

**T. C.**  
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KUTANÖZ LEİSHMANİASİS'Lİ HASTALARIN TANI VE  
TAKİBİNDE REAL TIME PCR KULLANIMI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Hatice ÖZBİLGE**

**HAZIRLAYAN**

**Vet. Hek. Ayşe Nuriye VARIŞLI**

**Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**ŞANLIURFA- 2005**

## İÇİNDEKİLER

1.	ÖNSÖZ	2
2	GİRİŞ	3- 4
3	Leishmania Türleri'nin Sınıflandırılması	4- 6
4	Epidemiyoloji	6- 10
5	Vektör ve Rezervuarlar	10- 13
6	Hayat Evrimi ve Morfolojisi	14- 16
7	İmmunoloji	16- 17
8	Kutanöz Leishmaniasis'in Kliniği	17- 19
9	Muko- kutanöz Leishmaniasis'in Kliniği	19
10	Visseral Leishmaniasis'in Kliniği	19- 20
11	Tanı	22- 30
12	MATERYAL VE METOD	30- 33
13	BULGULAR	33- 36
14	TARTIŞMA	36- 41
15	KAYNAKLAR	42- 54
16	İNGİLİZCE ÖZET	55
17	ÖZET	56
18	ÖZGEÇMİŞ	57

## ÖNSÖZ

Deri leishmaniasis'i (kutanöz leishmaniasis) Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde insanlarda flebotom adı verilen vektörlerle taşınan bir hastalıktır. Şark Çıbanı, Urfa Çıbanı, Halep Çıbanı olarak da bilinen bu hastalık Atatürk Barajı'nın hizmete geçmesiyle vektörlerindeki artış nedeniyle son yıllarda insidansı artmıştır.

Bu çalışmada kutanöz leishmaniasis'li hastaların teşhisinde en güvenilir sonuç veren real- time PCR tekniği kullanılarak bu metodun diagnostik duyarlılığının gösterilmesi amaçlandı.

Bu çalışmanın her aşamasında bana desteklerini esirgemeyen Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hatice Özbilge'ye, Mikrobiyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Sami Taşçı'ya ve Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mustafa Ulukanlıgil'e teşekkür ederim. Ayrıca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme ve eşime de teşekkürü bir borç bilirim.

:

## GİRİŞ

Deri leishmaniasis'ine (Kutanöz leishmaniasis, KL) sebep olan etken Leishmania cinsi parazitik kamçılı protozoonlardır. Leishmanialar zorunlu hücre içi parazitidir ve enfekte kum sinekleri (phlebotomus, lutzomyia, tatarcık,yakarca) tarafından kan emme işlemi sırasında bulaştırılmaktadır. Köpekler tilkiler ve çakallar önemli rezervuarlardır. KL etkenleri Leishmania tropica, L. major ve L. aethiopica'dır (1- 8), ancak bazen visseral leishmaniasis etkenleri olan L donovani ve L infantum da basit kütanöz leishmaniasis'e neden olmaktadır (9, 2).

Enfeksiyon, mukokutanöz, kutanöz ve visseral leishmaniasis olmak üzere üç farklı klinik seyir gösterir. Deride veya mukozalarda şekil bozuklukları yapan lokalize kutanöz formlarından ve ölüme neden olabilen generalize visseral formları bu hastalığın geniş klinik spektrumunu oluştururlar (10, 2, 5).

Kütanöz leishmaniasis endemik olarak dünyada yaygın şekilde görülmektedir. Ortadoğu'nun çeşitli tropikal ve subtropikal bölgelerinde Afrika, Hindistan ve Asya'da 'Halep çıbanı', 'Bağdat çıbanı', 'Delhi çıbanı', 'Delhi Ülseri', 'Doğu Yarası', 'Aleppo'; ülkemizde ise 'Şark çıbanı', 'Yıl çıbanı', 'Antep Çıbanı' gibi farklı adlarla anılmaktadır (5, 11, 2). Visseral leishmaniasis 'Kala-Azar', 'Kara Hastalık', 'Dumdum Ateşi' olarak, mukokutanöz leishmaniasis ise 'Espundia', 'Uta', 'Chiclero Ülseri' olarak adlandırılır. (3, 4, 12)

Hastalığın bugün bilinen etkeniyle ilişkili ilk tarifini 1885'de D.D. Cunningham yazmıştır. Bu kişi Delhi çıbanı kesitinde mononükleer hücreler içinde koyu boyanan özel parazitlerin üzerinde durmuştur. Yurdumuzda 1910 yılında Dr. Servet Tevfik yaptığı çalışmaları 'Şark Çıbanı ve Amili Marazi 'si adıyla 24 sayfalık bir broşür halinde neşretmiştir (13, 14).

Kala-azar Batı Dünyasında 19. yüzyılın ikinci yarısında tanınmaya başlanmıştır. 1900'de Leishman, Hindistan'da Dumdum'da dizanteriye yakalanarak İngiltere'ye gönderilen ve 7 ay sonra ölen bir askerin dalağında yaptığı yayma preparasyonlarda ufak oval cisimler görmüş ve bunları 1903'de yayımlamıştır. Aynı yıl Donovan'da elde ettiği materyalden hazırladığı preparasyonlarda paraziti görmüş ve bulgusunu yayımlamıştır. Yine aynı yıl Ross bu parazitler için *Leishmania* cinsini tarif etmiş ve kala-azar etkenine *Leishmania donovani* adını vermiştir (2, 14, 15).

Uzun yıllar ciddi bir halk sağlığı problemi olarak önemi anlaşılamayan ve yeterli ilgiyi göremeyen leishmaniasis, 1976 yılından itibaren Dünya Bankası ve Dünya Sağlık Örgütü'nün ortak programları olan Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Eğitim Özel programı kapsamına alınmıştır. Bundan 60 yıl önce sadece belirli bölgelere lokalize olduğu düşünülürken, günümüzde Avustralya ve Antarktika hariç bütün kıtalarda bilinen bir hastalıktır (10, 11).

## **LEISHMANIA TÜRLERİNİN SINIFLANDIRILMASI**

Leishmanialar, Trypanosomatidae ailesinin kinetoplastida dizisinde yer alan protozoonlardır (16). Leishmaniaların sınıflandırılması; parazitlerin insanlarda meydana getirdiği tabloya, epidemiyolojisine, spesifik rezervuarları enfekte etmesine ve çeşitli kum sinekleriyle taşınmasına bağlıdır (5).

Lainson ve Shaw Leishmaniaları kumsineğindeki gelişimlerine göre *Viannia* ve *Leishmania* olarak iki alt sınıfa ayırmıştır (17).{Tablo1} *Viannia* alt genusu *L. braziliensis* 'i kapsar ve kum sineğinin orta ve ön barsağına göç etmeden önce arka barsakta gelişen türlerle ilişkilidir (3, 5).

## Leishmania

<i>L. donovani</i> <i>kompleksi</i>	<i>L. archibaldi</i> <i>L. chagasi</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
<i>L. tropica</i>	<i>L. killicki</i> <i>L. tropica</i>
<i>L. major</i>	<i>L. major</i>
<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
<i>L. mexicana</i>	<i>L.</i> <i>amazonensis</i> <i>L. garnhami</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> <i>L.</i> <i>venezuelensi</i> <i>s</i>
<i>Patojenik</i> <i>olmayan</i> <i>türler</i>	<i>L. arabica</i> <i>L. gerbilli</i> <i>L. aristidesi</i> <i>L. enriettii</i> <i>L. deanei</i> <i>L. hertigi</i>

## Viannia

<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. peruviana</i>
<i>Saptanamayan</i>	<i>L. lainsoni</i>
<i>L. guanensis</i>	<i>L. guyanensis</i>

**Tablo 1 Leishmania Türlerinin Sınıflandırılması(WHO 1990'a göre)**

İnsanda yaklaşık olarak 21 Leishmania türü enfeksiyona neden olur (10).

Türlerin izolasyonunda kullanılan birkaç metod mevcuttur. Leishmania izolatları arasında küçük ultrastrüktürel değişiklikler olmasına karşın promastigot ya da amastigot formlarına bakılarak morfolojik ayırımın yapılması çok zordur. Bu amaçla serolojik, biyokimyasal, immunolojik ve biyolojik verilerden yararlanılmaktadır. Özellikle son yıllarda izoenzim analizleri, monoklonal antikorların kullanılması, spesifik oligonükleotidler kullanılarak yapılan PCR tekniği veya kinetoplast DNA'nın yapılarının incelenmesi ile kesin tür ayırımına gitmek mümkün olmaktadır (2, 3, 5, 18).

## **EPİDEMİYOLOJİ**

KL tüm dünyada görülebilen bir hastalık olup özellikle Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde, tüm Orta Doğu ülkelerinde, Orta Asya'da, Hindistan, Pakistan ve Güneybatı Afrika'da insidansı oldukça yüksektir (11). Kutanöz Leishmaniasis olgularının % 90'ından fazlası Afganistan, Brezilya, İran, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'de görülmektedir. Leishmania enfeksiyonlarının görüldüğü diğer bölgeler Meksika, Orta ve Güney Amerika, Güney Avrupa, Asya (Güney Doğu Asya hariç), Ortadoğu ülkeleri ve Afrikadır (özellikle doğu ve kuzey Afrika) (10).



**Resim 1 Kutanöz Leishmaniasis'in Dağılımı (Oğur'dan)**

Son yıllarda hastalığın coğrafik dağılımı ve prevalansı hakkında daha net bilgilere ulaşılmıştır. Leishmaniasisin artık eskisine göre daha büyük bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir. Kutanöz Leishmaniasis Tunus, Sudan ve Moroko'da binlerce kişide bulaşıcı epidemilere yol açmıştır. Tahmini olarak dünyada 88 ülkede 350 milyon insan risk taşımakta ve 20 milyon insan da kutanöz leishmaniasis ile enfekte durumdadır. 72'si gelişmekte olan ülke grubuna giren bu ülkelerin çoğunluğu tropical ve subtropikal kuşakta bulunurlar. Bu ülkelerden WHO'ya bildirilen olgu sayısına her yıl 600 000 yeni olgu ilave olmaktadır (10, 11, 19, 20).

Visseral leishmaniasis Asya, Avrupa, Afrika ve Amerika'da görülür. Türkiyede özellikle Ege Bölgesi'nde rastlanmaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde, Batı Güney Asya'da, Amerika'da ve Çin'de 1-3 yaşındaki çocuklarda görülürken; Hindistan'da ve Batı Afrika'da genç erişkinlerde daha yaygındır (4). Kala-azar



olgularının % 90'ından fazlası, Hindistan, Bangladeş, Nepal, Sudan ve Brezilya'da görülür (10). Visseral. Leishmaniasis, Doğu Hindistan, Bangladeş ve Sudan'daki mülteciler arasında büyük epidemiler meydana getirmiştir. En büyük kentsel salgın Doğu Brezilya'dan rapor edilmiştir (21, 22).

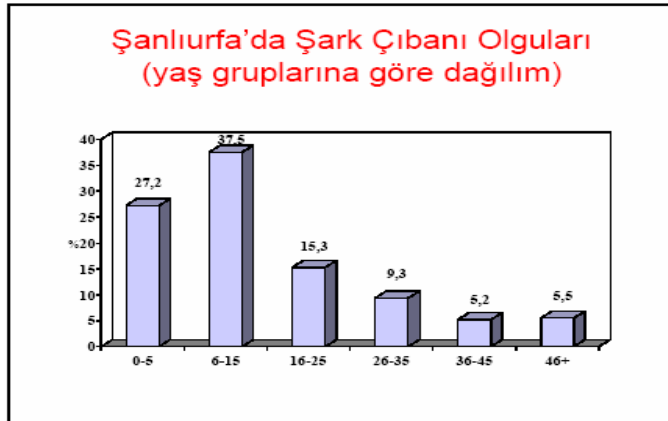
Yeni Dünya KL'si, Kuzey ve Orta Amerika'da Meksika ve Teksas'da görülmektedir. *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ve *L. Pifano*'nin, sebep olduğu mukutanöz leishmaniasis ise Brezilya, Peru, Bolivya, Paraguay, Ekvator, Kolombiya ve Venezuela'da yaygındır (3, 5).

Kutanöz Leishmaniasis, Orta Doğu'da, Central ve Güney Amerika'da ve diğer endemik bölgelerde çiftçiler, göçmenler, askerler ve turistler açısından önemli bir problemdir (5). Ülkemizde ise çoğunlukla *L. tropica*'nın etken olduğu ve antroponotik tipteki epidemilerle karakterize olan Kutanöz leishmaniasisin prevalansı 1950'li yıllardan önce Güneydoğu Anadolu bölgesi başta olmak üzere bütün yurttaki yüksek olarak bulunuyordu.. Sıtmaya karşı sivrisinek mücadelesi için uygulanan DDT'nin flebotomları da öldürmesinden dolayı Kutanöz leishmaniasis insidansı bu tarihten sonra düşmüştür. Enfekte rezervuarların azalmış olması, vektör yoğunluğunun eski düzeyine ulaşamaması ve toplumun sosyo-ekonomik düzeyinin yükselmiş olması gibi nedenlerle hastalık Güneydoğu Anadolu'da sınırlanmış ve diğer bölgelerde de sporadik bir görünüm almıştır. Ancak vektör ve rezervuar kontrol çalışmalarının zaman içinde aksatılması veya kullanılan insektisitlere direnç gelişmesi, ülkemizde özellikle antroponotik Kutanöz leishmaniasisin yaygın olması nedeni ile ana kaynak olan hastaların tedavi edilmemesi, endemik bölgelerden non-endemik bölgelere ulaşım ve seyahat imkanlarının artması, hijyen ve alt yapı koşulları kötü olan sağlıklı kentleşmelerin artması gibi pek çok faktör sonucu hastalığın insidansında son yıllarda tekrar bir artış olmuştur. Özellikle 1980'li yılların başında Şanlıurfa'daki epidemik patlamadan sonra daha önceleri sporadik olarak görülen bölgelerde bile (özellikle Çukurova bölgesinde) hastalık endemik bir

hal almıştır. Ne yazık ki bildirim mekanizmalarının yeterince işletilememesi nedeni ile (bildirimi zorunlu bir hastalık olduğu halde) gerçek sayılar bilinmemektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre hastalık son 10-12 yıl içerisinde giderek artış göstermekte ve özellikle Şanlıurfa, Adana ve Hatay illerinden çok sayıda olgu bildirilmektedir (11, 23, 24, 10).



**Grafik 1: 1991- 2001 Yılları Arasında Şanlıurfa'da Görülen Şark çıbanı olguları (Özbel'den)**



**Grafik 2: Şanlıurfa'da Görülen KL Olgularının Yaşa Göre Dağılımı (Özbel'den)**

Sıcak ve kuru iklim adaptasyonları nedeni ile Güneydoğu Anadolu bölgemizde yerleşen flebotomlar % 45-50 nisbi nemde aktif hale geçebilmektedir. GAP projesi sonunda çevrede meydana gelecek değişiklikler diğer hastalık taşıyıcısı insektlerin yanısıra flebotomları da etkileyecektir (10).

Leishmaniasisin kontrolü 100 kadar hayvan rezervuarının olması ve bir çok kum sineğinin de vektör olması bakımından zordur. 1982'de WHO Uzmanlar Komitesi Leishmaniasisin gözetim ve kontrolü için bir takım genel teknik kurallar belirlemiştir. Buna göre Leishmaniasis olguları birçok ülkede rapor edilmeye başlarken bu alanda yapılan çalışmalar da UNDP/World Bank/WHO tarafından tropikal hastalıklar kapsamında desteklenmiştir (3).

## **VEKTÖR VE REZERVUARLAR**

Phlebotominae'ler Diptera dizisi, Nematocera dizi bölümünün, Psychodidae ailesindedir (25). Leishmaniaların vektörleri parazitin türüne ve bölgesine göre değişmek üzere eski dünyada belirli Phlebotomus türleri, yeni dünyada belirli Lutzomyia türleridir (1, 4).

Kum sineklerinin sınıflandırılması ve jenerasyonu üzerinde genel bir ittifak olmamasına karşın geniş ölçüde kabul gören düşünceye göre Yeni Dünya'da Lutzomyia, Brumptomyia ve Warileya; Eski Dünya'da Phlebotomus, Sergentomyia ve Chinius olmak üzere 6 tane jenerasyonu kabul edilmiştir. Sadece Phlebotomus ve Lutzomyia'nın türleri ve alt türleri Leishmaniasisin vektörü olarak kanıtlanmıştır (3).

Hastalığın vektörü olan flebotomlar halk arasında tatarcık, yakarca, üvez vs. olarak bilinirler (11). Tatarcıkların vektör olabilmesi için promastigotların gelişerek sineğin ağzına kadar gelmesi ve antrofil olması gerekir (4). Parazitlerin hayatta kalmaları kolaydır; vektörün spesifikliğı ve kapasitesi yanında vektörün barsağındaki

parazitin konumu da önemlidir. Örneğin bazı leishmania enfeksiyonları vektörün abdominal orta barsağıyla sınırlı iken bazı leishmanialar da vektörün abdominal orta barsağıyla birlikte pyloride de yerleşim gösterirler (3). Tatarcıklardaki evrim süresi, leishmania türüne ve çevrenin sıcaklığına göre 14-18 gündür (25).

Yurdumuzda tatarcıklar *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* cinslerinde bulunmaktadır. *Lutzomyia* tatarcıkları Amerika kıtasında yaşamaktadırlar. Tatarcıkların erişkinleri 2-5 mm boyunda vücutları fazla tüylü ve donuk sarımsı renkte nematoser dipterlerdir. Erişkinlerin başları vücutları ile takriben 45 derecelik bir açı yapar. Baş vücuda oranla küçük olup bal peteği görünümündeki gözler geniş yer tutar. Antenler ince uzun tesbih gibidir. Tatarcıkların ağız boşluğu, karın plağındaki ve ayrıca farinks plaklarındaki dişlerin şekil ve sıralarının, cinslerin ve türlerin tanınmasında önemi vardır (4, 25).

Tatarcıkların erkekleri hiç gıda almazlar veya son aldıkları larva gıdası ile yetinirler; halbuki dişileri kan emerler. Tatarcıklar kısa ömürlüdürler, bunların erkekleri 4 gün, dişileri ise 12-30 gün kadar yaşarlar. Çoğunlukla dişiler yumurtalarının gelişmesi için kan emmeye ihtiyaç duyarlar. Kan emme sırasında salivasyon üretirler ve konakçıya verirler. Bu salivanın son zamanlarda peptit yapıda olduğu ve güçlü bir vazodilatatör etkiye sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bundan başka konakçıda leishmaniaların gelişimini sağladığı da tesbit edilmiştir (3, 4). Tatarcıkların uçuş güçleri azdır, kısa aralıklara konarak ve sessiz olarak uçarlar (25).

Sıcak ve nemli iklim koşullarında üreyip çoğalabilirler. Gündüzleri karanlık ve rüzgarsız yerlerde mesela kilerde, duvar yarıklarında, kuytu gölgeliklerde, kulübelere ve ahırlarda saklanan bu sinekler aktivasyonlarını özellikle sıcak ve durgun yaz gecelerinde gösterirler. Gece ile gündüz sıcaklığı farkları çok olan yerlerde kemirgenlerin ve kuşların toprak içindeki yuvalarında saklanırlar. Akşamları alaca karanlıkta saklandıkları yerlerden çıkarak beslenmek için kan emecek hayvan

ve insan ararlar. Bu kan emme işlemi sırasında farinkslerindeki leishmaniaları insan veya hayvanların derileri içerisine inoküle ederek hastalığı bulaştırırlar (4, 11).

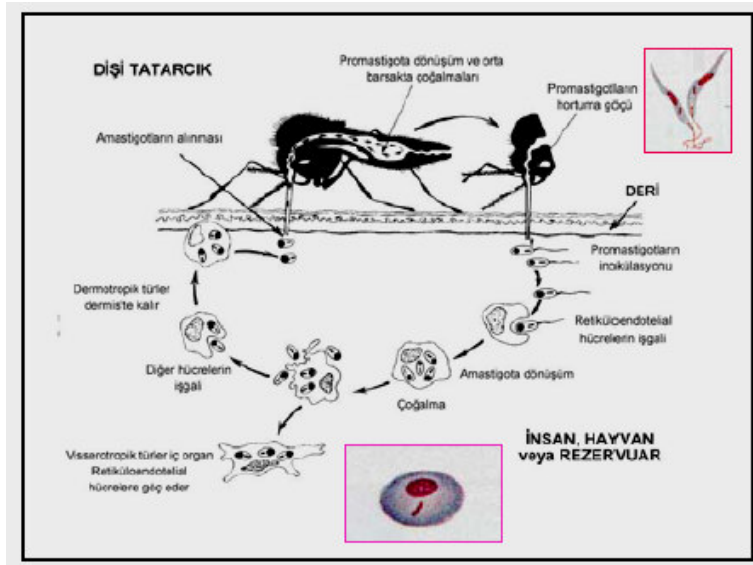
Dişi tatarcıklar insandan başka köpekler, kemirgenler gibi memelilerden, hatta bazen kuşlardan ve sürüngenlerden kan emerler. *Phlebotomus papatasi* insan ve kemirgenlerden, *Phlebotomus perniciosus* insan ve köpektan kan emer (4). Türkiye’de flebotom tür tesbiti çalışmaları 1935’te Akalın tarafından başlatılmış ve zamanımıza kadar bir çok bilimcinin katkılarıyla Türkiye flebotom faunası belirlenmiştir. Buna göre ülkemizde 17 tür flebotom vardır (25, 26).

Leishmaniasisin zoonoz ve antropoz şekilleri vardır. Eski Dünya deri leishmaniasisinde zoonoz olan şekle yarı kurak bölgelerde rastlanır, rezervuarı et yiyen gündüzcü ve koloni halinde bulunan kemirgenlerdir. Etken *L. major*, vektör *P. papatasi* gibi tatarcıklardır. Eski Dünya deri leishmaniasisinin antropoz olan şeklinde rezervuar insandır. Etken *L. tropica*, vektör *P. sergenti* adı verilen tatarcıklardır. Yeni Dünya deri ve mukozal leishmaniasisi genellikle zoonotiktir. Etken *L. braziliensis* ve *L. mexicana* alt türleri ve vektör orman tatarcıklarıdır. Bazı leishmaniasis formlarında ise *hyrax* ve *rhonebomis* denilen tarla farelerine benzer kemirgenler kaynak olarak rol oynarlar (4, 11, 27).

Akdeniz Ülkeleri ve Türkiye’de şehirlerdeki deri leishmaniasisinin vektörü *P. sergenti*’dir (4). Buna karşın Şanlıurfa’da yapılan bir çalışmada *P. sergenti* % 77.6, *P. papatasi*, % 21.92 *P. major*, % 1.39 ve *P. perfiliewi* % 0.09 oranında tespit edilmiştir (28). Akdeniz iç organ leishmaniasisinin temel ve sürekli vektörü olarak *P. perniciosus* tesbit edilmiştir. Türkiye flebotom faunası içerisinde % 9 olarak bulunmasına rağmen ülkemizin bütün bölgelerinde tesbit edilmiş olması ve antropoz özelliği sebebiyle önemli bir vektördür (25).



**Resim 2- Leishmania'nın vektörü**



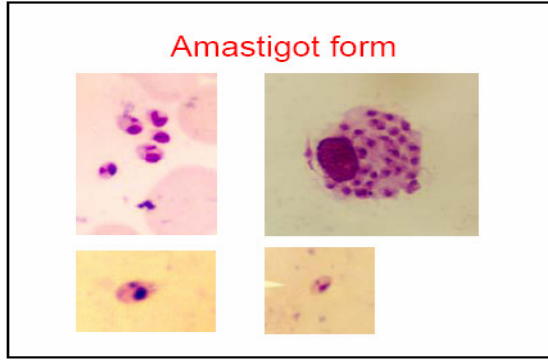
**Şekil 1-Leishmania parazitinin hayat döngüsü (Özbel'den)**

## HAYAT EVRİMİ VE MORFOLOJİSİ

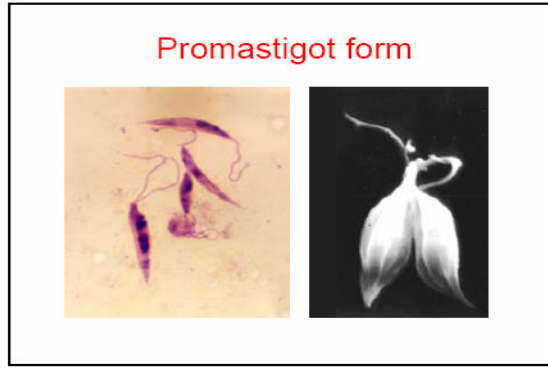
Leishmania parazitinin insan ve başka memelilerin vücudunda kamçısız (amastigot) ve tatarcık vücudunda kamçılı (promastigot) olmak üzere iki evrim şekli vardır. Leishmania türleri dimorfik yaşam siklusuna sahiptir. Seksüel döngü henüz tanımlanamamıştır (4, 5).

Leishmania'ların vektörü olan Phlebotomus veya Lutzomyia cinsi kum sinekleri leishmaniasis'li omurgalı konaktan kan emerken içinde parazit bulunan makrofajları da alırlar. Vektör tarafından alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken diğer bir kısmı şekil değiştirmeden bölünerek çoğalır. Bu şekil bir iki defa orta bağırsakta bölündükten sonra boyları uzar, flagella oluşur ve metasiklik promastigot haline gelirler. Bundan sonra ikiye bölünerek çoğalırlar ve sayıları arttıkça öne doğru gelirler. Enfekte kanın alınmasından 3 - 7 gün sonra yutağa varırlar ve burada farinksı tıkayacak kadar çoğalırlar. Enfektif promastigotlar vektör tarafından yine kan emerken yeni omurgalı konağın kanına geçerler ve burada konağın çeşitli savunma mekanizmalarına karşı koyarlar. Özellikle komplemanın sitotoksik ve eritici etkisine karşı koymaktan da öte bu etkileri kendi lehine kullanarak konağın makrofajlarına girerler ve makrofaj içinde amastigot forma dönüşerek ikiye bölünme ile çoğalır ve makrofajları patlatırlar. Kan yoluyla organizmaya yayılırlar ve yeni makrofajlar içine girerler (1, 4, 29).Şekil 1.

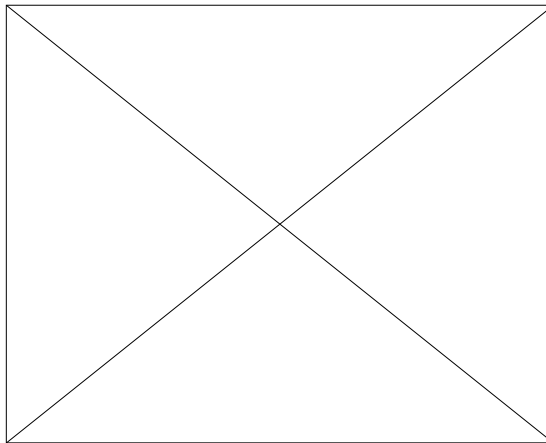
İnsanlarda ve diğer duyarlı memelilerde leishmania amastigotları 2-4 µm büyüklüğünde, yuvarlak veya oval formlardır. Wright ve Giemsa ile boyanan preparasyonlarda soluk mavi görünen sitoplazma içinde pembe veya koyu kırmızıya boyanan ve oldukça büyük bir çekirdek vardır (4, 5).



Resim 3- Leishmania'nın Amastigot formu(Özbel'den)



Resim 4- Leishmania'nın Promastigot formu (Özbel'den)



Resim-5 Leishmania'nın Promastigot formu (Edmiston'dan)



Vertebrasız kum sineğinin barsağında ekstraselüler olarak yaşayan ve invitro kültürlerde de geliştirilebilen promastigotların vücutları armut veya iğ şeklinde olup boyutları değişebilir. Uzunluğu 10-15µm, genişliği ise 1.5- 3.5 µm 'dir (5). 15-28 µm uzunluğunda olan ve parazitin ön ucundan çıkan bir serbest kamçısı bulunmaktadır (1, 30).

## İMMUNOLOJİ

Söz konusu lezyonlar iyileştiklerinde genellikle kişiyi ömür boyu re-enfeksiyonlardan koruyan kalıcı bir bağışıklık bırakırlar (11). Bu olay Leishmania antijenlerine karşı hücresel aşırı duyarlılık olarak bilinmektedir (1).

İnsanlarda deri leishmaniasisine karşı doğal bir direnç yoktur. Bununla beraber hastalıkların endemik oldukları bölgelerde şark çıbanı çıkarmayan insanlara rastlanır. Yaşın ve eşeyin etkisi yoktur (31). Hastalık genellikle çocuklarda görülür. Bunun sebebi bu hastalıkların ömür boyu bağışıklık vermesi dolayısıyla erişkinlerin bağışıklığının bu hastalıkların bunlarda görülmesini önlemesidir (4). Bağışıklık hastalık belirdikten 3-4 ay sonra başlar ve iyileştikten sonra bütün ömür boyunca sürer. Bağışıklık türe özgüdür, bundan dolayı *L.donovani* enfeksiyonu *L.tropica* enfeksiyonuna karşı bağışıklık vermez (32).

Bağışıklıkta önemli rolü olan T hücrelerinin etkisi :

- 1-Lenfokinlerde makrofajların aktifleşmesi
- 2-Parazitli konak hücresinin sitotoksik T lenfositler tarafından eritilmesi
- 3-T hücrelerinin hedef makrofaj hücreleriyle teması sonucu bunların aktifleşmesi şeklinde olmaktadır (4).

Parazitin antijenik yapısı üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle somatik yapıda olduğu ve 30 kadar somatik antijeninin bulunduğu saptanmıştır (33). Günümüzde leishmaniasise karşı aşılama çalışmaları devam etmektedir (34, 35).

## **KUTANÖZ LEİSHMANİASİS'İN KLİNİĞİ**

Kutanöz leishmaniasisin inkubasyon periyodu iki haftadan birkaç aya kadar değişir ve bir vakada üç yıla kadar uzadığı bildirilmiştir (36). Hastalığın klinik belirtileri; parazitin invazyonu, tropizmi ve patojenitesiyle birlikte konakçının immun cevabı gibi kompleks olaylara bağlı olarak değişir (5).

.Meydana gelen deri lezyonları iki şekilde görülür:

**A- Lokalize form:** akut, kronik ve rezidiv olmak üzere 3 formda görülür.

**1-Akut Form:** Enfeksiyon bölgesi genellikle sineğin ısırığı yerle sınırlıdır. Burada 2-3 mm çapında bir papül gelişir. Birkaç hafta sonra papül büyüyerek nodüler bir görünüm alır. Bu nodül sert olup alttaki yapılara sıkıca yapışıktır. Kısa bir zamanda nodülün ortasında bir ülser gelişir. Ülserin üzerinde, altına doğru folliküler çıkıntılar gösteren sert bir kurut gelişir buna Hulusi Behçet Çivi Belirtisi denir. Şark çibanının tanısında son derece karakteristiktir. Eğer temiz bakılırsa en çok bir yılda kendiliğinden iyileşir. Ancak izi kalır. Akut formda lezyonlar, tek sayıda olmakla birlikte ender olarak birden çok sayıda olabilir. Lezyonlar ağrısızdır. Genelde sekonder enfeksiyonlar tabloya eklendiği için hem klinik daha ağır olmakta hem de daha geç iyileşmektedir. İyileşmeden sonra konak parazite karşı ömür boyu bağışıklık kazanmaktadır. Bu nedenle endemik bölgede halk kendi arasında görünmeyen bir yerinde bu enfeksiyonu bulaştırmakta ve bağışıklık kazandırmaktadır. Histopatolojik olarak, epidermal hiperkeratoz, parakeratoz ile dermiste histiosit ve monoküler hücrelerden oluşan infiltrat ve intrasellüler paraziter cisimlerin varlığı tipiktir (11, 10, 3, 4, 12).

*L.tropica*'nın oluşturduğu lezyonlar daha çok yüzde görülür, kuru tip leishmaniasis de denir. Kuru ülser yaklaşık bir yılda veya daha uzun zamanda spontan olarak iyileşir (3, 10). *L. major*'un oluşturduğu lezyonlar ise daha çok ekstremitelerde görülür, bu tipe yaş tip de denir. Lenfanjit sık rastlanan bir komplikasyondur. Daha geniş ve enflamatuvar görünümlü olan lezyonlar daha hızlı bir progresyon gösterip kısa sürede (sıklıkla 2-8 ayda) yerinde daha çirkin bir iz bırakarak iyileşirler. *Leishmania major* enfeksiyonları *L. tropica*'ya göre daha ağır seyreder fakat kısa sürede (6-7 ay) iyileşir (1).

**2- Kronik Form** :Yaşlılarda görülür. Ülserleşmeyen eritematöz plaklarla karakterizedir(10).

**3- Residiv Form** :Daha önceki lezyonların skarlarında papüller veya tüberküller belirir. Buna lupoid veya tüberküloid form da denir. Uzun yıllar sonrasında oluşur. Tedaviye çok az yanıt verir. Lezyonlar genellikle yüzedir ve periferal olarak ilerleyen bir skarla karakterizedir. Lezyonda amastigotların azlığı sebebiyle tanıda lupus vulgaris'le karışabilir. Kronik bir seyir gösterip bazı vakalarda 20-30 yıla kadar uzadığı bildirilmiştir (10, 5, 4, 3).

**B- Generalize form:** Diffüz kutanöz leishmaniasis ve leishmanid olmak üzere 2 formda görülür.

**1- Diffuz Kutanöz Leishmaniasis:** Eski Dünya KL'si *L. aethiopica* tarafından meydana getirilir. Şiddetli şekilde ve geniş sahalarda kalınlaşmış deri plakları, papüller ve multiple nodüllerle karakterizedir. Lezyonlar genellikle yüzde ve kol ve bacakların dış yüzeylerinde daha sıktır. Lepramatöz lepra ile karışabilir. Yeni Dünya KL'si *L. mexicana* türü ve alt türleri ile ilişkilidir. Papüller yavaş yavaş gelişerek infiltre plaklara ve multiple nodüllere dönüşürler. Oluşturduğu lezyona Chiclero's ülseri denir. Olguların % 40'ı kulaktadır. Kulaktaki enfeksiyonlar dışında birkaç ay

içinde kendiliğinden iyileşebilir. Deri lezyonları ülser, vegetatif, verrüköz veya nodüler karakterdedir. En sık görülen ülser şekildir (3, 12, 4, 11). Diffuz KL'de lezyonda parazit çok bol olup Montenegro antijenine spesifik anerji hali saptanmaktadır (3, 12).

**2- Leishmanid'ler:** Bunlar içlerinde parazitin bulunduğu sifiloid veya bulunmadığı tüberküloid tipte papüllerdir ve leishmaniaların kan yolu ile yayılmaları ile meydana gelirler. Bazen tüm vücuda yayılabilirler (12).

## **MUKO-KUTANÖZ LEİSHMANİASİS'İN KLİNİĞİ**

Uta, Espundia adı verilen deri hastalığının etkeni *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ve *L. Pifanoi*'dir. Lezyon genelde ağızda veya burun mukozasındadır. Lezyon sayısı çoktur ve geniştir. 3-12 cm'lik büyüklük arzeden bu lezyonların infiltrasyon sebebiyle sınırlarının kalkık olması çok karakteristiktir. Bunun yanında mukozaların lize olması da hastalığın esaslı bir komplikasyonu olup şark çıbanından ayırır edilir. Hastalığın kıkırdak dokusuna geçme eğilimi olduğundan nazofarinks enfekte ederek deve burnu denilen görüntüyü oluşturur. Vakaların % 2- 5'inin bu forma dönüştüğü bildirilmiştir. Nazal septum eriyebilir, bu durumda nazal çöküntü oluşur (sivri burun). Yumuşak damakta perforasyon oluşur (3, 12, 37, 38).

## **VİSSERAL LEİSHMANİASİS'İN KLİNİĞİ**

Lenforetiküler sistemin (RES) bir infeksiyonu olup ateş, kilo kaybı, iştahsızlık, splenomegali ve pansitopeni ile karakterizedir. İlk belirti, tatarcığın sokma yerindeki krut bırakan nodüldür. Çoğu olguda başka belirti yoktur. Önceleri 38, 5C nadiren geçen ve günde iki kez zirve yapan ama giderek süreklilik kazanan bir ateş vardır. Bazı olgularda üşüme, titreme ile ateş yükselmesi ve terleme periyodları ile malaraya benzeri bir başlangıç periyodu gelişebilir. İmmün defektiflerde ise manifest

infeksiyon gelişir. Karaciğer ve lenf bezlerinde büyüme görülür (10, 4, 5). Organ transplantasyonu yapılanlarda ve immun yetersizliği olanlarda (örneğin HIV virusu ile enfekte olanlarda) hastalık daha ağır seyreder. Dalak çok büyük, yumuşak ve ağrısızdır, masif olabilen splenomegali, hepatomegali, anemi, lökopeni, hipergammaglobulinemi ve kilo kaybı çoğunlukla olmaktadır (39, 40, 41).

Hastaların cildinde, persistant irritasyon ve cilt tutulumu sonucunda pigmentasyon artışı görülür (post-Kala-Azar dermal Leishmaniasis). Hastanın saçları kuru ince cansız kolay kırılır, derisi toprak rengi görünümündedir. Karın şiş kollar cansız ve ince görünümündedir. Cilt lezyonları yayılma riskini artırır. En sık ölüm nedenleri; koma, kanama diyatezi (epistaxis), bronşit, pnömoni, sepsis, menenjit gibi sekonder infeksiyonlardır. İyileştikten sonra immünite kalıcı özelliktedir (10, 4, 5, 3, 2).

Körfez savaşı sırasında, kala-azar olan Amerikan askerlerinden ve Fas'ta kala-azarlı köpeklerin kemik iliğinden izole edilen etkenlerin moleküler yöntemlerle *L.tropica* olduğunun belirlenmiş olması ile bazı kutanöz etkenlerin viskerotropik olduğu gösterilmiştir (42, 43).



Resim 6 Şark Çıbanı Olguları



Resim 7 Leishmaniasis'in Klinik Formları

## TANI

Hastanın yaşadığı coğrafik bölge hastalığın akla getirilmesi bakımından tanıda önemli bir ipucu olabilir. Çünkü hastalık belli bölgelerde endemik olarak

bulunmaktadır. Özellikle Çukurova ve Güneydoğu Anadolu bölgelerindeki köy, kasaba ve hatta büyük Őehir merkezi gibi herhangi bir yerleşim biriminden gelen ve özellikle vücudun açık bölgelerine yerleŐmiŐ, uzun süredir iyileŐmeyen, eritemli papül, nodül veya ülser Şeklinde deri lezyonu olan tüm olgularda mutlaka KL akla getirilmelidir.

Ancak hastalığın bu özellikleri tanıya yaklaŐımı kolaylaŐtırması bakımından bir yandan önemli bir avantaj sağlarken bir yandan da bu hastalığı taklit edebilen (zellikle benzer biçimde uzun anamnezleri olan deri kanserleri ve deri tüberkülozu gibi) başka deri hastalıklarına da yanlıŐlıkla KL tanısı koyma riskini beraberinde taŐır.

Klinik olarak KL lezyonları fronkl, karbonkül, ektima gibi bakteriyel deri enfeksiyonları ile sıkça karıŐtırılmaktadır. Bu enfeksiyonlarda lezyon sürelerinin KL'nin aksine kısa olması (en fazla 1-2 hafta, sıklıkla birkaç gün), yine KL'nin aksine ağrılı ve sıcak olmaları (KL lezyonları üzerlerine sekonder bir enfeksiyon eklenmediği sürece ağrısızdırlar) nemli ayırt edici özelliklerdir. Genellikle KL'e benzer biçimde uzun süreli anamnezleri olması nedeni ile deri maligniteleri de (zellikle bazal hücreli ve skuamöz hücreli karsinomalar) ayırıcı tanıda mutlaka akla getirilmelidirler. Özellikle yaŐlı hastalarda, güneŐe maruz deri bölgelerinde yerleŐmiŐ, kenarları daha sert (endüre) ve bazen lenfadenopatilerin eŐlik ettiği lezyonlardan, eğer leishmania smear'i negatif ise, mutlaka biyopsi alınmalıdır. Lezyon süreleri iki yılı aŐmıŐ KL olgularının (kronik KL) ve skarla iyileŐip birkaç yıl içerisinde skar dokusu etrafında taze lezyonlarla nüksetmesi ile karakterize rezidivan leishmaniasis olgularının ayırıcı tanılarında ise yine malignitelerin yanı sıra özellikle son yıllarda tekrar artış gösteren deri tberklozları da akla getirilmelidir. Bu nedenle klinik olarak konmuŐ bir KL tanısı mutlaka bir laboratuar yöntemi ile doğrulanarak kesinleŐtirilmelidir (11, 3).

Direkt bakıda amastigotların görülmesi veya yapılan kültürlerde parazitin üretilmesi ile hastaya tanı konulmaktadır. Kültürde 2-3 haftada, hayvan deneyinde ise haftalar sonra parazit varlığı tespit edilebilmektedir (44, 45, 46). Kütanöz leishmaniasis'in tanısında son zamanlarda çeşitli serolojik ve moleküler testler kullanılmaktadır. Serumdaki anti- leishmanial antikorlar serolojik olarak ELİSA, immunfloresan assay ve direkt aglutinasyon testi gibi yöntemlerle belirlenebilir fakat bu antikorlar genellikle düşük titrede olduğu için serolojik tanı değerli değildir (5). İdentifikasyon amaçlı; gen ürünü olan enzim (zimodem) ve antijenlerden (serodem) yararlanılarak yapılan fenotipik moleküler yöntemler yanında DNA'ya dayalı genotipik moleküler teknikler (Şizodem, RFLP, PCR ve RAPD-PCR gibi) de uygulanmaktadır. Ancak genotipik moleküler teknikler, diğerlerine oranla daha güvenli ve sensitiftir. Konvansiyonel testlerin yanında bu çeşit testlerin kullanılması bir yandan tanının güvenilirliğini artırırken, diğer yandan tanı süresini kısaltabilmekte, ayrıca tedaviyi takip etmeyi de kolaylaştırmaktadır. (11, 3, 18).

### **Direkt Mikroskopi**

Kütanöz leishmaniosis şüphesi olan hastalarda örnek yaradan elde edilir. İnce iğne aspirasyonu ile yaradan sıvı veya lokal anesteziyle lezyonun sağlam kenarından biopsi ile parça alınabilir. Alınan örneğin yarısı direkt bakı için öteki yarısı ise kültür için kullanılır. Direkt bakı için hazırlanan lam metanolle tesbit edilip, giemza ile boyanır ve X100 objektif kullanılarak lamda amastigotlar aranır.

### **Kültür**

Kültür için NNN besiyerine ekim yapılır. Kültürler 26 derecede etüve bırakılarak, haftada 2 kez üreme yönünden kontrolleri yapılır, üçüncü hafta sonunda kültürler üreme yoksa etüvden çıkarılır.



## PCR

Günümüzde leishmania türlerinin tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) sıklıkla başvurulan bir yöntemdir.

PCR tekniği Kary Mullis tarafından 1985' te bulunmuş ve 1993 yılında bu çalışma ile Nobel ödülü kazanmıştır. PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu ) sağlayan basit ama çok başarılı bir invitro DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir (47, 48).

PCR uygulamaları için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Metod basitçe tüpte nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem hücre içinde gerçekleşen doğal replikasyonun bir tüp içinde taklit edilmesidir. PCR ile DNA nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında; çoğaltılacak olan kalıp DNA, bu DNA da çoğaltılması planlanan bölgedeki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan primerler, enzim olarak Taq polimeraz, sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatlar, polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler bulunmalıdır. Bu yöntemle RNA çoğaltılmak istenirse bunun önce reverse transriptase kullanılarak DNA kopyası çıkarılır ve PCR ile bu DNA molekülü çoğaltılır (48, 49, 50).

İşlem 3 aşamadan oluşmaktadır.

### 1-Ekstraksiyon

Muayene maddesinde hedef DNA 'nın elde edilmesine yönelik kaynatma, organik çözücüler ile ayırım ve etanol ile çöktürme vb. bir seri işlemleri içermektedir (50).

## 2-Amplifikasyon:

PCR üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleşir. Bu işlem için amaca yönelik olarak hazırlanmış otomatize sistemlerden ( Thermal Cyclers ) yararlanır.

İlk basamak **denatürasyondur**. 94 °C ye kadar ısıtılan DNA nın iki zinciri birbirinden ayrılır.

İkinci basamak; Primerlerin DNA' daki hedef bölgelerle özgül hibridizasyonuna olanak verecek sıcaklıkta **birleşmedir (annealing reaksiyonu)**. Primerlerin ayrılmış DNA zincirleri üzerinde komplementer oldukları bölgelere eşleşip kalıp DNA zinciri ile primer arasında hidrojen bağlarının oluşmasının sağlanacağı bir sıcaklık derecesi vardır. Tm ( erime noktası ) adını alan bu sıcaklık derecesi primer dizisinin baz içeriğine göre değişir. Primerdeki G ve C sayısı artıkça Tm derecesi de artar.  $Tm = 4 ( G + C ) + 2 ( A + T )$  Annealing sıcaklığı genellikle Tm değerinin 5 °C aşağısı alınarak belirlenir. Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları ile bağlanırlar. Primerlerin zgl olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50 °C ile 70 °C arasında değişmektedir.

nc basamak **polimerizasyon** veya **sentez (Extension)** aşamasıdır. Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklık olan 72 °C' ye getirildiğinde, primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri 3' ucuna kalıp DNA' ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar.

Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur, her tekrarlanışında iki primer arasında kalan zgl DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur ve n döngüde  $2^n$  sayıda amplifikasyon ürünü elde edilmiş olur (47, 50, 51, 52, 53, 54).

### 3-Tesbit:

Çoğaltılan DNA parçalarının gösterilmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem, agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezidir. Elektroforez ile boylarına göre ayrıştırılan DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışığı altında floresans vererek görünür hale getirilir. Elektroforez de PCR ürünlerinin büyüklüğü daha önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırılarak belirlenir. Reaksiyonun özgülüğü çok iyi tanımlanmış primer oligonükleotidlerin seçilmesiyle sağlanır(49, 55).

PCR; DNA' nın dizi analizi ve DNA haritalamasında, enfeksiyon hastalıkları ve genetik hastalıkların teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, v.b.), DNA parmak analizinde, insan evrimi araştırmalarında, İnsan Genom Projesi' ndeki araştırmalarda, allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık babalık tayini), tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evölüsyon çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde), ve hatta Mısır' daki mumyalardan DNA klonlaması gibi çok değişik alanlarda kullanılmaktadır (47).

### Real- Time PCR

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu ekranda izleyerek 'Real Time' (eşzamanlı) olarak

reaksiyonun gidişini ölçmek mümkündür. Real-time PCR, geleneksel PCR'ın uygulama alanlarını arttırırken PCR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (56, 57). Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT-PCR, Kantitatif-kinetik PCR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür. Real-Time PCR sistemi, floresan boyalar ya da probler kullanılarak PCR ürününün reaksiyon sırasında görüntülenmesine olanak verir. Ürünün çoğalımı floresan sinyalin artışına neden olduğundan, her döngüde artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür (55, 49,58).

Real-Time PCR'da, konvansiyonel PCR'dan farklı olarak, ürünlerin analizi döngüler sırasında yapılmaktadır (56, 59). Bu yüzden, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (56, 57, 49, 60).

### **Real Time-PCR'da kullanılan prob sistemleri ve boyalar**

#### **A. Özgül Floresan İşaretli Problar**

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Taqman,  
Molecular Beacons, Scorpion Primerleri, Hibridizasyon Probları

#### **B. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar**

Syber Green I, Etidyum Bromid

## **Real time PCR metotları**

İnterkalatör boya metodu

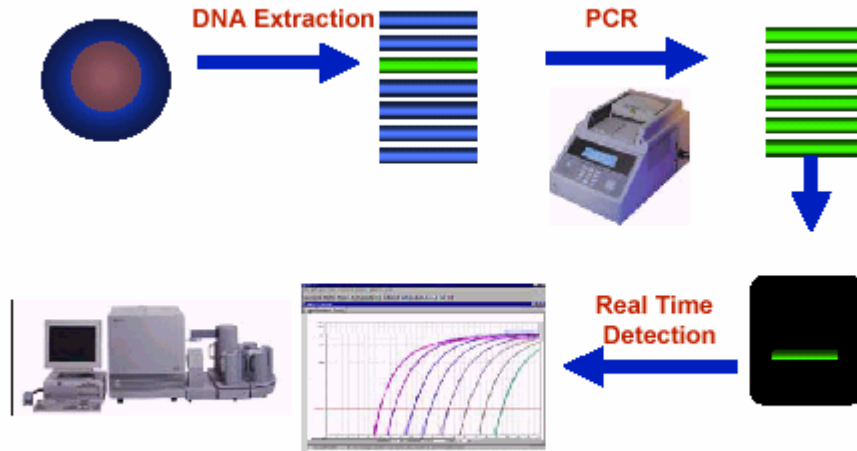
Hidroliz prob metodu

Hibridizasyon prob metodu

**İnterkalatör boya metodunda** SYBR green kullanılır. DNA'nın ayrılması sırasında bağlanmamış SYBR green düşük miktarda floresans verirler. Bağlanma derecesinde moleküller oluşan çift zincirli primer-hedef DNA ya bağlanmaya başlarlar. Polimerizasyon basamağında daha fazla molekül sentezlenen DNA ya bağlanır ve oluşan floresans real-time monitorize edilebilir (58, 57, 49, 59).

**Hidroliz prob metodunda** TaqMan problemleri kullanılır. Bu problemler DNA polimeraz enziminin 5' nükleaz aktivitesini hidroliz için kullanılır. DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi çift zincire spesifiktir. PCR sırasında prob hedef DNA dizisiyle hibridize olur. Prob ekstansiyon sırasında polimeraz enzimi ile uzaklaştırılır. Reporter Quencher 'den polimeraz enzimin 5' 3' nükleaz etkisi ile ayrılır. Serbest kalan reporter floresan ışık yayar (58, 49, 59).

**Hibridizasyon prob metodunda** [FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)] Donör fluorofor uygun dalga boyu ile eksite edilir. Donör enerjisi akseptör fluorofora aktarılır. Akseptör fluorofor daha uzun dalga boyunda emisyon yapar. Denatürasyon basamağında hibridizasyon problemleri solüsyon içerisinde ayrı ayrı durmaktadırlar. Annealing basamağında, problemler hedef DNA dizisine yan yana bağlanır. Birinci boyanın emisyon enerjisi ikinci boyayı eksite eder. Eksite olan ikinci boyada emisyon enerjisi yayar. Ekstansiyon basamağında her iki prob tekrar hedef DNA dizisinden ayrılmaya başlar. Polimerizasyon bitiminde problemler serbest hale dönerler (59, 58, 49).



Şekil 2 Real-time PCR (Davidson NC'den)

### Real-time PCR sırasındaki amplifikasyon evreleri

Başlangıç fazı

Logaritmik faz

Plato fazı

**Başlangıç Fazı:** Ürün oluşmakta ancak floresans, background seviyesinin altında kalmaktadır.

**Logaritmik Faz:** Ürünün eksponansiyel birikimiyle floresans background seviyesinin üzerine çıkmaktadır. Floresans amplifiye olan ürün miktarıyla direkt orantılı olarak yükselmektedir.

**Plato Fazı:** DNA veya floresans miktarında reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükenmesinden dolayı anlamlı artış yoktur (49, 58).

### **Real Time PCR genel kullanım alanları**

Gen ekspresyonunun kantitasyonu (61), DNA hasarı (mikrosatellit instabilitesi) tespiti (62), Metilasyon tespiti, 6. KİT sonrası kimerizmin izlenmesi (63); KİT sonrası MRD izlenmesi (63, 64, 65) Anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı(66), Hemoglobinopatilerin prenatal tanısı

### **Real Time PCR'ın enfeksiyon hastalıklarında kullanım alanları**

Klinik uygulamaları giderek artan real-time PCR sistemleri, enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir (56).

Streptococcus pneumoniae'nin penisillin duyarlılığının tesbitinde (67), patojenlerin tespitinde (68), Viral kantitasyonda (69, 70), CMV (67, 71, 69), Mycobacterium tuberculosis enfeksiyonlarının tanısında (72), Bağışık sistemi baskılanmış hastalarda mantar enfeksiyonlarının tanı ve takibinde (73). Genotipleme - melting-curve analizi gibi olgularda başarıyla kullanılmaktadır. Hematolojik maligniteli olup nakil yapılan hastalarda fungal enfeksiyonların tanı ve izlenmesinde PCR ve real-time PCR (lightcycler) kullanılmış ve real-time PCR'nin diğer kantitatif PCR yöntemlerine göre daha duyarlı ve özgül olduğu ve diğer sistemlerden hızlı olduğu gösterilmiştir (74).

## **MATERYAL VE METOD**

**Hasta Özellikleri:** Bu çalışma Şanlıurfa iline bağlı Harrankapı Sağlık Ocağı ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na başvuran 28 erkek (% 56), 22 bayan (% 44) olmak üzere toplam 50 hasta üzerinde yapıldı. Çalışmada

ülserle lezyonlu hastalar % 15, nodüler lezyonlu hastalar % 85 olarak tespit edildi. Yaş ortalaması 16± arasında olan bu hastaların bir tane lezyonu olanların % 40.6, birden fazla lezyonu olanların ise % 59.4 olduğu tespit edildi.

**Direkt Mikroskopi:** Klinik olarak kutanöz leishmaniasis tanısı konulan hastaların deri lezyonunun sağlam dokuya yakın kısmı % 70'lik alkolle silinip, bu bölge iki parmakla sıkıştırılarak lansetle delindi. Gelen kansız seröz sıvı lama nazikçe yayıldı, lam oda ısısında kuruduktan sonra üzerine metanol ilave edilerek tesbit işlemi yapıldı. Hazır Giemsa boyası solüsyonunun her bir mililitresi için 9 mililitre distile su konularak sulandırma yapılarak hazırlanan Giemsa boyası lamın üzerinde 20 dk kadar bekletildikten sonra yıkandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (100X objektif) incelendi.

Hazırlanan preparatlarda, yuvarlak veya oval şekilli, bir köşede koyu mor renkli nükleosu ve bunun hemen yanında kinetoplastı bulunan, sitoplazması soluk mavi renkte yapılar şeklinde görülen amastigot bulunduran lamlar pozitif olarak kabul edildi.

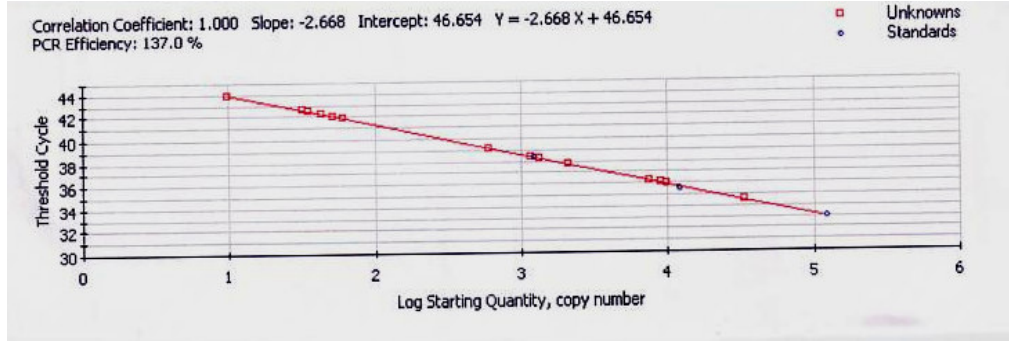
**Kültür:** Parazit kültürü muayenesi için örnek alınırken yara yeri % 70'lik etil-alkol ile silindikten sonra 10 IU'ye kadar steril serum fizyolojik çekilen insülin enjektörü ile tesbit edilen noktadan yara içine girildi ve yara içi birkaç defa bu solüsyonla yıkandı. Sonra yara içindeki tüm sıvı enjektöre çekildi ve alınan bu sıvının yarısı PCR için ayrıldı diğer yarısı ise vida kapaklı tüplerde hazırladığımız NNN (Novy, McNeal ve Nicolle) besiyeri içine bırakıldı. NNN besiyerini hazırlamak için 1.5 gr NaCl ve 3.5 gr agar 225 ml distile su içerisinde benmaride eritilip, otoklavda 121°C'de 20 dakika sterilize edildi ve 50°C'ye soğutulduktan sonra üzerine 60 ml defibrine tavşan kanı ilave edildi. Bu karışımdan 3'er ml steril vida kapaklı cam tüplere konularak NNN besiyeri hazırlandı. Bakteriyel kontaminasyonu engellemek



amacıyla besiyerine penisilin (200 IU/ml) ve streptomisin (2 µgr/ml) ilave edildi. Hazırlanan NNN besiyerleri kondansasyon sıvısının birikmesi amacıyla derin dondurucuya bırakıldı. Ekim yapılmadan önce besiyerleri oda ısısına getirildi. Ekim sonrası 26<sup>0</sup> C ye bırakılan besiyerleri haftada iki kez üreme yönünden kontrol edildi ve 3 hafta sonunda üreme olmayanlar çıkarıldı. Mikroskopik muayenede bir ucu sivri öteki ucu daha küt olan, bazen armuda benzeyen ve ön ucunda kamçılı şekilde görülen promastigotların kültürleri pozitif olarak kabul edildi.

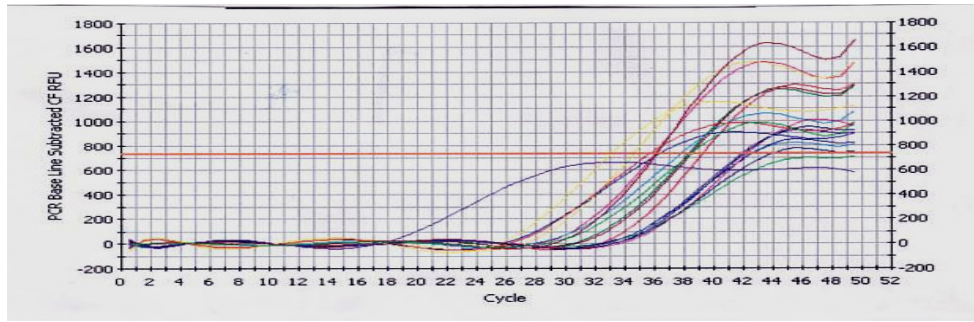
**PCR:** Real- time PCR çalışması için Bio Rad Instruments'ın "i-cycler" cihazı kullanıldı (USA.). DNA ekstraksiyonu için Qiagen'in DNA ekstraksiyon kiti kullanıldı (Qiamp® DNA Mini Kit 50 Hilden, Germany). Leishmania DNA'sının kantitasyonu için İontek firması tarafından üretilen Leishmania kantitasyon kiti kullanıldı (Fluorion Leishmania Kantitasyon Kiti İstanbul, Türkiye). Bu kit ile Leishmania DNA miktarı hassas biçimde ölçüldü. Testin lineer aralığı 1.2x10<sup>6</sup> kopya/ul - 1.2x10<sup>3</sup> kopya/ul idi.

Leishmania genomunun kinetoplast DNA'sı üzerinde 188 baz çifti uzunluğundaki korunmuş bölge, real-time PCR cihazında çoğaltıldı. PCR ürünü, floresan bir boya olan SYBR-green aracılığıyla reaksiyon sırasında görüntülendi. Çoğalan DNA'nın hedef bölge olduğu, erime eğrisi analizi yoluyla kesinleştirildi ve PCR reaksiyonu kontrol edilerek yanlış pozitif sonuçların verilmesi önlendi. Her örnek için amplifikasyonun ilk görüldüğü döngü, "döngü eşik değeri" (cycle threshold) olarak belirlendi. Erime eğrisi analizi ile spesifik ürün primer dimerlerden ayrıldı.



**Grafik 3**

**Grafik 3 Hasta ve Standartların Standart Eğri Grafikleri**



**Grafik 4 Hasta ve Standartların PCR amplifikasyon Eğri grafiği**

**İstatistiksel Analiz:** Veriler SPSS® 10.0 Windows programı ile analiz edildi. Verilerin analizi için istatistiksel parametrik metot kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için bağımsız gruplar arasında yapılan *t*-testi ve ki-kare testi kullanıldı. *P* değeri 0.05 yada daha az olduğunda önemli olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 50 hastanın 29'unun (% 58) yaralarının çapının 1- 3 cm arasında olduğu, 21'inin (% 42) ise 3 cm çapın üstünde olduğu gözlenmiştir.

Kliniğe göre direkt mikroskopi, kültür ve real- time PCR metodların tanısal verimlilik nitelikleri incelendiğinde sensitivite oranları sırasıyla % 40, % 50 ve % 92 olarak bulundu.

Direkt mikroskopi ile negatif sonuç bulunan 30 hastanın 26'sı real- time PCR ile pozitif bulunurken kültür ile negatif bulunan 25 hastanın 21'i real- time PCR ile pozitif bulunmuştur.

	D. mikroskopi		Kültür		PCR	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
<b>Sayı</b>	20	30	25	25	46	4
<b>Yüzde</b>	40	60	50	50	92	8

**Tablo 2 Direkt Mikroskopi, Kültür,ve PCR Sonuçları**

Antimon tedavisi alan hastaların almış olduğu tedavi sayıları ile parazit DNA miktarları arasında bir ilişki olup olmadığı ki-kare testi ile araştırıldı ve istatistiksel olarak  $p < 0.05$  oranında anlamlılık bulundu. DNA miktarı 1000 copy/ ml'nin üzerinde olan hastaların % 50'sinin 3'ten fazla tedavi aldığı halde, yaralarında hala yüksek sayıda parazit bulunduğu tespit edildi.

Direkt mikroskopi pozitifliği ile real-time PCR'ın pozitifliği arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu ki-kare testi ile tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar aşağıda verilen tablodadır.

	PCR Pozitif	PCR Negatif	Toplam
Direkt Mikroskopi Pozitif	20	0	20
Direkt Mikroskopi Negatif	26	4	30
Toplam	46	4	50

**Tablo 3 Direkt mikroskopi ve PCR pozitifliğinin ilişkisi**

Kültür pozitifliği ile real- time PCR'ın pozitifliği arasındaki ilişki de ki- kare testi ile anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar aşağıda verilen tablodadır.

	PCR Pozitif	PCR Negatif	Toplam
Kültür Pozitif	25	0	25
Kültür Negatif	21	4	25
Toplam	46	4	50

**Tablo 4 Kültür ve PCR pozitifliğinin ilişkisi**

Tedavi alan ve tedavi almayan hastaların enfeksiyon süresi ile ilişkisi ki- kare testi ile anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Buna göre tedavi almayan toplam 25 hastadan 21'inin enfeksiyon süresi 6 aydan küçük idi.

Tedavi alan hasta grubunda enfeksiyon süresi 6 aydan büyük olan ve enfeksiyon süresi 6 aydan küçük olan hastaların PCR DNA miktarları arasındaki ilişki, iki bağımsız grup arasında yapılan t testi ile anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ). Tedavi alan ve enfeksiyon süresi 6 aydan büyük olan 17 hastanın PCR DNA miktarlarının enfeksiyon süresiyle orantılı olarak azaldığı tespit edildi. Bu 17 hastadan 3'ünün PCR DNA miktarının ise çok yüksek olduğu gözlemlendi. Bu hastalardan birine ulaşılabildi ve tek lezyonlu bir hasta iken 1.5 senedir devam eden ve klinik olarak satellit lezyonlarla

karakterize rezidivan hasta olduğu gözlemlendi. 3 hastanın ekstrakte edilen DNA'ları ilerde DNA analizi yapılmak üzere ayrıldı.

Direkt mikroskopi ile PCR DNA miktarları arasındaki ilişki bağımsız gruplar arasında yapılan t testi ile araştırıldı ve anlamlı bulundu ( $p < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Kutanöz leishmaniasis'in tanısında, alınan örneklerde parazitin sayıca çok az olması, enfeksiyonun seyrinin değişik olabilmesi. kültür yönteminin yeterli duyarlılığa sahip olmaması gibi nedenlerle konvansiyonel yöntemlerle tanı konulamayan kutanöz leishmaniasisli hastalarda, kısa sürede güvenilirliği yüksek bir test sonucu alınmak istendiğinde yada tedaviyi takip etme durumunda PCR gittikçe önemi artan bir test olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu sebeple leishmaniasis'in tanısında PCR metodunun kullanımı günümüzde yaygınlaşmaktadır. Brezilya'da kutanöz ve visseral leishmanialı rodentlerin kan ve doku örneklerinde PCR metoduyla leishmania türlerinin identifikasyonu yapılmıştır (75). İsrail'in kuzeyinde yeni kutanöz leishmaniasis salgın odakları tanımlanmış ve PCR tekniği ile *L. tropica* izole ve identifiye edilmiştir (76). Yine Orta Doğu'da kutanöz leishmania türlerinin identifikasyonu amacıyla kinetoplast DNA spesifik primerler kullanılarak PCR uygulanmıştır (77). Bunun gibi kutanöz leishmaniasis'in tanısı ve türlerin identifikasyonunda PCR'in kullanılması ile ilgili yapılan pek çok çalışma vardır (78- 91). Visseral Leishmaniasis'in tanısında da PCR sıklıkla kullanılan bir metottur (92- 95). Eski Dünya Leishmania türlerinin ayırt edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada Permissively Primed İntergenic Polymorphic (PPIP)-PCR metodu türlerin tanımlanmasında ve kopyalanmasında hızlı bir yöntem olarak bulunmuştur (85).

Leishmaniasisli hastalarda kültür ve direk bakının sensitivitesi % 50-70 arasında değişirken, PCR' ın sensitivitesi % 95- 100 arasında (84, 96, 97, 44, 46, 98, 99, 100) değişir, spesifikliğı ise % 100 (96) olarak bildirilmiştir. Çeliksöz ve arkadaşlarının Şanlıurfa Harrankapı Sağlık Merkezinde yaptıkları bir çalışmada, KL'li 21 hastadan 11'inde (% 52) direkt mikroskopik inceleme ile amastigotların görüldüğü ve 15'inde (% 71) NNN besiyerindeki kültürde promastigotların üretildiğı bildirilmektedir (101). Tanı yöntemleri olarak direkt mikroskopi, kültür, ELISA ve IFA testi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada leishmaniasis için pozitiflik sırasıyla % 41.5, % 49, % 53, % 71 şeklinde bulunmuştur (102). Direkt mikroskopi, kültür ve PCR yöntemleriyle yapılan bir başka çalışmada ise pozitiflik sırasıyla, % 64, % 42 ve % 98 olarak bulunmuştur (103). Leishmaniasis tanısı için yapılan bir diğer çalışmada ise direkt bakı % 55, histolojik kesitlerin mikroskopisi % 76, PCR ise % 96 oranında duyarlı bulunmuştur (84).

Real time PCR metodu infeksiyon hastalıklarının tanısında son zamanlarda kullanıma girmiştir. Araştırmacılar bu yöntemi hastanın durumu hakkında erken bilgi vermesi, infeksiyonların erken tanısı ve tedavinin izlenmesinde kullanılabilmesi nedeni ile tercih etmektedir. Real-time kantitatif PCR; parazitik enfeksiyonların kantitasyonunun zor olduğı ve çok az duyarlılığa sahip standart metotların (genellikle mikroskopik) yerini almaya başlamıştır (59, 104). Son yıllarda plasmodium (68), toxoplasma (105), Trichomonas vaginalis (106, 107), Entamoeba histolytica (108), Cryptosporidium parvum (109), Leishmania (95), Giardia(110) ve Neospora'(59) nın tanısında sıklıkla uygulanmaktadır. Rebecca ve ark. insan gaita örneklerinde Giardia lamblia 'nın tanısı ve genotipinin belirlenmesinde en duyarlı metot olarak real time PCR yöntemini uygulamışlardır (111).

Real- time PCR tekniğı tamamen kantitatif sonuç verir, hızlı bir yöntemdir ve amplifikasyon sonrası elektroforez yapılmasına gerek yoktur. Bu teknik ile düşük seviyelerdeki parazitlerin kantitatif olarak ölçümü pre-semptomatik seviyelerde aşı

etkinliği hakkında fikir verebilir. İlaç tedavisi altında enfeksiyonun seyrini belirlemede, tedavinin takibinde ve belirsiz enfeksiyonların ve taşıyıcıların tanısını koymada güvenle kullanılan bir metottur (59).

Parazit hasarıyla hastalığın klinik bulgularının ilişkisi, güncel bilgilere göre parazit miktarıyla ilişkilidir. Bununla birlikte aynı türün multiple parazit tiplerinin değişik genotipleriyle oluşan enfeksiyonların tanısında da real time PCR uygulaması büyük bir kolaylık sağlar. Örneğin *P. falciparum*'un mutasyon nedeniyle gösterdiği ilaç dirençlerinin belirlenmesinde yada *P. vivax*'a karşı aşı çalışmalarında büyük umutlar bağlanan circumsporozoite proteininin farklı olduğu bazı varyant formlarının saptanmasında başarılı olarak kullanılmaktadır (112, 59).

Real-time kantitatif PCR yöntemi; DNA'nın kantitasyonunda hızlı ve alternatif bir yöntemdir. Bu nedenle bu metod, tıpta patojen mikroorganizmaların tesbitinde, çevrede ve gıdalarda bulunan çok çeşitli mikroorganizma türlerinin identifikasyonu ve sayılarının belirlenmesinde büyük bir potansiyele sahiptir (71, 104, 113).

Real Time PCR leishmaniasis'in tanı ve takibinde; hızlı, noninvaziv ve güvenilir bir metottur (99, 114). Leishmania enfeksiyonları ile ilgili yapılan deneysel çalışmaların bir çoğu çeşitli dokulardaki parazit miktarının belirlenmesine ihtiyaç göstermektedir. Parazit kültürlerinin mikrotitrasyonu yorucu olup mikrobiyal kontaminasyon riski taşıırken, parazitlerin mikroskobik kantitasyonu da çok sensitiv değildir ve zaman alıcıdır (115). Leishmaniasis'de başarılı bir terapi sonrası parazitemi seviyesi 1 parazit/ml'nin altında kalmaktadır (116). Leishmaniasis'in endemik olduğu Fransa'nın Marseilla Bölgesi'nde yaşayan ve leishmania hikayesi olmayan kişiler üzerinde yapılan bir çalışmada bu kişilerin %21'inin kanında Leishmania DNA'sı real time kantitatif PCR ile belirlenebilmiştir (116). Real-time PCR uygulaması için tek bir parazit DNA'sı bile yeterli olması sebebiyle terapi

sonrası hastanın takibi, paraziteminin kantitasyonu, belirsiz enfeksiyonların tanısı ve epidemiyolojik ve diagnostik amaçla kullanılmaktadır (116, 117). Patojen *Leishmania* türlerinin belirlenmesi, ayırımı ve kantitasyonu amacıyla uygulanan floresans rezonans enerji transferine dayalı real time PCR yönteminin analitik duyarlılığı %95 olarak bulunmuştur (118).

Rolao ve ark., *L. infantum* ile enfekte farelerin dalak ve karaciğerlerinden alınan örneklerde parazitin, spesifik DNA Taq Man problemleri kullanılarak, real time PCR ile kantitasyonunun yapılması ve bu tekniğin etkinliğinin PCR-ELISA ile karşılaştırılması amacıyla yaptıkları bir çalışmada PCR-ELISA tekniği, çok yüksek ve düşük miktardaki parazitin DNA'sının kantitasyonunda yetersiz kalırken Real-Time PCR tekniği daha sensitiv bulunmuştur (116).

Bir çalışmada *L. infantum* kinetoplast DNA'sı kantitatif real time PCR ile araştırılmış ve duyarlılığı diğer yöntemlerle; direk bakı, kültür ve konvansiyonel PCR'la karşılaştırılmış real time kantitatif PCR kandaki 0.0125 parazit/ml miktarındaki paraziti belirlemede duyarlı bulunmuştur. Bunun yanında epidemiyolojik ve diagnostik amaçla özellikle tedavi sonrası çok düşük düzeylerdeki paraziteminin kantitasyonunda çok kullanışlı bir yöntem olarak tesbit edilmiştir (116). Wortmann ve ark., 49 KL şüpheli hastadan aldıkları deri biyopsi örneklerini etanol içerisinde saklayıp Real Time PCR metodu ile birlikte konvansiyonel tanı metotlarını uygulamışlar ve karşılaştırmasını yapmışlardır. Buna göre real time PCR'ın duyarlılığı % 96 (47/ 49), histopatoloji % 61 (30/ 49)ve kültür ise % 33 (16/ 49) olarak bulunmuştur (119).

Çalışmamızda klinik olarak kutanöz leishmaniasis tanısı konulan 50 hastada direkt mikroskopi, kültür ve real- time PCR yöntemini uygulayarak PCR' ın tanıdaki etkinliğini ve duyarlılığını araştırmayı amaçladık. Kliniğe göre bu metodların tanısal verimlilik nitelikleri incelendiğinde sensitivite oranları sırasıyla % 40 (20/ 50), % 50



(25/ 50)ve % 92 (46/ 50) olarak bulundu. Direkt mikroskopi ile negatif sonuç bulunan 30 hastadan 26'sı, real- time PCR ile pozitif bulunurken kültür ile negatif bulunan 25 hastadan 21'i real- time PCR ile pozitif bulunmuştur. Bizim sonuçlarımız da bu çalışma ile uygunluk göstermiş olup real- time PCR'ın diagnostik duyarlılığının direkt mikroskopi ve kültür gibi konvansiyonel metodlara göre çok yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Tedavi almayan toplam 25 hastadan 21'inin enfeksiyon süresi 6 aydan küçük bulunmuştur. Bu hastaların tedaviye alınmalarının geciktiği görülmüştür. Hastalardan alınan anemneze göre hastanın lezyonu tanımlayamaması, sivilce veya benzeri lezyonlara benzetmesi nedeniyle önemsememesi, bazı vakalarda 6 aya kadar kendiliğinden geçebilmesinden dolayı hastanın iyileşmeyi beklemesi, bu bölge insanının tarımla uğraşmasından dolayı hastalığın olduğu yaz döneminde çalışıyor olması gibi sebeplerle tedavi almaları gecikmiştir. Bununla beraber yarada sekonder bir enfeksiyon olması, yaranın residivan ya da kronik şekle dönüşmesi nedeniyle direkt bakı ve kültürle tanısı konulamayan KL olgularının da olabileceği düşünülmektedir

Klinik olarak visseral leishmaniasis tanısı konulan ve aynı zamanda HIV ile enfekte 25 hastanın periferik kan örnekleri real time PCR'la değerlendirilmiş ve bu metodun diagnostik duyarlılığı % 100 olarak bulunmuştur. Bu hastaların tedavi sikluslarında parazit miktarının azaldığı ve tedavinin en sonunda ise < 0.63 parazit/ml olduğu da bu metodla tesbit edilmiştir (120).

Yaptığımız bu çalışmada antimon tedavisi alan ve enfeksiyon süresi 6 aydan büyük olan 17 hastanın PCR DNA miktarlarının enfeksiyon süresiyle orantılı olarak azaldığı tespit edildi. Bu sonuçlar konak immun yanıtının antimon tedavisine belli bir sürede cevap verdiğini ve real- time PCR 'ın antimon tedavisinin etkinliğini izlemedeki başarısını göstermektedir.

Tedavi alan ve enfeksiyon süresi 6 aydan büyük olan 3 hastanın PCR DNA miktarının yüksek olduğu gözlenmiştir. Bunun nedenlerinin; ilaca dirençli süşun gelişmesi, bozulmuş konak immün yanıtı, rezidivan kutanöz leishmaniasis gibi çeşitli sebepler olabileceği düşünülmüştür. Bu hastalardan birine ulaşılabilmektedir. Bu hastanın başlangıçta tek bir lezyona sahip olduğu, daha sonra lezyon etrafında satellit lezyonlar oluşarak rezidivan hale geçtiği ve 1.5 senedir hastalığın devam ettiği belirlenmiştir. Klinik olarak KL tanısı konan 4 hastanın ise real- time PCR ile negatif olduğu kesinleşmiştir.

Değişik leishmania türleri ile infekte edilen farelerin dokularından alınan örneklerde parazit DNA'sının kantitasyonu için real time kantitatif PCR metodu kullanılmıştır. Bu yöntem ile 0.1 parazit miktarına eşdeğer *L. major* DNA'sı belirlenmiştir. Bazı örneklerde sonuçlar geleneksel PCR'da negatif iken Real time PCR'da pozitif bulunmuştur (99). Çalışmamızda klinik olarak KL tanısı konan hastaların real- time PCR ile tespit edilen parazitemi seviyesi çok geniş bir dağılım göstermektedir (9.00- 155000.00 parazit/ ml). Bizim çalışmamızda da real- time PCR 'ın çok düşük seviyelerdeki parazit miktarını belirleyebildiği ve diğer metodlara göre hızlı, noninvaziv, duyarlılığı yüksek ve güvenilir bir metod olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile klinik ve geleneksel laboratuvar teknikleri ile KL tanısı konan hastalarda, amastigotların çok az olduğu rezidivan KL olgularında, tedaviye cevabın araştırılmasında ve hastalığın doğal seyrini takipde real- time PCR 'ın kullanımının çok önemli olduğu gösterilmiştir

## KAYNAKLAR

- 1- Özbel, Y.: Deri Ülserine neden olan parazit hastalıkları etkenleri. Erişim: <http://med.ege.edu.tr/~parazit/staff/ozbel/CL1.pdf>, 2003.
- 2- Altıntaş, N.: Leishmaniosis. Gap ve Parazit Hastalıkları. Editör:Ali Özcel., 89-120, 1993.
- 3- World Health Organization.: Control Of The Leishmaniasis Technical Report Series 793, Geneva, 1990.
- 4- Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., Samastı, M.: İnsanın Ökaryonlu Parazitleri ve Bunlarla Oluşan Hastalıkları. Unat'ın Tıp Parazitolojisi Beşinci Baskı. Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfi Yayınları. No 15. Doyuran Matbaası, 564–86, İstanbul, 1995.
- 5- Pearson, R.D, Sousa, Q. A. : Leishmania species: Visceral (kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis, in Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practices of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, 2428-42, New York 1995.
- 6- Garcia, L., and Bruckner, D.: Leishmaniasis in :Diagnostic Medikal Parasitology, Amerikan Society For Microbiology, 139-50, Washington, 2005
- 7- Svobodova, M., Votypka, J.: Experimental transmission of *Leishmania tropica* to hamsters and mice by the bite of *Phlebotomus sergenti.*, Microbes and Infection 5, 471–4, 2003
- 8- Geneviève, F.: Chapitre 7 Regulation Of Leishmania-Induced Innate Inflammatory Response By The Phosphotyrosine Phosphatase Shp-1, Philosophiæ doctor (Ph.D.) Université Laval Faculté De Médecine Doctorat en microbiologie-immunologie Directeur(trice) de recherche : Olivier, Martin 2004-01 © Geneviève Forget, 2004 OIM.,
- 9- Gramissia, M., Ben-Ismail R., Gradoni L.: A *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia., Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85:370-371, 1991.
- 10- Oğur, R.: *Leishmania* Enfeksiyonları, Türk Silahlı Kuvvetleri Koruyucu Hekimlik Bülteni., 1(2), 2002.

- 11- Uzun, S. : Kutanöz Leishmaniasis. 2003. Erişim:[http://lokman.cu.edu.tr/dermatology/egitim\\_intern/leishmaniasis.htm](http://lokman.cu.edu.tr/dermatology/egitim_intern/leishmaniasis.htm).
- 12- Gezen, C.: Deri Leishmaniasis'i. Leishmaniasis, kala-zar ve şark çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi. T. Par. Derneği no: 2, 1981.
- 13- Yücel, A., Polat, E., Gökler, G.: Bir Deri Leyişmanyazı, Türkiye Par Der 20(2), 207- 9, 1996
- 14- Unat, E.K.: Leishmaniasislerin Tarihçesi, Leishmaniasis, kala-zar ve şark çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi. T. Par. Derneği no: 2, 1981
- 15- Unat, E.K.: Osmanlı İmparatorluğunda Tıp Zoolojisi ve Parazitolojisi., İ.Ü. Cer. Tıp Fak. Yay., 8/1577, 1971.
- 16- Hausmann- Huelsmann.: Protozoon Protista. Erişim <http://homepage3.nifty.com/cxj11255/zool/protozoa2.html>, 1996.
- 17- Lainson, R., and Shaw J.J.: Leishmaniasis in the new world: taxonomic problems, Brit. Med. Bull. 28, 44-8, 1972.
- 18- Dilmeç, F., Matur, A., Alhan, E., Aksaray, N.: Çukurova Bölgesi Visseral Leishmania Etkenlerinde Total DNA Restriksiyon Endonükleaz Profilleri, Çukurova Ü. Tıp Fak. Der., 24, 4 158- 64, 1999.
- 19- World Health Organization. 2000. Fact sheet no. 116. [Online.] <http://www.who.int/inffs/en/fact116.html>. Accessed 15 July 2002.
- 20- Desjeux, P.: The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg ; 95:239 43, 2001.
- 21- Elias, M., Rahman, A.J., Khan, N.I.: Visseral leishmaniasis and its control in Bangladesh. Bull World Health Organ., 67, 43-9, 1989.
- 22- Costa, C.H., Pereira, H.F., Araugo, M.V. : Visseral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí ,Brazil, 1980-1986, Rev Saude Pulica 24, 361-72, 1990.
- 23- Memişoğlu, HR., Uzun, S.:Türkiye'de Kutanöz Leishmaniasisin Durumu, X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 15-19, İzmir, 2001.

- 24- Gürel, S., Ulukanlıgil, M., Ozbilge, H.: Cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa: epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). *Int J Dermatol* 41(1), 32-7 2002.
- 25- Doğan, F. : Leishmania enfeksiyonlarının epidemiyolojisi leishmaniaların rezervuar ve vektörleri. Leishmaniasis kala-azar ve şark çıbanı. 2. Ulusal Parazitoloji Kongresi. T. Par. Derneği no: 2, 1981.
- 26- Yaşarol, Ş. :Medikal Parazitoloji. E.Ü. Tıp Fak. Yayın no.93: 49-60, İzmir 1978.
- 27- Killick-Kendrick, R.: Phlebotomine vectors Of The Leishmaniasis: a review, *Med Vet Entomol*, 4, 1-24 1990.
- 28- Akkafa, F., Taşçı, S.: Şanlıurfa ilinde görülen Phlebotomus türleri, *T. Par. Der.*, 23,4 417- 22, 1999.
- 29- Merdivenci, A.: Medikal Protozooloji, Temel Matbaası, 137- 67, İstanbul, 1981.
- 30- Pearson, RD., Sousa, A.Q. : Clinic spectrum of leishmaniasis. *Clinic infekc disease*, 22:1-13, 1996.
- 31- Stauber, LA.: İmmunity to Leishmania, *Acad. Sci.*, 113, 409- 417, 1963.
- 32- Manson- Bahr, P. E. C.: İmmuniyt in kala- azar.,*Trans Roy Sos Trop Med Hyg* 55, 550-55, 1961
- 33- Mael, J.: Leishmaniasis. *Membran Pathology of Tropical Disease .WHO Trop Disease Research ser. No: 2, 105-129, 1979*
- 34- Aksoy, N., Ozbilge, H., Keles, S., Iriadam, M., Vural, H., Akcay, F.: A preliminary approach to the separation of Leishmania cell-surface antigens. *J Sep Sci.* ; 27 (12), 1011-1016, 2004.
- 35- Alimohammadian, M. H., Hakimi H. and Nikseresht M. A.: The preparation and evaluation of reference leishmanin from *Leishmania major* for use in man for diagnostic and experimental purposes, *Med. J. Islamic Repub. Iran* 7, 23- 8, 1993.
- 36- Smith, P.A.J.: Long Incubation Period in Leishmaniasis. *BMJ.* 2: 1143, 1955.
- 37- Marsden, P.D., Nonata R.R.: Mucocutaneous Leishmaniasis-a review of clinical aspects, *Rev Soc Bras Med Trop*, 9: 309-26, 1975.
- 38- Pupo, J.A.: Estudo Leishmaniose tegumentar Americans-(L. braziliensis-viannia,

- 1911), Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo, 1, 113-164, 1946.
- 39- Minodier, P., Garnier, J.M.: Childhood visceral leishmaniasis in Provence. Arch Pediatr 7: 572- 7, 2000.
- 40- Büyükaşık, Y., İleri, N.S., Haznedaroğlu, I.C., Demiroğlu, H., Dündar, S.: Fever, hepatosplenomegaly and pancytopenia in a patient living in the Mediterranean region. Postgrad Med J., 74: 237-9,1998.
- 41- Colovic, M.D., Jankovic, G.M., Colovic, N.R., Martinovic, V.C.: Kalaazar and myelodysplastic syndrome in the same patient. Haematology, 5: 246-8,2002.
- 42- Grogl, M., Daugirda J.L., Hoover, D.L., Magill, A.J., Berman, J.D.: Survivability and infectivity of viscerotropic *Leishmania tropica* from operation desert storm participants in human blood products maintained under blood bank conditions. Am J Trop Med Hyg , 49; 308-315 1983.
- 43- Guessous-Idrissi, N., Berrag, B., Riyad, M., et al.: Short report: L.tropica: Etiologic agent of a case of canine visceral Leishmaniasis in Northern Morocco. Am J Trop Med Hyg ; 57: 172-173, 1997.
- 44- Navin, TR., Arana, FE., Mérida, AM., Arana, BA., Castillo, L., Silvers, DN.: Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. Am J Trop Med Hyg., 42: 36–42, 1990.
- 45- Weigle, KA., Dávalos, M., Heredia, P., Molineros, R., Saravia N G D'Alessandro, A. : Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods, Am J Trop Med Hyg., 36,489–96 1987.
- 46- Cuba Cuba, CA., Netto, EM., Marsden, PD., Rosa Ade, C., Llanos Cuentas, EA., Costa, JL.: Cultivation of *Leishmania braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions, Trans R Soc Trop Med Hy.,80, 456– 7 1986.
- 47- Arı, Ş.: Moleküler Biyolojide Kullanılan, “DNA’ nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması” Ed. Temizkan, G., Arda N. Nobel Kitabevi, 57-67, 1999.

- 48- Uysal, M.: PCR ve Real time PCR Erişim: [www.uysal M. klinikbiyokimya. com](http://www.uysal M. klinikbiyokimya. com)
- 49- Biyomoleküler tanı yöntemleri Erişim: [www. tedavi. saglik. gov. tr./ bolumler./ .bolumdetayları /tbc / biyomol. lab. htm](http://www. tedavi. saglik. gov. tr./ bolumler./ .bolumdetayları /tbc / biyomol. lab. htm)
- 50- Mullis, K B., Faloona, F A.: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50 1987.
- 51- Persing D H. In vitro nucleic acid amplification techniques. Persing, D H, Smith T F, Tenover F C, White T J 1993 (ed) *Diagnostic Molecular Biology, Principles and Applications*. American Society for Microbiology . Washington.D.C. 51-87 1993.
- 52- Bej, AK., Mahbubani, MH., Atlas RM.: Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26, 301-34. 1991.
- 53- Erlich, HA, Gelfand, D., Sninsky, JJ.: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-5 1991.
- 54- Saiki, R K., Gelfand, D H., Stoffel, S., Scharf, S J., Higuchi, R., Horn, G T., Mullis, K. B., Erlich, H A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science.*, 239, 487-91 1988.
- 55- Davidson, NC.: Real time PCR method. Erişim: [www. bio. davidson. edu/ courses / genomics/ method/ realtimepcr. html](http://www. bio. davidson. edu/ courses / genomics/ method/ realtimepcr. html)
- 56- İontek. Leishmania - QNS 1.0 Leishmania DNA Kantitasyon Kiti. Erişim: - <http://www.iontek.com.tr/?id=9> 2003.
- 57- Aydın- Sayitoğlu, M.: Hematoloji'de real time PCR Erişim: [www. thd. org. tr/ sub /turk /doc /mugeaydinsayitoglu. pdf](http://www. thd. org. tr/ sub /turk /doc /mugeaydinsayitoglu. pdf)
- 58- Real time PCR vs. Traditional PCR,Erişim: [www. appliedbiosystems. com./support /tutorials/ pdf/ rtPCR. vs. tradPCR. Pdf, 2001](http://www. appliedbiosystems. com./support /tutorials/ pdf/ rtPCR. vs. tradPCR. Pdf, 2001).
- 59- Bell, A.S., Ranford-Cartwright, L.C.: Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol.*, 18(8), 337-42, 2002.

- 60- Dorak, M.:Real time PCR Erişim.: [www.dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html](http://www.dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html)
- 61- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C.: An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression, *Methods.*, 25(4),386-401 2001.
- 62- Dietmaier, W., Hofstadter, F.: Detection of Microsatellite instability by real time PCR and hibridization prob melting point analyzis, *Lab. Invest.* 81(10), 1453- 56, 2001.
- 63- Elmaagacli, AH.: Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation, *Int J Hematol.*, 76, 2 204-5 2002.
- 64- Gabert, J., Beillard, E., Van der Velden, VH., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, JM., Cave, H, Pane, F., Aerts, JL., De, Micheli D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., Van Dongen, JJ.: Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program, *Leukemia.*;17(12), 2318-57 2003.
- 65- Van der Velden, VH., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., Van Dongen, JJ: Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia.* Jun;17(6), 1013-34 2003
- 66- Bischoff, EW., Soetekouw, PM., De, Vries., M, Scheepers, PT., Bleijenberg, G., Van der Meer, JW.: Chemical sensitivity in symptomatic Cambodia veterans, *Arch Environ Health*, 58(12), 740-5 2003.



- 67- Kearns, A: Rapid detection and quantification of CMV DNA in urine using LightCycler-based real-time PCR. Journ. of Clinic. Virology, Volume 24, Issue 1-2, Pages 131-134 2003.
- 68- Perandin, F., Manca, N., Calderaro, A., Piccolo, G., Galati, L., Ricci, L., Medici, M. C., Arcangeletti, M. C., Snounou, G., Dettori, G., and Chezzi, C.: Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis, J Clin Microbiol. 42(3), 1214–19 2004.
- 69- Mengelle, C., Sandres-Saune, K., Pasquier, C., Rostaing, L., Mansuy, J.M., Marty, M., Da Silva, I., Attal, M., Massip, P., Izopet, J.: Automated extraction and quantification of human cytomegalovirus DNA in whole blood by real-time PCR assay. J Clin Microbiol. Aug;41(8), 3840-5, 2003.
- 70- Niesters, H.: Clinic Virology in real time, J. Clin. Virol., 25, (3 ) 3- 12 2002.
- 71- Kearns, A. M., Guiver, M., James, V. and King, J.: Development and evaluation of a real-time quantitative PCR for the detection of human cytomegalovirus. J. Virol. Methods 95:121-131, 2001.
- 72- Hazbon, MH: Recent advances in molecular methods for early diagnosis of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis, Biomedica. 2004 Jun;24 Supp 1:149-62
- 73- Işık, N., Ağaçfıdan, A., Ağırbaşı, H., Işık, M., Yeğenoğlu, Y., Uzun, E., Erturan, Z., Bozkaya, E., Badur, S.: Bağışık Sistemi Baskılanmış Hastalarda Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Mantar İnfeksiyonlarının Tanı Ve Takibi İnfeksiyon Dergisi., 18(1), 79-4, 2004.
- 74- Işık, N., Mills, K.: Hematolojik Maligniteli Olup Nakil Yapılan Hastalarda Fungal İnfeksiyonların Tanı Ve İzlenmesinde PCR Ve Real-Time PCR (Lightcycler) Kullanımı, Turkish J. of Haematol;20(2), 63-8, 2003.
- 75- Oliveira, F.S., Pirmez, C., Pires, M.Q., Brazil, R.P., Pacheco, R.S.: PCR-based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic

area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol.* May 15;129(3-4):219-27, 2005.

76- Jacobson, R.L., Eisenberger, C.L., Svobodova, M., Baneth, G., Sztern, J., Carvalho, J., Nasereddin, A., Fari, M., Shalom, U., Volf, P., Votypka, J., Dedet, J., Pratlong, F., Schonian, G., Schnur, L.F., Jaffe, C.L., and Warburg, A.: Outbreak of Cutaneous Leishmaniasis in Northern Israel, *The Journal of Infectious Diseases* ;188:1065-1073, 2003.

77- Anders, G., Eisenberger, CL., Jonas, F., Greenblatt, CL.: Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*;96, 1 87-2, 2002.

78- Schonian, G., Schnur, L., el Fahi, M., Oskam, L., Kolesnikov, A. A., Sokolowska-Kohler, W., Presber, W.: Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-Based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 95(2), 217-24. 2001

79- Noyes, HA., Reyburn, H., Bailey, JW., Smith, D. : A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinic samples and its application to the study of the epidemiology *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol.*, 37(5), 1656-7 1999.

80- Svobodová, M., Votypka, J., Nicolas, L., Volf, P.: *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*, *Microbes and Infection.*, 5, 5 361-364 2003.

81- Al-Jawabreh A, Schnur LF, Nasereddin A, Schwenkenbecher JM, Abdeen Z, Barghuthy F, Khanfar H, Presber W, Schonian G. The recent emergence of

*Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major.*, Trop Med Int Health., 9(7), 812-6 2004.

82- Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of Kna. Scand J Infect Dis. 2001;33(8):596-6.

83- Nimri, L.F, Schallig H.D.:Application of riboprinting for the identification of isolates of cutaneous *Leishmania* spp., Parasitology. Sep;127(Pt 3):201-5, 2003.

84- Andresen, K., Gaafar, A., El- Hassan, A. M., İsmail, A.,Dafalla, M., Theander, T. G., and Kharazmi, A: Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions, Transactions of the Royal Soc. Of Trop. Med. and Hyg., 90, 133-5 1996.

85- Eisenberger, C.L. and Jaffe, C.L.: *Leishmania*:Identification of Old World Species Using a Permissively Primed Intergenic Polymorphic-Polymerase Chain Reaction ,Volume 91, Issue 1, January , Pages 70-77, 1999.

86- Bhattacharyya, R., Das, K., Sen, S., Roy, S., Majumder, H. K: Development of a genus specific primer set for detection of leishmania parasites by polimerase chain reaction, FEMS Microbiology Letters, 135: 195-200 1996.

87- Kennedy W. P. K.: Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of leishmania isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridization, Mol. Biochem Parasitol. 12, 313-5 1984.

88- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B. And Convit, J: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization, J. Of Clin. Microbiol. 2246-52, 1994.

89- Özensoy Töz, S., Özbel, Y., Gül Atay, M., Ertabaklar, H., Şakru, N., Taylan Özkan, A., Hökelek M: İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerle leishmaniasis tanısı için polimeraz zincir reaksiyonu uygulanması, T. Parazitol. Der., 26(3): 239-4, 2002.

- 90- Piñero, J., Martínez, E., Pacheco, R., Aragón, Z., De Armas, F., Del Castillo, A. and Valladares, B.: PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis, *Acta Tropica* Volume 73, Issue 1 , 25 May , Pages 21-29, 1999.
- 91- Tiago, M., Castilho, Jeffrey Jon Shaw, And Lucile, M., Floeter-Winter.: New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase For Identification Of *Leishmania* Species, *Journal Of Clin. Microbiol.*,41(2), 540–46 2003.
- 92- Cascio, A., Calattini, S., Colomba, C., Scalamogna, C., Galazzi, M., Pizzuto, M., Camilli, R., Gramiccia, M., Titone, L., Corbellino, M., and Antinori, S.: Polymerase chain reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics* 109:E27. 2002.
- 93- Fisa, R., Riera, C., Ribero, E., Gallego, M. and Portus, M.: A nested polymerase chain reaction for diagnosis and follow-up of human visceral leishmaniasis patients using blood samples. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96(1), 191-94, 2002.
- 94- Lachaud, L., J. Dereure, E. Chabbert, J. Reynes, J. M. Mauboussin, E. Oziol, J. P. Dedet, and P. Bastien. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 38:236-240, 2000.
- 95- Bretagne, S., Durand, R., Olivi, M., Jean- François, G., Sulahian, A., Rivollet, D., Vidaud, M., Deniau, M.: Real-Time PCR as a New Tool for Quantifying *Leishmania infantum* in Liver in Infected Mice *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, July , p. 828-831, Vol. 8, No. 4,2001.
- 96- Safaei, A., Motazedian, M.H., Vasei, M.: Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Histologically Positive, Suspicious and Negative Skin Biopsies *Dermatology*,205, 1 2002.
- 97- Lopez, M., Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos- Cuentas, A., Orrego, C., Arevalo, J.: Diagnosis of *Leishmania* using the polimerase chain reaction: A simplified procedure for field work , *Am. J Trop Med Hyg.* 49(3), 348- 56, 1993.

- 98- Akman, L., Aksu, HSZ., Wang, RQ., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Alkan, Z., Ozcel, MA., Culha, G., Ozcan, K., Uzun, S., Memisoglu, HR., Chang, KP.: Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *J Euk Microbiol* 47, 545–54 2000.
- 99- Nicolas, L., Prina, E., Lang, T. and Milon, G.: Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol.* May; 40(5): 1666–1669, 2002.
- 100- Degrave, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U.: Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*, A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 89, 463–469. 1994.
- 101- Çeliksöz, A., Saygı, G., Özçelik, S.: Comparison of direct and culture methods in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis and the investigation of the effects of both trimethoprim-sulfametaxozole and ofloxacin on promastigotes. Özcel MA (ed) First world congress on leishmaniasis abstracts. *Acta Parasitologica Turcica.* ;21(S1), 110, 1997.
- 102- Özbilge, H.: Kutanöz leishmaniosis tanısında direkt mikroskopi, kültür, elisa ve ıfat yöntemlerinin karşılaştırılması, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Malatya, 1999.
- 103- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takıff, H., Bloom, B. And Convit, J: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization, *J. Of Clin. Microbiol.* 2246-52, 1994.
- 104- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M.: Real-time quantitative PCR. *Genome Res.* 6:986-994, 1996.
- 105- Ordinaire, I., Simon, A., Frealle, E., Soula, F., Valat, AS., Rouland, V., Subtil, D., Dei-Cas, E., Camus, D., Delhaes, L.: Real-time quantitative PCR for toxoplasmosis diagnosis, *Ann Biol Clin (Paris).* Jan-Feb;63(1), 67-3, 2005.

- 106- Hardick, J., Yang, S., Lin, S., Duncan, D., and Gaydos, C.: Use of the Roche LightCycler Instrument in a Real-Time PCR for *Trichomonas vaginalis* in Urine Samples from Females and Males- J Clin Microbiol.; 41(12), 5619– 22, 2003
- 107- Jordan, J. A., Lowery, D., and Trucco M.: Taqman- based detection of *Trichomonas vaginalis* DNA from female genital specimens, J. Clin. Microbiol, 39, 3819- 22, 2001.
- 108- Mirelman, D., Nuchamowitz, Y., and Stolarsky T.: Comparison of use of enzyme- liked immunosorbent assay- based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar.*, J. Clin. Microbiol. 35, 2405-7, 1997.
- 109- Fontaine, M., and Guillot E.: Development of a taq man quantitative PCR assay specific for *Cryptosporidium parvum*, FEMS Microbiol. Lett. 214, 13-7, 2002
- 110- Verweij J.J, Schinkel J, Laeijendecker D, van Rooyen M.A, van Lieshout L, Polderman A.M.: Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. Mol Cell Probes. Oct;17(5):223-5, 2003.
- 111- Rebecca A. Guy, Chongxie Xiao, and Paul A. Horgen. All Rights Reserved. Real-Time PCR Assay for Detection and Genotype Differentiation of *Giardia lamblia* in Stool Specimens. Journal of Clinical Microbiology, July 2004, p. 3317-3320, Vol. 42, No. 7
- 112- Kain, K. C., Keystone, J., Franke, E. D., Lanar D. E.: Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*, J Infect Dis 164, 208- 10, 1991
- 113- 1-Komurian-Pradel, F., G. Paranhos-Baccala, M. Sodoyer, P. Chevallier, B. Mandrand, V. Lotteau, and P. André. 2001. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. J. Virol. Methods 95:111-119.

- 114- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti, F., Bazzocchi, C., Genchi, C., Bandi C.: Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania, *Parassitologia*. Jun;46(1-2), 163-7, 2004.
- 115- Rolao, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R., Campino, L.J. :Quantification of Leishmania infantum parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasitol*. Oct;90(5):1150-4, 2004.
- 116- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L. and Dumon, H.: Quantification of Leishmania infantum DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, November, p. 5249-5255, Vol. 42, No. 11, 2004.
- 117- Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., Caracappa, S.: TaqMan-based detection of Leishmania infantum DNA using canine samples, *Ann N Y Acad Sci*. 1026, 139- 43 2004.
- 118- Schulz, A., Mellenthin, K., Schonian, G., Fleischer, B., Drosten, C.: Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. Apr;41(4), 1529-35, 2003.
- 119- Wortmann, G.W., Romero, L.I., Paz, H.M., Ortega-Barria, E., Bayard, V., Hochberg, L.P., Ryan, J.R., Trans, R.: Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue, *Soc Trop Med Hyg*. Mar;98(3):148-51, 2004.
- 120- Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, L., Uberti-Foppa, C. and Cinque, P.: Real-Time PCR Assay for Clinical Management of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Visceral Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. November; 41(11): 5080–4, 2003.
- 121- Edmiston, H.: Outlook Magazine Erişim: [http:// outlook. wufl. edu/ winter 2004/ picturepage. Html](http://outlook.wufl.edu/winter2004/picturepage.html)

## THE USE OF REAL TIME PCR IN DIAGNOSIS AND FOLLOW UP OF PATIENTS WITH CUTANEOUS LEISHMANIASIS

### ABSTRACT

Conventional diagnostic methods in diagnosis of leishmaniasis are direct microscopy and culture. These are often time-consuming, difficult and low sensitive. Real-time quantitative polymerase chain reaction has recently been used to parasitology. This PCR techniques are truly quantitative, are quick to perform and require no manipulations post-amplification and more sensitive. We have used a real-time PCR quantitative test for the detection of leishmania parasite in biopsy samples of patients with cutaneous leishmaniasis. The aim of this study was to assess the efficacy of real-time PCR method and compared with conventional diagnostic methods in establishing the diagnosis of patients with cutaneous leishmaniasis. A total of 50 needle biopsy samples collected prospectively from both men and women were tested for leishmaniasis. These samples were divided into three groups. First group samples were stained with the Giemsa. Another group samples were given in medium of N.N.N for culture. Last groups samples were studied real time PCR with the i-cycler system. With clinical diagnosis as the gold standard, real-time PCR had a sensitivity of 92 % (46/50), 50 % (25/50) for culture and 40 % (20/50) for microscopy of direct. Parasitemia could vary by a wide range (9 to 155,000 parasites/ml, with a median of 457 parasites/ml). The use of real time PCR in diagnosis of cutaneous leishmaniasis would provide sensitive and specific diagnosis and could improve patient management. These results indicate that real time PCR will be a great help to us for diagnosis and follow-up of patients with cutaneous leishmaniasis.

**Key words:** Cutaneous leishmaniasis, Direct Microscopy, Culture, Real-time PCR, Therapy.



## KUTANÖZ LEISHMANİASİS'Lİ HASTALARIN TANI VE TAKİBİNDE REAL TIME PCR KULLANIMI

### ÖZET

Kutanöz leishmaniasis tanısında kullanılan geleneksel tanı metodları; direkt mikroskopi ve kültürdür. Bunlar genellikle zaman alıcı ve yorucudur, düşük duyarlılıktadır. Real- time kantitatif PCR tekniği parazitolojide son zamanlarda kullanıma girmiştir. Real- time PCR tekniği tamamen kantitatif sonuç verir, hızlı bir yöntemdir, amplifikasyon sonrası elektroforez yapılmasına ihtiyaç göstermez ve daha hassastır. Biz, kutanöz leishmaniasis'li hastaların biyopsi örneklerinde leishmania parazitinin tesbiti için kantitatif bir test olan real- time PCR tekniğini kullandık. Bu çalışmanın amacı, kutanöz leishmaniasis'li hastaların tanısında real- time PCR'ın etkinliğini belirlemek ve konvansiyonel tanı metodlarıyla karşılaştırmak idi. Leishmaniasis için test edilen, hasta olduğu varsayılan kadın ve erkeklerden 50 ince iğne biyopsi örneği toplandı. Bu örnekler 3 gruba ayrıldı. İlk gruptaki örnekler Giemsa ile boyandı. Diğer grup örnekler kültür için N. N. N besiyerine bırakıldı. Son gruptaki örnekler ise i- cycler sistemiyle real- time PCR 'da çalışıldı. Klinik tanı altın standart olarak alındığında PCR'ın duyarlılığı % 92, kültürün duyarlılığı % 50, direkt mikroskopinin duyarlılığı ise % 40 olarak bulundu. Parazitemi çok geniş bir dağılım göstermekteydi (9 - 155,000 parazit/ ml, ortalama olarak 457 parazit/ ml ). Kutanöz leishmaniasis'in tanısında real- time PCR 'ın kullanımı hassasiyet sağlar, tanıyı özgüleştirebilir ve hastanın takibinde kullanışlı bir metoddur. Bu sonuçlar, real- time PCR'ın, kutanöz leishmaniasis'li hastaların tanı ve takibinde bize büyük kolaylıklar sağlamakta olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kutanöz leishmaniasis, Direkt Mikroskopi, Kültür, Real- time PCR, Tedavi

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Ankara'da doğdum. İlköğrenimimi 1991'de Van'da tamamladım. Ortaöğrenimi 1997'de Şanlıurfa'da tamamladım. Aynı yıl Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdim. 2002'de ikincilikle mezun oldum. Aynı yıl Şanlıurfa Yimpaş A.Ş.'de sorumlu veteriner hekim olarak çalışmaya başladım. 2003'de Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde master programına başladım. Evliyim ve İngilizce bilmekteyim.

