük imersiyon objektifte incelenmesinde hücre dışında veya içinde parazitin görülmesi mümkün olmaktadır.

Leyişmanyozun bütün şekillerinde olduğu gibi Kutanöz Leyişmanyoz enfeksiyonunda da mononükleer fagositik hücrelerin içinde 2–5 µm boyutundaki amastigotların varlığını saptamak oldukça güç olmaktadır. Amastigotların etrafını çeviren plazma membranı, koyu boyanan ve daha büyükçe bir çekirdek ile nisbeten küçük yine koyu boyanan ve DNA içeren çubuk şekilli kinetoplast ile ayırt edilebilmektedir[13].

2.9.2.SEROLOJİK YÖNTEMLER

Kutanöz Leyişmanyoz tanısında Floresan antikor (FA), doğrudan aglütinasyon(DA), kompleman birleşmesi ve western blot analizi gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır[2,16].

Kutanöz Leyişmanyoz'da serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için tanıda serolojik test tercih edilmemektedir. *Leishmania* 'nın deri testi (LDL) hücresel bağışıklığı göstermekte ve lezyon kabuklunmaya başlar başlamaz pozitif olmakta ve süresiz olarak öyle kalmaktadır. Ancak bu testler eski ve yeni enfeksiyonu ayırt edememektedir[2].

2.9.3.KÜLTÜR YÖNTEMLERİ

Lezyonun bulunduğu bölgeden, lezyonu kanatmadan alınan materyal N.N.N (Novy, Mac Neal, Nicole), RPMI (Media Designed at Roswell Park Memorial Institute) modifikasyonları RPMI 1629, RPMI 1630, RPMI 1640 ve Schneider'ın besiyeri başta olmak üzere çeşitli besiyerlerine ekim yapılarak amastigotların promastigotlara dönüşüp dönüşmediği kontrol edilir[2,3,4].

Genellikle N.N.N (Novy, Mac Neal, Nicole) besiyerinde 21 gün içinde, RPMI ve Schneider'ın besiyerinde 4–5 günde üreme gerçekleşmektedir[2,3].

2.9.4.MOLEKÜLER YÖNTEMLER

Son yıllarda hastalığın tanısında kinetoplast DNA'sının yapısı, antijen incelemeleriyle türlerinin tanımlanması yoluna gidilmiştir. Çeşitli moleküler yöntemler ile enfeksiyon tanımı için *Leishmania* DNA'sını bulma ve türlerin tanımlanması hedeflenmiştir. Birçok araştırmacı tarafından *Leishmania*'ya özgü olarak belirlenen primerler ile PCR amplifikasyonu yapılarak (nükleer veya minicircle kinetoplast DNA, subunit suRNA veya miniekson DNA sekansları) tür tayini tespit edilmektedir. *Leishmania* türlerini tiplendirmek için kullanılan metodlar multiplex PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), single-strand konformasyon polimorfizimi, restriksiyon fragment length polimorfizm (RFLP) ve DNA dizi analizi kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu genotipik moleküler teknikler diğer tanı yöntemlerine oranla daha güvenilir ve spesifiktir[3,6,7].

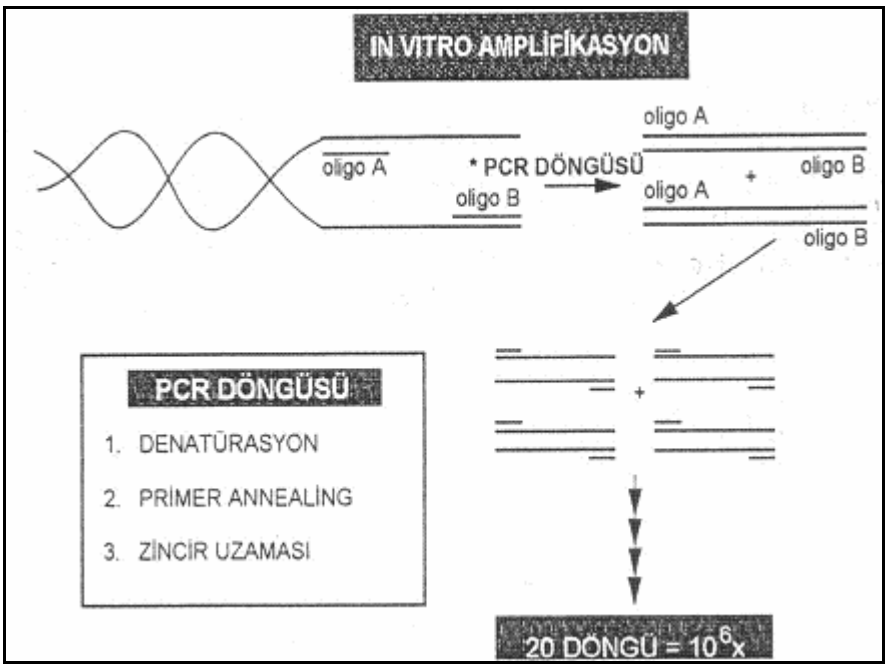
2.10.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu; dizisi bilinen iki bölge arasındaki gen parçasını in vitro koşullarda çoğaltmak için kullanılır. PCR, in vitro koşullarda genomik DNA'nın istenilen bölgesine özgü primerler kullanılarak, konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir[32].

Amplifikasyon işleminde ilk önce iki oligonükleotid (primer) ve dört deoksinükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında DNA 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. İkinci aşamada ısı 55°C–65°C arasına düşürülerek spesifik primerlerin koplementer dizilerine yapışması (annealing) gerçekleştirilir. Son aşamada 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi, ortamda bulunan deoksinükleotid trifosfatların 5'→3' yönünde eklenmesiyle zincirin uzamasını sağlar. Bu ısı değişimi döngüsünde DNA iki katına çıkmakta ve bu tekrarlanan her döngüde DNA geometrik olarak artmaktadır **(Şekil 4)**[32,33,34,35].

PCR'nin etkinliği; onun özgüllüğü, verimliliği ve doğruluğu ile ölçülür. Yüksek oranda özgül PCR, tasarlanmış hedef dizisi olan bir amplifikasyon ürünü oluşturur. Daha verimli amplifikasyon birkaç döngü ile daha çok ürün oluşturur. İdeal bir PCR, yüksek özgüllük, verim ve doğruluğa sahip olmalıdır. Çalışmalar bu üç değişkenin her biri tampon şartları, PCR döngü rejimi (Örneğin her bir basamağın ısı ve süresi) ve DNA polimerazı çeşitli PCR bileşenleri tarafından etkilenir[36].

Şekil.4.Polimeraz zincir reaksiyon[36].



2.10.1.Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri

Polimeraz zincir tepkimesinin kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı; örnek, amplifiye olacak bölgenin uzunluğu ve primerlerin dizisi tarafından belirlenir. Tepkime koşulları değişken olup en yüksek duyarlıklık için dikkatlice yönetilmeye ve en verimli hale getirilmeye gereksinim duyar. Bu nedenle en uygun koşullar aşağıda sıralanmış PCR bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır[36]:

- Enzim (Taq DNA polimeraz)
- Deoksinükleotit Trifosfatlar (dNTP)
- Magnezyum Derişimi
- Tampon

- Oligonükleotit (primer)
- Hedef Diziler
- Isılar ve Döngü Sayısı

2.10.1.1.Enzim

Taq DNA polimeraz enzimi *Thermus aquaticus'*dan elde edilmiş ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimidir. Bu enzimin değişik rekombinat tipleri üretilmiştir ve bu enzim 5'-3' polimerizasyona bağımlı ekzonükleaz etkisi taşırken 3'- 5' ekzonükleaz etkisi yoktur. PCR tepkimesinde diğer değişkenlerin elverişli olduğu koşullarda bu enzimin önerilen derişim aralığı, 100 µl'lik tepkimede 1–5 ünite arasındadır. Taq polimeraz enzim derişimi yüksek ise jel görüntüsünde özgül olmayan arka plan ürünler oluşabildiği gibi düşük olduğu durumlarda istenilen PCR tepkime ürünleri elde edilemez[34,35].

2.10.1.2.Deoksinükleotit Trifosfatları

PCR tepkimesinde hedef dizinin bileşimi ve uzunluğu için uygun en düşük dNTP derişiminde karar kılınmalıdır. Örneğin, 100 µl'lik tepkimede 20 µM'lık her bir dNTP derişimi teorik olarak 400 bç'lik bir dizinin 10 pmol'ünü ya da DNA'nın 2,6 µg'ını sentezlemek için yeterlidir. Her bir dNTP'nin 20–200 µM arasındaki derişimi verim, özgüllük ve doğruluk arasındaki en iyi denge ile sonuçlanmaktadır. PCR'nin hem özgüllüğü hemde doğruluğu düşük dNTP derişimleri kullanılarak artırılır. Düşük dNTP derişimleri hedef olmayan yörelerde hatalı kullanımı en aza indirger ve hatalı birleşmiş nükleotitlerin uzama olasılığı azaltır[36].

2.10.1.3.Magnezyum Derişimi

PCR tepkimesinde magnezyum derişimi primer yapışmasını, hem kalıp hem de PCR ürününün zincir ayrışma ısılarını, ürün özgüllüğünü, primer-dimer kalıntılarının oluşumu ile enzim etkinliğini ve doğruluğunu etkileyebilmektedir. Taq DNA polimeraz kalıp DNA, primerler ve dNTP'ler ile bağlanmışın üzerinde serbest magnezyum

gerktirmektedir. Bundan dolayı PCR'ler toplam dNTP derişiminin üzerinde 0.5–0.25 mM magnezyum içermelidir[34,35].

2.10.1.4.Tampon İçeriği

PCR için önerilen tampon 10–50 mM derişimdeki 20 ^{0}C'de PH 8,3 ile PH 8,8 arasındaki Tris HCl'dir. Tamponun içerisine primer yapışmasını kolaylaştırdığı için potasyum klorür (KCl) veya sodyum klorür (NaCl) eklenebilmektedir. NaCl ve KCl 50 mM üzerindeki derişimlerde Taq polimeraz enziminin etkisini engellemektedir. Jelatin ve Bovin serum albumin (BSA, 100 µg/ml) ve Tween 20 veya Laureth 12 (%0.05–0.1) gibi iyonik olmayan deterjanlar enzimi karalı kılmada yardımcı olurlar[35,36].

2.10.1.5.Oligonükleotitler (Primer)

Bir PCR'de başarılı bir amplifikasyon için oligonükleotitler (primerler) doğru tasarlanmalıdır. Seçilmiş primer dizilimi PCR ürününün büyüklüğü ve yerini belirlemesi yanında ürün veriminde önemli olduğu gösterilmiş bir fiziksel değişken olan amplifiye ürünün primer yapışma sıcaklığını (T_m) tanımlar. Primerin 0.1–0.5 µM arasındaki derişimi genellikle en elverişli olanıdır. Daha yüksek primer derişimleri hatalı dizilimlemeye neden olabilmektedir[35,36].

Tipik olarak primerler %50–60 Guanin+Sitosin (G+C) bileşimine sahip 18–28 baz uzunluğundaki nükleotitlerdir. Bir primer çiftinin hesaplanmış primer yapışma sıcaklığı (T_m) dengelenmiş olmalıdır. Bu amaç için pratik olarak Adenin (A) veya Timin (T) için 2^0C, Guanin (G) veya Sitosin (C) için 4^0C'lik hesaplama kullanılabilir. Uygulamaya bağlı olarak 55^0C ile 80^0C arasında T_m istenilir. Primer-dimer kalıntılarının oluşumuna neden olması ve istenilen ürün verimini azaltması nedeniyle primer çiftlerinin 3' uçlarındaki eşleşmeden sakınılmalıdır. Ayrıca primerlerin 3' uçlarında C ve G'lerin serbestçe kullanımı (3 ya da daha fazla) G+C'den zengin dizilerde hatalı dizilimlemeler oluşturulabilir. Olası ise primerler içinde palindromik diziler olmasından sakınılmalıdır[36].

2.10.1.6.Hedef Diziler

Hedef diziler doğrusal DNA'lardan çok kapalı dairesel DNA'ları da taşıdığından belirgin şekilde daha az etkin olarak amplifiye edilir. Bundan dolayı polimeraz zincir tepkimesinde kalıp olarak kullanılmadan önce plazmit DNA ları doğrusal hale getirmek istenir. Kalıp DNA'daki hedef dizilerin derişimi belirgin olarak koşullara göre değişir ve sıklıkla deneycinin kontrolü altında değildir[36].

2.10.1.7.Isılar ve Döngü Sayısı

Tipik denatürasyon koşulları 95^0C de 30 saniye veya 97^0C de 15 saniyedir. Zincir ayrışma ısısında (T_{ss}) DNA'yı denatüre etmek yalnızca birkaç saniye almakla birlikte geri kalan tepkime tüpünün iç kenarının T_{ss}'ye ulaşma zamanıdır[24].

Primer yapışması için gerekli zaman uzunluğu ve ısısı amplfikasyon primerlerinin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır. Uygulanabilir yapışma ısısı amplifikasyon primerlerinin gerçek T_m'nin 5^0C altındadır. Taq DNA polimeraz ısıların sınır aralıkları üzerinde etkin olduğundan primer uzaması yapışma basamağını da kapsayan düşük ısılarda oluşacaktır[36,37].

Polimeraz zincir tepkimesinde diğer değişkenlerin en elverişli olduğu koşullarda döngü sayısı, hedef DNA'nın başlangıç derişimlerine bağlı olacaktır. Bir tek kopya geni amplifiye etmek amacıyla 40 döngüden daha fazla döngü yapılıyor ise PCR ile ilgili bazı ciddi hatalar vardır[35].

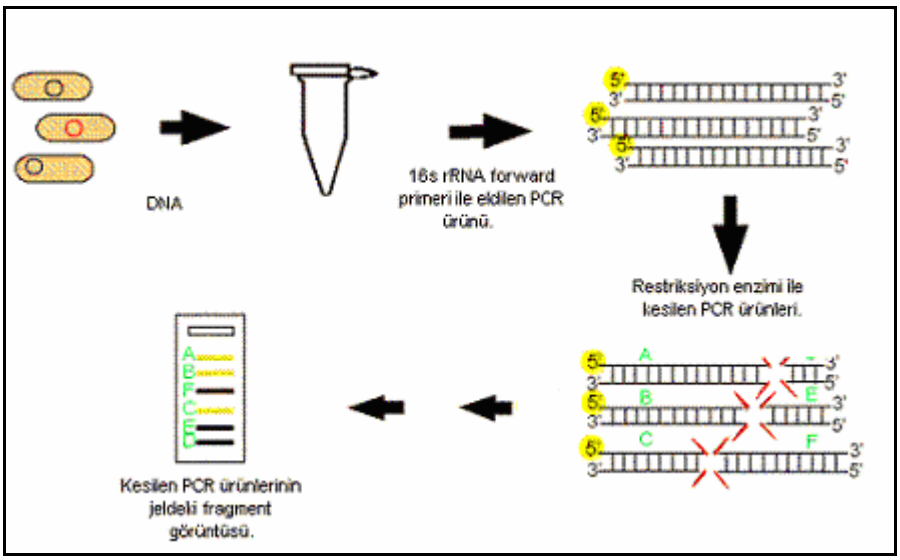
2.11. RESTRİKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZMİ (RFLP)

Restriksiyon enzimleri (RE), çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak, DNA'dan bir genin veya gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin fonksiyonları olan enzimlerdir[38] .

DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra ethidium bromid ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe "restriction fragment length polymorphism" adı verilmektedir **(Şekil.5)**[32,36].

Şimdiye kadar üç değişik tipte restriksiyon enzimine rastalanmıştır. Her tip ayrı ayrı hem kısıtlama hem de modifikasyon (metilasyon) aktivitesini beraberinde göstermektedir ve çift zincirli DNA'yı kırmaktadır. Tip 1 restriksiyon enzimlerinde; aynı protein molekülü içinde metilaz ve nükleaz aktivitesi gözlenmektedir. Tanınan dizi herhangi bir simetri göstermemektedir ve kopma bu diziden uzakta gerçekleşmektedir. Örn: EcoB için tanıma bölgesi $TGAN_8TGCT$ dizinimi olup bundan 1 b uzağını kesmektedir. Tip II restriksiyon enzimleri; diziyi tam orta nokasından ayırmaktadır. Hemen hemen hepsi homodimer yapıdadır ve alt birim molekül ağırlıkları 30–40 kDa arasında değişmektedir. Örnek: EcoRI enzimi Tip III restriksiyon enzimleri; hem endonükleaz hemde metilaz aktivitesini birlikte gösterir. ATP kullanmaz ve sadece bir DNA iplikçiğini modifiye eder. Kırılma bölgesi tanıma bölgesine çok yakındır. Örnek : EcoPI enzimi[36,38].

Şekil.5. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi[39].



2.12.LEİSHMANİA GENOTİPLERİNİN PCR İLE BELİRLENMESİ

Leishmania'nın tanısı için serolojik testler, mikroskop bakısı ve kültür yöntemleri kullanılmaktır. Ancak bu yöntemler ile morfolojik benzerliklerinden dolayı *Leishmania*'nın tür tayini yapılamamaktadır. Patojen *Leishmania* türlerinin

sınıflandırılması için izoenzim elektroforez (zimodem analiz), monoklonal antikorlar veya minicircle DNA probları gibi türe spesifik problar ile hibridizasyon yöntemleri kullanılarak çeşitli biyokimyasal, immunolojik ve moleküler metodlar kullanılmaktadır[38].

Son yıllarda *Leishmania'*nın tür tayini için PCR'a dayalı yöntemler geliştirilmiştir. *Leishmania*'nın PCR'a dayalı moleküler tanısı için yaygın olarak genomik DNA (gDNA) ve kinetoplast DNA (kDNA) kullanılmaktadır. Kültürden, insan dokusundan, tatarcıktan ve diğer omurgalı konaklardan *Leishmania*'nın PCR amplifikasyonu için SSU rRNA geni, tekrarlı dizilimler, internal trankript spacer (ITS) gen bölgesi, tubülin geni, gb63 gen lokusu, splice leader mini-exon (SLME) gibi farklı gen bölgeleri kullanılmaktadır. *Leishmania*'nın her türünde 10000'den 20000'e kadar minicircle bulunduğu için *Leishmania* tanısında kDNA ile çalışmak çok uygundur. Kutanöz Leyişmanyoz olgularında etken *Leishmania* türlerinin tanısı için yapılan çalışmalarda rRNA (40-200 kopya) genlerinin ITS I gen bölgesi ve SLME (100-200 kopya) genlerinin PCR analizinde kullanılmaktadır. Bu gen bölgelerinin PCR ürünleri uygun restriksiyon enzimler ile kesildiğinde tür tayininin yapılabilmektedir[38,40].

2.12.1.KİNETOPLAST DNA (kDNA)

Kinetoplast genomu büyük heterojen minicirle bölgeleri ve az sayıda maksicircle yapılarından oluşmaktadır. Maksicircle 16-17 kb büyüklüğünde kodlanan bölge ile türler ve hatta suşlar arasında farklılık gösteren, yüksek oranda değişken olan kodlanmayan bölgelerden oluşmuştur[38,40].

Minicircle'ın büyük bir kısmı değişik nükleotid diziliminden oluşmuştur. *Leishmania* türlerinin bazılarında minicircle büyüklüğü değişsede yaklaşık 800 bç uzunluğuna sahiptir. Alt sınıflarda farklı nükleotid dizilimine sahip olmasına rağmen bütün *Leishmania* türlerinde 120 bç uzunluğunda korunmuş aynı nükleotid dizilimini taşımaktadırlar[40].

Leishmania türlerinin genotiplendirilmesi için geliştirilen birçok moleküler metod her hücrede 10.000-20.000 minicircle varlığından dolayı polimorfik kDNA minicircle üzerinde odaklanmıştır. Bu nedenle kDNA PCR yöntemi oldukça sensitif

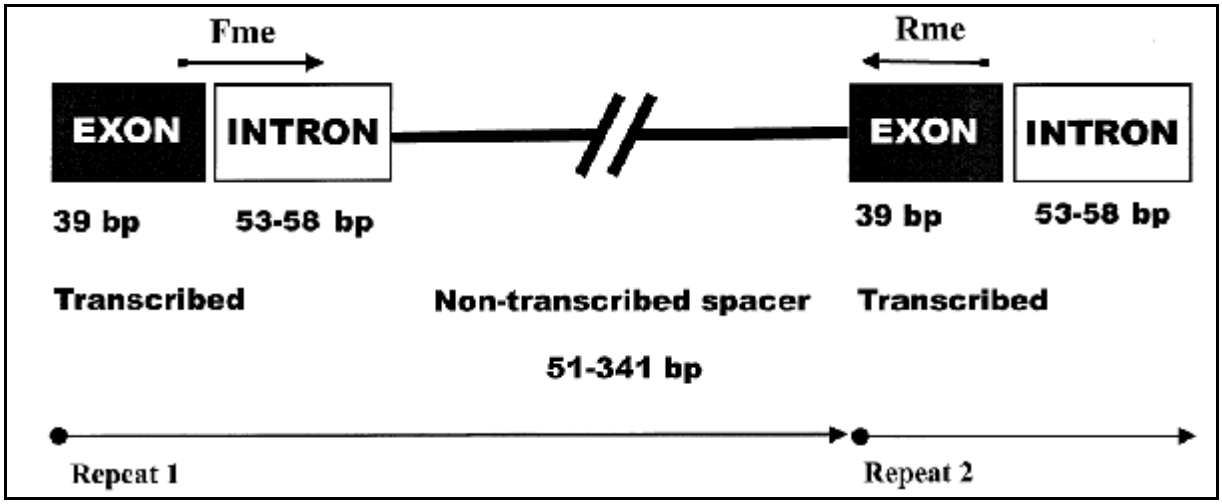
olacaktır. Farklı Yeni ve Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz türlerinin kDNA dizi analizi arasında oldukça fazla dizi farklılığı bulunmaktadır[38,40].

2.12.2.INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS I) BÖLGESİ

Miniekzon geni her nükleer genomda 100-200 kez tekrar etmektedir ve omurgalı konaklar ile omurgasız vektörlerde bulunmamaktadır. *Leishmania* türlerinde tekrarlı miniekzon geni içinde bulunan transkript edilmeyen spacerların DNA dizi analizi ile dizisinin çıkarılmasıyla filogenetik bir marker olabilecekleri tespit edilmiştir. Miniekzon genin bu özelliğinden dolayı PCR ürünleri restriksiyon enzimi ile kesilerek tür tayini mümkün olmaktadır. Restriksiyon enzimi ile elde edilen fragmanların uzunlukları her bir tür için karakteristik olup tür tayinini sağlamaktadır[38].

Leishmania'nın tekrar eden miniekson gen bölgesinin her bir tekrarında yüksek oranda korunmuş ekzon (39bç) ve çok fazla değişkenlik göstermeyen transkript edilen intron bölgesi (55-101 bç) ve yüksek oranda değişkenlik gösteren transkript edilmeyen spacer dizileri (51-341 bç) bulunmaktadır **(Şekil.6).** PCR amplifikasyonunda kullanılan Fme ve Rme primerlenin yerleşimi şekilde gösterilmiştir[38].

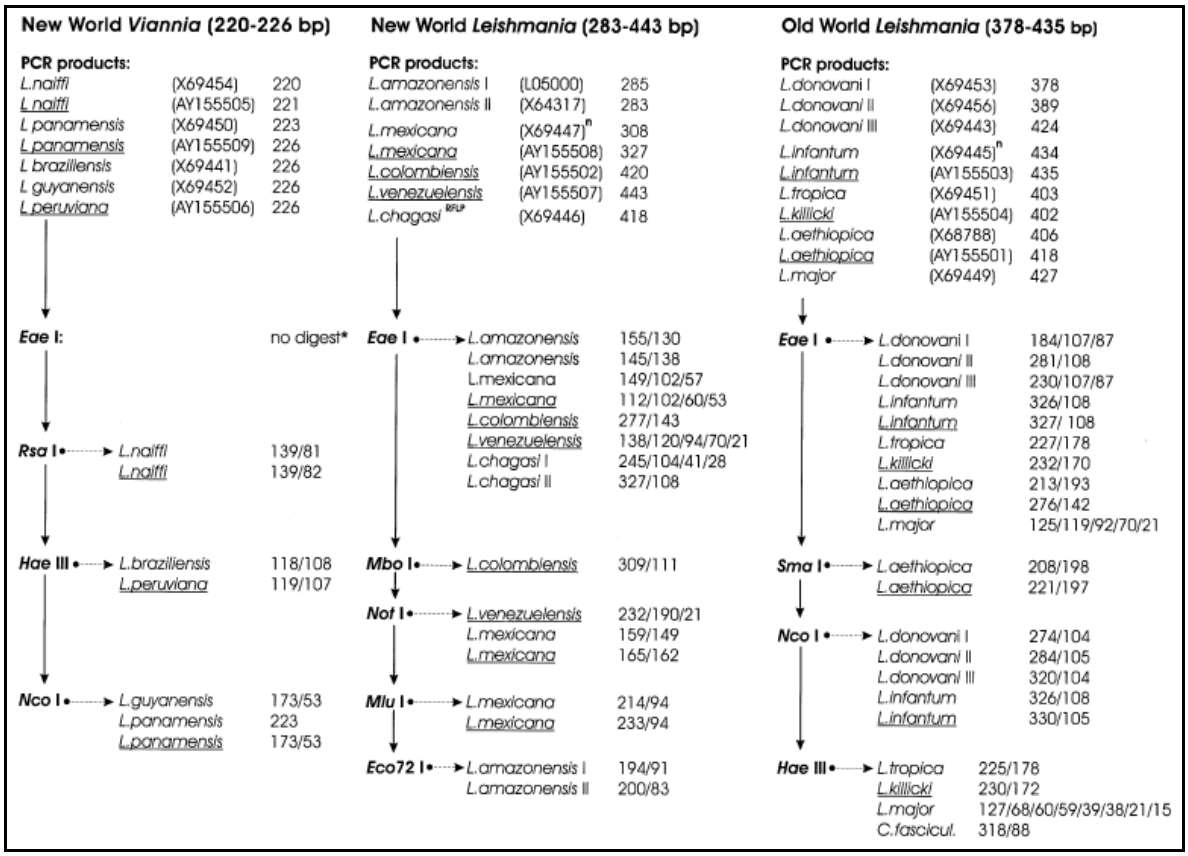
Şekil.6. *Leishmania*'nın tekrar eden miniekson gen bölgesi.



Fme ve Rme primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin uzunluklarının farklı *Leishmania* komplekslerde, farklı uzunluklarda olduğu tespit edilmiştir. Ama her

bir türe spesifik değildir. Fme-Rme primerleriyle yapılmış çalışmada her bir türde elde edilen PCR ürünün uzunluğu ve restriksiyon enzimi ile kesildiğinde elde edilen fragman uzunlukları şekil.7'de gösterilmiştir[38].

Şekil.7.Mini-ekson PCR-RFLP genotipleri.



Kutanöz Leyişmanyoz olgularında yapılan PCR çalışmlarının sonunda kDNA *Leishmania* tanısı koymak için en uygun gen bölgesidir. Çünkü kDNA'nın kopya sayısı SLME ve ITS1'e göre 50-250 kat daha fazladır; amplikon uzunluğu küçüktür. Parazit DNA titrasyon deneylerinde 13A ve 13B primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyonda <0.001 parazit/reaksiyon eşdeğer DNA tespit edilebilirken, SLME ve ITSI PCR'da sırasıyla 10 ve 0.2 parazit/reaksiyon eşdeğer DNA tespit edilebilmektedir[40].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

3.1.1.Cihazlar

- Termal cycler (Biometra)
- Minigel elektroforez tankı (MaxFıll)
- Düşük voltajlı güç kaynağı (Consort E815)
- Santrifuj (Universal)
- Hassas terazi (Universal)
- Derin dondurucu (Bosch)
- UV lamba (Biometra)

3.1.2.Kimyasal Malzemeler

- Taq polimeraz (Fermentas)
- dNTP mix (Fermentas)
- Magnezyum klorür (Fermentas)
- 10 X PCR Tamponu (Fermentas)
- Etihyum bromür (Sigma)
- Proteinaz K (Sigma)
- Brom fenol mavisi (Sigma)
- Tris HCl (Takara)
- KCl (Takara)
- Amonyum klorür (Takara)
- Amonyum bikarbonat (Fermentas)
- Sodyum klorür (Fermentas)
- EDTA Na_2(pH:7,5) (Sigma)
- SDS (Sigma)
- Fenol (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- Etil alkol (Sigma)

3.2.ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Bu çalışmada 05.06.2006–15.02.2007 tarihleri arasında, Adana merkez, İmamoğlu, Karaisalı, Kozan ve Yüreğir ilçelerine bağlı köylerde yaşayan, vücutlarında Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyon bulunan 64 kişiden alınan smear ve 50 kişiden alınan aspirasyon sıvıları olmak üzere toplam 114 örnek çalışıldı. Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyonlardan birkaçı şekil 8'de gösterilmiştir.

Adana il sağlık müdürlüğünden sağlanan resmi izin belgesi ve araç ile 9 ay boyunca haftada bir gün Adana merkez köyleri başta olmak üzere İmamoğlu, Karaisalı, Kozan, Yüreğir ilçelerine ve bu ilçelere bağlı köylere gidilerek Kutanöz Leyişmanyoz taraması yapıldı.

Köylülere öncelikle Kutanöz Leyişmanyoz enfeksiyonu hakkında bilgi verildi. Daha sonra Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli olduğu düşünülen hastalara aydınlatılmış onam formları doldurulduu ve bu çalışma için onayları alındı (Ek.1). Çalışmaya katılan hastalardan Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyonlarında amastigot varlığını mikroskop ve PCR yöntemi ile tespit etmek için hem smear hem de aspirasyon sıvısı örnekleri alındı.

Şekil .8. Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli bazı hastalardaki lezyonlar.



3.2.1.Aspirasyon Sıvılarının Alımı

Daha önceden laboratuarımızda hazırlanmış ve steril edilmiş % 0.9'luk sodyum klorürden (NaCl) 0.5 ml. insülin enjektörüne alındı. Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyon %70'lik alkol ile temizlendi. İnsülin enjektörü ile lezyonun sağlam deriye yakın olan kenarından lezyona girildi ve steril sodyum klorür çözeltisi lezyonun içerisine bırakıldıktan sonra lezyon içindeki sıvı enjektör ile geri çekildi **(Şekil 9)**.

Alınan aspirasyon sıvısı iki ayrı temiz ependorf tüplerine eşit miktarda paylaştırıldı. Bu aspirasyon sıvılarından birinden yayma preparat hazırlanıp giemza ile boyandıktan sonra mikroskopta 100'lük objektifte incelendi. Amastigot görülen preparatlar pozitif (+) olarak, amastigot görülmeyen preparatlar negatif (-) olarak değerlendirilip sonuçlar Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli hastalara bildirildi. İçerisinde aspirasyon sıvısı bulunan diğer ependorf tüpleri PCR çalışılmak üzere 0^0C'de saklandı.

Şekil.9. Aspirasyon sıvısının alımı.



3.2.2.Smear Örneklerinin Alımı

Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyon %70'lik alkol ile temizlendikten sonra steril 5'lik bistüri ile lezyonun sağlam deriye yakın olan kenarından kazıntı örnekleri alındı ve alkol ile temizlenmiş iki lamın üzerine yayma yapıldı **(Şekil.10)**.

Yapılan bu yaymalardan biri giemza boyası ile boyanarak mikroskopta 100'lük objektifte incelendi ve amastigot görülen preparatlar pozitif (+), amastigot görülmeyen preparatlar negatif (-) kabul edilip, Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli hastalara (+) veya (-) sonuçlar bildirildi. Diğer yayma preparatlar ise PCR çalışılmak üzere 0^0C'de saklandı.

Şekil.10. Smear örneğinin alımı.



3.3.ASPİRASYON SIVISI VE SMEAR ÖRNEKLERİNDEN DNA İZOLOSYONU

0^0C'de saklanan aspirasyon sıvıları oda sıcaklığına çıkartıldı ve çözülmeleri beklendi. 0^0C'de saklanan smear örnekleri 5'lik bistürü ile lamın üzerinden kazınarak temiz bir ependorfa aktarıldı.

Farklı ependorf tüpleri içinde bulunanan aspirasyon sıvıları ve smear örneklerinde saptanabilecek *Leishmania* amastigotları proteinaz K, sodyum klorür ve Tris-EDTA ile muamele edilerek *Leishmania* amastigotlarının hücre zarı parçalandı ve proteinler hidroliz edildi. DNA, fenol-kloroform ile hücre zarı ve atıklarından arındırıldıktan sonra saf etanolde çöktürülerek elde edildi.

3.3.1. Çözeltiler

1. Parçalayıcı (Lizis) Tampon: 3.570 g Amonyum klorür ve 0.0350 g Amonyum bikarbonat distile suda çözülerek 1 L'ye tamamlandı.

2. Tampon:

4M NaCI	3.75 ml
0,5 M EDTA Na_2 (pH 7.5)	5.0 ml
SDS (%0.1)	100 mg
Proteinaz K (25mg/mL)	0.2 ml

Distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

3. Doymuş Fenol Çözeltisi: Kristal halde 250 g fenol, 50 mL distile suda eritildi. Üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 mL tampon eklenerek karıştırıldı. Fenol ve su fazı ayrıldıktan sonra üstte kalan su fazının pH'sı 8.0'ın altında ise su fazı alındı ve pH 8.0 olana kadar bu işlem tekrar edildi. Son olarak üstte bir miktar tampon bırakılarak +4 °C'de ve koyu renkli cam şişede saklandı.

4. Kloroform

5. %70'lik Etil Alkol: 70 mL saf etil alkol üzerine 30 mL saf su ilave edilerek hazırlandı.

3.3.2. Yöntem

1. 1 mL aspirasyon sıvısı veya 1 mg smear örneğinin üzerine 3 mL soğuk parçalayıcı tampon eklendi.

2. +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve bu işlem iki kez tekrarlandı.

3. Pelletin üzerine 1 mL tampon (NaCl, EDTA, SDS, Proteinaz K, distile su) eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 37 ^{o}C'de bir gece bekletildi.

4.Süre sonunda tüplere 400 µL fenol, 400 µL kloroform eklendi ve bu karışım 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Altta kalan fenol klorofom karışımı atılıp bu işlem iki kez tekrar edildi.

5. Aynı işlem iki kez kloroform ile tekrar edildi.

6. Tüpler santrifüj edilerek süpernatant 5 mL %95'lik etil alkol içine aktarılıp tüp yavaşça altüst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alması sağlandı. DNA ipliksi bir görünüm aldıktan sonra 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltisi elde edildi.

7. Süpernatan dökülerek DNA'nın kuruması için tüp ters çevrildi.

8. Pelletin büyüklüğüne göre üzerine 40–100 µL saf su eklenip DNA'nın çözünmesi için bir gece 37 ^{o}C'de bekletildi.

9. Elde edilen ürünlerin DNA olup olmadığını anlamak için örneklerimiz %2'lik agaroz jelde 100V'da 30 dk yürütüldü. Ultraviyole (UV) ışığı altında DNA fragmanları görülen örnekler çalışmanın devamında kullanıldı.

3.4.AMPLİFİKASYON İÇİN GEREKLİ ÇÖZELTİLER VE KİMYASAL MADDELER

3.4.1. Çözeltiler

1. 10X $(NH_4)_2SO_4$ Tamponu

   700 mM/L Tris-HCl (pH:8.8)

   200 mM/L $(NH4)_2SO_4$

   % 0.1 Tween 20

2. PCR Karışımı

10X $(NH_4)_2SO_4$ Tamponu	5 µL
12,5 mM dNTP karışımı	1 µL
25 mM $MgCl_2$	5 µL
Steril distile su	33 µL

3.Primerler: PCR ile mikroskop bakısını karşılaştırmak amacıyla *Leishmania* kinetoplast DNA'sına ait olan ve en az 10 parazite karşı duyarlı olan 13A ve 13B (Alpha DNA) primerleri kullanıldı. *Leishmania* tiplendirmesi yapmak için *Leishmanai* parazitinin kinetoplast DNA'sından daha spesifik, miniekson gen bölgesine ait olan Fme-Rme (Alpha DNA) primerleri kullanıldı.

Çizelge 3. *Leishmania* cinsine spesifik primer dizilimi[37,38].

13 A	5'- TTG ACC CCC AAC CAC ATT ATA- 3'
13 B	5'- GTG GGG GAG GGG CGT TCT -3'
Fme	5'- ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA GCG -3'
Rme	5'- TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG -3'

3.4.2. Yöntem

Gen amplifikasyonu, Thermal Cycler ile ısıya dayanıklı mikrotüpler içerisinde yapıldı. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikro işlemciden oluşan bu alette termal döngü protokolleri önceden belirlenerek uygulandı.

3.4.3.Amplifikasyon Koşulları

PCR karışımı	44 µL
5' Forward primer 13A veya Fme	0.5 µL
3' Reverse primer 13B veya Rme	0.5 µL
gDNA (0.5–1 µg/mL)	5.0 µL
Taq polimeraz (5 U/uL)	0.2 µL
Toplam hacim	50 µL'dir.

3.4.4. Termal Cycler ile PCR Protokolü

Amplifiye edilmek istenen DNA uzunluğuna ve primer içeriğine bağlı olarak sıcaklık ve süre değişmektedir. Bu çalışmada kullandığımız 13A-13B ve Fme-Rme primerleri için kullandığımız PCR protokolündeki sıcaklık, süre ve döngü sayısı çizelge 4'te gösterilmektedir.

Çizelge 4. 13A-13B ve Fme-Rme primerleri için kullanılan PCR programı.

94°C	5 dakika	Ön Denatürasyon	→1 döngü
94°C	1 dakika	Denatürasyon	→40 döngü
54°C	1 dakika	Primer bağlanması	
72°C	1 dakika	Zincir uzaması	
72°C	10 dakika	Son döngüde zincir uzaması	→1 döngü

3.4.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Örneklerin Yürütülmesi

Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi; amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanıldı. Agaroz jelde DNA moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç etmektedir ve bu çalışmada, bu göç hızı jele eş zamanlı aplike edilen DNA markeri (50bp Bio Basıc) ile birlikte değerlendirildi.

3.4.5.1. Çözeltiler

1. 5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8.0:

Tris baz	54.0 g
Borik asit	27.5 g
EDTA [0.5 M, pH:8.0]	20 mL

Bir miktar saf suda çözünerek 1 L'ye tamamlandı.

2. Elektroforez için 0.5X TBE Tamponu:

5×TBE'den 10 mL alınarak saf su ile 200 mL'ye tamamlandı.

3. %3'lik agaroz jel:

3 g Agaroz 100 mL 0.5×TBE tamponu içeresinde gazlı ocak üzerindeki alevde eritildi. Jel hafif soğuyunca içerisine tarak yerleştirilmiş jel aparatlarına döküldü.

4. Yükleme tamponu

Brom fenol Mavisi	%0.05
Gliserol	%10
Ficoll	%15

0.5×TBE tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.

5. Etidyum Bromür çözeltisi:

Etidyum Bromür 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlandı.

3.4.5.2. Yöntem

3 gr agaroz tartılıp temiz bir erlen içine alındı, üzerine 100 mL 0,5 X TBE tamponu ilave edildi ve bu karışım gaz ocağı üzerindeki alevde homojen hale gelene kadar ısıtıldı. Erlen içerisindeki jel soğuduktan sonra içerisine tarak yerleştirilen elektroforez tankına döküldü ve tank 0.5×TBE tamponuyla doldurudu. Jel içindeki tarak çıkarılıp aplikasyon kuyuları tampon ile temizlendi. Amplifiye edilen örnekten 10 µL alınıp 5 µL yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyulara aplike edildi. Kuyulardan birine fragman uzunluklarını değerlendirmek için DNA markeri (50 bp Bio Basıc) aplike edildi. Bu jel 100 voltta 45 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrası jel, elektroforez tankından çıkartılıp etidyum bromür ile 1 dakika boyandı ve saf suda yarım saat bekletilerek boya atıklarından temizlendi. Ultraviyole ışık (UV) altında görülen DNA fragmanlarının fotoğrafı çekilerek sonuç değerlendirildi.

3.5. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polmorfizimi (RFLP)

Ultraviyole (UV) ışığı altında DNA fragmanlarının görüldüğü Fme-Rme primerleri ile amplifiye edilmiş PCR ürünleri, tür tayini yapmak amacıyla Enterobacter aerogenes (Eae I) restriksiyon enzimi ile kesildi. Enterobacter aerogenes (Eae I) restriksiyon enziminin Fme-Rme primerleri ile amplifiye olmuş *Leishmania* parazitlerinde kestiği gen bölgeleri çizelge 5'de gösterilmektedir.

Amplifiye olmuş her PCR ürününden 10 µL alınıp PCR tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 1 µL Eae I (5U/ µL) enzimi ilave edildi. Bu karışım 37^0C'de 1 gece inkübe

edildikten sonra %4'lük agaroz jelinde marker ile beraber yürütüldü. Agaroz jel etidyum bromür boyası ile boyandıktan sonra fragman uzunlukları değerlendirildi.

Çizelge.5.*Enterobacter aerogenes* (Eae I) restriksiyon enzimi[38]**.**

Enzim	**Köken**	**Tanıma alanı**	**Tepkime şartları**
Eae I	*Enterobacter aerogenes*	5'-Py*GGCCPu-3'	37^0C 1 gece
Eae I restriksiyon enziminin Leishmania parazitinde kestiği gen bölgeleri			
Eae I ….*L.donovani* I……184/107/87 *L.donovani* II….. 281/108 *L.donovani* III…. 230/107/87 *L.infantum* …… 327/108 *L.tropica*……. 227/178 *L.kilicki*…….. 232/170 *L.aethiopica*……. 213/193 *L.aethiopica*……. 276/142 *L.major*…… 125/119/92/70/21			

4.BULGULAR

Bu çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun kullanılabilirliğinin belirlenmesi ve Kutanöz Leyişmanyoz'lu hastalarda etken türlerin PCR-RFLP ile tanımlamak amacıyla; aktif dönemde olan 64 Kutanöz Leyişmanyoz olgusundan alınan smear örneği ve süregen dönemde olan 50 Kutanöz Leyişmanyoz olgusundan alınan aspirasyon sıvısı çalışıldı. Örnek alınan toplam 114 hastanın yaşadığı yer, yaş, meslek ve lezyon özellikleri ek.2'de gösterilmektedir.

Aktif lezyonlu hastalardan alınan 64 smear örneği giemsa boyası ile hazırlanıp 100X'lik mikroskop altında incelendi ve 30 tanesinin mikroskop bakısı pozitif (+), 34 tanesinin mikroskop bakısı negatif (-) bulundu. Süregen hastalardan alınan 50 aspirasyon sıvısı da giemsa boyası ile boyanıp 100X objektif altında mikroskopta incelendi ve 12 tanesinin mikroskop bakısı pozitif(+), 38 tanesininde mikroskop bakısı negatif(-) bulundu. Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli hastalardan alınan 64 smear örneği ve 50 aspirasyon sıvısı kDNA'da bulunan ve 10 *Leishmania* parazitine kadar hassas olan 13A ve 13B primerleri ile PCR çalışıldı. 13A ve 13B primerleri ile yapılan PCR çalışmasında agaroz jelde 120 bp uzunluğunda fragman veren örnekler pozitif kabul edildi **(Şekil.11-Şekil.12).** 13A-13B primerleri ile PCR pozitif olan DNA örnekleri ile tiplendirme yapmak için Fme-Rme primerleri ile çalışıldı ve agaroz jelde 400-500 bp uzunluğundaki fragmanlar pozitif kabul edildi **(Şekil.13).**

PCR ile mikroskop bakısı pozitif olan 30 smear örneğinin 30 tanesinde PCR pozitif (+), mikroskop bakısı negatif olan 34 smear örneğinin 14'ünde PCR pozitif (+) sonuç bulundu **(Çizelge 6).** Mikroskop bakısı pozitif olan 12 aspirasyon sıvısının 12'si PCR'da pozitif, mikroskop bakısı negatif olan 38 aspirasyon sıvısının 12 tanesi PCR'da pozitif bulundu (**Çizelge 7**).

Çizelge.6. Smear örneklerinin mikroskop bakısı ve PCR yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

	Mikroskop (+)	**Mikroskop (-)**	**Toplam**
PCR (+)	30	14	44
PCR (-)	0	20	20
Toplam	30	34	64

PCR Hassasiyet (Sensitivite) = 30 / (30+0) x 100 = % 100

PCR Seçiçilik (Spesifite) = 20 / (20+14) x100 = %58.8

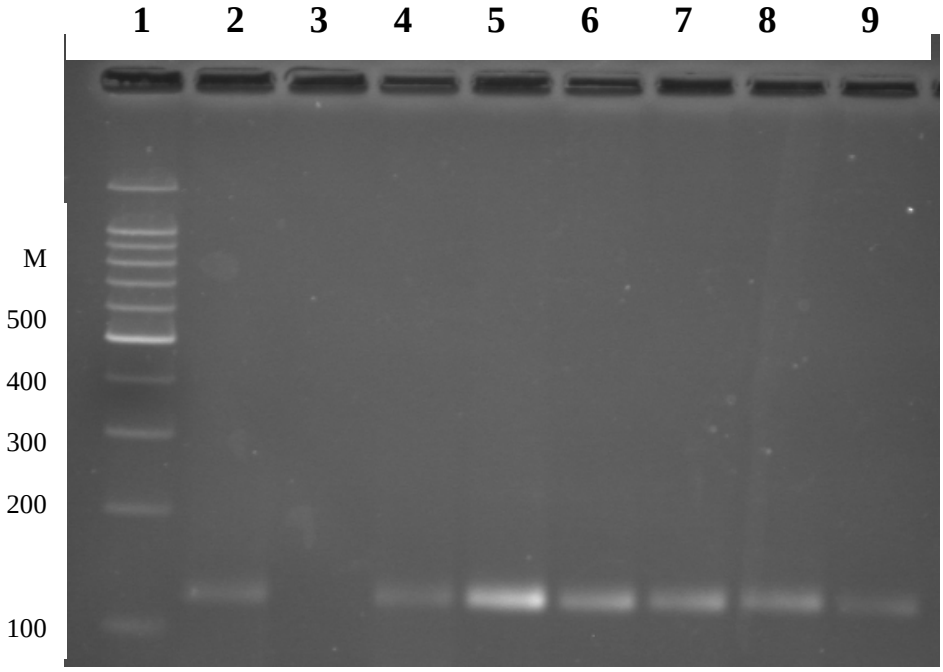
Çizelge.7. Aspirasyon sıvılarının mikroskop bakısı ve PCR yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.

	Mikroskop (+)	**Mikroskop (-)**	**Toplam**
PCR (+)	12	12	24
PCR (-)	0	26	26
Toplam	12	38	50

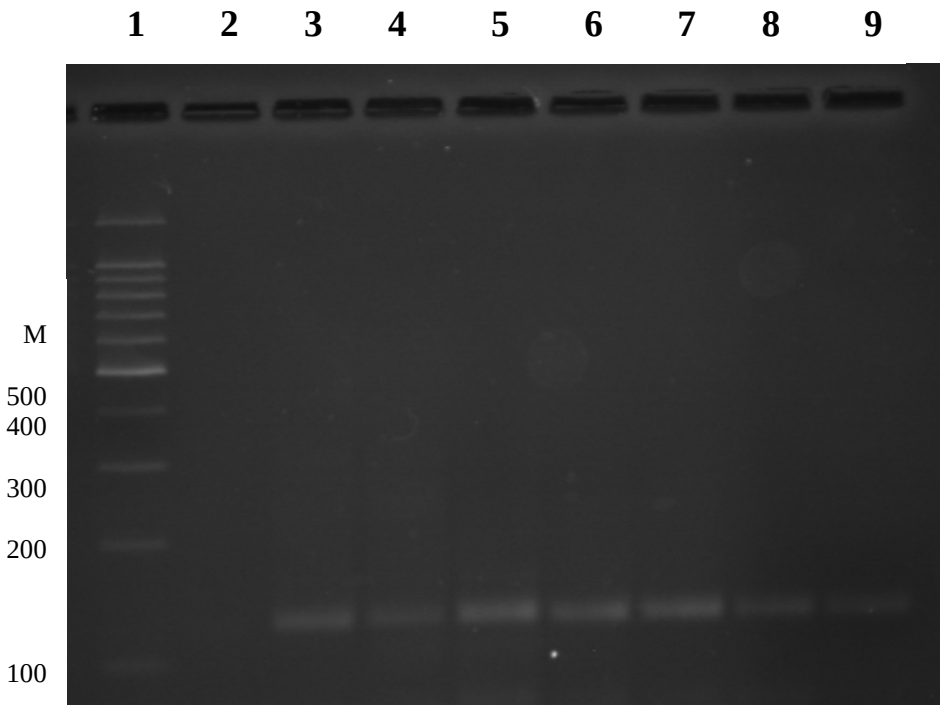
PCR Hassasiyet (Sensitivite) = 12 / (12+0) x 100 = % 100

PCR Seçicilik (Spesifite) = 26 / (12+26) x 100 = % 68.4

Süregen Kutanöz Leyişmanyoz olgularından alınan aspirasyon sıvılarında PCR seçiciliğinin aktif Kutanöz Leyişmanyoz olgularından alınan smear örneklerinin seçiçiliğine göre daha fazla olduğu tespit edilirken her iki örnek çeşiti için PCR hassasiyetinin % 100 olduğu tespit edildi.



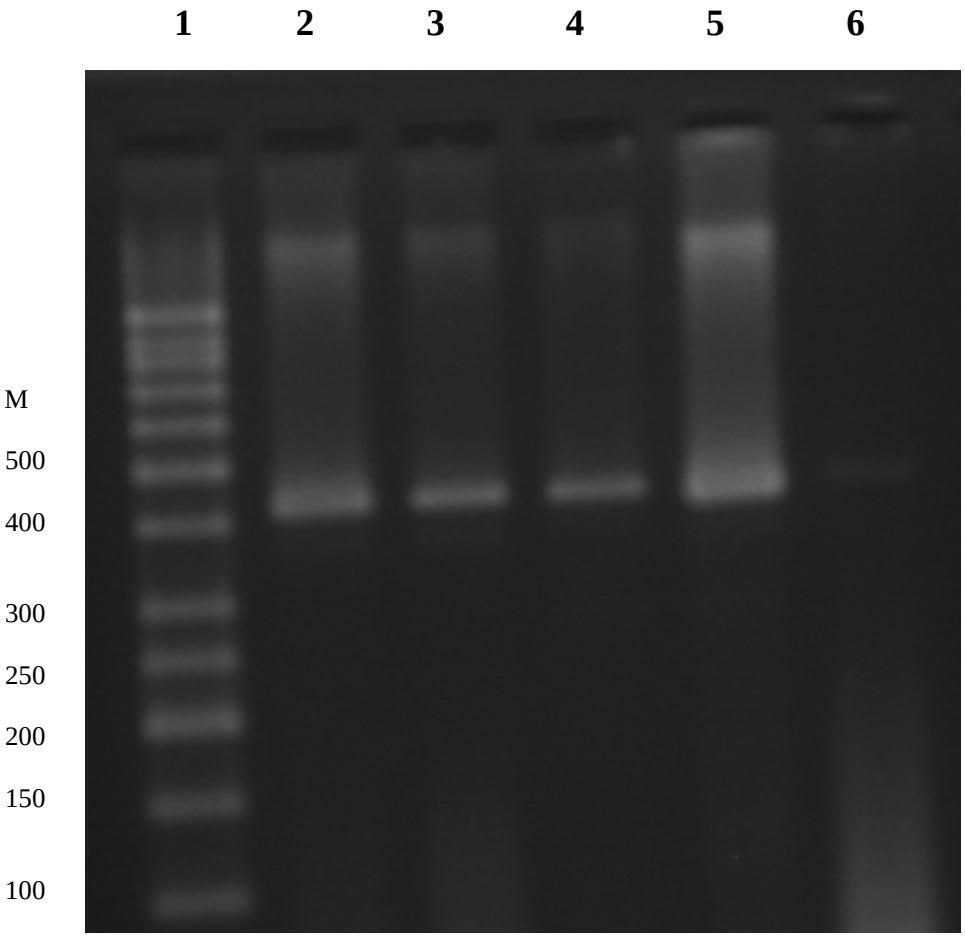
Şekil.11.13A-13B Primerleri ile amplifiye olmuş aspirasyon sıvılarının PCR sonuçları.
1.100bp'lik Marker (Bio Basic)
2.Pozitif kontrol
3.Negatif kontrol
4-9, Hastalardan alınan örnekle



Şekil.12.13A-13B Primerleri ile amplifiye olmuş smear örneklerinin PCR sonuçları.

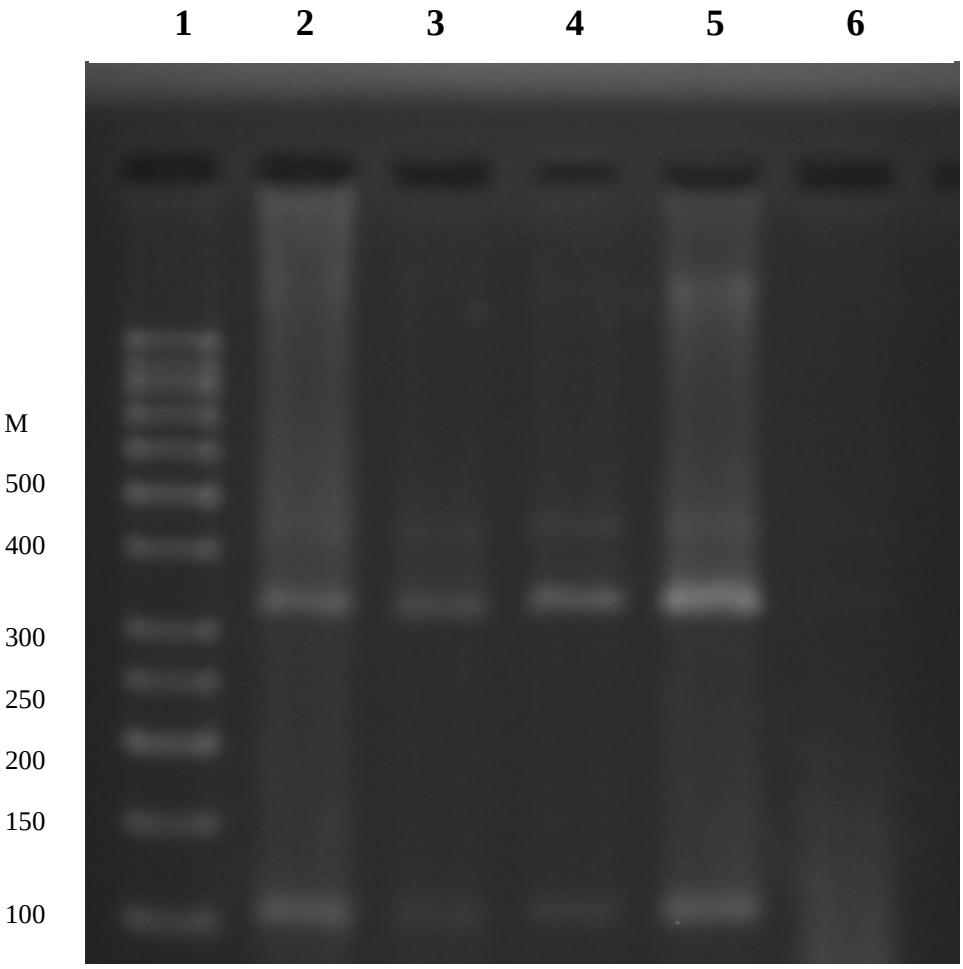
1.100bp'lik Marker (Bio Basic)
2.Negatif kontrol
3.Pozitif kontrol
4-9. Hastalardan alınan örnekler

13A ve 13B primerlerine ile pozitif bulunan örneklerden 15'inin DNA'sı *Leishmania* parazitinin miniekson bölgesine ait olan Fme-Rme primerleri ile ampilifiye edildi. Leishmania türleri arasında miniekson bölgesi uzunluğu farklılık göstermektedir. Agaroz jelde 400-500 bp uzunluğunda fragman görülen PCR ürünlerinin tiplendirilmesi için Eae I restriksiyon enzimi ile kesildi. Amplifiye olan PCR ürünlerininin agaroz jel görüntüsü şekil 13 gösterilmektedir.



Şekil.13.Fme-Rme Primerleri ile amplifiye olmuş PCR ürünleri.
1.50bp'lik Marker (Bio Basıc)
2-6. Hastalardan alınan örnekler

Fme-Rme primerleri ile amplifiye edilen ve Eae I restriksiyon enzimi ile kesilen PCR ürünü 50 bp'lik DNA marker ile yürütüldü. Agaroz jeldeki fragmanlar çizelge 5'deki verilere göre değerlendirildi ve 327/108 bp uzunluğundaki fragmanlar *Leishmania infantum* olarak kabul edildi. 15 *Leishmania* parazitinin hepsinde *Leishmania infantum* türleri tespit edildi. *Leishmania infantum* türlerine ait jel görüntüsü şekil.14'de gösterilmektedir. *Leishmania major* ve *Leishmania tropica* türlerine rastlanmadı.



Şekil.14. Eae I restriksiyon enzimi ile kesilmiş RFLP sonuçları.

1.50bp'lik Marker (Bio Basıc)
2-6. *Leishmania infantum*

5.TARTIŞMA

Ülkemizde çoğunlukla *Leishmania tropica*'nın etken olduğu ve antroponetik tipteki epidemilerle özellenen Kutanöz Leyişmanyoz'unun prevalansı 1950'li yıllardan önce başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere bütün yurtta çok yüksekti[41,42,43].

Adana, Osmaniye ve Hatay'dan her yıl artan sayılarda olgu bildirimi yapılmaktadır. Hastalık Adana'nın ilçelerinden olan Karaisalı'da son yıllara kadar sporadik seyir izlerken son iki yıl içerisinde bu ilçede çok sayıda hasta görülmesi yeni endemik odaklar oluştuğunu vermektedir. Çukurova bölgesi için endemik odakların Kozan ve Karaisalı olduğu saptanmıştır[41,42,43].

Kutanöz Leyişmanyoz'un belli bir bölgede sıklığının artması o bölgede oluşan çevresel ve ekolojik değişikliklerin yanı sıra, insan hareketleri ve sosyoekonomik düzeyi ile yakından ilişkilidir. Hastalığın endemik olduğu bölgelerde yeni yerleşim merkezlerinin kurulması ve bu bölgelerde nüfus yoğunluğunun artması hastalığın yayılmasında önemli bir etkendir. Aynı zamanda endemik bölgeden endemik olmayan bölgeye geçiçi tarım işçiliği gibi nedenlerle büyük kitlelerin göç etmesi de önemli diğer bir etkendir[42].

Çalışma kapsamımızda olan bireylerin %95'i çiftçilik ile uğraşan ve *Phlebotomus*'ların (tatarcıklar) yaygın olduğu saatlerde tarlalarındaki ürünleri sulamak amacıyla dere kenarlarında veya su kanalları etrafında bulunan, yaz aylarında evlerin damlarında yatan kişilerdi. Bu kişilerin sosyoekonomik düzeyleri düşük olmakla birlikte hastalık hakkında yeterli bilgileri de yoktu. Çalışmamıza katılan kişilerin yaş ortalamaları 27 ve örnek alınan şüpheli lezyonların %90'ı kollarda bulunmaktaydı. Klinik olarak bu hastaların 64'ü aktif lezyona, 50'si ise iki ile dört yıl arasında değişen süregen lezyona sahiptiler. Aktif lezyona sahip hastaların mikroskop bakılarının negatif olarak değerlendirilmesi alınan örneklerde yeterli amastigotun bulunmamasında ileri gelmektedir. Süregen lezyona sahip hastaların doğrudan mikroskop bakılarının negatif olarak değerlendirilmesi ise, lezyonların süregen olması ve parazit sayısının bu tip lezyonlarda çok az olmasından ileri gelmektedir. Bu nedenle klinik olarak tanı konmasına rağmen giemza ile boyalı preparatlarda parazit görülememektedir.

Kültür ortamında da bu lezyonlardan parazitin üretilmesi güçleşebilmektedir. Lezyon örneklerinden aspirasyon sıvılarının alınıp kültürlerin yapılması özellikle bazı

Leishmania suşları için oldukça zordur. Her suş aynı besiyerinde üretememektedir. Örneğin Nikaragua'nın belli bölgelerinde çok iyi çalışan besiyerleri her bölgede aynı başarıyı gösterememektedir[43].

Kutanöz Leyişmanyoz'da serolojik yöntemler ile çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için tanıda serolojik test tercih edilmemektedir. *Leishmania* deri testi (LDL) hücresel bağışıklığı göstermekte ve lezyon kabuklanmaya başlar başlamaz pozitif olmakta ve süresiz olarak öyle kalmaktadır. Yanlış pozitiflikten dolayı LDL testi özgül değildir. Ayrıca serolojik testler ve LDL testi eski ve yeni enfeksiyonu ayırt edememektedir[5].

PCR yöntemi çok az sayıda amastigotu bile analiz edebilmesinden dolayı, özellikle Kutanöz Leyişmanyoz olgularında oldukça önemli ve anlamlı bir yöntemdir. PCR yöntemi parazit DNA'sının gösterilmesi, organizmaların mikroskop bakısında, serolojik testlerde ve kültürde gösterilmesinden özellikle süregen olgularda oldukça duyarlıdır[46].

Klinik olarak Kutanöz Leyişmanyoz ile karışan diğer lezyonların ayırt edilmesinde ve hastaya uygulanacak tedavi seçiminde tanıda PCR ve moleküler tiplendirmede RFLP önemli yer tutmaktadır. Tür ayrımında izoenzim elektroforezinin kullanılması son zamanlarda kullanılan bir yöntemdir. Ancak bu çalışmalar için büyük hacimde parazitin elde edilmesi gerekir. Bu yöntem, endemik ülkelerde kullanılabilecek bir yöntem değildir. Çünkü uygulaması zor ve çok maliyet gerektirmektedir[45,47].

Son zamanlarda Kutanöz Leyişmanyoz parazitlerinin tanısı ile pek çok araştırma yapılmıştır.

Aviles ve arkadaşları[48] kültür yöntemini esas olarak almışlardır ve Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli 24 hastada PCR, mikroskop bakısı, histopatolojik boyama ve IgG düzeylerine bakmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre PCR'da duyarlılık %92, mikroskop bakısı %42, histopatolojik boyamada %33 olarak bulmuşlardır[48].

Al-Jawabreh ve arkadaşları[49] 2006 yılında mikroskop bakısı ile PCR yöntemini karşılaştırmışlardır. Al-Jawabreh ve arkadaşları; 22 mikroskop bakısı pozitif, 38 mikroskop bakısı negatif olmak üzere toplam 60 hastada PCR çalışmışlar ve çalışma sonunda 60 örneğin 58'inde PCR ile pozitif sonuç elde etmişlerdir ve mikroskop bakısına göre PCR'ın duyarlılığı %100 saptanmıştır[49].

N. Chargui ve arkadaşları[50] Kutanöz Leyişmanyoz tanısında klasik yöntemleri ve PCR yöntemini karşılaştırmışlar ve %99.3 oranında PCR'ı daha duyarlı bulmuşlardır[50].

Wortmann ve arkadaşları[51] 49 Kutanöz Leyişmanyoz'lu hastadan smear örnekleri ve aspiarsyon svısı örnekleri almışlar. Bu örnekleri laboratuar tanı yöntemleri ve PCR yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonunda mikroskop bakısının duyarlılığını % 61, kültür yöntemini %44 ve PCR yöntemini %83 bulmuşlardır[51].

Bizim çalışmamızda mikroskop bakısı pozitif 30 ve mikroskop bakısı negatif olan 34 smear örneği olmak üzere toplam 64 aktif Kutanöz Leyişmanyoz olgusu çalışılmış ve %100 PCR yöntemi duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda aynı zamanda, mikroskop bakısı pozitif 12 ve mikroskop bakısı negatif olan 38 süregen kutanöz leyişmanyoz olgusu olmak üzere toplam 50 aspirasyon sıvısı çalışılmış ve PCR yönteminin yine %100 duyarlı olduğu bulunmuştur.

Kutanöz Leyişmanyoz tedavisinde, *leishmania* türü, leyişmanyozun kliniği, lezyonun yeri, şiddeti, sayısı ve kişinin immun durumuna bağlı olarak, sistemik ilaç tedavisi, intralezyoner tedavi, tropikal tedavi veya fiziksel yöntemlerden herhangi biri ya da birkaçı birlikte uygulanmalıdır. Farklı türlere bağlı lezyonlar klinik seyir ve tedaviye cevap açısından da farklılık gösterir. *L.tropica* ve *L.major* 'un etken olduğu Kutanöz Leyişmanyoz'da koruyucu immünite gelişir, tedavi edilmeksizin spontan iyileşme gerçekleşebilir. Bu yüzden bu türlerin enfeksiyonlarında ilaç kullanılmaksızın özellikle endemik bölgelerde izlenimin yeterli olmaktadır. *L.mexicana* ve *L.braziliensis'in* neden olduğu Kutanöz Leyişmanyoz daha ciddi ve daha uzun sürelidir. *L.braziliensis* türü Mukokütanöz Leyişmanyoz'una neden olduğu için bu türün tespit edildiği hastalara sistemik tedavi başlanılmalıdır[8,9,10].

Dünyada birçok bölgede olduğu gibi hastalığın tedavisindeki öneminden dolayı Kutanöz Leyişmanyoz olgularına neden olan *leishmania* türlerinin bilinmesi önemlidir.

Gadisa ve arkadaşları[52] Habasiştan'da 55 kutanöz şüpheli olgudan örnek almışlar ve bu örnekleri Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerinde ürettikten sonra *Leishmania* parazitinin ITS 1 (Internal transcribed spacer regions) gen bölgesinde L5.8S / LISTR primerlerini kullanarak tiplendirme çalışması yapmışlardır. Bu çalışma ile Habesiştan'da *Leishmania aethiopica*'nın baskın suş olduğu sonucuna varmışlardır[52].

Mahnaz ve arkadaşları[53] İran'da Leishmania parazitinin tiplendirmesi üzerine çalışma yapmışladır. L5.8S-LITSR primerlerini kullanarak *Leishmania'nın* ITS 1 gen bölgesi ile çalışmışlardır ve İran'da *L.major* türünün baskın olduğunu tespit etmişlerdir[53].

Jutta Marfurt[38] ve arkadaşları *Leishmania* parazitinin Fme-Rme primerleri ile ITS I gen bölgesini çoğaltmışlar ve bu bölgeyi Hae III-Eae I enzimi ile keserek Leishmania türlerini tiplendirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada tiplendirme için en uygun gen bölgesinin ITS I bölgesi olduğunu savunmuşlardır[38].

Serin ve arkadaşları[54] 2005 yılında *Leishmania* parazitini mikro kültür yöntemi ile üretip, Fme-Rme primerlerini kullanarak ITS I gen bölgesinde tiplendirme çalışması yapmışlardır. Çoğaltıkları ITS I gen bölgesini Hae III ve Eae I enzimleri ile kesmişler ve %30 *L.infantum* ve %70 *L.tropica* türleri tespit etmişlerdir[54].

Motazedian ve arkadaşları[55] Kutanöz Leyişmanyoz olgularına etken türler ile ilgili yayınlarında Kutanöz Leyişmanyoza *L.major* ve *L.*tropica'nın yanı sıra *L.infantumun'da* neden olabileceğini bildirmişlerdir[55].

Adana merkez ve ilçelerinde yapmış olduğumuz bu çalışmada *Leishmania* parazitine ait Fme-Rme primerleri kullanıldı. Elde edilen 15 PCR ürünü Eae I restriksiyon enzimleri ile kesilerek tiplendirme yapıldı.

Sonuç olarak PCR yönteminin bölgemiz gibi endemik olan yerlerde kullanılması gereken bir yöntem olduğu ve PCR-RFLP yöntemi ile *Leishmania* parazitlerinin tiplendirileceği ortaya çıkmaktadır. PCR-RFLP yöntemi ile hastalığın epidemiyolojisi, tedavisi ve yok edilmesi konusunda önemli sonuçlar elde edilecektir. Dahada önemlisi çalışmamızda elde edilen smear ve aspirasyon sıvısı örneklerinden direkt DNA elde edilerek PCR-RFLP uygulanmış ve kültür gibi ön çalışmalar yapılmayarak zaman kaybı önlenmiştir.

6.SONUÇ

Kutanöz Leyişmanyoz, ülkemizin bazı bölgelerinde geçmiş yıllarda olduğu gibi günümüzde de ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak varlığını sürdürmektedir. Adana il sağlık müdürlüğünün verilerine göre, son yıllarda başta Kozan ve Karaisalı ilçesi olmak üzere Adana merkez ve ilçelerinden Kutanöz Leyişmanyoz olguları bildirilmektedir.

Kutanöz Leyişmanyoz'da serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğunda, mikroskop bakısıyla parazitlerin az olması durumunda ve kültür yönteminde parazitin dış şartlardan etkilenmesiden dolayı üreme olmamakta ve yanlış tanı konmaktadır ve ayrıca bu klasik laboratuar tanı yöntemleri ile tiplendirme yapılamamaktadır. Bu nedenle *Leishmania*'nın epidemiyolojisini araştırmak, Kutanöz Leyişmanyoz olgularına kesin tanı koymak ve Kutanöz Leyişmanyoz'lu hastalarda etken olan türleri tanımlamak amacıyla PCR-RFLP yöntemi bölgemizdeki kutanöz leyişmanyozlu hastalarda uygulandı.

Bu çalışmada aktif ve süregenleşen olgularda PCR yönteminin duyarlılığı %100 bulundu ve rutin tanıda kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Tedavide ve hastalığın epidemiyolojisinde, özellikle *Leishmania* tür tayini yapılması gerekmektedir. Bunun içinde PCR-RFLP yöntemi ile bölgemizde Kutanöz Leyişmanyoz'a neden olan türler tiplendirildi. Çalışma sonunda Çukurova Bölgesinde Viseral Leyişmanyoz hikayesi olmadığı halde Kutanöz Leyişmanyoz olgularında *Leishmania infantum* türleri bulundu. Daha fazla sayıda hastadan elde edilecek örnekler ile yapılacak çalışmalarda hastalığın epidemiyolojisi ve parazitlerin tiplendirilmesi bakımından daha yaralı bilgiler sağlanacaktır.

7.KAYNAKLAR

1. **World Health Organization web sayfası** http: / www.who.int/dr/ diseases/leish/default.htm Erişim tarihi: 11.10.2007.

2. **Özbel Y, Töz ÖS**, Leishmaniosis, Özcel MA**.** *Tıbbi Parazit Hastalıkları*.1.Baskı,İzmir: Meta Basım Matbacılık Hizmetleri **,2007:** 198-230**.**

3**.** **Unat EK, Yücel A, Atlaş K, Samastı M.** *Unat'ın Tıp Parazitolojisi* 5. Baskı, İstanbul: Doyuran Matbası, **1995:** 564-586.

4**.** **Saygı G.** *Temel Tıbbi Parazitoloji*, Sivas: Esnaf Ofset Matbaacılık, **1998:** 47-55.

5. **Weigle KA, Valderlama L, Arias AL, Santrica C, Saravia NG**. Leishmnanin standardization and evalution af safety,dose,storage,longevity of reaction and sensitization. *Am Journal Tropica Medical Hyeneg.* **1991**:44:260-271.

6. **Piarroux R, Gambarelli F, Duman H, Fontes M, Dunan S, Mary C, Toga B, Qulici M**. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration,Myeloulture and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmniasis in Immunocompromised Patients. *Journal of Clincal Microbiology*.**1994**:746-749.

7. **Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, Pratlong F, Garin YJF, Derouin F.** Prospective Value of PCR Amplification and Seqencing for Diagnosis and Typing of Old World Leishmania Infections in an Area of Nonendemicity.*Journal of Clinacal Microbiology*.**2003**:1419-1422.

8. **Hepburn NC, Omer AHS**. *Old world cutenous leishmaniasis: pathology,clinical features,differential diagnosis and therapy*.In : Gilles Hm (ed).Protozoal Diseases 10thEd.London Oxford unv.Press.**1999**:471-480.

9. **Hepburn NC.** Cutenous leishmaniasis.*Clinica .Exp .Dermatol*ogy.**2000**:25: 363-370.

10. **Hepburn NC.** Cutenous leishmaniasis an overview. *Journal Pastgrand Medicine*.**2003:** 49: 50-54.

11. **Berman J.** Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr.Opin.Infection Dİs.***2003**;16:397-401.

12. **Marquard WC.Dermaree RS,Grieve RB**.Leishmania and Leishmanioses.*Parasitology and Vector Biology*.Harcourt-Academic Pres .**2000**:57-71.

13. **Gerlind A**. PCR Diagnosis of Leishmaniasis in Israel and West Bank Development of a field applicable procedure useful for epidemiological studies,The Kuvin Center fort the study of Infectıous and Tropical Disesaes,The Hebrew University**.1999**

14. **Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, AseVa A, Gedamu L,** *Leishmania* (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR–RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. *Experimental Parasitology*.**2007**:115 :339–343

15. **Unat EK, Yaşarol Ş.** *Leishmaniasis: Kala-azar ve Şark Çıbanı* Ege Üniversitesi Matbaası Bornova-İzmir, **1981:** 1-45.

16. **Özcel MA, Özbilgin A.** *Güney Doğu Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları*. **Altıntaş N.** Leishmaniosis. Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1995**: 97-127.

17. **Krotoski MJ**. Medical Parasitology.8th .Ed.,W.B.Saunders company-London.**1999:** 147-154.

18. **Antinori S**. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travellers. *Clinical Microbiology Infection.* **2005**: 11: 343–346.

19. **Klaus SN, Frankenburg H, Ingber A.** Epidemiology of cutaneous leishmaniosis.*Clinical Dermatol*ogy.**1999**:17:257-260.

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

21. **Gustavo A.S.R, Marcus V.F.G, Marcilene G, Paes E C, Cristiane Bentin T**, **Vanize O.M, Octavio F**.Sensitivity of the polymerase chain reaction fort he diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania guyanensis. *Acta Tropica*. **2001:**79: 225-239.

22. **Ashford RW, Desjeux P, de Raadt P**. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniosis. *Parasitology Today.* **1992**:8:104-105.

23. **Desjerux P**. The increase in risk factors for leishmaniosis world wide. *Trans R Soc Tropica Medicine Hygene*. **1991**:85(2):212-213.

24. **Davidson NR**, Leishmaniasis, Cohen J, Powderly GW. Infectious Diseases, 8th, Edinburgh, Mosby, 2004, 1621-1626.

25. **Soulsby E.J.L**, Immune responses in parasitic infections:ımmunology,ımmunopatology and ımmunoprophylaxıs,vol.3,CRC Pres,Florida.**1987**: 126-130.

26. **Herwaldt BL**.,Leishmaniasis.*Lancet* **1999**: 354 : 1191-1199.

27. **Ramos E, Silva M,DeMoura Castro Jacques C**,Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. *Clinic Dermatology*. **2002**: 20: 122-134.

28. **Akisu Ç, Korkmaz M.** Tıbbi Parazitolojide Tedavi, *Türkiye Parazitoloji Derneği.* **2003**: 20: 56-58.

29. www.saglik.gov.tr Erişim Tarihi: 10.11.2007

30. **Alkan Z, Özbel Y, Özensoy S, Atambay M**,Moleküler biyolojik yöntemler. Ed Özcel MA, Altıntaş N, Parazit Hastalıklarında Tanı. *Tıbbi Parazitoji Derneği,* Ege Üniversitesi ,Yayın No: 15

31. www.inonu.edu.tr Erişim Tarihi : 12.12.2007

32. **Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük M A, Attila G.** *Tanıda DNA teknikleri*. Adana: 6.Biyokimya Yaz Okulu, **2003**.

33. **Erlich H A.** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, IRL Press at Oxford University Press, Oxfort, **1989.**

34. **Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J.** PCR Protocols: A Guide to methods and Aplications, Acedemic Press Inc., San Diego, Calofornia. **1990.**

35. **White B A.** PCR Protocols: Current Methods and Applications for DNA Amplification, Humana Press, Totowa New Jersey. **1993.**

36. **Aksoy K, Kayrın L, Tuli A.** Tanıda Moleküler Genetik Yöntemler. Adana : 9.Biyokimya Yaz Okulu, **2006.**

37. **Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalssheker N, Smith J C, Markham A F.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids.* **1989:** 17:2503-2516.

38. **Marfurt J, Niederwieser I, Makia Divine N, Beck H, Felger I.** Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP. *Diagnoistic Microbiology and Infectıous Disease*.**2003**:46:115-124.

39. http://images .google.com.tr Erişim Tarihi: 12.12.2007

40. **Bensoussan E, Abedelmajeed N, Jonas F, Schur L, Jaffe C.** Comparison of PCR Assay for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*.**2006** : 1435-1439.

41. **Uzun S, Yücel A, Özpoyraz M**.Cutaneous Leishmaniasis: Evalution of 3074 cases in the Çukurova Region,Turkey. *Tibbi Parasitoloji Dergisi*. **1997**:21:142.

42. **Özpoyraz M, Memişoğlu HR**. Kutanöz Leishmaniasis Türkiyedeki durumu.*Arşiv* **1996**:5:1-5.

43. **Memişoğlu HR.** Kutanöz Leishmaniasis. *Aknem Dergisi* **1997**:11(3):319-329.

44. **Çulha G**. Deri Leyişmayozunda doğrudan boyama ile pozitif bulunan olgularda polimeraz zincir reaksiyonunun tanı değeri. Doktora Tezi, Ç.Ü.Tıp Fak.Parazitoloji AD.Adana,**2002.**

45. **Primez C, da Silva Traano V, Paes Oliveria Neto M, Goncaleves da Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O.** Use of PCR in diagnosis of human American tegumantory leishmaniasis in Rio de Janerio Brazil. *Journal of Clinic Mikrobiology*.**1999**:37(6): 1819-1823.

46. **Gomez EAL, Okamura Y, Hashiguchi Y.** Studies on New World Leishmaniasis and its transmission with particular refence to ecuador. *Japan Res Rep Ser*.**1997**: (1):45-49.

47. **Wilson SM**. DNA based metods in the detection of Leishmania parasites: Field applications and practicalities. *Ann Tropica Medical Parasitology*.**1995**;1:95-100.

48. **Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy F, Harris E.** PCR detection and İdentification of Leishmania Parsites in Clincal Specimens in Ecuador: A comparison with classical Diagnostic Methods. *Journal of Parasitology*.**1999**:85(2):181-187.

49. **Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W**. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears,.*Acta Tropica.* **2006**:(99) 55–61.

50. **Charguia N, Bastienb N, Kallel K, Haouasa N, Messaidi Akroute M, Masmoudif A, Zili J, Chakerd E, Dhahri Ben Othmanh A, Azaieza R, Crobuc L, Mezhouda H, Babbaa H.**

Usefulness of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***. 2005**: (**99**) 762—768.

51. **Gadisa A, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, Aseva A, Gedamu L.** *Leishmania* (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR–RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. *Experimental parasitology*.**2007**:(115): 339-343.

51. **Wortmann G, Romero L, Roz H.M, Ortega E, Bayard V, Hochberg L.P, Ryan JR.** Real time polmerase chain reaction diagnosis of Leishmaniasis in Panama from both fresh and froze tissue.*Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.**2004**: (98):148-151.

52. **Mahnaz T, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Sch¨onian G, Farajnia S, Alimohammadian M.H.** *Leishmania major*: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. *Acta Tropica*.**2006**:(98):52-58.

53. **Serin M.S, Daglioglu K, Bagirova M, Allahverdiyev A, Uzun, Vural Z, Kayar B, Tezcan S, Yetkin M, Aslan G, Emekdas G, Koksal F**. Rapid diagnosis and genotyping of Leishmania isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of miniexon region.*Diagnoistic Microbiology and Infectious Disease*.**2005**:(53):209-214.

54. **Motazedian H, Karamıan M, Noyes A, Ardehali S**. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Annals of TropicalMedicine & Parasitology*. **2002**: 96(1):31–34.

8.EKLER

EK.1: AYDINLATILMIŞ ONAM

DERİ LEYİŞMANYOZU TANISINDA DİREK MİKROSKOBİ, KÜLTÜR VE ELISA YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI ARAŞTIRMASI

Değerli katılımcı,

Ülkemizdeki ve bölgemizdeki paraziter enfeksiyonların sıklığı ve bunların bireyler arasında kolaylıkla yayıldığı bilinmektedir. Gerekli önlemlerin alınmaması halinde bireylerde ortaya çıkacak çok ciddi rahatsızlıklar ortaya çıkabilir. Onay vermeniz koşuluyla katılacağınız bu çalışmada sizden kan örneği alınacaktır. Böylece vücudunuzdaki bir parazit enfeksiyonun varlığı araştırılacaktır. Buna ek olarak bu enfeksiyonun kaynakları ve bulaşma yollarının saptanmasına yönelik 5 dakikalık bir anket yapılacaktır. Bunlar sonucunda saptanan enfeksiyonun tedavisini yönlendirmek üzere sonuçlar tarafınıza bildirilecektir.

Çalışmaya dahil edilebilmeniz için bu bilgiler ışığında ve diğer sorularınızın aydınlatılması sonucunda ONAY vermeniz gerekmektedir.

İlgili çalışma konusunda tarafıma her türlü bilgi aktarıldı. Sorduğum sorulara yeterli cevap aldım. Vücudumdan kan örneği alınmasını kabul ediyorum. Kendi isteğimle çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcının adı, soyadı :

Katılımcının imzası

Ç.Ü.T.F. PARAZİTOLOJİ ANABİLİN! DALI ANKET FORMU ANKET NO:

1. ADI:
2. SOYADI:
3. YAŞI:
4. CİNSİYETİ: ERKEK ( ) KADIN ( )
5. TEL NO: ' 6. ADRESİ:
7. MESLEĞİ:
8. YÜZ, EL VE BACAKTA YARA: VAR( ) YOK ( )
9. AİLEDEKİ BİREYLERDE AYNI YARA: VAR ( ) YOK ( )
10. YAŞADIĞI YERDE TATARCIK: VAR ( ) YOK ( )
11. SON 6 AYDIR YAŞADIĞI YERDEN BAŞKA BİR YERE SEYAHAT YAPTI MI?: EVET ( ) HAYIR ( )

EVET İSE NERESİ?

12. KÖPEK BESLİYORMU? EVET ( ) HAYIR ( )

EK.2.ÇALIŞMAYA KATILAN HASTALARIN BİLGİLERİ

MİKROSKOP BAKISI NEGATİF OLAN SMEAR ÖRNEKLERİNİN ALINDIĞI HASTALAR İLE İLGİLİ BİLGİLER

Hasta Numarası	Yaş	Yaşadığı Yer	Örnek Alım Tarihi	Lezyonun Özelliği	Meslek
1.CL 1	27	Çorlu Köyü	24.08.2006	Kolda-2 yıl	Çiftçi
2.CL 2	13	Çorlu Köyü	24.08.2006	Kolda-1 yıl	Öğrenci
3.CL 3	61	Kaşoba Köyü	24.08.2006	Kolda- 2 ay	Çiftçi
4.CL 4	5	Kaşoba Köyü	24.08.2006	Yüzde-3 yıl	-
5.CL 5	5	Kaşoba Köyü	24.08.2006	Yüzde-6 ay	-
6.CL 6	30	Kaşoba Köyü	24.08.2006	Yüzde-1 yıl	İmam
7.CL 7	50	Hacımusalı Köyü	17.08.2006	Kolda-4 yıl	Çiftçi
8.CL 8	14	Nuhlu Köyü	17.08.2006	Kolda- 1yıl	Öğrenci
9.CL 9	20	Nuhlu Köyü	17.08.2006	Yüzde- 3 ay	İşçi
10.CL 10	13	Çorlu Köyü	24.08.2006	Kolda-1 yıl	Öğrenci
11.CL 11	23	Çorlu Köyü	24.08.2006	Yüzde-6 ay	Ev hanımı
12.CL 12	32	Yazıbaşı Köyü	31.08.2006	Kolda-2 yıl	Ev hanımı
13.CL 13	13	Kılıçlı Köyü	12.09.2006	Yüzde-1 yıl	Öğrenci
14.CL 14	21	Kılıçlı Köyü	12.09.2006	Kolda-1 yıl	Çiftçi
15.CL 15	7	Kılıçlı Köyü	12.09.2006	Kolda-4 ay	-
16.CL 16	12	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Kolda- 1 yıl	Öğrenci
17.CL 17	11	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Kolda-5 ay	Öğrenci
18.CL 18	22	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Kolda-2 ay	Çiftçi
19.CL 19	30	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Kolda-2 yıl	Çiftçi
20.CL 20	26	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Yüzde-3 ay	Evhanımı
21.CL 21	16	Yüksekören Köyü	15.06.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
22.CL 22	56	Tılan Köyü	21.06.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
23.CL 23	20	Torunsolaklı		Kolda- 1 ay	İşçi
24.CL 24	45	Yeniyayla	01.09.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
25.CL 25	34	Cerenli Köyü	26.10.2006	Yüzde-3 ay	Çiftçi
26.CL 26	23	Kiremithane	12.09.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
27.CL 27	32	Buruk	12.09.2006	Kolda- 3 ay	İşçi
28.CL 28	42	Buruk	12.09.2006	Yüzde- 2 ay	İşçi
29.CL 29	31	Cerenli Köyü	12.09.2006	Ayak-5 ay	Çiftçi
30.CL 30	38	Gümürtülü	12.09.2006	Kolda- 1 yıl	Çiftçi
31.CL 31	40	İmamoğlu	02.11.2006	Kolda- 8 ay	İşçi
32.CL 32	42	İmamoğlu	02.11.2006	Yüzde- 7 ay	İşçi
33.CL 33	24	Kılıçlı Köyü	20.07.2006	Ayakta- 10 ay	Çiftçi
34.CL 34	20	Topallı Köyü	26.02.2007	Kolda- 2 ay	İşçi

MİKROSKOP BAKISI POZİTİF OLAN SMEAR ÖRNEKLERİNİN ALINDIĞI HASTALAR İLE İLGİLİ BİLGİLER

Hasta Numarası	Yaş	Yaşadığı Yer	Örneğin Alındığı Tarih	Alınan Lezyonun Özelliği	Meslek
1.C 1	17	Kozan	19.06.2006	Burun- 2 ay	Öğrenci
2.C 2	17	Kaşoba Köyü	24.08.2006	Kolda-2 yıl	Çiftçi
3.C 3	47	Eğlence Köyü	05.08.2006	Kolda-2 yıl	Çiftçi
4.C 4	32	Eğlence Köyü	05.08.2006	Yüzde-3 ay	Evhanımı
5.C 5	16	Eğelence Köyü	05.08.2006	Ayakda-2 yıl	Öğrenci
6.C 6	35	Kürkçüler Köyü	23.06.2006	Elde-2 yıl	İşçi
7.C 7	36	Kahyalar Köyü	12.07.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
8.C 8	53	Kahyalar Köyü	12.07.2006	Ayakta-4 ay	Emekli
9.C 9	60	Boztahta Köyü	12.08.2006	Kolda-3 ay	Evhanımı
10.C 10	11	Sevinçli Köyü	18.07.2006	Kolda-5 ay	Öğrenci
11.C 11	6	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Yüzde- 6 ay	-
12.C 12	55	Yazıbaşı Köyü	31.08.2006	Kolda-5 yıl	Emekli
13.C 13	54	Sadıkali Köyü	05.06.2006	Elde-2 yıl	Evhanımı
14.C 14	66	Çelemli Köyü	04.08.2006	Elde-1 yıl	Evhanımı
15.C 15	26	Güvenç Köyü	12.08.2006	Kolda-2 ay	Evhanımı
16.C 16	24	Saygeçit Köyü	04.12.2006	Kolda-5 ay	Çiftçi
17.C 17	53	Saygeçit Köyü	04.12.2006	Yüzde-8 ay	Evhanımı
18.C 18	6	İmamoğlu	02.11.2006	Yüzde-4 ay	-
19.C 19	16	Çolaklı Köyü	26.02.2007	Elde- 8 ay	Evhanımı
20.C 20	12	Topallı Köyü	26.02.2007	Yüzde-1 yıl	Öğrenci
21.C 21	32	Topallı Köyü	26.02.2007	Kolda- 2 yıl	Çiftçi
22.C 22	42	Topallı Köyü	26.02.2007	Kolda-1 yıl	Çiftçi
23.C 23	13	Çolaklı Köyü	26.02.2007	Elde-1 yıl	Öğrenci
24.C 24	8	Torunsolaklı Köyü	31.08.2006	Ayakda-1 yıl	Öğrenci
25.C 25	17	Torunsolaklı Köyü	31.08.2006	Kolda-2 yıl	Öğrenci
26.C 26	19	Torunsolaklı Köyü	31.08.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
27.C 27	27	Torunsolaklı Köyü	31.08.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
28.C 28	40	Yüzbaşı Köyü	31.08.2006	Kolda-3 yıl	Evhanımı
29.C 29	32	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Yüzde-1 yıl	Çiftçi
30.C 30	21	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-5 ay	Çiftçi

MİKROSKOP BAKISI NEGATİF OLAN ASPİRASYON SIVILARININ ALINDIĞI HASTALAR İLE İLGİLİ BİLGİLER

Hasta Numarası	Yaş	Yaşadığı Yer	Örneğin Alındığı Tarih	Alınan Lezyonun Özelliği	Meslek
1.A 1	36	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Yüzde-2 yıl	Evhanımı
2.A 2	52	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-3 yıl	Evhanımı
3.A 3	12	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-6 ay	Öğrenci
4.A 4	14	Cerenli Köyü	26.10.2006	Kolda-3 yıl	Öğrenci
5.A 5	8	Cerenli Köyü	26.10.2006	Kolda-2 yıl	-
6.A 6	45	İmamoğlu	02.11.2006	Yüzde-1 yıl	Çiftçi
7.A 7	32	Yağızlı Köyü	10.11.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
8.A 8	10	Cerenli Köyü	26.10.2006	Yüzde-1 yıl	Öğrenci
9.A 9	46	Pekmezci Köyü	12.07.2006	Kolda-3 yıl	Çiftçi
10.A 10	46	Otluk Köyü	24.07.2006	Yüzde-1 yıl	Çiftçi
11.A 11	16	Camili Köyü	08.06.2006	Kolda-6 ay	Öğrenci
12.A 12	36	Camili Köyü	08.06.2006	Kolda-2 yıl	Çiftçi
13.A 13	8	İmamoğlu	02.11.2006	Yüzde-5 ay	Öğrenci
14.A 14	13	İmamoğlu	02.11.2006	Kolda-8 ay	Öğrenci
15.A 15	35	İmamoğlu	02.11.2006	Kolda-3 yıl	İşçi
16.A 16	12	Pekmezci Köyü	12.07.2006	Yüzde-6 ay	Öğrenci
17.A 17	23	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-2 yıl	İşçi
18.A 18	36	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Yüzde-1 yıl	İşçi
19.A 19	24	Koyunevi Köyü	14.09.2006	Kolda-1 yıl	Evhanımı
20.A 20	7	Pekmezci Köyü	12.07.2006	Yüzde-3 ay	-
21.A 21	16	Pekmezci Köyü	12.07.2006	Kolda-1 yıl	İşçi
22.A 22	33	Kızıkaş	04.07.2006	Kolda-2 yıl	İşçi
23.A 23	13	Kızıkaş Köyü	04.07.2006	Yüzde-1 yıl	Öğrenci
24.A 24	25	Kızıkaş Köyü	04.07.2006	Kolda-1 yıl	İşçi
25.A 25	36	Buruk	12.09.2006	Ayakta-2 yıl	İşçi
26.A 26	45	Buruk	12.09.2006	Kolda-4 yıl	İşçi
27.A 27	37	Üçtepe Köyü	03.02.2007	Kolda-2 yıl	Çiftçi
28.A 28	28	Çolaklı Köyü	26.02.2007	Kolda-3 yıl	Çiftçi
29.A 29	53	Çolaklı Köyü	26.02.2007	Kolda-1 yıl	Çiftçi
30.A 30	42	Buruk	12.06.2006	Ayakta-3 yıl	İşçi
31.A 31	34	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-4 yıl	İşçi
32.A 32	13	Cerenli Köyü	26.10.2006	Kolda-2 yıl	Öğrenci
33.A 33	45	Cerenli Köyü	26.10.2006	Kolda-3 yıl	Çiftçi
34.A 34	12	Cerenli Köyü	26.10.2006	Yüzde-1 yıl	Öğrenci
35.A 35	39	Kılıçlı Köyü	20.07.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
36.A 36	24	Kılıçlı Köyü	20.07.2006	Yüzde-1 yıl	Çiftçi
37.A 37	25	Buruk	12.09.2006	Kolda-2 yıl	İşçi
38.A 38	8	Buruk	12.09.2006	Kolda-1 yıl	Öğrenci

MİKROSKOP BAKISI POZİTİF OLAN ASPİRASYON SIVILARININ ALINDIĞI HASTALAR İLE İLGİLİ BİLGİLER

Hasta Numarası	Yaş	Yaşadığı Yer	Örneğin Alındığı Tarih	Alınan Lezyonun Özelliği	Meslek
1.AS 1	35	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Kolda-3 yıl	İşçi
2.AS 2	23	İmamoğlu	02.11.2006	Yüzde-5 ay	İşçi
3.AS 3	36	Çörten Köyü	03.12.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
4.AS 4	28	Çörten Köyü	03.12.2006	Kolda-2 yıl	Evhanımı
5.AS 5	15	Çörten Köyü	03.12.2006	Yüzde-6 ay	Öğrenci
6.AS 6	34	Kürkçüler Köyü	06.07.2006	Yüzde-2 yıl	Çiftçi
7.AS 7	13	Çiçekli Köyü	12.07.2006	Kolda-1 yıl	Öğrenci
8.AS 8	29	Çiçekli Köyü	12.07.2006	Yüzde-1 yıl	İşçi
9.AS 9	13	İmamoğlu	02.11.2006	Kolda-6 ay	Öğrenci
10.AS 10	56	Topallı Köyü	26.02.2007	Yüzde-4 yıl	Çiftçi
11.AS 11	6	İmamoğlu	02.11.2006	Kolda-1 yıl	-
12.AS 12	16	Gümüşlü Köyü	12.09.2006	Yüzde-1 yıl	Çiftçi

9.ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana'da doğdum. 1995 yılında Cebesoy İlköğretim okulundan, 1999 yılında Danişment Gazi Anadolu Lisesinden ve 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Mezun olduğum yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladım. 2008 yılında "Kutanöz Leşmanyozlu Hastalarda Etken Türlerin PCR-RFLP ile Tanımlanması" adlı yüksek lisans tezini bitirdim.