

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İSTANBUL'DAKİ KAN MERKEZLERİNDEN ELDE EDİLEN DONÖR KAN
ÖRNEKLERİNDE, *LEISHMANIA* PARAZİTLERİNİN YENİ MİKROKÜLTÜR
YÖNTEMİ VE DİĞER YÖNTEMLER İLE KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ

SEZEN CANIM ATEŞ

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. ADİL M. ALLAHVERDİYEV

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSTANBUL'DAKİ KAN MERKEZLERİNDEN ELDE EDİLEN DONÖR KAN
ÖRNEKLERİNDE, *LEISHMANIA* PARAZİTLERİNİN YENİ MİKROKÜLTÜR YÖNTEMİ
VE DİĞER YÖNTEMLER İLE KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

Sezen CANIM ATEŞ tarafından hazırlanan tez çalışması / /2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİEV
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek TURGUT BALIK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yaşar Ali ÖNER
İstanbul Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 29-07-04-02 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Leishmaniasisin donör kanlarındaki varlığının araştırılması ve farklı tanı yöntemlerinin kıyaslanması ile gelecekteki yaklaşımlara ışık tutması amacıyla gerçekleşen doktora tezi yolculuğu süresince engin bilgi ve deneyimiyle yoluma ışık tutan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimimde ilk danışmanım olan merhum Prof. Dr. Mehmet Mustafa AKDESTE'ye teşekkürü bir borç bilip kendisini rahmetle anıyorum.

Çalışmalarına destek veren Leishmaniasis tanısındaki tecrübeleriyle çalışmamın temellerini sağlamlaştırmamda yardımcı olan değerli Hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya,

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek içten fikirleri ile çalışmamı değerlendiren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK ve Sayın Doç. Dr. Dilek TURGUT BALIK'a,

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ-BAP Koordinatörlüğüne, çalışmamın yerine getirilmesine imkân sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a ve bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistan arkadaşlarıma,

Donör kan örnekleri teminlerindeki yardımları için Sayın Uz. Dr. Hüsnü ALTUNAY, Sayın Erdoğan KOŞAN ve Çapa Kızılay Kan Merkezi çalışanlarına,

Deneyisel çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve desteklerini unutamayacağım arkadaşlarım Serap YEŞİLKIR BAYDAR, Olga Nehir ÖZTEL, Serhat ELÇİÇEK, Rabia ÇAKIR KOÇ, Günay BABAYEVA ve Serkan YAMAN'a, çalışmalarım süresince desteklerini hissettiğim, Melike ERSÖZ ve Emrah Şefik ABAMOR'a,

Manevi destekleri ve yardımları ile hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Banu MANSUROĞLU, Arş. Gör. Kadriye KIZILBEY ve Arş. Gör. Serap DERMAN'a,

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, içtenlik ve dürüstlüğü bana öğreten annem Zümrüt CANIM ve babam Özcan CANIM'a ve hep yanımda olan değerli eşim Aytaç ATEŞ'e içtenlikle teşekkür ederim.

Mart, 2012

Sezen CANIM ATEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	İx
KISALTMA LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	Xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	XV
ABSTRACT	Xvii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti ve Amaç	1
1.2 Tezin Amacı	4
1.3 Bulgular	5
BÖLÜM 2	8
GENEL BİLGİLER	8
2.1 <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması	8
2.2 Morfoloji	11
2.2.1 Amastigot Formlar	11
2.2.2 Promastigot Formlar	13
2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü	14
2.4 Leishmaniasis	15
2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis (KL)	16
2.4.2 Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)	17
2.4.3 Visseral Leishmaniasis (VL).....	17
2.4.4 Asemptomatik Leishmaniasis	19
2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisi.....	20
2.6 Leishmaniasisin Dünyadaki Dağılımı	21

2.7	Leishmaniasisin Ülkemizdeki Dağılımı	22
2.8	Leishmaniasisin Tedavisi	24
2.9	Leishmaniasisten Korunma ve Kontrol	25
2.10	Leishmaniasisin Tanısında Kullanılan Yöntemler	25
2.10.1	Klinik Tanı	25
2.10.1.1	Visseral Leishmaniasis	25
2.10.1.2	Kutanöz Leishmaniasis	26
2.10.2	Laboratuvar Tanısı	26
2.10.2.1	Mikroskobik Tanı Yöntemleri	26
2.10.2.1.1	İğne Biyopsisi ve Biyopsi	27
2.10.2.2	Kültür Yöntemleri	27
2.10.2.2.1	Leishmania Parazitlerinin Kültürünün Yapılması	28
2.10.2.2.2	Leishmania Parazitlerinin Kültüründe Kullanılan Besiyerleri.....	29
2.10.2.2.3	Klasik Kültür	32
2.10.2.2.4	Mikro Kültür	32
2.10.2.2.5	In vivo Kültür	33
2.10.2.2.6	Kriyoprezervasyon	34
2.10.2.3	Serolojik Yöntemler	35
2.10.2.3.1	İmmünofloresan Antikor Testi (IFAT)	37
2.10.2.3.2	Enzim bağlanan İmmünosorbent Testi (ELISA).....	38
2.10.2.3.3	İmmünokromatografik Test (ICT)	39
2.10.2.3.4	Direk Aglütinasyon Testi (DAT)	40
2.10.2.3.5	Komplement Fiksasyon Testi	40
2.10.2.3.6	İndirek (Dolaylı) Hemaglutinasyon Testi (IHA)	41
2.10.2.3.7	Western Blotting (WB).....	41
2.10.2.3.8	Leishmanin Deri Testi (LDT)	42
2.10.2.4	Moleküler Yöntemler	43
2.10.2.4.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	43
2.10.2.4.2	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)	44
2.10.2.5	Leishmaniasisin tanısında kullanılan yöntemlerin özet değerlendirmesi.....	45
BÖLÜM 3.....		47
DENEYSEL ÇALIŞMALAR		47
3.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler.....	47
3.1.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	47
3.1.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	48
3.2	Çalışma grubunun oluşturulması	50
3.2.1	Donör Kan Örneklerinin Toplanması, Taşınması ve Saklanması	50
3.3	Deneysel çalışmalarda kullanılan Yöntemler	50
3.3.1	Mikroskobik Yöntemler.....	50
3.3.1.1	Yayma Örneklerinin Giemsa ile Boyanması	50
3.3.2	Kültür Yöntemleri.....	51
3.3.2.1	Klasik Kültür Yöntemi	52

3.3.2.2	Mikro Kültür Yöntemi (MKY)	52
3.3.3	Serolojik Yöntemler	53
3.3.3.1	İmmünofloresan Antikor Testi (IFAT)	55
3.3.3.2	Enzim bağlanan immünosorbent testi (ELISA)	57
3.3.3.3	İmmünokromatografik test (ICT)	59
3.3.4	Moleküler Yöntemler	59
3.3.4.1	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	59
3.4	İstatistik	62
BÖLÜM 4		63
DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR		63
4.1	Donör Kan Örneklerinin Mikroskopik olarak incelenmesi	65
4.2	Donör Kan Örneklerinde <i>Leishmania</i> Parazitlerinin Kültür Yöntemleriyle incelenmesi	66
4.3	Donör Kan Örneklerinin Serolojik Yöntemlerle İncelenmesi	66
4.3.1	IFAT İncelemesi	66
4.3.2	ELISA İncelemesi	73
4.3.3	ICT İncelemesi	75
4.4	Moleküler Yöntem Sonuçları	76
4.4.1	PCR İncelemesi	76
4.5	Donör Kanlarında Leishmaniasise Göre Pozitif Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması	78
4.5.1	Mikro kültür yöntemi ile <i>Leishmania</i> pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması	80
4.5.2	IFAT Yöntemi ile VL ve KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması	82
4.5.3	ELISA Yöntemi ile VL ve KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması	85
4.6	İstatistiksel Değerlendirme	88
4.7	Tartışma	91
BÖLÜM 5		98
SONUÇ VE ÖNERİLER		98
5.1	Sonuç Değerlendirilmesi	98
5.2	Öneriler	100
KAYNAKLAR		101
EK-A		115
ETİK KURUL TUTANAĞI		115
EK-B		116

KAN BANKASI BİLGİ FORMU	116
EK-B.....	117
KAN BANKASI BİLGİ FORMU (DEVAM).....	117
ÖZGEÇMİŞ.....	118

SİMGE LİSTESİ

Da	Dalton
g	Gram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mA	Miliamper
mM	Milimolar
°C	Santigrat derece

KISALTMA LİSTESİ

AIDS	Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (Acquired İmmüno Deficiency Syndrome)
DAT	Direk Aglütinasyon Testi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütünün
DTH	Gecikmiş Tip Hipersensitivite (Delayed Type Hypersensitivity)
EDTA	Etilendiamin tetra asetat
ELISA	Enzim bağlanan immünosorbent testi (Enzim Linked İmmünosorbent Assay)
FAST	Hızlı Aglütinasyon Tarama Testi (Fast agglutination-screening test)
FDS	Fetal dana serumu
HRP	Horse Radish Peroksidaz Enzimi
HCl	Hidrojen klorür
HEPES	N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansulfonik asit
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (Human İmmünodeficiency Virus)
ICT	İmmünokromatografik test (immünochromatographic test)
IFAT	İmmünofloresan Antikor Testi (immünofluorescent antibody test)
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IHA	Dolaylı (Indirect) hemaglutinasyon testi
KCl	Potasyum klorür
kDNA	Kinetoplast DNA
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
KL	Kutanöz Leishmaniasis
LDT	Leishmanin deri testi
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
MKL	Mukokutanöz Leishmaniasis
MKY	Mikro Kültür Yöntemi
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
Na ₂ HPO ₄	Di sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaN ₃	Sodyum Azid

NNN	Novy-MacNeal ve Nicole Besiyeri
OD	Optik dansite
PAGE	Poliakrilamide jel elektroforezi
PBS	Fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PNFF	Para-nitro Fenil Fosfat
RE	Restriksiyon Enzimleri
RFLP	Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SB	Sağlık Bakanlığı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris Borik Asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultraviyole
VL	Visseral Leishmaniasis
WB	Western Blotting
ZnCl ₂	Çinko Klorür

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 <i>Leishmania</i> parazitlerinin amastigot formu [48, 54, 66]	12
Şekil 2. 2 <i>Leishmania</i> parazitlerinin promastigot formu [48, 54, 66].....	13
Şekil 2. 3 <i>Leishmania</i> parazitlerinin hayat döngüsü [75]	15
Şekil 2. 4 Dünya’da Leishmaniasis Dağılımı [99]	22
Şekil 2. 5 Türkiye’de Leishmaniasis Dağılımı [101].....	23
Şekil 3. 1 <i>Leishmania infantum</i> Kültürü (40x)	53
Şekil 3. 2 <i>Leishmania tropica</i> Kültürü (40x).....	54
Şekil 3. 3 <i>L. infantum</i> ve <i>L. tropica</i> antijenleri kaplı kuyucuklu IFAT lamaları.....	55
Şekil 3. 4 Pozitif kontrol olarak kullanılan hasta serumunun IFAT görüntüsü (40x)	56
Şekil 3. 5 Pozitif kontrol olarak kullanılan hasta serumunun IFAT görüntüsü (40x)	57
Şekil 3. 6 ELISA Yöntemi uygulaması ¹¹	58
Şekil 4. 1 Donör Kan Örneklerinde <i>Leishmania</i> parazitlerinin amastigot formu (Giemsa,100x)	65
Şekil 4. 2 Antijen olarak <i>Leishmania infantum</i> kullanıldığında IgG antikor pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (40x)	67
Şekil 4. 3 Antijen olarak <i>Leishmania infantum</i> kullanıldığında IgM antikor pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (40x)	67
Şekil 4. 4 Antijen olarak <i>Leishmania tropica</i> kullanıldığında IgG antikor pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (20x)	68
Şekil 4. 5 Antijen olarak <i>Leishmania tropica</i> kullanıldığında IgM antikor pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (20x)	68
Şekil 4. 6 ICT ile pozitif çıkan donör serum örneği	75
Şekil 4. 7 PCR Yönteminin parazit sayısına bağlı olarak duyarlılığı	76
Şekil 4. 8 MKY pozitif olan örneklerden elde edilmiş PCR pozitif çıkan örnekler	77

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	<i>Leishmania</i> parazitlerinin sınıflandırılması [62] 10
Çizelge 2. 2	Etkenlerine göre leishmaniasis sınıflandırılması [56, 80]..... 16
Çizelge 2. 3	Türkiye’de VL ve KL vaka sayıları ile morbidite hızları..... 24
Çizelge 2. 4	Farklı besiyerleri kullanılarak VL’den şüpheli hastaların kemik iliğinden alınan örneklerde kültür yöntemlerinin duyarlılığının karşılaştırılması..33
Çizelge 4.1	<i>Leishmania</i> pozitif sonuç veren donörlerin bazı demografik bilgileri 63
Çizelge 4.2	Donör kan örneklerinin farklı serum seyreltmelerinde <i>L. infantum</i> ve <i>L. tropica</i> antijenlerine karşı antikor varlığı 69
Çizelge 4.3	<i>Leishmania infantum</i> antijenine karşı IgG ve IgM antikor varlığının farklı titrelerdeki sayısal dağılımı 69
Çizelge 4.4	<i>Leishmania tropica</i> antijenine karşı IgG ve IgM antikor varlığının farklı titrelerdeki sayısal dağılımı..... 70
Çizelge 4.5	<i>L. infantum</i> antijeni kullanıldığında farklı titrelerdeki serum örneklerinin pozitiflik dağılımı (%) 70
Çizelge 4.6	<i>L. tropica</i> antijeni kullanıldığında farklı titrelerdeki serum örneklerinin pozitiflik dağılımı (%) 71
Çizelge 4.7	Donörlerde <i>L. infantum</i> ve <i>L. tropica</i> antijenlerine karşı IgG ve IgM antikorlarının dağılımı 72
Çizelge 4.8	Donör serum örneklerinin pozitif ve negatif dağılımı (ELISA) 74
Çizelge 4.9	Donör serum örneklerindeki IgG tipi antikor varlığının farklı antijenlere göre pozitiflik dağılımı (%) 74
Çizelge 4.10	MKY, Yayma, IFAT ve ELISA uygulanan örneklerin sonuçları 78
Çizelge 4.11	En az bir yöntem ile <i>Leishmania</i> parazitleri tespit edilen donör örnekleri 79
Çizelge 4.12	Mikro kültür ve Yayma yöntemi ile <i>Leishmania</i> pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması 81
Çizelge 4.13	IFAT ile VL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması 83
Çizelge 4.14	IFAT ile KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması 84
Çizelge 4.15	ELISA ile VL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması 86
Çizelge 4.16	ELISA ile KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile

	karşılaştırılması	87
Çizelge 4.17	Donör örneklerine uygulanan farklı tanı yöntemlerinin sonuçları: yöntemlerin duyarlılığı	89
Çizelge 4.18	Çeşitli tanı yöntemleri ile elde edilen (pozitif-negatif) sonuçların istatistiksel analizi.....	90

İSTANBUL'DAKİ KAN MERKEZLERİNDEN ELDE EDİLEN DONÖR KAN ÖRNEKLERİNDE, *LEISHMANIA* PARAZİTLERİNİN YENİ MİKROKÜLTÜR YÖNTEMİ VE DİĞER YÖNTEMLER İLE KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ

Sezen CANIM ATEŞ

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi *Leishmania* cinsi protozoonların etken olduğu zoonotik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre leishmaniasis 72'si gelişmekte olan ülke olmak üzere 98 ülkede 350 milyon insanı tehdit etmektedir. Dünya çapında yaklaşık 12 milyon vaka vardır. Her yıl bu sayıya 500 bin kişinin eklendiği ve her yıl 75 bin kişinin bu hastalıktan öldüğü tahmin edilmektedir. Son yıllarda hastalığın giderek yayılmasının esas nedeni; hastalığın vektörlerinde kullanılan insektisitlere, etkenlerinde ise kullanılan ilaçlara karşı dirençliğin gelişmesidir. Ayrıca şimdiye kadar etkin bir aşı geliştirilmemesidir. Küresel ısınma ile hastalığın Avrupa ülkeleri de dahil olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde giderek çoğalması bu problemin önemini daha da arttırmaktadır. *Leishmania* parazitleri tatarcıkların ısırması; kan nakli, organ transplantasyonu gibi çeşitli yollarla bulaşmaktadır. Ayrıca donör kanı vasıtasıyla hastalığın bulaştığı bilinmekte ve bu konu güncel bir problem oluşturmaktadır. Donör kanı ile hastalığın bulaşması sadece epidemiyolojik açıdan değil, aynı zamanda kan alıcılarının sağlığı için de hayati önem taşımaktadır. Hastalığın kan nakli ile iletildiğinin belirlenmesi zor olsa da endemik bölgelerde kan donörleri arasında *Leishmania* parazitinin taşındığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Ayrıca DSÖ'nün açıklamalarına göre, semptomatik hasta sayısı mevcut leishmaniasis hastalarının sadece % 5-20'ini oluşturmaktadır.

Dünyanın çeşitli endemik ülkelerinde donör kanları üzerine yapılmış çalışmalar mevcutken, ülkemiz gibi endemik bölgeler içeren bir coğrafyada henüz insan donör örnekleri ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Buna göre de, bu tez çalışmasında ilk kez olarak donör kan örneklerinde, *Leishmania* parazitlerini tespit etmek amacıyla, semptomatik visseral leishmaniasis hastalarının tanısında yüksek duyarlılık ve spesifite gösteren, ancak asemptomatik sağlıklı kişiler veya donör kanlarındaki duyarlılığı bilinmeyen mikro kültür yöntemi (MKY), leishmaniasis tanısında kullanılan diğer yöntemler ile kıyaslanarak incelenmiştir. Çapa Kızılay kan merkezinden temin edilen 343 donör kan örneğine mikroskopik (yayma), kültür (NNN agar ve MKY), serolojik (IFAT, ELISA ve ICT) ve moleküler yöntemler (PCR) uygulanmıştır. İncelenen 343 donör kanının yirmi altısında (% 7.58) kullanılan yöntemler *Leishmania* parazitlerine göre pozitiflik tespit edilmiştir. 343 donörün hepsine uygulanan Yayma, MKY, IFAT ve ELISA yöntemleri temel alınarak en az bir yöntem ile pozitif veren 26 donörün muhtemelen enfekte olduğu kabul edilerek duyarlılık değerlendirildi. Bu değerlendirmeye göre asemptomatik leishmaniasisi tespit etmede yöntemlerin hassasiyeti MKY için % 58, yayma için % 15, NNN agar için % 4, PCR için % 11 ve ICT için % 4 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca IFAT-*L. infantum* için % 38 ile IFAT-*L. tropica* için % 23 ve ELISA-*L. infantum* için % 35 ile ELISA-*L. tropica* için % 19 olarak duyarlılık belirlenmiştir. Böylece ilk kez olarak donör kanlarında MKY ile leishmaniasisin tanısında kullanılan diğer yöntemlerin kıyaslanarak incelenmesi sonucunda, kan bankasından elde edilen örneklerde *Leishmania* parazitlerinin tespiti için en duyarlı yöntemin MKY olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca ilk kez olarak Türkiye’de İstanbul gibi non-endemik olan bir bölgede donör kanlarında *Leishmania* parazitlerinin varlığı saptanmıştır. Kullanılan diğer yöntemlere göre serolojik yöntemlerden IFAT ve ELISA da yüksek duyarlılık göstermiştir. Ancak parazitolojik olarak kesin tanı parazitin kendisine veya moleküler özelliklerine dayanmaktadır. Serolojik yöntemlerin ise çapraz reaksiyon verdikleri dikkate alındığında, asemptomatik sağlıklı bireylerin tanısında MKY’nin kullanılması önerilebilir.

Sonuç olarak non-invaziv, uygulaması kolay ve ekonomik olan MKY ile kan bankalarından temin edilen kanlar, kan ihtiyacı olan kişilere verilmeden önce mutlaka leishmaniasise göre kontrol edilmelidir. Gerek *Leishmania* tanısındaki hekim bilgilendirilmelerinin artırılması, gerekse kan bankalarındaki kanların leishmaniasise göre taraması gibi düzenlemeleri yapılması gerekmektedir. Bu amaçla TC Sağlık Bakanlığının bu sorunu dikkate alması için çalışmalar başlatılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, tanı yöntemleri, mikro kültür yöntemi, donör kanları

**COMPARATIVE INVESTIGATION OF *LEISHMANIA* PARASITES WITH NEW
MICRO CULTURE METHOD AND SOME OTHER METHODS IN DONOR
BLOOD SAMPLES WHICH ARE OBTAINED FROM BLOOD CENTERS IN
ISTANBUL**

Sezen CANIM ATEŞ

Department of Chemistry

PhD. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV

Leishmaniasis is a zoonotic disease which occurs by a compulsory intracellular protozoon *Leishmania* species. According to the World Health Organization (WHO) leishmaniasis is threatening 350 million people in 98 countries in which 72 of these countries is developing countries. There are approximately 12 million cases worldwide. It is estimated that every year 500 thousand people are being added to this number and 75 thousand people going to die according to this disease. Recently, the basic reason of the disease's expanding is emerging resistance to the insecticides in vectors and to drugs in parasites. Furthermore vaccines are inefficient improving against leishmaniasis up to now. In addition global warming is indicating this disease's effect area in the world including Europe countries, so this situation is being increase the importance of the problem. *Leishmania* parasites are being transmitted by *Phlebotomus* bites, blood transfusion, organ transplantation and etc. Additionally it's known that the disease can be transmitted by donor bloods and this subject is producing a current problem. Transmitting the disease by donor bloods not only has a vital importance as epidemiologically but also important for the health of blood receivers. It's difficult to determinate the transmitting with blood transfusion but in endemic areas there are evidences about transmitting the *Leishmania* parasite

between blood donors and blood receivers. Furthermore according to WHO, the number of symptomatic patient is just 5-20 % of total patients.

There are different studies on donor bloods in the endemic countries of the world but in our country there is no study about this subject. Accordingly in this thesis study for the first time, different *Leishmania* diagnostic methods and micro culture method (MCM) investigated by comparing to identify *Leishmania* parasites in the donor blood samples. Because MCM is highly specific and sensitive for symptomatic visceral leishmaniasis but the sensitivity of the MCM is not known in asymptomatic healthy individuals or donors. Obtained 343 donor blood samples from the Çapa Red Crescent Blood Center were analyzed by microscopic (smear), culture (NNN agar and MCM), serological (IFAT, ELISA and ICT) and molecular (PCR) methods. Twenty-six of (7.58 %) the investigated 343 donor blood samples were identified as positive for *Leishmania* parasites with the applied methods. The sensitivity was calculated as considered that these 26 donors were probably infected when was one of the techniques gave a positive result. The sensitivity assessment was 58 % for MCM, 15 % for smear, 4 % for NNN agar, 11 % for PCR and 4 % for ICT. Furthermore the sensitivity calculated 38 % for IFAT-*L. infantum*, 23 % for IFAT-*L. tropica* and 35 % for ELISA-*L. infantum*, 19 % for ELISA-*L. tropica*. Thus, for the first time, in donor bloods as a result of investigation in comparison MCM with other methods used in the diagnosis of leishmaniasis, in samples which are obtained from the blood bank for the detection of *Leishmania* parasites have emerged as the most sensitive method MCM. In addition, for the first time in Turkey such as Istanbul, which is a non-endemic region, the presence of *Leishmania* parasites in the blood donors has been identified. Serological methods, IFAT and ELISA, also showed a high sensitivity according to the other used methods. However, as a parasitological definitive diagnosis based on the parasite itself or its molecular characteristics. MCM can be suggested for diagnosis of asymptomatic healthy individuals, because the serological methods could be given cross-reaction.

As a result, obtained blood from blood banks, must be checked before giving people according to leishmaniasis with MCM which easy to apply, non-invasive and economical. Arrangements such as physicians informing about the diagnosis of *Leishmania* and screening of blood banks according to leishmaniasis should be made. For this purpose, studies must be started for considering this issue by the Turkish Ministry of Health.

Key words: Leishmaniasis, diagnosis methods, micro culture method, donor bloods

1.1 Literatür Özeti ve Amaç

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi *Leishmania* cinsi protozoonların etken olduğu zoonotik bir hastalıktır [1, 2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) belirlediği 6 önemli tropikal hastalıklar listesinde, sıtmadan sonra ikinci hastalık olarak bilinmektedir [3, 4]. DSÖ'nün verilerine göre leishmaniasis 72'si gelişmekte olan ülke olmak üzere 98 ülkede 350 milyon insanı tehdit etmektedir [1]. Dünya'da 12 milyon *Leishmania* hastası olduğu, her yıl bu sayıya 500 bin kişinin eklendiği ve her yıl 75 bin kişinin bu hastalıktan öldüğü tahmin edilmektedir [5-7]. Ancak bu veriler sadece semptomatik leishmaniasise ait olup, mevcut leishmaniasisin % 5-20'sini oluşturmaktadır. Geride kalan % 80-95 kısmını ise asemptomatik leishmaniasis oluşturmaktadır [8, 9].

Uzun yıllardan beri leishmaniasise karşı mücadele yapılmasına rağmen, hastalığın giderek artmasının esas nedeni; hastalığın vektörlerinde kullanılan insektisitlere, etkenlerinde ise kullanılan ilaçlara karşı dirençliliğin gelişmesidir. Ayrıca şimdiye kadar leishmaniasise karşı etkili bir aşının bulunmamasıdır [4]. Küresel ısınma ile hastalığın Avrupa ülkeleri de dahil olmak üzere dünyanın çeşitli ülkelerinde giderek artması beklenmektedir. Ayrıca AIDS ve diğer immün yetmezliklerin artması, seyahatler, savaşlar ve laboratuvar tanısındaki problemler de hastalığın yayılmasında önemli rol oynamaktadır [10].

Leishmaniasis aynı zamanda Türkiye'nin de ciddi halk sağlığı problemidir [11]. Türkiye'de yaklaşık 20 milyon kişi leishmaniasis tehdidi altındadır. Ülkenin değişik

bölgelerinde hastalığın visseral ve özellikle de kutanöz formlarına rastlanmaktadır. Sağlık Bakanlığı (SB) istatistiklerine göre hastalık son yıllarda giderek artış göstermekte ve özellikle Şanlıurfa, Osmaniye, Adana, Hatay, Kahramanmaraş ve Mersin illerinden çok sayıda olgu bildirilmektedir [12]. İzmir, Aydın, Denizli, Manisa, Muğla gibi kıyı illerinin yanı sıra Bilecik, Karabük, Kars, Tokat, Kastamonu ve İstanbul gibi farklı coğrafi bölgelerde bulunan illerden hastalık bildirimlerinin olması bu hastalığın subtropikal iklimde yer alan ülkemizin diğer non-endemik bölgelerinde de görülebileceğini düşündürmektedir [5, 12, 13]. Bununla birlikte hastalığın rezervuarı olan köpeklerde non-endemik kabul edilen İstanbul ilinde yapılan bir çalışmada PCR ile % 4.30 pozitiflik görülmüştür [14]. Yine İstanbul ilinde farklı hastanelerden temin edilen leishmaniasis şüpheli hastalara uygulanan çeşitli tanı testleriyle bir ya da daha fazla test ile % 32.2'sinde *Leishmania* varlığı bildirilmiştir [5, 15].

Leishmaniasisin kontrol altına alınmasında, etkenlerin identifiye edilmesi hastalığın epidemiyolojisinin anlaşılması açısından çok önemlidir [16]. Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* olmak üzere başlıca üç *Leishmania* türüne rastlanılmaktadır [17, 18]. Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde ise en sık karşılaşılan etkenler *L. infantum* ve *L. tropica*'dır [19]. VL etkeni olarak Ege ve Akdeniz kıyılarında *L. infantum*'un saptandığı bilinmekte, Güney ve Güneydoğu kesimlerinde KL etkeni olarak *L. tropica* izole edilmektedir. Ayrıca Akdeniz bölgesinin doğu kesimlerinde KL etkeni olarak yine *L. infantum* görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur [20].

Leishmania parazitleri sağlıklı kişilere çeşitli yollarla bulaşmaktadır. Bunların en önemlisi *Leishmania* parazitleri ile enfekte olmuş tatarcıkların ısırması ile olan bulaşmadır [8, 21]. Ancak leishmaniasisin tatarcık ısırığı dışında diğer yollarla; kan nakliyle [8, 22-27], laboratuvar kazalarıyla [28, 29], cinsel ilişki ile [8, 30], anneden plasenta yolu ile bebeğe [31], *Leishmania* ile enfekte olmuş hamsterın ısırığıyla [32] ve organ [8, 33] ve kök hücre nakli [34, 35] ile bulaştığı da rapor edilmiştir. Ayrıca laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda ilk kez olarak, yağ dokusundan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin *Leishmania* parazitlerinin çeşitli türleri (*L. infantum*, *L. tropica*) için konak hücre rolünü oynadığı gösterilmiştir [36]. Ancak *Leishmania*'nın bulaşmasının en önemli nedenlerinden biri de donör kanı aracılığıyla hastalığın yayılmasıdır. Ayrıca kan bankalarında depo edilen kanların uzun süre saklanmasıyla da

Leishmania parazitlerinin canlılık ve enfektifliklerini korudukları gösterilmiştir [8, 37, 38]. Bu ise leishmaniasisin epidemiyolojisi açısından oldukça önemlidir. Donör kanı ile hastalığın bulaşması aynı zamanda kan alıcılarının sağlığı için de hayati önem taşımaktadır. Dünyanın çeşitli endemik bölgelerinde leishmaniasisin donör kanları ile yayılması hakkında birçok çalışma yapılmış ve donör kanı ile bulaşma riskinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür [8, 39-44]. Visseral leishmaniasisin kan transfüzyonu ile bulaşması, İngiltere, Belçika, Fransa, Hindistan'ın endemik olmayan bölgelerindeki yurtdışı seyahat geçmişi bulunmayan bireylerde de belirlenmiştir [2, 41, 45]. Türkiye'de ise şimdiye kadar kan bankalarından elde edilen insan donör kan örnekleri ile yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Leishmaniasisin donör kanlarındaki tanısı ile ilgili çalışmaların az sayıda olmasının önemli nedenlerinden biri tanıda karşılaşılan problemler ve bu konunun ihmal edilmesidir [18, 46]. Leishmaniasisin tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak mevcut bu yöntemler genellikle klinik açıdan şüpheli leishmaniasis hastalarının tanısına yöneliktir. Kullanılan yöntemlerin yüksek spesifite ve duyarlılığı ise invaziv yöntemlerle (dalak, karaciğer, kemik iliği) elde edilen örnekler kullanıldığında mümkün olmaktadır. Tanı yöntemlerinden en yaygın ve uygulanması daha kolay olanı mikroskobik yöntemlerdir. Ancak mikroskobik yöntemlerde duyarlılık örneğin invaziv veya non-invaziv yolla elde edilmesine ve örnekte bulunan parazit sayısına bağlı olarak değişir.

Leishmaniasis tanısında kullanılan diğer bir yöntem klasik kültür yöntemidir. Kültür yönteminin en büyük avantajı parazitin direk olarak gözle görünebilmesidir. Yapılan bazı çalışmalar, mikroskobik yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemin duyarlılığının da örnekteki parazit sayısına bağlı olduğunu göstermiştir [6]. Yöntemin en büyük dezavantajı parazit sayısı az olan durumlarda duyarlılığının azalmasıdır. Semptomatik VL tanısında venöz kandan elde edilen kan kültürünün duyarlılığı % 42.3 iken mikroskobik yöntemin duyarlılığı % 26.3'dür [6, 47]. Böylece semptomatik leishmaniasisin tanısında kullanılan mevcut yöntemlerin dezavantajları, parazit sayısına bağlı olarak duyarlılıklarının azalmasıdır. Ayrıca mikroskobik yöntemlerde deneyimli araştırmacıya gereksinim duyulması, kültür yöntemlerinde ise 20 günden 6 aya kadar süre gerektiği bilinmektedir [2, 6, 39, 40].

VL tanısında immünfloresan antikor testi (IFAT), Enzim-bağılı immünassay (ELISA) testi, direk aglütinasyon testi (DAT), lateks aglütinasyon, rk39 immümkromatografik dipstik hızlı tanı testi (ICT), western blotting (WB) gibi invaziv olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin temeli, hasta serumunda veya idrarında parazite karşı oluşan antikor yanıtının serolojik testlerle belirlenmesine dayanır. Ancak periferik laboratuvarlarda pratik uygulamalardaki zorluklar bir yana bu testlerin çoğunda hassasiyet ve spesifiklik sınırlayıcı faktörlerdir [48, 49]. Ayrıca diğer bazı protozoonlarla ile çapraz reaksiyon oluşturmaları ve özellikle asemptomatik VL’de duyarlılığın düşük olması nedeniyle dezavantajlıdır.

Leishmaniasis tanısında kullanılan diğer yöntemlerden biri polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR) [6, 47]. PCR’ın klinik semptomlar gösteren kişilerde duyarlılığı % 75’dir. Ancak saha çalışmaları için henüz uygulanabilir olmayan ve halen çok pahalı olan bir yöntemdir. Ayrıca bazı kültür pozitif asemptomatik donör kanlarında PCR negatif sonuç verebilmektedir. Ancak asemptomatik sağlıklı kişilerde, leishmaniasis klinik açıdan hiçbir şüphe göstermediğinden bu tür donörlerden örneğin invaziv yöntemler ile elde edilmesi uygulanmamaktadır. Buna göre de asemptomatik sağlıklı kişilerin tanısında invaziv yöntemler ile elde edilmeyen ve aynı zamanda örnekteki parazit sayısına bağlı olmayan yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca asemptomatik leishmaniasis enfeksiyonunun tespit edilmesinin zor olmasına bağlı olarak, asemptomatik leishmaniasisli hastaların belirlenmesinde altın standart olarak gösterilecek bir yöntemin bulunmadığıda bilinmektedir [43, 50].

1.2 Tezin Amacı

Böylece asemptomatik sağlıklı kişilerin donör kan örneklerinde *Leishmania* parazitlerinin tanısı için daha duyarlı ve spesifik bir yöntemin acilen geliştirilmesi gerekmektedir. Bu açıdan leishmaniasisli hastaların tanısında yüksek duyarlılık ve spesifiklik gösteren yeni mikro kültür yönteminin (MKY) donör kan örneklerinde incelenmesi oldukça önemli olabilir. Son yıllarda geliştirilmiş olan MKY’nin, klasik kültürden farklı olarak daha duyarlı, daha kısa sürede yanıt veren ve daha spesifik bir yöntem olduğu bilinmektedir [6, 51, 52]. Ancak şimdiye kadar bu yöntemin

semptomatik hastalardaki duyarlılığı bilinmesine rağmen, asemptomatik hastalardaki duyarlılığı incelenmemiştir.

Buna göre bu çalışmanın amacı, kan bankalarından elde edilen donör kan örneklerinde leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler ile son yıllarda geliştirilmiş ve VL şüpheli hastaların tanısında yüksek duyarlılık gösteren ve dünyanın çeşitli bölgelerinde uygulanan, ancak şimdiye kadar asemptomatik leishmaniasis veya donör kanlarındaki duyarlılığı bilinmeyen MKY'nin, diğer yöntemler ile kıyaslanarak daha duyarlı, daha spesifik, daha hızlı ve daha ekonomik tanı yöntemini belirlemek olmuştur. Hedefe ulaşmak için aşağıda belirtilen çalışmalar planlanmıştır.

- Farklı *Leishmania* suşlarının (*L. infantum*, *L. tropica*) *in vitro* kültürlerinin elde edilmesi ve serolojik tanı yöntemlerinde kullanmak amacıyla antijen hazırlanması,
- IFAT ve ELISA serolojik yöntemlerinin optimizasyonu,
- Parazit miktarına bağlı olarak PCR'in tanıdaki duyarlılığının belirlenmesi,
- Çapa Kızılay Kan Merkezinden donör kan örneklerinin temin edilmesi,
- Elde edilen donör kan örneklerinin yayma, MKY, IFAT ve ELISA yöntemleri ile incelenmesi,
- Yayma, MKY, IFAT ve ELISA yöntemleri ile leishmaniasise göre pozitif bulunan donör kan örneklerinin klasik kültür, ICT ve PCR ile incelenmesi.
- Uygulanan yöntemlerin kıyaslanması sonucunda donör kanlarında leishmaniasisin tanısı için daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik tanı yönteminin belirlenmesi ve pratikte uygulanmasının önerilmesi.

1.3 Bulgular

Bu doktora tez çalışmasında donör kan örneklerinde, leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler ile son yıllarda geliştirilmiş ve VL şüpheli hastaların tanısında yüksek duyarlılık gösteren ancak şimdiye kadar asemptomatik leishmaniasis veya donör kanlarındaki duyarlılığı bilinmeyen MKY kıyaslanmıştır. Bu amaçla Türkiye'de ilk kez olarak non-endemik bir bölge olan İstanbul'da donör kan örnekleri mikroskopik (yayma), kültür (klasik ve mikro kültür), serolojik (IFAT, ELISA ve ICT) ve moleküler yöntemler (PCR) ile incelendi. Uygulanan yöntemler ile aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Mikroskopik inceleme sonucunda 343 adet donör kan örneğinin dördünde (4) (% 1.16) *Leishmania* parazitleri tespit edildi. Uygulanan buffy coat katmanı ile direk kandan hazırlanan yaymalar kıyaslandığında, buffy coat katmanının daha duyarlı olduğu görüldü.
2. Donör kanlarının klasik ve mikro kültür yöntemleri ile yapılan incelemeleri sonucunda 343 donörden on beş (15) (% 4.37) adet donör pozitif tespit edildi. Bu donörlerden biri (1) hem klasik hem de mikro kültür yöntemi ile pozitif çıkarken, on dördü (14) sadece MKY ile pozitif çıktı.
3. Donör kan örnekleri serolojik yöntemlerden IFAT, ELISA ve ICT ile incelenmiş ve kullanılan farklı *Leishmania* türleri ile aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.
 - IFAT yönteminde antijen olarak *L. infantum* parazitleri kullanıldığında, 1/32 seyreltmede IgG % 15.4 ve IgM % 14.5, 1/64'de IgG % 3.7 ve IgM % 2.6 ve 1/128'de ise IgG % 2 ve IgM % 1.7 pozitiflik gösterirken; antijen olarak *L. tropica* parazitleri kullanıldığında ise, 1/32 seyreltmede IgG % 11 ve IgM % 9.9, 1/64'de IgG % 2.9 ve IgM % 2.3 ve 1/128'de ise IgG ve IgM'in % 0.8 pozitiflik olduğu görüldü.
 - ELISA yönteminde ise kit ve tarafımızca optimize edilen yöntemlerin kullanılması sonucunda IgG antikoruna karşı *L. infantum* antijeni ile % 2.6, *L. tropica* antijeni ile % 1.5 ve *L. donovani* antijeni ile de % 0.7 pozitiflik tespit edildi. Ayrıca sadece 1 donörde de hem *L. infantum* hem de *L. donovani* karşı antikor varlığı belirlendi. Böylece tarafımızca hazırlanan antijenlerle uygulanan ELISA yönteminin ticari alınan ELISA kitinden daha duyarlı olduğunu gösterdi.
 - ICT yöntemi ise ticari olarak temin edilen rK39 antijenine özgün kalazar tespitine dayalı ticari hızlı test ile uygulanması sonucunda ise bir (1) donör pozitif olarak tespit edildi.

Serolojik yöntemlerin kıyaslanması sonucunda ICT yönteminin duyarlılığının en düşük IFAT ve ELISA yöntemlerinin ise yüksek olduğu görüldü. *Leishmania* türlerine göre incelemede ise *L. infantum* antijenine karşı antikor pozitifliğinin *L. tropica* antijenine göre daha fazla olduğu görüldü.

4. PCR yöntemi ile incelenen 54 donör örneğinin üçü (3) pozitif olarak tespit edildi.

Uygulanan yöntemler ile 343 donörden 26'sında (% 7. 58) en az bir yöntem ile pozitiflik saptandı. Donör kanlarına uygulanan yöntemlerin duyarlılığı bu pozitif 26 donörün muhtemelen enfekte olduğu kabul edilerek değerlendirildi. Duyarlılığın MKY için % 58, yayma için % 15, NNN agar için % 4, PCR için % 11 ve ICT için % 4 olduğunu gösterdi. Ayrıca IFAT-*L. infantum* için % 38 ile IFAT-*L. tropica* için % 23 ve ELISA-*L. infantum* için % 35 ile ELISA-*L. tropica* için % 19 olduğunu gösterdi. Sonuçlar MKY'nin uygulanan diğer yöntemlerden daha yüksek duyarlılıkta olduğunu gösterdi.

L. infantum ve *L. tropica* antijeni ayrı ayrı kullanıldığında serolojik yöntemlerin duyarlılığının MKY'ne göre daha düşük olduğunu ancak her iki tür sonuçları birlikte değerlendirildiğinde ise MKY ile serolojik yöntemlerin benzer sonuçlar verdiği görüldü. Sonuçlar farklı suşların birlikte kullanılması ile uygulanan serolojik yöntemlerin duyarlılığı arttırdığını gösterdi.

Böylece bu çalışmada ilk kez olarak kan bankalarından elde edilen donör kan örneklerinde leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler ile MKY'nin kıyaslanması sonucunda asemptomatik leishmaniasis ve donör kanlarında leishmaniasisin tanısı için MKY'nin daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olduğu belirlendi.

Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda ilk kez olarak İstanbul gibi non-endemik bir bölgede donör kanlarında *Leishmania* parazitlerinin olduğu görüldü.

2.1 *Leishmania* Parazitlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Leishmania paraziti, ilk kez Güney Amerika’da yer alan And dağları bölgesinden dönen mevsimlik İspanyol işçilerinde görülmüş ve “Vadi Hastalığı” veya “And Hastalığı” olarak isimlendirilmiştir. Ayrıca XV. ve XVI. yüzyıllardan kalma Inca yazıtlarında da bu hastalıktan bahsedilmiştir [46, 49] .

İyileşmeyen burun ve ağız lezyonlarıyla cüzzama çok benzemesinden dolayı hastalığa “beyaz cüzzam” adı da verilmiştir. 1882 yılında Clarke, Hindistanlı hekimler tarafından, Sanskritçe “kala azar” adı verilen ve anlamı kara ateş “black fever” olan hastalığın Hindistan’da bazı yerlerde hemen hemen hiç insan bırakmayacak kadar ölümlere sebep olduğunu bildirmiştir [46, 53].

Bu çok eski tarihlere dayanan ve nedeni bilinemeyen hastalığı oluşturan *Leishmania* parazitleri ilk kez 1900 yılında W.B. Leishman tarafından Hindistan'da dizanteriye yakalanan bir hastanın dalağında görülmüştür. Daha sonra Donovan Madras'ta viseral leishmaniasisli hastaların dalağından elde ettiği örneklerde paraziti görmüş ve bulgularını 1903 yılında yayınlamıştır. Yine 1903 yılında Major Ross bu parazitler için, *Leishmania* cinsini ortaya koymuş ve kala-azar etkenine *Leishmania donovani* ismini vermiştir [53-58]. Nicolle ise 1908’de, Akdeniz ülkelerinde bulunduğu küçük kala-azar etkenlerine *Leishmania infantum* adını vermiştir. Ayrıca Nicolle ve Compte içlerinde köpeklerin de bulunduğu bir grup memelinin *Leishmania* paraziti için rezervuar rolü oynadığını bildirmiştir [49, 53]. 1911’de Vianna, Amerikan deri leishmaniasis olgularında bulunduğu etkenleri *L. brasiliense* olarak adlandırmış ve parazitlerin köpek,

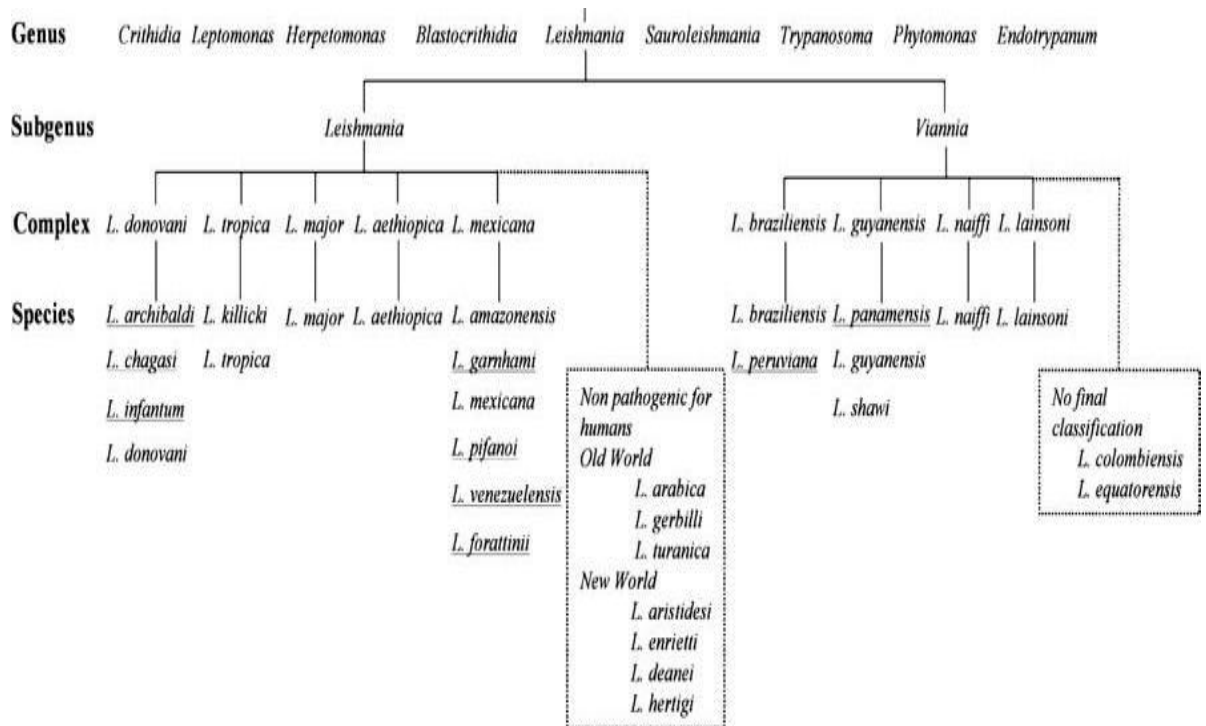
kedi, çakal gibi memeli hayvanlarda da bulunduğunu belirtmiştir [46, 53]. 1942’de Swaminath, Shortt ve Anderson gönüllü insan denekleri kullanarak leishmaniasisin *Phlebotomus* cinsi sineklerle taşınabileceğini göstermişlerdir [1, 15].

Türkiye’de, leishmaniasis’in varlığı ilk kez Kristamonas tarafından ortaya koyulmuş ve İzmir’de ilk bildirim de 1918 yılında Dr. Hofer Kaller tarafından yapılmıştır [15, 46]. Parazit ilk kez kültürde 1911’de üretilmiştir. Hulusi Behçet, 1916’da ülserin altındaki epitel hücresi tabakasını “stub sign” olarak tanımlamış ve tanındaki önemini göstermiştir. 1931 ve 1936 yıllarında İbrahim Osman ve Dr. Akil Muhtar Özden tarafından kala-azar vakaları yayınlanmıştır [53, 57]. 1936 yılından itibaren Dr. Arif İsmet Çetingel tarafından yapılan araştırmalarda hastalığa dikkat çekilmiş ve ülkemizde 1948 yılına kadar yüzden fazla kala-azar vakası bildirilmiştir. 1950’li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesinde olmak üzere Türkiye’nin endemik bir bölge olduğu 1950’den sonra sıtma kontrolünde kullanılan insektisitler nedeniyle hastalığın azaldığı ancak 1960’dan sonra sıtma kontrol çalışmalarındaki yetersizlik sonucu tekrar olgu sayısının arttığı bildirilmektedir. Türkiye’de 1988–1999 yılları arasında toplam 27.960 olgu bildirilmiştir [48, 53, 57, 59, 60].

Leishmania cinsi, içinde yirmiden fazla farklı türler ve alt türler bulundurur [54, 61]. Işık mikroskopunda bütün türler morfolojik olarak aynı görünüme sahip olduğundan sınıflandırma; neden oldukları hastalıklar, epidemiyolojik, coğrafik dağılım, serolojik, biyokimyasal ve biyolojik özelliklerine dayanarak yapılmıştır. Son yıllarda sınıflandırmada izoenzimlerin araştırılması, monoklonal antikorlar ya da parazitin DNA yapısının incelenmesi de dikkate alınmıştır. Buna rağmen sınıflandırma da halen sorunlar devam etmektedir. DSÖ’nün onayladığı sınıflandırma Çizelge 2.1 ‘de verilmiştir [49, 62].

Çizelge 2. 1 *Leishmania* parazitlerinin sınıflandırılması [62]

Kingdom (Alem)	Protista
Subkingdom (Alt Alem)	Protozoa
Phylum (Şube)	Sarcomastigophora
Subphylum (Alt Şube)	Mastigophora
Class (Sınıf)	Zoomastigophora
Order (Takım)	Kinetoplastida
Suborder (Alt Takım)	Trypanosamatina
Family (Aile)	Trypanosamatidea
Genus (Cins)	<i>Leishmania</i>



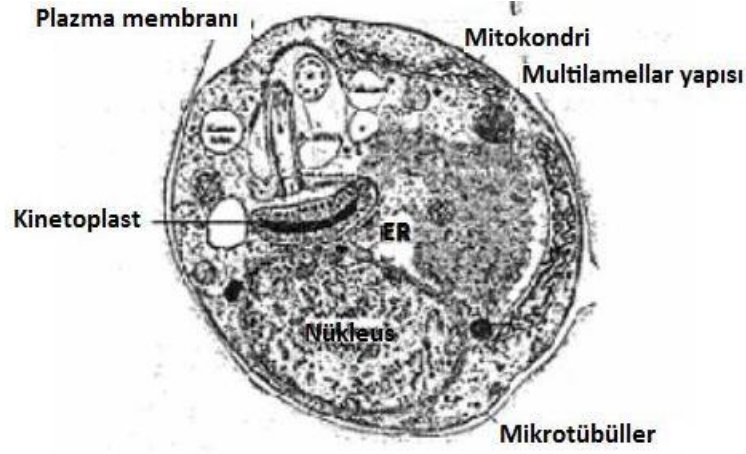
2.2 Morfoloji

Leishmania protozoanları, tek bir kamçı, mitokondri benzeri bir organel, kinetoplast, lizozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı, vakuoller ve zengin DNA içeriğine sahip nükleusu bulunan tek hücreli ökaryot organizmalardır [63]. *Leishmania* parazitleri yaşam siklusları boyunca iki formda gözlenirler. Parazitin vektör olan sineğin gastrointestinal sisteminde bulunan, kamçılı ve hareketli formuna promastigot, hastalarda ve hayvan rezervuarlarda bulunan kamçısız ve hareketsiz formuna ise amastigot denir [55, 64].

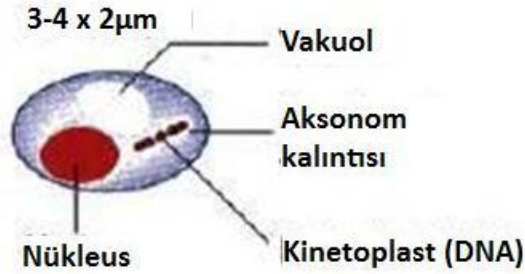
Leishmania parazitleri insan ve diğer memelilerde amastigot, vektörlerde (kum sineği, tatarcık, yakarca) ise kamçılı promastigot (*Leptomonas*) olmak üzere iki farklı morfolojik şekilde bulunur [55, 56, 64].

2.2.1 Amastigot Formlar

Parazitlerin amastigot formu, yaklaşık 1–3 µm eninde ve 2-5 µm boyunda; oval ve hareketsizdir (Şekil 2.1). Bu formlar omurgalı konakta retiküloendotelial sistem makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalmaktadır [28]. Sitoplâzmadaki büyük bir nükleus ve nükleusa yakın kinetoplast bulunur. Kinetoplast *Leishmania*'yı da içeren kinetoplastida sınıfındaki tüm protozoonlarda bulunan bir organeldir. Kinetoplast, şekli çubuğa benzeyen mitokondrial bir yapıdır. İçerisinde yaklaşık 10 bin kadar mini DNA halkaları ile 50 kadar büyük DNA halkaları bulunmaktadır. Bu halkalar “minicircle” ve “maxicircle” olarak adlandırılır. Kinetoplastın hücre içindeki işlevi tam olarak aydınlanmamakla birlikte, büyük halkaların mitokondrial ribozomal RNA'yı kodladığı; küçük halkaların ise mRNA'nın edisyonunda rol oynadığı bilinmektedir [21, 32, 65]. Elektron mikroskopunda disk biçiminde görülen kinetoplastın boyutu 0,4–0,8 µm arasında değişir. Giemsa ile boyanan yaymalarda amastigotun sitoplazması açık mavi, çekirdeği ise koyu renkte görülür. Kinetoplast çekirdeğin yanında parlak kırmızı veya mor renkte boyanır [55, 56, 64]. Nükleus ve kinetoplastın her ikisi de Deoksiribonükleik Asit (DNA) içerir. Kinetoplasttaki DNA çekirdekten farklıdır. Bu DNA'nın dizilimi türlere göre farklılık gösterdiğinden tür tayinlerinde kullanılır.



İnsan makrofaj hücrelerinde Amastigot

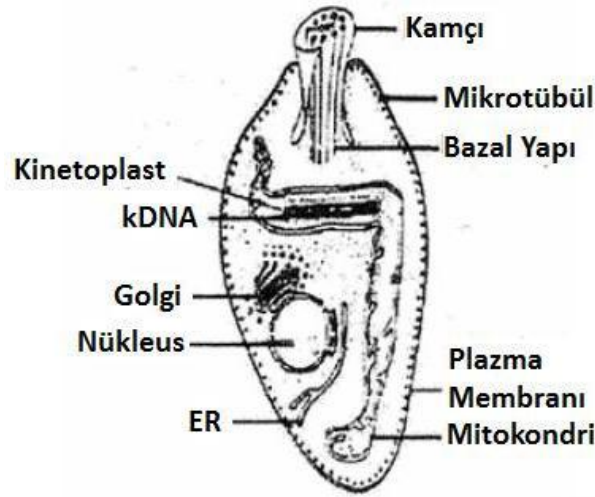


Şekil 2. 1 *Leishmania* parazitlerinin amastigot formu [48, 54, 66]

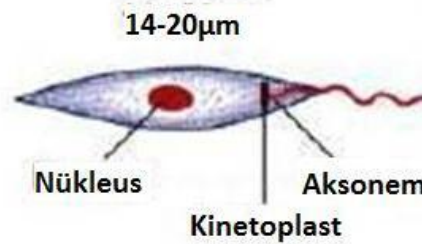
Kinetoplastın genetik bir devamlılığı olduğu ve çekirdekten önce bölündüğü belirlenmiştir. Kinetoplast'ta koyu boyanan parabazal cisim ve yanında nokta şeklindeki blefaroplasttan (kamçı kökü) çıkıp ön kısımda sonlanan bir aksonem vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemlerde parazit plazma membranının tipik olarak üç katlı olduğu, hücreye destek görevi de yapan 2-4nm'lik bir yapı olan pelikül altı mikrotübülleri bulunmaktadır [54, 67]. Makromoleküllerin hücre içine alınmasında önemli rol oynayan bu mikrotübüllerin sayıları ve merkezden uzaklıkları *Leishmania* tür ayrımında kullanılmaktadır. Bütün *Leishmania* türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondri bulunmaktadır. Lizozomların, suda erimeyen polifosfat asidinin, peroksizomların ve RNA içeren volutin taneciklerinin, parazitin beslenmesinden ve salgı kontrolünden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Amastigotlar, kamçı cebi içinde aktif ve serbest olmayan bir kamçıya sahiptir [54].

2.2.2 Promastigot Formlar

Vektörlerin bağırsaklarında ve *in vitro* kültür ortamlarında bulunan ve parazitin hücre dışı formu olan promastigotlar (*Leptomonas*) ise, 14-20 µm boyunda, 2-3 µm genişlikte ve ön uçtan çıkan serbest bir kamçı boyları 20 µm'ye ulaşabilen ve yüksek oranda hareketliliğe izin veren bir yapıya sahiptirler (Şekil 2.2) [54, 68]. Kamçının bir çift merkez ve dokuz çift periferik fibril çiftinden oluşan bir aksonemi vardır. Ön uçta yuvarlak veya at nalı şeklinde kinetoplast, kinetoplastın ön ve kamçının dip kısmında ise blefaroplast bulunur. Çekirdek ile çekirdekçik merkezde bulunur ve çekirdek zarında porlar vardır. Ayrıca sitoplazma içinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum gibi organeller bulunur [69].



Vektörde Promastigot Formu
(ve kültürde)



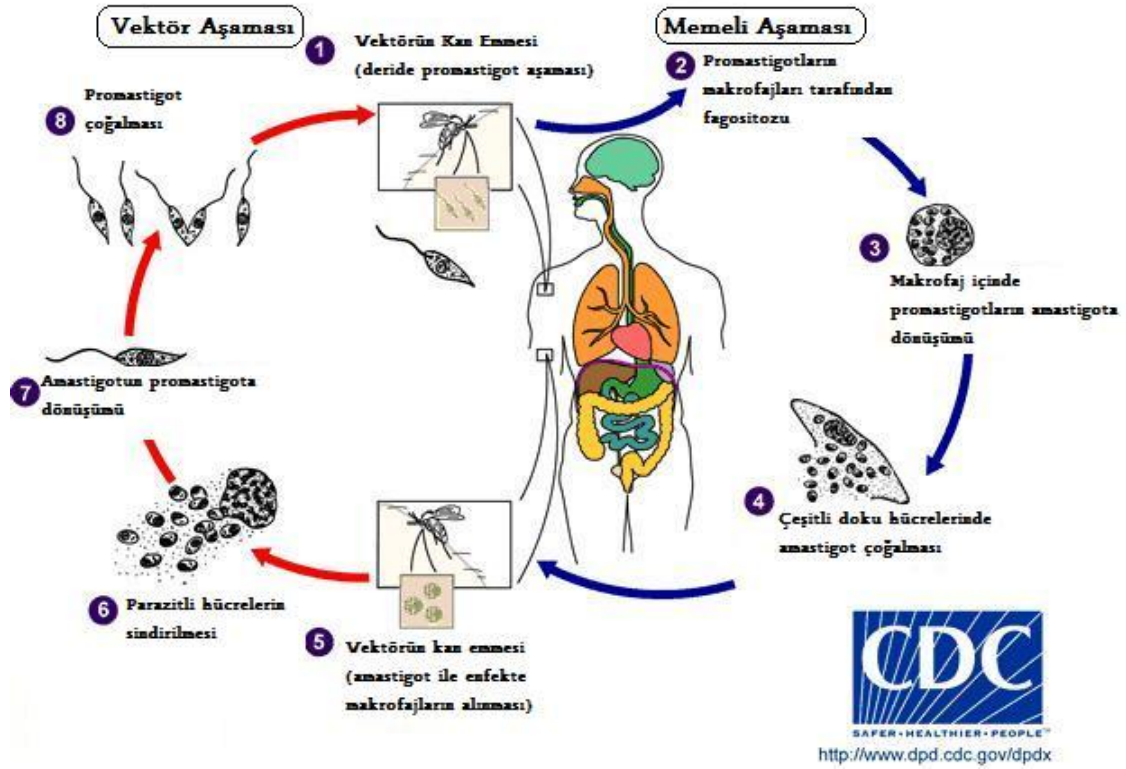
Şekil 2. 2 *Leishmania* parazitlerinin promastigot formu [48, 54, 66]

Promastigotlar vektörün ağızındaki hortum kısmına göç ederler ve bu göç sırasında parazitler çeşitli aşamalar geçirerek enfektif metasiklogenez olarak adlandırılan olgun ve bölünmeyen bir evreye geçerler [70, 71]. Bu evrede yüzey glikokonjugatları

sentezlenir ve bu da promastigotun konak serumuna karşı direncini arttırır. Bu evredeki parazit, metasiklik promastigot olarak adlandırılır [70, 72].

2.3 Parazitlerin Hayat Döngüsü

Dişi tatarcıklar enfekte konaktan kan emerken, amastigotlar ile enfekte olurlar. [63, 70]. Kan ile alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken, bir kısmı da orta bağırsakta bölünerek kamçılı metasiklik (enfektif) promastigot formuna dönüşürler. Bu metasiklik promastigotlar vektörün ağız kısmına geçerek bir sonraki kan emiliminde memeli konağa girerler [63, 70]. Enfektif promastigotlar, tatarcıkların kan emmesini düzenleyen kardiak kapağa zarar vererek, kan akımının tersi yönünde tatarcığın vücudundan, omurgalı konağa geçerler. Makrofajların promastigotlarla 4–8 saat içinde enfekte edildiği ve 24 saat sonra amastigotların çoğaldığı belirlenmiştir [54, 68]. Konağa geçen promastigotların bir kısmı, kan dolaşımına katılarak konak tarafından öldürülür. Ancak geri kalan promastigotlar deri makrofajları veya dendritik hücreler tarafından reseptör temelli fagositoz ile fagosit edilir. Fagosit edilen promastigotlar, amastigot formuna dönüşerek çoğalırlar ve hücreyi patlatarak serbest kalırlar. Hücreyi parçalayarak serbest hale geçen bu amastigotlar, yeniden makrofajları enfekte ederek dalak, karaciğer ve kemik iliği gibi retikuloendotelial sistem organlarına yerleşirler. Parazitin yerleşim yeri karşılaştan konağın immün sisteminin durumuna göre değişiklikler gösterebilmekte ve parazitler türüne uygun olmayan yerlere de göç edebilmektedirler [69, 73]. Enfekte olmuş konakların kan ve lezyonlarında hem serbest amastigotlar, hem de enfekte makrofajlar vardır. Vektör, enfekte konaktan tekrar kan emdiğinde, hem serbest amastigotları, hem de enfekte makrofajları alır. Amastigotlar tekrar vektörün mide kanalında gelişim sürecini geçirerek, promastigot forma dönüşürler. Bu döngü vektör olan tatarcığın beslenmek için bir başka konak bulmasıyla devam etmekte ve tüm bu döngü özellikle çevre ısısına bağlı olarak 4–25 gün sürmektedir [54, 74].



Şekil 2. 3 *Leishmania* parazitlerinin hayat döngüsü [75]

2.4 Leishmaniasis

Leishmania parazitlerinin neden olduğu leishmaniasis (*Leishmania* hastalığı), farklı klinik belirtilerle ortaya çıkan hastalıklara verilen genel isimdir. Leishmaniasis epidemiyolojik ve klinik açıdan farklılıklar gösteren ve ciddi bir halk sağlığı problemi olarak tüm dünyada önemini koruyan bir hastalıktır [76]. *Leishmania* parazitleri yaşamlarını sürdürebilmek için omurgalı ve omurgasız konaklara ihtiyaç duyarlar. İnsan, köpek, kedi, kemirgen, sırtlan, kobay gibi omurgalı canlılarda parazit amastigot şeklinde bulunurken, omurgasız konağı olan *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri ile kültür ortamlarında promastigot şeklinde bulunurlar. Enfekte dişi tatarcıklar kan emme sırasında *Leishmania* parazitleri ile hastalığı bulaştırır [54, 77]. Yaklaşık olarak 30 farklı tür *Phlebotomus* ve/veya *Lutzomia* cinsi sineklerin ve 21 değişik *Leishmania* türünün insanların enfekte olmasında rol oynadıkları bilinmektedir [11, 78, 79]. Hastalığın en sık rastlanan üç klinik formu; retiküloendotelial sistemin organlarını etkileyen iç organ leishmaniasisi-visseral leishmaniasis (VL), kronik deri ülserleri ile ortaya çıkan deri

leishmaniasisi-kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukozalarda erozyonlarla seyreden mukozal deri leishmaniasisi-mukokutanöz leishmaniasis (MKL)'dir.

Çizelge 2. 2 Etkenlerine göre leishmaniasis sınıflandırılması [56, 80]

Klinik	Etkeni
İç Organ Leishmaniasis	<i>L. donovani</i>
(Visseral Leishmaniasis)	<i>L. infantum</i>
	<i>L. chagasi</i>
Deri Leishmaniasis	<i>L. tropica</i>
(Cutaneous Leishmaniasis)	<i>L. major</i>
	<i>L. aethiopica</i>
	<i>L. mexicana</i>
	<i>L. braziliensisguyanensis</i>
	<i>L. b. panamensis</i>
	<i>L. peruviana</i>
Mukokutanöz Leishmaniasis	<i>L. b. Brasiliensis</i>
	<i>L. mexicana</i>

2.4.1 Kutanöz Leishmaniasis (KL)

Kutanöz leishmaniasisin, Delhi ülseri, Şark Çıbanı, Yıl yarası, Aleppo, deri leishmaniasisi olarak farklı adlandırmaları vardır. *Leishmania* cinsi parazitler, tatarcık tarafından kan emilen yerden derinin retikuloendotelial hücrelerine girererek amastigot formuna dönüşürler. Vektör tarafından ısırılan yerde küçük kırmızı bir papül meydana gelir, bu papül daha sonra nodüle dönüşür. Papüller 2 cm'den büyük çaplı, kaşıntılı lezyonlar oluştururlar ve daha sonra ülserleşerek kabuklanır. İnkübasyon periyodu cinslere göre 2 hafta kadar kısa sürede olabileceği gibi, birkaç aydan 3 yıla

kadar uzun da olabilir. KL'nin Türkiye'deki başlıca etkeni *L. tropica*'dır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda *L. infantum*'un da KL'ye neden olduğu ortaya çıkmıştır [20, 49, 55, 56]. KL her yaşta görülebilir ve genellikle vücudun örtülmeyen yüz, ense ve kol kısımlarında sıklıkla oluşur. Ancak, gövdede, saçlı deride ve hatta peniste de olduğu bildirilmiştir [81]. Parazit memeli konağa girdikten 2-12 haftalık bir süre geçtikten sonra ilk lezyonun tam olarak görülmeye başlar. Daha uzun süren kuluçka süreleri de bildirilmiştir. Ayrıca dünyanın çeşitli bölgelerinde KL'nin cinsiyete göre de farklılık gösterdiği bilinmektedir [82].

2.4.2 Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL)

Deri ve mukozaların birleştiği yerde ülser ve kabuklaşma meydana gelmesiyle oluşur. Etkeni *L. braziliensis*'tir. Güney Amerika'da Espundia olarak da adlandırılan *L. braziliensis* ile enfekte olan kişilerde, burun, ağız, farinks ve larinkste mukozal lezyonların gelişmesi ile mukokutanöz leishmaniasis olarak isimlendirilen klinik tablo ortaya çıkmaktadır [83]. Hastalığın kuluçka süresi 10 gün ile birkaç ay arasında değişebilir. Tatarcığın kan emdiği bölgede meydana gelen nodül, papül, vezikül ya da ülser lezyonları 10 cm'den büyük olabilir [61]. Herhangi bir komplikasyon oluşmazsa lezyon 6 ay ile 2 yıl arasında kendiliğinden iyileşebilir. MKL lezyonları mukozal bölgelerde meydana geldiğinden, şark çıbanından ayırt edilebilir [84]. Burundaki lezyonlar sonucu doku kayıpları oluşur. Doku harabiyeti sonucunda burun, üst dudak ve alt göz kapağında ciddi patolojik değişiklikler gelişir [82]. Bazı *Leishmania* türlerinin yetersiz tedavisinden sonra da mukokutanöz leishmaniasis ortaya çıkabilir ve eğer tedavi edilmezse, acılı sakatlıklar hatta ölüme bile neden olabilir.

2.4.3 Visseral Leishmaniasis (VL)

Kala-Azar olarak da bilinen VL, en şiddetli ve çoğunlukla ölümcül olan sendromdur. Özellikle dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf nodlarında bulunan mononükleer fagositik sistem hücrelerinin enfekte olması sonucu görülen bir hastalıktır. Etkenlerinden *Leishmania donovani* Hindistan ve Afrika'da, *Leishmania infantum* Akdeniz Bölgesi'nde ve *Leishmania chagasi* ise Yeni Dünya'da görülmektedir [85]. VL yetersiz beslenme, organ nakilleri sonucu oluşan immün yetersizlik ve AIDS gibi immün sistemin

baskılandığı durumlarda kolaylıkla gelişebilmektedir [86]. Bununla birlikte, mononükleer fagositik sistem hücrelerinin bulunduğu akciğer ve bağırsaklarda da görülebilir [54, 68]. Hastalığın kuluçka süresi genellikle 2-4 aydır. Bu süre bir yıla kadar uzayabilir. Hastalık genellikle kendini gizleyerek sinsi başlar, immün sistemin baskılandığı durumlarda aniden ortaya çıkabilir. Ayrıca ateş, hepatosplenomegali, anemi, trombositopeni, lökopeni ve hipergammaglobülinemi gibi klinik semptomlar gösterir. Başlangıçta baş ağrısı, zayıflama ve hafif ateş görülür. Daha sonra yüksek ateş ile birlikte dalak büyür. Hastalığın ilerlemesi ile ateş yükselip düşerek VL'ye özgü bir eğri çizer. Günde iki kez yükselen aralıklı bir ateş ile devam eder. Genelde 39-40°C olmakla beraber bazen 40-40.5°C'ye çıkabilir [56]. Yetişkinlerde de görülen VL genellikle çocuklarda tedavi edilmez ise ciddi enfeksiyonlara ve hatta ölümlere neden olabilir [28]. Ayrıca eğer tedavi bırakılırsa, hastalığın, immünbaskılayıcı ve ikincil hastalıklara dayalı yüksek bir ölüm oranı mevcuttur. VL, endemik alanlardaki HIV pozitif bireylerde sık görülen bir hastalık haline gelmiştir.

Klinik olarak VL'in akut, subakut ve kronik olmak üzere 3 formu olduğu belirlenmiştir [67]. Subakut form; klinik olarak en sık görülen form olup akut forma göre daha belirgindir. Tedavi edilmesine rağmen hastalığın % 1 ile % 11 arasında ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Ölüm nedenleri olarak gastrointestinal sistem kanamaları, anemiye bağlı gelişen kalp yetmezliği ve karaciğer yetmezliği rapor edilmiştir. Akut form; şiddetli diş eti, burun, bağırsak kanamaları ile kemik iliği baskılanmasına bağlı oluşan kanda eritrosit, lökosit ve trombosit sayısının normalin altına düşmesi sonucu hastalık daha da ağırlaşarak ilerlemekte ve özellikle ishal şikâyetlerinin eklenmesi ile hastanın genel durumu bozulmakta, hasta 2-3 ay içinde hayatını kaybetmektedir. Kronik vakalarda ise zayıflama, karaciğer ve dalak büyüklüğü dışında genelde hastalarda bir şikâyet yoktur ve hastanın yaşamına normal olarak devam ettirdiği bildirilmiştir [85]. Genellikle *L. infantum*'un rezervuarı köpekler olup, seroprevalansı bu hayvanlarda % 0.72-% 33 olarak belirlenmiştir [87]. Son yıllarda immün yetmezliği olan hasta olgularının artmasına paralel olarak VL olgularında da artış görüldüğü dikkat çekmektedir.

2.4.4 Asemptomatik Leishmaniasis

Son yıllarda yapılan endemik çalışmalarda subklinik form olarak asemptomatik viseral leishmaniasisin de oldukça yaygın olduğu gösterilmiştir [88]. Asemptomatik enfeksiyonun sebebi parazitin virulensliği veya hastanın hücrel immün sistemine bağlı olabilir. Bazen de klinik iyileşme sağlandıktan sonra parazitlerin hala vücutta kalarak asemptomatik olarak devam ettiği gösterilmiştir [2, 9, 89]. Dünya sağlık örgütünün açıklamalarına göre, semptomatik olarak ilerleyen hastaların sayısı, asemptomatik bireylerin sadece % 5-20'sini oluşturmaktadır [8, 9]. Hafif ve gizli *Leishmania* enfeksiyonlarının varlığı yakın zamanda değil, 20. yüzyılın başlarında da çok az belirti veren VL ve spontan olarak VL tanısı konmuş şekilde rapor edilmiştir [90]. Brezilya'da yayınlanan epidemiyolojik raporlarda, hafif seyreden ya da asemptomatik *L. chagasi* ya da *L. infantum* etkenlerine bağlı enfeksiyon hastalığının daha önceden düşünülenin aksine az belirti gösteren hastalıklardan daha sık rastlanıldığı gösterilmektedir [91, 92]. Akdeniz bölgesinde ise, uzun süren subklinik leishmaniasis, sağlıklı ve HIV ile enfekte vakalarda da rapor edilmiştir [39, 40, 93-95]. Asemptomatik leishmaniasis, periferik kanda parazit dolaşımının bulunduğu ancak tespit edilemeyen, hiçbir klinik veya hematolojik değişiklik bulunmayan asemptomatik subklinik periyot ile başlar. VL'nin kan transfüzyonu ile bulaşması, İngiltere, Belçika, Fransa, Hindistan'ın endemik olmayan bölgelerindeki yurtdışı seyahat geçmişi bulunmayan bireylerde belirlenmiştir [2, 41, 45]. Asemptomatik leishmaniasis immün sistemi baskılanmış kişilerde meydana gelebilir [88]. Ertelenmiş antileishmanial hipersensitivite göstergesi olan pozitif leishmanin deri testi (LDT) sonuçları VL geçmişi olmayan ve yeni bir enfeksiyonu bulunmayan kişilerde gösterilmiştir. *L. donovani* ve *L. tropica* asemptomatik enfeksiyonunda, tedavi edilmiş *L. brasiliensis* enfeksiyonunda ve Güney Fransa ile İspanya'nın Balerik Adalarındaki asemptomatik kan bağışçılarında görülen *L. infantum* enfeksiyonunda periferik kanda parazit sirkülasyonu olduğu rapor edilmiştir [2, 39, 42]. Asemptomatik bireylerin % 5'den daha azında klinik olarak kalıcı visseral leishmaniasis gelişmektedir ancak bu kişiler yıllarca hastalık taşıyıcısı durumundadırlar [96]. Hatta asemptomatik *Leishmania*'nın inkübasyon süresinin 30 yıla kadar çıkabildiği rapor edilmiştir [8, 97, 98]. Ayrıca non-endemik bölgelerde de asemptomatik leishmaniasis bulgularına da rastlanmıştır [96].

2.5 Leishmaniasisin Epidemiyolojisi

Leishmaniasis tüm dünyada yaygın olup, 98 ülkenin tropikal ve tropikale yakın iklimde sahip bölgelerinde endemik olarak görülmektedir. Dünya çapında yaklaşık 12 milyon vaka vardır [5]. Her yıl 1.5 milyonu KL ve 0.5 milyonu VL olmak üzere 2 milyon yeni vaka ortaya çıktığı tahmin edilmektedir [1]. Leishmaniasisin coğrafik dağılımı, tatarcığın doğal yaşam alanlarına bağlı olarak değişir. Ekonomik gelişmişlik, yaygın kentleşme, ormanların yok olması ve kentsel alanlara göç sonucu yeni yerleşim yerlerinin kurulması *Leishmania*'nın rezervuarı olarak tatarcığın yayılmasında neden olarak gösterilebilir. Ayrıca, yeni konak popülasyonunun sayısı, örneğin; HIV ve leishmaniasisin aynı anda enfekte ettiği hasta popülasyonu özellikle güney Avrupa ve Afrika'da artış göstermektedir [28].

Uzun yıllardır leishmaniasise karşı mücadele yapılmasına rağmen, hastalığın giderek yayılması devam etmektedir [1]. Hastalık rezervuarı köpeklerin başta kırsal alanlar olmak üzere her yerde bulunması ve vektörlerin bu kaynaktan alabilecekleri paraziti her zaman insanlara bulaştırma olasılığı, leishmaniasisin yayılmasının başlıca nedenidir. Ayrıca hastalığın vektörlerinde kullanılan insektisitlere ve hastalığın etkenlerinde ise kullanılan ilaçlara karşı dirençliliğin gelişmesi de önemlidir. Hastalığın yayılmasının birçok etkeni vardır. Bunlar; hastaların tedavi edilememesi, kentler arası seyahatlerin kolaylaşması ve leishmaniasise duyarlı kişilerin endemik olan bölgelere göçleri, savaşlar, AIDS ve diğer immün yetmezliklerin, tarım alanlarının ve sulamanın artması, ormanların tahribi, barajların yapımı, insektisit uygulamasının etkin ve yeterli yapılamaması ile vektörün insektisitlere direnç kazanması gibi pek çok neden mümkündür [67, 86].

Ayrıca *Leishmania* parazitleri sağlıklı kişilere çeşitli yollarla bulaşmaktadır. Bunların en önemlisi *Leishmania* parazitleri ile enfekte olmuş tatarcıkların ısırması ile olan bulaşmadır [8, 21]. Ancak leishmaniasisin tatarcık ısırığı dışında diğer yollarla; kan nakliyle [8, 22-27], laboratuvar kazalarıyla [28, 29], cinsel ilişki ile [8, 30], anneden plasenta yolu ile bebeğe [31], *Leishmania* ile enfekte olmuş hamsterın ısırığıyla [32] ve organ [8, 33] ve kök hücre nakli [34, 35] ile bulaştığı da rapor edilmiştir. Ancak *Leishmania*'nın bulaşmasının en önemli nedenlerinden biri de donör kanı aracılığıyla hastalığın yayılmasıdır. Ayrıca dünyanın çeşitli bölgelerinde leishmaniasisin donör

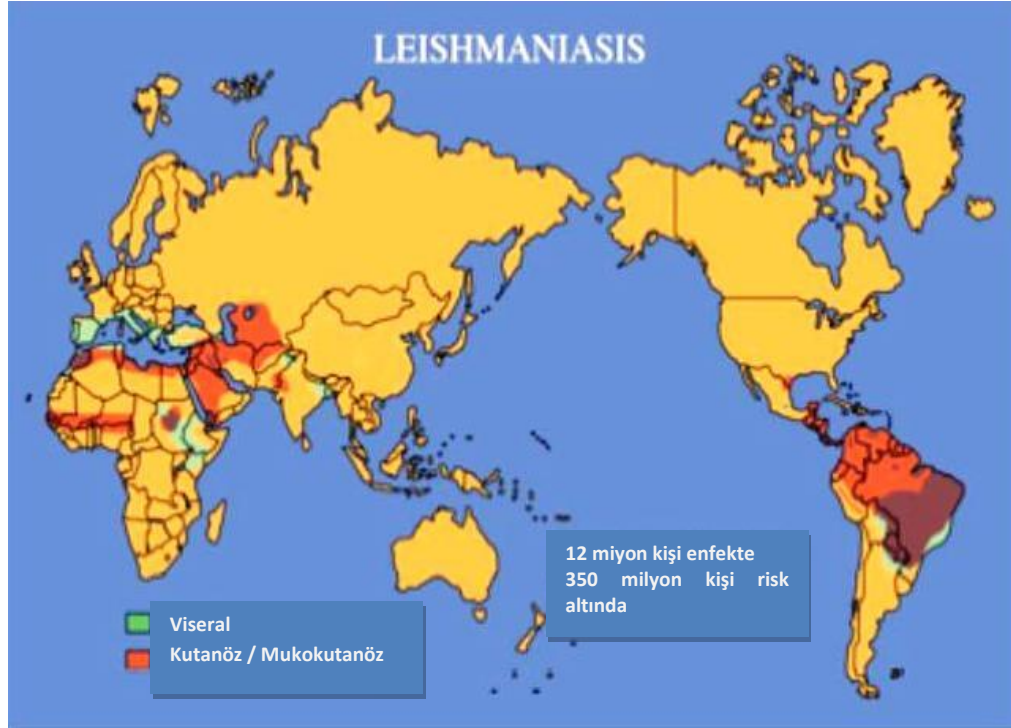
kanları ile yayılması hakkında çalışmalar yapılmış ve donör kanı ile bulaşma riskinin de oldukça yüksek olduğu görülmüştür [8, 39-44]. Örneğin Güney Fransa'da 565 donörün % 13.4'ü western blot ve % 1.6'sı kültür yöntemi ile [8], İspanya'nın Eivissa endemik bölgesinde 656 donörün %7.6'sı Western Blot, %2.4'ü ELISA, %4.4 kültür ve % 22 PCR yöntemi ile [8, 40], Brezilya'da 21 donörün %24'ü PCR ve % 43'ü dot-blot yöntemi ile [41] pozitif çıkmıştır. Monako'da 462 donörün %13.2'sinde western blot ve %0.4'ünde de kan kültüründe *Leishmania* enfeksiyonuna pozitiflik vermiştir. Ayrıca *Leishmania* DNA'sı 122 donör kanının %22.1'inde amplifiye edilmiş ve nested-PCR ile pozitif sonuç veren üç donörden kan kültürü yapılarak canlı parazitlerin varlığı tayin edilmiştir [40]. Güney Fransa'da, 18 donör kanından kültür ya da PCR ile yaptıkları araştırmada sadece iki kişiden pozitif sonuç alarak *Leishmania* tanısı koyabilmişlerdir [39]. Visseral leishmaniasisin Endemik olduğu Hindistan'ın Bihar bölgesinde 450 asemptomatik sağlıklı kişiden Giemsa boyama ile periferik kandan hazırlanan yaymalardan sadece 6 kişide (%1.3) *Leishmania* amastigotlarının varlığına rastlanmıştır [44]. Brezilya'da da yapılan bir çalışma ile *L. donovani*'nin donör kanlarında bulunması incelenmiş ve donör örneklerinde PCR yöntemi ile %24 ve dot-blot yöntemi ile de % 43 pozitiflik olduğu gösterilmiştir [41]. Bununla birlikte İtalya'nın Sicilya bölgesinde yapılan bir çalışmada 500 donörden kan örnekleri alınarak *L. infantum* seropozitifliğine bakılmış ama hastalık bulgusuna rastlanmamıştır [42]. Görüldüğü gibi leishmaniasisin epidemiyolojisinde donör kanlarının önemini belirlemek amacıyla dünyanın çeşitli endemik ülkelerinde donör kanları üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur.

Ayrıca tanıda yaşanan problemler, her sağlık kurumunda ayrıntılı tanı ve teşhis yapılamaması, şimdiye kadar leishmaniasise karşı çeşitli aşı geliştirilmesi çalışmaları olmasına rağmen etkin bir aşının elde edilmemiş olması gibi sorunların da çözümü ulaştırılması gerekmektedir.

2.6 Leishmaniasisin Dünyadaki Dağılımı

Birçok ülkede endemik olan leishmaniasis ülkelere özgü bölgesel karakter gösterir. Bu durum ısı, nem, bölgenin yüksekliği ve bitki örtüsü gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca vektör olan tatarcık türlerinin, o bölgede fazlasıyla çoğalabilmesi ve rezervuar olan insan ve hayvanlar gibi farklı etkenler de rol oynar [15, 67, 86]. Tropikal ve subtropikal

bölgelerin hastalığı olan leishmaniasis; Kuzey Afrika ve Güney Batı Asya'da özellikle 1-4 yaş, Batı Afrika ve Hindistan'da 5-9 yaş arası çocuklarda, Çin ve Avrupa'da ise hemen tüm yaş gruplarında görülebilecek şekilde epidemik karakter göstermektedir.



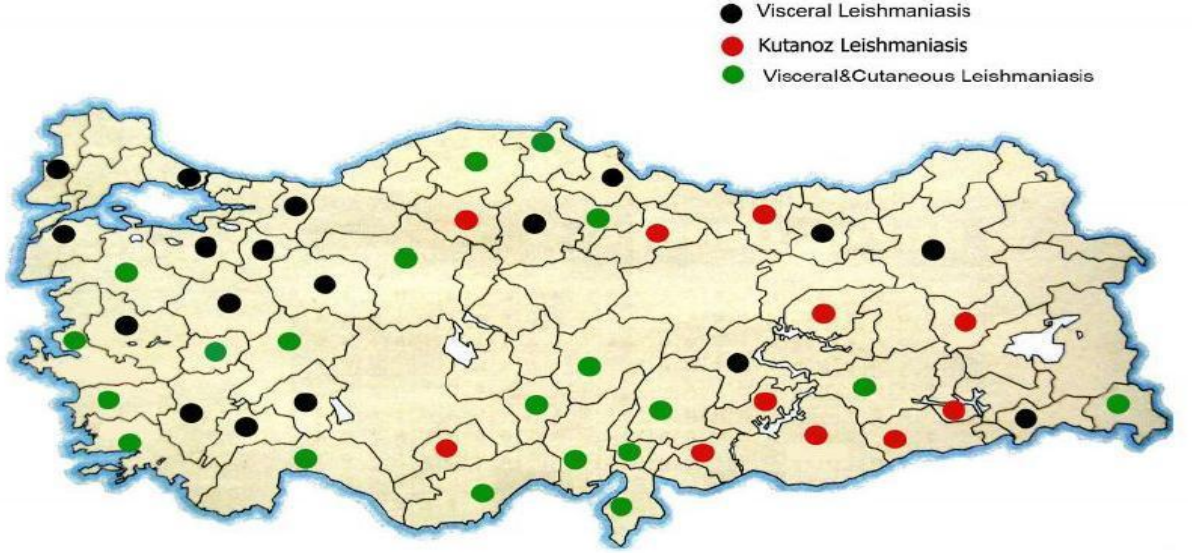
Şekil 2. 4 Dünya'da Leishmaniasis Dağılımı [99]

Akdeniz havzası ve Avrupa için de bir sağlık problemi olan hastalık, Türkiye'den Portekiz'e kadar olan kıyı bölgelerinde görülmektedir. Azerbaycan, Ermenistan, Türkmenistan, Kazakistan gibi ülkelerden de olgular bildirilmiştir [15, 100]. Dünya'da leishmaniasis; orman ürünleri ticareti, madencilik, baraj yapımı, tarım alanlarının genişletilmesi, yol inşaatları gibi nedenlerle orman alanlarının tahribi ve insanların bu bölgelerde yoğunlaşması, kırsal alandan kentlere göç, hızlı şehirleşme gibi durumlar, insanların flebotomlarla karşılaşmasını ve hastalığa yakalanmasını arttırmaktadır [67, 86].

2.7 Leishmaniasisin Ülkemizdeki Dağılımı

Türkiye'de yaklaşık 20 milyon kişi leishmaniasis tehdidi altındadır. Ülkenin değişik bölgelerinde visseral ve özellikle de kutanöz formlarına rastlanmaktadır. SB istatistiklerine göre hastalık son yıllarda giderek artış göstermekte ve özellikle Şanlıurfa,

Osmaniye, Adana, Hatay, Kahramanmaraş ve Mersin illerinden çok sayıda olgu bildirilmektedir [12].



Şekil 2. 5 Türkiye’de Leishmaniasis Dağılımı [101]

2004 yılında SB’nin yayınladığı, halk sağlığı sorunu olarak önemini koruyan bazı bulaşıcı hastalıkların etiyolojik ajanları hakkında veri elde edilmesi ve gerektiğinde bunların ileri epidemiyolojik araştırmalarının yapılabilmesini amaçlayan yönergeye göre bulaşıcı hastalıkların ihbarı ve geri bildirimi zorunlu hale gelmiştir. Buna göre KL birinci basamaktan itibaren sağlık sisteminde yer alan tüm kurumlardan bilgi toplanmasını gerektiren A grubundaki hastalıklara girerken VL de önemli bir kısmını bildirim sistemine yeni dahil olan hastalıkların oluşturduğu C grubuna girmektedir [102]. Şekil 2. ‘de Türkiye’de VL (Kala Azar) ve KL (Şark Çıbanı) vaka sayıları ile morbidite hızları verilmiştir [103].

Çizelge 2. 3 Türkiye’de VL ve KL vaka sayıları ile morbidite hızları

Kala Azar Vaka Sayıları ve Morbidite Hızları, Türkiye, 1989-2005

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)
1989	57.426.316	129	0,22
1990	57.582.446	417	0,72
1991	57.736.288	1.045	1,81
1992	59.088.101	768	1,30
1993	60.384.474	713	1,18
1994	61.779.288	196	0,32
1995	63.206.510	95	0,15
1996	62.727.000	1.748	2,79
1997	63.745.000	71	0,11
1998	64.786.000	34	0,05
1999	65.819.000	22	0,03
2000	67.844.903	34	0,05
2001	69.081.716	17	0,02
2002	70.415.064	46	0,07
2003	71.772.711	24	0,03
2004	71.152.000	30	0,04
2005	72.065.000	32	0,04

Vaka sayıları rutin bildirim sisteminden elde edilmiştir. Morbidite hesaplanmasında kullanılan nüfuslar Türkiye İstatistik Kurumu 2000 yılı nüfus sayımına göre yapılan projeksiyonlardır.

Şark Çıbanı Vaka Sayıları ve Morbidite Hızları, Türkiye, 1988-2005

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı (100.000)
1988	54.176.000	1.005	1,86
1989	57.426.316	2.743	4,78
1990	57.582.446	1.056	1,83
1991	57.736.288	1.732	3,00
1992	59.088.101	1.935	3,27
1993	60.384.474	3.235	5,36
1994	61.779.288	5.692	9,21
1995	63.206.510	2.158	3,41
1996	62.727.000	3.857	6,15
1997	63.745.000	2.038	3,20
1998	64.786.000	1.499	2,31
1999	65.819.000	1.010	1,53
2000	67.844.903	1.135	1,67
2001	69.081.716	994	1,44
2002	70.415.064	2.721	3,86
2003	71.772.711	2.497	3,48
2004	71.152.000	4.187	5,88
2005	72.065.000	2.563	3,56

Vaka sayıları rutin bildirim sisteminden elde edilmiştir. Morbidite hesaplanmasında kullanılan nüfuslar Türkiye İstatistik Kurumu 2000 yılı nüfus sayımına göre yapılan projeksiyonlardır.

2.8 Leishmaniasisin Tedavisi

Leishmaniasis vakalarında, kriyoterapi, laser, cerrahi eksizyon gibi fiziksel yöntemler de olsa da günümüzde en sık kullanılan, en etkili ve en iyi sonuç alınabilen tedavi ilaç tedavisidir. Leishmaniasis tedavisinde uygun ilacın seçimi önemlidir. Çünkü *L. donovani* ve *L. tropica* gibi türlerde ilaç direnci ile karşılaşmaktadır. Tedavide, DSÖ tarafından kullanılması ilk olarak önerilen, en yaygın ilaçlar; 5 değerli antimonlu sodyum stiboglukonat (*Pentostam®*), meglumine antimonat (*Glucantime®*) ve ethilstibamine (*Neostibosan®*) gibi beş değerli antimon bileşiklerdir [82, 85, 104]. Bu ilaçlar intravenöz veya intramuskuler yoldan uygulanır. Antimonların parenteral uygulanma yolu, uzun tedavi süresi ve yan etkileri gibi dezavantajları vardır. Antimonlara dirençli leishmaniasis tedavisinde ise pentamidin, paromomisin (aminosidin), allopurinol,

amfoterisin B ve yağlı formülasyonları, miltefosine, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol, terbinafin ve metronidazol gibi ilaçlar kullanılabilir. Ancak hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar oldukça toksikdir [82, 105, 106].

2.9 Leishmaniasisten Korunma ve Kontrol

Leishmaniasisin kontrol altına alınmasında en önemli nokta, enfekte bireylerin etkin olarak tedavi edilmesidir. Ayrıca kontrolü için kişisel korunma tedbirleri arttırılmalı, toplumun hastalıkla ilgili bilgilendirilmesi sağlanmalıdır. Kemirgen ve vektör kontrolü ile vektörlerin gelişme alanlarının ortadan kaldırılması da tatarcık popülasyonunu azaltılabilir [86, 107].

Ekonomik büyüme, kentleşme, insanoğlunun neden olduğu ekolojik dengenin değişmesi, baraj ve sulama sistemlerinin yapımı, yeni tarım ürünleri hastalığın artması için ana sebepler olarak düşünülmektedir. Ayrıca küresel ısınma ile Avrupa ülkeleri dahil Dünya'nın çeşitli ülkelerinde hastalığın giderek artması beklenmektedir [10].

Bu nedenle DSÖ, her ülkede bulunan üyeleriyle işbirliği içinde hazırladığı kontrol programları yanında, ulusal çapta eğitim kursları, çalıştaylar, seminerler, dünya çapındaki epidemiyolojik verilerin güncelleştirilmesi, teknik dokümanların hazırlanması ve kontrol ağırlıklı araştırma projelerinin desteklenmesi gibi hizmetleri de yürütmektedir [1, 84, 86, 100, 108]

2.10 Leishmaniasisin Tanısında Kullanılan Yöntemler

Leishmaniasisin tanısında klinik ve laboratuvar tanı yöntemleri kullanılmaktadır.

2.10.1 Klinik Tanı

Tanıda ilk aşama klinik tanıdır ve oldukça önemlidir. Endemik bölgede yaşayan ve bu bölgelere yolculuk eden insanların leishmaniasis açısından daha fazla risk altında olduğu unutulmamalıdır.

2.10.1.1 Visseral Leishmaniasis

Klinik belirti ve bulgular ile VL'ye tanı konulmamaktadır. Çünkü VL sıtma, hepatomegali ve splenomegaliye neden olan hastalıklar ya da portal hipertansiyona sekonder gelişen

siroz gibi tablolarla karışabilmektedir [109]. Ayrıca miliyer tüberküloz, broselloz, tifoid ateş, lenfoma, lösemi gibi hastalıklardan ayırıcı ve doğru tanının konulması da çok önemlidir.

2.10.1.2 Kutanöz Leishmaniasis

KL için endemik bölgelerde deri lezyonları olan hastalarda, lezyonlar KL'nin erken evresi olarak tanımlanarak gerçeğinden fazla sayıda tanı bildirilmekte, bunun yanında endemik olmayan bölgelerde ise KL yerine diğer deri hastalıklarına ait tanı konup gözden kaçırılmaktadır. İmpetigo, lepra, lupus vulgaris, sifilizin deri lezyonları, blastomikoz, deri kanseri ile KL için ayırıcı tanıda yer almalıdır.

2.10.2 Laboratuvar Tanısı

Leishmaniasis şüphesinde son nokta laboratuvar testlerinin sonuçları ile ortaya konmaktadır. Laboratuvar tanısında mikroskopik, kültür, serolojik ve moleküler yöntemler ile deney hayvanı uygulamaları yer almaktadır [109, 110].

2.10.2.1 Mikroskopik Tanı Yöntemleri

Laboratuvar tanısında en sık kullanılan yöntemlerdir. Dalak, kemik iliği, karaciğer, deri lezyonu, lenf düğümünden invaziv yöntemlerle elde edilen örnekler ile periferik kandan ve buffy coat katmanından elde edilen örneklerde bu yöntem kullanılır. Elde edilen örneklerin Giemsa boyası ile boyanması sonucunda mikroskopta *Leishmania* parazitlerinin amastigot formunun görülmesi ile tanı konmaktadır. Bunun için örnekler lama yayılıp fikse edildikten sonra Giemsa boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenir. Amastigotlar, monosit ve makrofajlar içinde intrasellüler ya da ekstrasellüler olarak bulunurlar. Deneyimli kişiler, 2-4µm boyutlarında yuvarlak-oval şekilli sitoplazması açık mavi, nükleusları görece olarak büyük, koyu ve nükleusa benzeyen ama daha küçük ve hücrenin bir köşesinde yerleşmiş olan çubuksu şekilli kinetoplastları da koyu pembe boyanmış amastigotları tanırlar. Kemik iliği ince yayması mikroskopik incelemesinin tanısal duyarlılık değeri % 60–85 civarındadır. Son derece riskli bir invaziv girişim olan dalak ince iğne biyopsisi tecrübeli kişilerce yapıldığında, bu örnekle hazırlanan yaymaların mikroskopik

incelemesi % 95'in üzerinde duyarlılık değerine ulaşabilmektedir [28]. Ancak hasta için riskli, ağrılı ve invaziv bir yöntemdir. Hem kemik iliği hem de dalak aspirasyonu hastane koşullarında ve aseptik olarak deneyimli hekimler tarafından gerçekleştirilmeli, bu durum ise sık uygulanmasını engellemektedir. Periferik kandan elde edilen kan örneklerin mikroskopik duyarlılığı ise invaziv yöntemlere göre oldukça düşük olup, tanıda sık kullanılmamaktadır. Buna göre de periferik kandan leishmaniasisin tanısı için yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. KL tanısında lezyondan alınan örneğin mikroskopik incelenmesinin yanında, kültürünün yapılması duyarlılığı % 70 oranına yükselttiği belirlenmiştir. Ancak bu yöntemin duyarlılığı elde edilen örnekteki parazit sayısının miktarına bağlı olarak değişir.

2.10.2.1.1 İğne Biyopsisi ve Biyopsi

Dalak, kemik iliği ya da lenfatik bezlerden alınan iğne biyopsisi genellikle kullanılan yöntemdir. Önceleri deri lezyonlar için materyal, ülserin alt kenarından elde edilirdi ancak günümüzde bu yöntemin yerine biyopsi geçmiştir [32]. Eğer doku, bir ayırma işlemi ile elde edilecekse bir ülserin kenarından dolu kalın biyopsi alma en iyi yöntemdir. Önce küçük bir parça uygun kültür medyumuna yerleştirilir; doku preparatları uygun bir sabitleyiciye konduğu sırada kenardan kesilerek yapılır. Sonradan ortaya çıkan lekelenmeler Giemsa boyama yöntemiyle ve parazitler histoloji için hematoksin ve eosin ile gösterilir. Ayrıca küçük bir parça az miktarda streptomisin ve penisilin içeren normal tuzla homojenize edilebilir. Yaymalar ve dokunma preparatları Leishman, Wright ya da Giemsa boyası ile pH 7.2'de boyanmalıdır [32].

2.10.2.2 Kültür Yöntemleri

Leishmaniasis tanısında kullanılan kültür yöntemleri diğer yöntemlerden farklı olarak daha spesifiktir. Bunun nedeni kültür ortamında direk olarak canlı parazitlerin tespit edilmesidir. Kültür yöntemlerinin temeli, hastadan elde edilen örneklerde bulunan amastigotların kültür koşullarında hareketli promastigotlara dönüşmesine dayanır. Ayrıca leishmaniasis tanısında kültür, serolojik tanı yöntemleri için yeterli sayıda antijen elde etmek ve tür belirleme çalışmaları ile *in vivo* çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli sayıda parazit elde etmek; *in vitro* ilaç çalışmaları yapabilmek ve makrofajlarla

amastigotlar arasındaki ilişkiyi incelemek için birinci sırada gelen bir tanı yöntemidir [28, 32]. Akut VL hastalarında kültürün duyarlılığı % 90 olarak bildirilmiştir. Son yıllarda Allahverdiyev ve ark. [51] tarafından geliştirilen mikro kültür yöntemi VL ve KL olgularının tanısında hızlı ve duyarlı sonuçlar vermesinin yanında uygulanmasının da kolay olması nedeniyle dikkat çekmektedir [6, 52, 111-114]. Ancak kültür yöntemlerinin duyarlılığı mikroskobik yöntemlerde olduğu gibi elde edilen örnekteki parazitin miktarına bağlıdır. Böylece kültür yönteminde duyarlılık, semptomatik leishmaniasisli hastalardan invaziv yöntemler ile elde edilen örnekler kullanıldığında yüksek olmaktadır. Ancak bu yüksek duyarlılık elde edilen örnekteki parazitin miktarına bağlı olarak değiştiğinden tanı konulmasında NNN agar kullanıldığında bile tanı süresi değişmektedir. Böylece parazit sayısı çok olan durumlarda yaklaşık bir haftada tanı konulurken parazit sayısı az olan durumlarda bu süre bir aydan fazla sürmektedir [51]. Asemptomatik leishmaniasisde ise bu yöntemin duyarlılığı oldukça düşük olup bu süre 6 aya kadar çıkabilmektedir [2, 39, 40]. Sonuç olarak leishmaniasis tanısında kültür tanı yöntemleri, altın standart olarak kabul edilmesine rağmen duyarlılığı ancak invaziv yöntemler kullanıldığında mümkün olmaktadır. Asemptomatik leishmaniasisde ise klinik bir belirti olmadığından dolayı, invaziv yöntemler kullanılmamaktadır. Buna göre de, asemptomatik leishmaniasis tanısında daha duyarlı kültür yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

2.10.2.2.1 *Leishmania* Parazitlerinin Kültürünün Yapılması

Kültürlerde besiyeri olarak tek fazlı (Schneider'ın besiyeri, M199, ya da Grace'in besiyeri) ya da iki fazlı (NNN besiyeri ve Tobies besiyeri) kullanılabilir [28]. M199 ve FDS içeren Tobies besiyeri de kültür amacıyla kullanılmaktadır. *Leishmania* parazitlerinin *in vitro* kültürü promastigot ve amastigot formların her ikisi içinde yapılabilir. Ancak memeli konaklarda hücre içinde yaşayan amastigotların kültürü, makrofaj benzeri hücreler içinde yapılması nispeten zor ve zahmetli olması nedeniyle, promastigot kültürü tercih edilmektedir [115, 116]. Promastigot ve amastigot formdaki parazitlerin büyüme koşulları arasında, sıcaklık, pH, besin kaynağı ve serum komponentleri açısından önemli farklılıklar bulunur. Sıcaklık ve pH'ın, promastigotların amastigotlara dönüşümünü tetiklemede önemli rolü vardır. Bu şekilde ortam

özelliklerini değiştirerek promastigotlar aksenik amastigotlara dönüştürülebilir [117, 118]. *Leishmania* parazitlerinin kültürünün yapılması parazitlerin biyokimya, immünoloji ve hücre biyolojisi üzerine çalışma yapılmasına olanak sağlar. Leishmaniasisli hayvanlardan alınan biyopsi örnekleri, uygun besiyerine ekilerek *Leishmania* promastigot kültürü yapılabilir. Kültüre ekilen biyopsi örneklerindeki *Leishmania* parazitleri önce hareketli promastigotlara dönüşür daha sonra çoğalmaya başlar [54, 70, 115].

2.10.2.2.2 *Leishmania* Parazitlerinin Kültüründe Kullanılan Besiyerleri

Leishmania'nın *in vitro* kültürünün yapılmasında birçok besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerlerinin her birinin farklı avantaj ve dezavantajları vardır. Bugün *Leishmania*'nın ürettiği besiyerlerinin tümü, diğer hücrelerin ürettikleri besiyerlerinin denenmesi ile bulunmuştur [115, 116].

1994 yılında, McNeal ve Novy tarafından *Trypanosoma* kültürünü elde etmek için hazırlanan bifazik besiyeri, Nicole tarafından modifiye edilerek *Leishmania* promastigotlarını üretmek için denenmiş ve tüm dünyada Novy-MacNeal ve Nicole (NNN) ismiyle bilinen besiyeri geliştirilmiştir [70, 115, 116]. Günümüzde *Leishmania* kültürü için çeşitli katı, yarı katı ve sıvı besiyerleri bulunmaktadır. Katı besiyerlerinden olan NNN besiyeri; agar, tuz ve defibrine edilmiş tavşan kanından oluşmaktadır. Besiyerine ayrıca % 20 fetal dana serumu (FDS) ilave edilerek 5–14 günde promastigotların üremesi sağlanmıştır [54]. FDS kullanılan besiyerlerinde, *Leishmania* % 25 oranında daha fazla üremektedir. Besiyerindeki besinin hızla tükenmesi, hücre ölümüne neden olacağından, *Leishmania* kültürünün sık sık rutin pasajlarının yapılması gerekmektedir [119]. Schneider'ın besiyeri sıvı bir besiyeri olup birçok amino asit içermektedir. Bu besiyeri genelde serolojik ve biyokimyasal çalışmalar için kullanılmaktadır. Ayrıca belli oranlarda FDS eklenmesi ile promastigot kültüründe kullanılması uygundur [54]. Schneider'ın besiyeri, *Leishmania*'nın üremesini hızlandırmakta böylelikle kısa sürede yüksek parazit miktarlarına ulaşılabilir [115]. Daha çok tanı amaçlı kullanılan beyin-kalp infüzyonu eriyiği, NNN besiyerinden agarın çıkartılması ile hazırlanmakta ve kısa sürede bol miktarda *Leishmania* üretilmesini sağlamaktadır [116].

Ayrıca tampon olarak HEPES kullanılan ve genelde % 10–20 FDS eklenmesi ile uygun sonuç alınabilen Medium 199 ile *Leishmania* pasajı 2 haftaya kadar dayanabilmektedir [115]. Bunun yanı sıra RPMI (Media Designed at Roswell Park Memorial Institute) 1640 gibi besiyerlerine % 10 FDS eklenmesi ile rutin promastigot kültürü başarılı bir şekilde yapılmaktadır.

Biyokimyasal çalışmalarda, sıvı besiyeri önerilirken, izolasyon ve pasajlarda modifiye NNN besiyerleri önerilmektedir [54, 115]. Sıvı besiyerleri ile kültür yapılmasının birçok avantajı vardır. En önemlisi kapalı bir sıvı örnek içersinde birçok hareketli promastigot bir arada toplanıp çalışılabilir. Hastalık tanısı konulmasında, sıvı besiyerleri özellikle parazit sayısının yüksek olduğu örneklerde oldukça avantajlıdır. Ayrıca Allahverdiyev vd. tarafından Dünya’da ilk kez olarak daha hassas, daha spesifik, daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olan “Yeni Mikro Kültür Yöntemi” geliştirilmiştir. Bu yöntem ile klasik yöntemden farklı olarak hastalığın tanısı 15 gün-6 ay yerine en fazla 1-5 gün içinde konulabilmektedir [2, 6, 36, 51]. Bu yöntem Türkiye’de ve Dünya’nın çeşitli bölgelerinde uygulanmaktadır [52, 111, 113, 114]. Mikro kültür yöntemi olarak bilinen bu yöntemde sıvı besiyeri ortamında parazitlerin, mikroaerofilik bir ortamda, kısa sürede amastigot formdan promastigot forma dönüştüğü ve bu promastigotların hızlı bir şekilde çoğaldığı gösterilmiştir.

Deneyisel çalışmaya uygun besiyeri seçilerek, besiyerlerinin pH’sının 6.8–8 arasında olması gerekir. İnkübasyon ise genellikle 25–30°C arasında olmaktadır. Ancak promastigotların bazı durumlarda 38°C’ye de uyum sağlayabildikleri görülmüştür [115]. Makrofaj içinde yapılan amastigot kültürü için CO₂ etüvü gerekirken, promastigot kültüründe böyle bir gereksinim yoktur, sadece sıcaklığın ayarlanması yeterlidir. Rutin pasajlar, eski kültürden alınan 10⁵–10⁶ promastigotun, yeni besiyeri içine konulmasıyla yapılır. Bakteri kontaminasyonlarını önlemek için besiyeri içine penisilin, streptomisin veya gentamisin gibi antibiyotikler katılabilir [120]. Rutinde kullanılan bu antibiyotikler, promastigotların üremesini etkilememektedir. Ayrıca, *Leishmania* kültürlerindeki mantar kontaminasyonlarını önlemek amacıyla mikostatin ve amfoterisin B gibi antifungal bileşikler besiyerine eklenebilmektedir [54]. *Leishmania* kültüründe kontaminasyon oldukça önemli bir problemdir. Bu sebepten kültürün steril ortamda yapılması zorunludur [54, 121].

In vitro ortamda çoğalan tüm *Leishmania* promastigotlarının ortak özelliği; diğer organizmalarda olduğu gibi logaritmik üreme ve sabit faz dönemlerinin olmasıdır. Genellikle ilk inokülasyonda 10^5 - 10^6 hücre/ml olan parazitler, 3-4 günlük inkübasyonun ardından 10^7 - 10^8 hücre/ml'ye kadar çıkabilmektedir [119].

Rutinde, örnek sayısı çok olduğu zaman hücrelerin sayımında Coulter sayacı kullanılabilir. Ayrıca, *Leishmania*'nın mikroskopik incelenmesi invert mikroskopla yapılabilmektedir. Kültür süresince, kültürdeki promastigotlar sıkça pleomorfizm gösterirler. Birçok türde promastigotların eni 1.5-2 μ m, boyu ise 1-20 μ m arasında değişebilir [116]. Yuvarlak, oval, eliptik veya silindir şekilde olabilirler. Bazen de uç kısımları sivrilebilir veya yuvarlaklaşabilir. İyi hazırlanmış bir kültürde, kendiliğinden hareket edebilen ve bölünen hücrelerin olması gereklidir. Çok sayıda hareketsiz ve normalden büyük veya aşırı küçük atipik hücrelerin varlığı, kültür ortamının yetersizliğinin göstergesidir [115]. Primer izolasyonda önemli olan, en uygun besiyerine karar vermektir çünkü bazı *Leishmania* türleri ilk izolasyonun yapıldığı besiyerinin değiştirilmesine adapte olamazlar. Eğer, besiyerleri arasında karşılaştırma yapılmak isteniyorsa, ilk besiyerine uyum sağlandıktan sonra alınan örneğin, birden fazla farklı besiyerlerine ekilmesi gerekir. *Leishmania*'nın primer olarak izolasyonu sırasında % 10 FDS eklenmiş RPM1 1640 besiyeri kullanılabilir [70, 115, 116].

Promastigotların üretilmesi, amastigotlara oranla biraz daha kolaydır. Kamçısız amastigotlar, ancak memeli makrofaj hücrelerinde üremektedir. Amastigotların ısı tercihi de promastigotlardan farklı olup 32°C'dir. *Leishmania* türleri; hazır besiyerlerinde üretildikleri gibi, deney hayvanlarına inoküle edilerek de üretilebilirler. Deney hayvanları kullanılarak; *Leishmania*'ların vektörlerdeki yapısı, biyolojisi ve patolojisi deneysel olarak araştırılabilmektedir [54, 70, 115, 122]. Günümüzde de enfekte edilmiş deney hayvanları kullanılarak aksenik amastigotları elde etme çalışmaları devam etmektedir [123]. *Leishmania* türlerinin devamlılığı, yapılan promastigot ve amastigot kültürleri ile hayvanlara inokülasyonla ya da diğer memeli hücreleri veya protozoanlarda olduğu gibi sıvı azotta dondurup uzun süre saklayarak sağlanabilir [115, 122].

2.10.2.2.3 Klasik Kültür

Leishmania suşları besiyerlerinde promastigot formunda bulunurlar. Kültür amaçlı besiyerleri monofazik ya da difazik olabilirler. Birinci gruba örnek olarak Schneider'ın besiyeri, M199, Grace besiyeri; ikinci gruba örnek olarak ise NNN besiyeri, Tobies besiyeri gibi besiyerleri verilebilir. KL ve VL olgularından alınan örnekler geleneksel olarak % 20-% 30 tavşan kanı içeren NNN agar veya sıvı Schnedier'ın besiyeri ortamına inoküle edilir. Ayrıca, lezyonun bulunduğu bölgeden, lezyonu kanatmadan alınan materyal, RPMI modifikasyonları olan RPMI 1629, RPMI 1630, RPMI 1640 gibi çeşitli besiyerlerine ekim yapılarak amastigotların promastigotlara dönüşüp dönüşmediği kontrol edilerek yapılmaktadır [48, 61, 67]. Akut hasta örneklerinde N.N.N agar besiyerinde 20-30 gün içinde, RPMI ve Schneider'ın takviyeli besiyerinde ise daha az sürede üreme gerçekleşmektedir [6, 48, 67].

2.10.2.2.4 Mikro Kültür

Allahverdiyev ve ark. [51] tarafından geliştirilen yeni kültür yöntemi diğer yöntemlere göre daha hassas, daha spesifik, daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olmasıyla öne çıkmaktadır. MKY'nin temeli klasik kültürde olduğu gibi örnekteki amastigotun hareketli promastigota dönüşmesine ve mikroskop altında saptanmasına dayanmaktadır. MKY olarak bilinen bu yöntemde kapiler tüpte sıvı besiyeri kullanılarak, örnekte parazit sayısı az olsa bile sıvı kültürde çoğaltılmasının mümkün olduğu gösterilmiştir. Yöntemin duyarlılığının esas nedeni ortamın mikro olması ve parazitin salgıladığı üreme faktörü ile CO₂'nin mikro ortamı zenginleştirmesidir. Ayrıca dar ve uzun olan kapiler tüpte parazitin tespiti araştırmacı tarafından daha kolay saptanmaktadır. Mikroaerofilik bir ortam sağlanarak, kısa sürede amastigotların promastigotlara dönüştüğü ve bu promastigotların hızlı bir şekilde çoğaldığı da bilinmektedir [6, 51]. VL'den şüpheli hastalarda geleneksel kültür yöntemleri ile duyarlılık kemik iliğinde % 37.5–100 ve periferik kanda da % 0–100 olurken, MKY ile ise duyarlılık kemik iliğinde % 100 ve periferik kanda % 77.8–100 olarak belirlenmiştir. Ayrıca örnekteki parazit yoğunluğuna göre promastigot tespitinin MKY'de geleneksel kültür yöntemlerinden daha kısa sürede olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.4) [6].

Çizelge 2. 4 Farklı besiyerleri kullanılarak VL'den şüpheli hastaların kemik iliğinden alınan örneklerde kültür yöntemlerinin duyarlılığının karşılaştırılması

Besiyeri	Kültür-pozitif olgularda her grubun pozitifliğinin (%) oranı ve pozitifliğin görüldüğü zaman (günler)					
	Grup I		Grup II		Grup III	
	TCM	MCM	TCM	MCM	TCM	MCM
SDM + 15% FBS	8/8 (100%) 4-6*	8/8 (100%) 1-2	5/9 (55.6%) 7-20	9/9 (100%) 2-4	3/8 (37.5%) 15-24	8/8 (100%) 3-5
RPMI-1640 + 15% FBS	6/8 (75%) 7-12	8/8 (100%) 1-2	4/9 (44.4%) 7-25	5/5 (100%) 2-5	3/8 (37.5%) 15-30	8/8 (100%) 3-5
Medium 199 + 15% FBS	5/8 (62.3%) 7-25	8/8 (100%) 2-4	2/9 (22.2%) 7-35	9/9 (100%) 4-6	2/8 (25%) 15-35	8/8 (100%) 3-7
NNN-agar + SDM + 15% DRB	8/8 (100%) 3-7	–	7/9 (77.7%) 7-15	–	5/8 (62.5%) 15-25	–
NNN-agar + RPMI-1640 + 15% DRB	7/8 (87.5%) 4-10	–	6/9 (66.7%) 7-20	–	4/8 (50.0%) 15-25	–
NNN-agar + 199 + 15% DRB	6/8 (75%) 7-25	–	4/9 (44.4%) 10-30	–	4/8 (50.0%) 15-35	–

TCM, geleneksel kültür metodu; MCM, mikro kültür metodu; BMs, kemik iliği örnekleri; SDM, Schneider'in Drosophila besiyeri; FBS, fetal dana serumu; DRB defibrine tavşan kanı. Grup I yayma pozitif (2+,3+ derecesinde); Grup II yayma pozitif (1+ derecesinde); Grup III yayma negatif (0 derecesinde).

* Kültürün pozitifleşme süresi (gün)

KL'den şüpheli hastalarda da geleneksel kültür yöntemleri ile 15-30 günde % 20-40 pozitiflik görülürken mikro kültür yöntemi ile 1-5 günde % 83-97 pozitiflik bulunmuştur [51]. Azerbaycan'da yapılmış bir çalışmada VL'den şüpheli 19 hasta incelenmiş ve yöntemlerin duyarlılığı MKY ile % 94.74, NNN agar ile % 31.58, IFAT ile % 42.11-47.37, ICT ile % 73.68, yayma ile % 36.84 ve PCR % 57.89 olarak belirlenmiştir [124].

Yapılan çalışmalar ile MKY'nin semptomatik leishmaniasis tanısında diğer yöntemlere nazaran oldukça yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve Türkiye ile dünyanın diğer bölgelerinde de leishmaniasisten şüpheli hastalarda uygulandığı bilinmektedir [52, 113, 114, 124, 125].

MKY'nin en büyük avantajı klasik kültür yöntemlerinden farklı olarak duyarlılığın örnekteki parazit sayısına bağlı olmaması bunun yanı sıra en önemlisi invaziv yöntem gerektirmemesi ve periferik kandan üretilmesinin mümkün olmasıdır. Ayrıca yöntem basit ve endemik bölgelerde tanı için kullanıma uygundur. Klasik kültür yöntemlerine göre duyarlılığı ve spesifitesi daha yüksek olan mikro kültür, az miktarda besiyeri kullanılması ve inkübasyon periyodunun 1-5 günde tamamlanması nedeniyle hem maliyet hem de zaman açısından da avantajlı bir tekniktir [6, 51, 54, 70].

2.10.2.2.5 In vivo Kültür

Parazit laboratuvar hayvanlarına aşılama yapılmasının ardından, enfekte olmuş örneklerle gösterilebilir. Hayvan aşılması pozitif sonuçlar alınana kadar birkaç ay gerektirdiğinden, genellikle tanı testi olarak kullanılmaz. Parazit izolasyonu için

alternatif bir yöntem olmakla birlikte hayvan gereksinimi ve bakımıyla ilgili zorluklar ve ayrıca alternatif tanı yöntemlerinin gelişmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Gerek *in vitro* kültür gerekse *in vivo* kültür sonucunda elde edilen promastigotlar, parazitin biyolojisinin araştırılması ve genotiplerinin saptanması amacıyla kullanılmaktadır. BALB/c farelerin ve hamsterların *Leishmania* türleriyle enfeksiyona duyarlı oldukları belirlenmiştir. Mikroskobik yöntemlere göre tanıda duyarlılığı yüksek bulunmakla birlikte örneğin hamsterlar kullanıldığında tanıda ortalama süre 34.5 gün olarak belirlenmiştir. BALB/c fareler kullanıldığında ise bu sürenin kısaldığı belirtilmiştir [126]. Altın hamster en uygun hayvandır ve *Leishmania* suşlarının çoğunluğunda duyarlıdır. Periton kesesi içinde yapılan aşı çoğunlukla *L. donovani* ve *L. infantum* suşları için yeterlidir [32]. Altın hamster *L. donovani* kompleksini korumak için iyi bir hayvan seçimidir. Mukoz membranlardan geçişi de içeren, enfekte etmek için birçok yol vardır fakat periton içi ya da dalak içi rota tercih edilir. Amastigotlar da promastigotlar da hayvanı enfekte edebilir. Aşılamadan sonra, hayvan, haftalık olarak kutanöz lezyonlar, karaciğer ve dalak büyümesi ya da metastatik lezyonlar gibi enfeksiyon belirtilerini görmek için tetkik edilir. Amastigotlar anestezi altındaki hayvanda biyopsi ile dalak ve karaciğerden toplanabilir ve bu işlem prosedürün devamı için enfektif parazitlerin kaynağının yaşamasına izin verir. Açık olarak enfeksiyon belirtisi görülmediğinde hayvan 4 ay sonra öldürülür, bu noktada parazit için karaciğer ve dalak örnekleri toplanır [28].

2.10.2.2.6 Kriyoprezervasyon

Hücrelerin istenildiği zaman bulunamaması ve bundan dolayı kullanılamamasına bağlı problemler, pratik olarak kolay yapılabilen *in vitro* üretilen kültür hücrelerinin dondurularak saklanması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. *Leishmania* kültürünün uzun yıllar saklanması ve çalışmalar için gerekli durumlarda tekrar *Leishmania* kültürü elde edilebilmesi için -196°C'deki sıvı azotta dondurularak saklanması, kriyoprezervasyonu mümkündür. Günümüzde *Leishmania* türleri için kriyoprezervasyon etkin olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin dondurulmaları ve çözölmeleri esnasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluştuğu ve bu kristallerin hücreyi parçalamasının yanı sıra oluşan osmotik basıncın hücreler üzerinde öldürücü etkisi olduğu bilinmektedir. Dimetil

sülfoksit (DMSO) ve gliserol gibi kriyoprotektan maddelerin kullanılmasıyla birlikte uygun bir dondurma ve çözme metodunun izlenmesi hücrelerde meydana gelebilecek hasarı en aza indirmektedir [127-129]. Kriyoprotektan maddeler dondurma ve çözme işlemleri sırasında suyu bağlayarak hücre içerisindeki elektrolit miktarını ve hücre içi buz oluşum noktasını baskılayarak mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azaltır [130]. Ayrıca hücre membranını stabilize eder ve hiperozmotik çevre oluşturarak hücrenin su kaybetmesini sağlar. DMSO hücre dışına ve hücre içine oldukça hızlı bir şekilde diffüze olabilmektedir. Bu özellik hücre prezervasyonu için oldukça önemlidir. Bu sayede dondurma işlemleri sırasında hücre hasarına neden olabilecek osmotik şok en aza indirilmektedir [131]. Kriyoprezervasyon sırasında dikkat edilecek hususlar dondurulacak örneklerin sıvı azot içinde saklanmaya uygun kriyotüplere konması ve sıkı kapatılmasıdır. Dondurulacak olan hücreler kriyoprotektan maddelerle birlikte kriyotüplere alınır, kademeli olarak soğutularak dondurulur ve azot tanklarında uzun süre saklanabilirler [132].

2.10.2.3 Serolojik Yöntemler

Aktif leishmaniasis tanısında antijen ve özellikle antikor tespitine yönelik testler önem taşımakta olup, antijen düzeylerinin parazit yüküyle paralellik gösterdiği düşünüldüğünde antikor yanıtı zayıf olan immün yetmezlikli hastalarda antijen tespiti antikor temelli serolojik testlere göre daha hassas olmaktadır. Örneğin AIDS hastalarında olduğu gibi yetersiz antikor üretimi yapılması durumunda hastalığın tanısı için bu metot gereklidir. Ayrıca son yıllarda geliştirilen lateks aglütinasyon testi ile VL olgularının idrar örneklerinde leishmanial antijenler belirlenebildiği görülmüştür [133]. Antijen tespitine dayalı testlerin duyarlılığının % 68-% 100, özgüllüğünün ise % 100 olduğu bildirilmiştir [134]. Antijen enfeksiyon sırasında erken tespit edilmekte ve ancak kemoterapi sonrasında tespit edilen antijen sayısındaki azalma hayvan deneyleri ile de belirlenmiştir [28].

Ancak birçok serolojik yöntem antikorların tespit edilmesi temeline dayanmaktadır. Testlerde kullanılan antikorun spesifikliği antijene ya da epitopa bağlıdır, parazit gibi gruba, cinse ve türe özel antikorların üretimini uyarır. Bu nedenle hassasiyet teste ve yöntemine bağlıdır fakat spesifiklik, serolojik prosedürlerde kullanılanlara oranla daha

çok antijene bağımlıdır. Birçok serolojik testte hassasiyet ve spesifiklik bilgileri farklı dokularda gösterilerek karşılaştırılır. Spesifik olmayan immünoglobulinleri tespit etmek için; Napier'in formol jel ya da aldehit testi ve Chopra antimon testi gibi bazı testler vardır. Globulin seviyesi yükselmesine bağlı olan bu testlerde, sonuçlar konakta pozitif olabilir. Spesifiklik yoksunluğu, bunun yanında hassasiyet değişkenliği bunları güvenilir hale getirmektedir. Daha hassas ve daha spesifik birçok immünoagnostik yöntem geliştirilmiştir. Bunlar spesifik durumları tanımlamak için yararlı yöntemlerdir ve toplum denetimi için kullanılabilir. İnsan vücudu VL'ye karşı, herhangi bir hastalığa cevap olarak bulunan, birbirinden farklı yüksek seviyeli antikorlar üreterek karşı koymaya çalışır. Bu, B hücrelerinin poliklonal aktivasyonlarından dolayı spesifik olmayan proteinlere ve haptenlere karşı serumda immünoglobulin G (IgG) ve immünoglobulin M (IgM) seviyelerindeki artışın işaretlenmesi ile sonuçlanır. Parazit antijenlerine karşı antikorların yüksek seviyelerde tutarlılıkları durumunda VL tanısı daha basitleşebilir.

Leishmaniasis tanısında jel difüzyon, dolaylı (indirek) hemaglutinasyon testi (IHA), IFAT, ELISA, DAT, ICT, kompleman fiksasyon, karşı akımlı immünoelektroforezi ve WB analizi gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır. Ancak laboratuvarlarda pratik uygulamalardaki zorluklar bir yana bu testlerin çoğunda hassasiyet ve spesifiklik sınırlayıcı faktörlerdir. Özellikle VL olgularındaki antikor yanıtını belirlemek amacıyla kullanılan IHA, immünoelektroforez, immüno difüzyon gibi testler günümüzde zahmetli olmaları ile düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları nedeniyle tercih edilmemektedir [48, 49].

Ayrıca serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için de tanıda serolojik test çok fazla tercih edilmemektedir. LDT hücresel bağışıklığı göstermekte, lezyon kabuklanmaya başlar başlamaz pozitif olmakta ve öyle kalmaktadır. Ancak bu testler eski ve yeni enfeksiyonu ayırt edememektedir. İmmünitesi baskılanmış kişilerde güvenli olmamakla birlikte diğer patojenlerle çapraz reaksiyonlar da verebilmektedirler [48, 135].

Ayrıca serolojik yöntemler semptomatik hastalarda yüksek spesifiklik ve duyarlılık göstermesine rağmen, asemptomatik insan ve hayvanlarda oldukça düşük duyarlılığa sahip olmaları ve donör kanlarında antikor titresinin düşük olması nedeniyle çok fazla

tercih edilmemektedir [48, 135, 136]. Bu testlerin yerine duyarlılığı yüksek, kolay uygulanabilen, çok sayıda örneğin çalışılmasına imkan veren, hızlı testler geliştirilmekte ve yenilerinin araştırılmasına da devam edilmektedir.

2.10.2.3.1 İmmüno Floresan Antikor Testi (IFAT)

Fikse edilmiş promastigotlara karşı oluşan anti-*Leishmania* antikorlarını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle VL olgularının tanısında yararlanılmaktadır. Enfeksiyonun erken dönemlerinde antikorlar belirlenmekte ve tedavi sonrasında 6-9. aylarda ise antikor belirlenmemesi şeklinde tanıda kullanılmaktadır. IFA testi değişen özelliklidir ve çapraz tepkimeler genellikle Sıtma, *T. cruzi* enfeksiyonunda, Afrika trypanosomiasisinde ve bazı akciğer tüberküloz hastalıklarında görülür [137].

IFAT için antijenler amastigotlardan ya da kültürde gelişmiş promastigotlardan hazırlanabilir. Promastigot antijen; direk kullanım ya da dondurularak kurutulmuş preparatların yeniden yapılanmasıyla kullanılarak, kültürden elde edilebilir. *T. cruzi* 'nin trypanomastigotları ve diğer organizmaların epimastigotlarının da kullanılabilmesine rağmen *Leishmania* promastigotları bazı hastalıklarda daha yüksek titre verebilir [32, 137] Amastigot antijen ise; iyi antijenlerdir ve daha genel kullanıma sahiptir. Amastigotlar promastigotların 34°C'ye yükseltilmesi ile kültüründen elde edilebilirler [32].

Antikor titresinin 1:20 saptanması önemli kabul edilirken, 1:128 ise tanısaldır. Kuvvetli pozitif hastalarda testin pozitifliğinin 1/800 dilüsyonun üzerinde olduğu bulunmuştur. Leishmaniasis tanısında, zayıf pozitif hastalarda IFAT sonuçlarının diğer serolojik yöntemlerle desteklenmesi önerilmektedir [55, 64, 135, 138]. IFAT için antijenler amastigotlardan ya da promastigotların kültürde gelişmişlerinden hazırlanabilir [32]. Antijenli lamalar oda ısısında kurutulduktan sonra -20°C de uzun süre saklanabilmektedir.

IFAT ile *Leishmania* parazitleri tarafından enfekte edilen insanlarda antikorların oluşmaya başladığı tarihi belirlemenin zor olduğu, ancak tedaviden sonra antikor seviyesinin ilk iki ay içinde 1/100 seviyesine düştüğü ve bu düzeyde bir yıldan fazla varlığını koruduğu bildirilmektedir. IFA testinin duyarlılığı ve özgüllüğü % 100 olarak bildirilmiştir [55, 64, 135, 138].

2.10.2.3.2 Enzim bağlanan İmmünosorbent Testi (ELISA)

ELISA yöntemi VL tanısında serolojik yöntemler arasında duyarlılığı en yüksek test olarak kabul edilmektedir. Özellikle saha çalışmalarında ve laboratuvar uygulamalarında çok sayıda örneğin kısa zaman diliminde taranabilmesine olanak tanınması büyük yarar sağlamaktadır. ELISA yönteminde tüm stoplazmik antijen, fukozmannoz, sentetik peptidler, rekombinant proteinler gibi farklı antijenler kullanılabilir. Duyarlılığı oldukça yüksek olan bu yöntemin, özgünlüğü tamamen kullanılan antijenin iyi şekilde hazırlanıp hazırlanmadığına bağlıdır. Antijen genellikle fosfat tamponundaki (PBS) promastigotların süspansiyonu tekrarlanan dondurma ve çözme (dört ya da altı kez), ardından 10.000 – 20.000 g ile soğuk santrifüjleme işlemleriyle hazırlanır. Supernatant çözülebilir antijen olarak kullanılır ve protein içerikleri (100 – 5000 ng/ml) hesaplanarak ELISA platelerini kaplamak için kullanılır [28]. Promastigot ve amastigotlardan elde edilen eriyik antijenlerden başka son yıllarda daha spesifik olan rekombinant leishmanial (rK39, gp63, gp70–2, dp72) antijenler kullanılmaktadır [48, 49, 55, 56, 61, 139]. Rekombinant antijenlerden rK39 üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olup *L. donovani* kompleks türlerinin neden olduğu VL olgularında spesifik antikor oluşumu gösterilmiştir. AIDS gibi immün yetmezlikli hasta gruplarında gelişen VL’de de rK39 ELISA tanıda yüksek duyarlılığa sahiptir. Dot ELISA yönteminde bu antijenlerle VL şüpheli kişilerde % 84 ile % 100 oranında antikor cevabı alınmış ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [49, 55, 56, 61, 64, 140]. Fakat trypanosomiasis, tüberküloz ve sıtma hastalarının serumlarıyla çapraz reaksiyonlar olduğu da gözlenmiştir [28].

İlk kez. *L. chagasi* parazitlerinden elde edilmiş olan rK39 adı verilen ve *L. donovani* kompleksine ait tüm türlerin neden olduğu VL’li hastaların serumlarında antikor yanıtı oluşturduğu gözlenen rekombinant bir antijen, hastalığın akut evresi daha başlarken bile olumlu yanıt vermektedir [28, 109]. Bu antijen kullanılarak VL’li ve immün sistemi baskılanmamış hastalarda yüksek antikor düzeyleri gösterilmiştir. Bu antijen ile gerçekleştirilen ELISA sonuçları % 100 duyarlı ve özgün bulunmuştur [28, 141]. Anti-rK39 antikorlarının titreleri doğrudan hastalığın ne kadar aktif olduğuyla ilişkili olduğundan VL hastalarının tedaviye verdikleri yanıtı değerlendirmek açısından da önemlidir. Hasta kişilerin rK39 antijenine verdikleri antikor yanıtının titreleri, eriyik

antijene verdikleri titre yanıtından 59 kat daha güçlü bulunmuş, tedavi sonrasında görülen düşüşün de çok daha keskin olduğu belirlenmiştir [28, 60, 141].

2.10.2.3.3 İmmünokromatografik Test (ICT)

Endemik bölgelerde saha koşullarında ileri teknoloji gerektiren ve uygulanması karmaşık testler kullanılamayacağı için, hızlı, ucuz, uygulanışı basit ve herhangi bir uzmanlık gerektirmeyecek testlere daima ihtiyaç vardır. Bu nedenle rK39 ve rKE16 gibi rekombinant antijenler kullanılarak membran filtrasyon teknolojisi ile ticari hızlı testler kullanıma sunulmuştur [142]. rK39 antijeni temelli kullanıma hazır immünokromatografik bant testi hızlı bir test olarak zor durumlarda kullanılmak için geliştirilmiştir. Rekombinant antijen dikdörtgen bir nitroselüloz membran parçasına bant formunda immobilize edilir ve keçi anti-protein A membran üzerindeki antijen bantına tutturulur. Farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda bu testin hassasiyeti ve spesifikiğinde farklılıklar gözlemlenmiştir. Saha koşullarında son derece kolay kullanılabilecek bu “immünokromatografik strip test”, VL hastalarını içeren ilk geniş kapsamlı saha çalışmasında % 100 duyarlı ve % 98 özgün bulunmuştur [143]. Bunun ardından Hindistan ve çevresinde yapılan çalışmalarda da benzer değerler bulunmuştur [28, 143, 144]. Ancak Sudan’da yapılan bir çalışmada duyarlılık % 67 [28, 60], Güney Avrupa’da yapılan bir çalışmada % 71,4 olarak bulunmuştur [145, 146]. Bu farklılıkların nedeni farklı etnik grupların verebileceği farklı immün yanıtlara bağlanmıştır. Özgünlük açısından değerlendirildiğinde ise % 97–100 arasında rakamlar elde edilmiştir [147]. Ancak bazı sağlıklı endemik bölgelerdeki kontrollerde de (% 12.5) pozitif test edilmiştir. Bazı reaksiyonların yanlış pozitif olması ihtimali göz önünde bulundurulurken, bunlar muhtemelen belirti göstermeyen enfeksiyonları ifade etmektedir. Bu yöntemdeki diğer bir engel, başka bir hastalıktan kaynaklanan (sıtma, tifo ya da tüberküloz) VL ile benzer klinik özelliklere sahip olması nedeniyle bireyde rK39 bant testinin pozitif çıkmasıdır. Buna rağmen rK39 immünokromatografik bant testinin akut enfeksiyonların tahmin edilmesi için kullanılabilir olması kanıtlanmıştır [28]. Bütün bu çalışmalar rK39 immünokromatografik strip testi, VL tanısını saha koşullarında ve tarama çalışmaları açısından; üstelik de herhangi bir eğitim gerektirmediği ve çok ucuz olduğu için son

derece kullanışlı olduğunu göstermiştir [147]. Ancak kan bankalarında kullanımının uygun olmadığı da ticari kitlerde uyarı olarak belirtilmektedir.

2.10.2.3.4 Direk Aglütinasyon Testi (DAT)

Yüksek duyarlılık (% 91-% 100) ve özgüllüğe (% 72-% 100) sahip olan DAT, ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle özellikle saha çalışmalarında ve rutin laboratuvarlarda tercih edilmektedir. Hasta serumundaki antikorların işaretli promastigotlarla plak kuyucuğunda aglütinasyon (çökme) oluşturması temeline dayanır [60, 109, 148]. Bu yöntemde tüm boyanmış promastigotlar ya süspansiyon olarak ya da donmuş-kuru formda kullanılmaktadır. Donmuş-kuru formun ısı stabil olması saha çalışmalarında kullanımına olanak vermektedir. Bununla birlikte 18 saatlik inkübasyon gereksinimi, kan veya serumun seri dilüsyonlarının yapılması kullanım zorluklarını oluşturmaktadır. Aynı zamanda tedavi sonrasında yıllarca antikor titresini saptaması nedeniyle tedavi takibi amacıyla kullanılamamaktadır [149].

1988 yılında, VL’de oldukça kullanışlı olduğu belirtilen modifiye bir DAT kullanılmış; daha stabil olduğu bildirilen ve dondurulup liyofilize edilerek hazırlanan antijen sayesinde, bir çok ülkede endemik takip amacıyla yararlı bulunarak saha çalışmalarında uygulanmaya başlamıştır [150]. DAT’ın birçok avantajı bulunmakla birlikte, tedavi sonrasında tam iyileşme durumunda bile uzun süre serumdaki antikorları göstermeye devam etmektedir [60, 109, 150]. Schoone ve ark. [151] tarafından geliştirilen fast agglutination-screening testi (FAST) anti-*Leishmania* antikorlarının serumda ya da filtre kağıdına emdirilmiş kanda kısa sürede belirlenmesine olanak tanımaktadır. Aynı zamanda FAST ile tek serum dilüsyonunda kalitatif sonuç elde edilmektedir. Duyarlılığı ve özgüllüğü DAT yönteminden daha yüksek bulunmuştur [152].

2.10.2.3.5 Komplement Fiksasyon Testi

Antijenler, amastigotların ultrasonik titreşimler ile fragmentlere ayrılmasıyla hazırlanır fakat promastigotların bir polisakkarit parçası negatif reaksiyon verir [153]. 1/10 tireleri ya da daha fazlası önemlidir ve enfeksiyonda erken gelişir, tedaviden sonra hızlıca düşer ve genellikle 6 ay içinde görülmez, ama devamlı titreler gizli ve geçmiş enfeksiyonları saptamakta seroepidemiolojik tetkiklerde kullanılır [154].

Çapraz reaksiyonlar *T. cruzi* enfeksiyonuyla oluşur ve ara sıra tüberküloz hastalıklarında ortaya çıkar. Komplement fiske antikorlar VL'de (*L. donovani*) ve KL espundia'da (*L. braziliensis*) bulunur ve klinik tanılarda ve hastalıkları görüntülemeye kullanılır. Komplement fiske antikorlar, VL için seroepidemiolojik tetkiklerde kullanılır [32, 154]. Ancak erken pozitifleşen bir antikor testidir ve yalancı pozitiflik görülebilir [64].

2.10.2.3.6 Indirek (Dolaylı) Hemaglutinasyon Testi (IHA)

VL ve post kala-azar dermal leishmaniasisin tanısında kullanılan bu yöntemde antijenler promastigotların gelişmiş kültürlerinden hazırlanır. 1/200 titresi ciddi olarak dikkate alınmalıdır [32, 155, 156].

2.10.2.3.7 Western Blotting (WB)

Western blotting ya da immüno-blotting adı verilen bu immünokimyasal yöntem bir membran üzerine sabitleştirilmiş proteinleri tanımlamada kullanılmaktadır. Bu transfer yöntemi "blotting-blotlama" diye adlandırılır, çünkü elektroforez ile jel içinde ayrıştırılan proteinlerin transfer edildikleri nitroselüloz membran ya da polivinilidin diflorür (PVDF) üzerindeki bant örnekleri, orijinal jel üzerindeki örneklerin tam anlamıyla kopyasıdır. Proteinlerin membranlara transferi de "Western blotting", DNA izolasyonu için kullanılan yöntem "Southern blotting", RNA izolasyonu için kullanılan yöntem ise "Northern blotting" olarak isimlendirilmiştir [157]. Spesifik antikorların varlığının tespit edilmesinde sık kullanılan bir teknik olan Western blotting yöntemi iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Birinci aşaması olan SDS-PAGE ile elektroforeze tabi tutulan proteinler transfere hazır hale gelirler. Bu aşamadan sonra uygulanacak olan western blotting yönteminin ana hatlarını önce seperasyona tabi tutulan proteinlerin nitroselüloza transfer edilmesi ve non-spesifik bağlanmayı önlemek için membran üzerindeki protein bağlanma kısmının bloke edilmesidir. Bundan sonraki işlem transfer edilmiş ilgili proteine spesifik antikorun bağlanması ve birinci antikora, enzim işaretli ikinci antikorun bağlanması son olarak enzim bağlı kompleksin membrana uygun enzim-substrat solüsyonu uygulanarak gösterilmesi şeklindedir.

Serumlarda *Leishmania* antikor varlığının tespiti için ise öncelikle *Leishmania* parazitlerinin promastigot formlarının logaritmik faza gelişmesi sağlanır. Bu

parazitlerden eriyik antijen hazırlanır. Protein içeren eriyik *Leishmania* antijeni sodyum dodesil sülfat-poliakrilamide jel elektroforezinde (SDS-PAGE) koşturulur. Ayrılan proteinler nitroselüloz bir membranda elektroblotting ile geçirilir ve bakılacak serumlar ile problanır. ELISA da olduğu gibi spesifik antijenler kullanılabilir. VL hastalarının serumları 12-120 kD arasında moleküler ağırlıktaki birçok antijeni kapsamaktadır. 14-16 kD antijenleri leishmaniasis için en yüksek hassasiyeti göstermektedirler. Aynı durum AIDS'li hastalarda da geçerli sayılmaktadır. Bazı vakalarda 14 kD bantı bulunmasa da 16 kD'luk bant mutlaka saptanmaktadır. Endemik bölgelerdeki VL hastalarının tanımlanmasında 14-16, 22, 24 kD antijenlerine karşı antikorlar kullanılırken, epidemiyolojik çalışmalarda 14 kD ve 16 kD antijenlerine karşı antikor taramanın değerli bir tanı aracı olduğu belirtilmektedir. Western blotting tekniği kullanılarak çeşitli organizmalar arasındaki minör antijenik farklılıklar bulunur ve bu sayede çapraz reaktif antijenler tespit edilir. Ancak uygulaması zor bir yöntemdir. Ayrıca, bu proses zaman kaybına sebep olur, teknik olarak kullanışsız ve pahalıdır [15, 28, 158].

2.10.2.3.8 Leishmanin Deri Testi (LDT)

Montenegro reaksiyonu olarak da bilinen Leishmanin deri testi leishmaniasisin kutanöz formu için gecikmiş tip hipersensitivite (DTH) reaksiyonu ile belirlenebilmektedir. LDT spesifik leishmaniasiste DTH için uygulanan bir testtir fakat sınırlı bir işlevi vardır. Bu yöntemde tüm parazitleri (5×10^7 promastigot) öldürecek 0.5 ml fenol hastanın dirsekle bilek arasındaki kısmına enjekte edilir. 48-72 saat sonra katılaşmanın büyüklüğü ölçülür ve kontrol amacıyla diğer koldaki dirsekle bilek arasına enjekte edilen fenol tamponun oluşturduğu katılaşmayla karşılaştırma yapılır. Halen LDT'ye ait standardize edilmiş bir ayraç yoktur. DTH olmadığı durumda VL'nin akut belirtilerinde test negatiftir ve sadece kala-azar tedavisinde belirtiler pozitifdir [28]. Daha çok insan ve hayvan popülasyonlarında KL ile MKL ve tedavi edilmiş VL prevalansının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Çok sayıda serolojik test bulunmasına rağmen, zayıf humoral yanıt nedeniyle düşük düzeyde antikor üretimiyle karakterize KL ve MKL tanısında serolojik yöntemler yardımcı olamamaktadır [159]. Leishmanin deri testi leishmaniasisin geçmiş

enfeksiyon ölçümlerini ve VL ile KL epidemiyolojisini çalışmak için yaygın olarak kullanılır [32].

2.10.2.4 Moleküler Yöntemler

Leishmaniasisin tanısında kullanılan serolojik yöntemler, daha önce parazitle karşılaşılıp karşılaşılmadığına yardımcı, duyarlı ve özgüdür. Ancak, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli değildir. Eski ve yeni olguları tam olarak ayıramayabilir. Diğer patojenlerle çapraz reaksiyonlar olabilir. Moleküler tekniklerde parazitin az miktarda veya atipik morfolojide bulunması, kültür yöntemindeki kontaminasyon riski gibi nedenlerle örneklerde, genellikle *Leishmania* parazitlerinin saptanmasında güçlükler olabilmektedir. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Yine de, örnekten birkaç farklı inceleme yapılmasına olanak sağladığından *Leishmania* türlerinin saptanması ve tanımlanması için genellikle her parazitte birçok kopyası bulunan "maksisirküler" ve "minisirküler" kinetoplast DNA'sı (kDNA) hedef seçilmektedir [15, 59, 160, 161]. 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 tür tayini tespit edilmektedir. *Leishmania* türlerini tiplendirmek için kullanılan metodlar multipleks PCR, nested-PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA, single-strand konformasyon polimorfizmi, kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizi kullanılmaktadır. DNA'ya dayalı bu genotipik moleküler teknikler diğer tanı yöntemlerine oranla daha güvenilir ve spesifiktir. Bu yöntemler çok hassas oldukları halde (50 – 100 kadar parazit tespiti), hibridizasyonun karmaşık olan prosesi rutin uygulamalarda potansiyellerinin kullanılmasına engel olmaktadır [28, 59].

2.10.2.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR'ın gelişimi leishmaniasis tanısında kullanılan moleküler biyoloji teknikleri uygulamalarda yüksek verime yaklaşılmalarını sağlamaktadır. Tür seviyesi tanımlaması farklı *Leishmania* türlerinin minisirküler kDNA'larında korumalı bölgelerden primer seçimi ile amplifiye minisirküler kDNA'larının analizi ile yapılabilir. Çünkü kinetoplastın

binlerce minisirküler DNA kopyasını yapabildiği bilinmektedir. Sudan’da yapılan bir çalışmaya göre PCR, lenf düğümleri ve kemik iliği aspirasyonunda *Leishmania* paraziti tespiti için yapılan mikroskopiden daha hassas bulunmuştur. Ancak kandan yapılan *Leishmania* DNA’sı ile akut VL vakalarının % 70’inin tespitinin yapılabildiği parazitolojik olarak kanıtlanmıştır. Hindistan’da *L. donovani* için türe özgü primer kullanılarak yapılan başka bir çalışmanın sonucuna göre de VL hastalarından alınan tam-kan ile yapılan PCR hassasiyeti % 96 tespit edilmiştir. Bununla birlikte *Leishmania* tespitinde buffy coat preparatları kullanılarak yapılan PCR çalışması tam-kan preparatlarıyla yapılandan 10 kat daha hassastır. PCR’ın, VL hastalığında başarı değerlendirmesinde önemli bir araç olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan parazit canlı olmadığı halde PCR sonucu hastalarda pozitif olarak gözlenebilir ve bu nedenle hatalı sonuçlara sebep olabilir [28].

2.10.2.4.2 Kesilmiş Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Özel restriksiyon enzimleri (RE) kullanılarak çeşitli organizmaların DNA’larının kesilmesi sonucunda, türlere ve hatta bazen suşlara özgü farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşması ile karakterize DNA modellerinin elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. RE’ler DNA’yı 4–6 bp’lik özel tanıma bölgelerinden keserler. Daha sonra da ortaya çıkan DNA parçalarının uzunlukları, jel elektroforezi yoluyla görüntülenir [60]. RFLP analiz yöntemi ile tüm DNA zinciri hedef alınarak kullanılmasının yanı sıra, bir DNA dizisi hedef alınarak, PCR yöntemiyle çoğaltılıp, elde milyonlarca kopyası bulunan bu diziye RE ile keserek daha keskin bantlar elde etmek mümkündür. Özellikle tür düzeyinde tanı koyabilmek amacıyla bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Uygulama sırasında, önce DNA bölgelerinden birisi PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılır. Sonra bir ya da birden fazla RE kullanılarak, çoğaltılan hedef DNA optimum koşullarda parçalara ayrılır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi ile bu parçaların uzunluklarına göre ayrılması sağlanır. Benzerlik ve farklılıklar, yakınlık ve uzaklıklar elde edilen modellerin birbirleriyle karşılaştırması ile yapılır. Hem *Trypanosoma* hem de *Leishmania* türlerinde önemli minisirküler sınıflarının PCR uygulanmadan yapılan direkt RFLP 20 yıldan uzun bir süredir güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır [162]. Bir mikroorganizma için kullanılacak olan PCR–RFLP yönteminin duyarlılığı, öncelikle PCR’da hedef olarak

seçilen gen ya da DNA bölgesinin tekrar sayısına ve ne kadar az polimorfizm gösterdiğine; ardından da PCR ürünlerinin kesimi için kullanılacak olan RE'nin diziye olan özgünlüğüne bağlıdır. Duyarlılığı artırmanın en sık kullanılan bir başka yolu da, bir DNA bölgesini hedefleyerek çoğalttıktan sonra, ilk PCR ürününün içinde yer alan daha özgün bir dizi hedefleyen ve ilkinden farklı primerler kullanan ikinci bir PCR uygulayarak çok daha özgün bir DNA bölgesini elde etmektir. Bu yöntem "nested PCR" denir. Eğer hedef DNA bölgesi başka organizmalarda da varsa özgünlüğü daha düşük olacaktır. Ancak tanı amacıyla popüler olarak kullanılan PCR bölgeleri tür ya da suş ayrımı için yeterince iyi olmayabilir [60, 160, 163, 164].

2.10.2.5 Leishmaniasisin tanısında kullanılan yöntemlerin özet değerlendirmesi

Literatür değerlendirilmesinden görüldüğü gibi leishmaniasis tanısında özellikle laboratuvar tanı yöntemleri önem taşımaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılığı özellikle semptomatik VL'de daha yüksek olmaktadır. Bunun nedeni ise bu hastalardan elde edilen örneklerin invaziv yolla (dalak, karaciğer, kemik iliği) elde edilmesidir. VL tanısında invaziv yöntemler kullanılmasının esas nedeni ise periferik kanda parazit sayısının oldukça az olması ve kullanılan yöntemlerin (mikroskopik, kültür, serolojik ve moleküler) duyarlılıklarının ise incelenen örnekteki parazit miktarına bağlı olmasıdır. Serolojik yöntemler VL tanısında yüksek duyarlılık gösterse de eski ve yeni enfeksiyonu ayırt edemez ve diğer patojenlerle çapraz reaksiyonlar verirler [48, 135]. Ancak VL'in büyük bir kısmını % 80-95 asemptomatik leishmaniasis oluşturmaktadır [8, 9]. Semptomatik leishmaniasisten farklı olarak asemptomatik leishmaniasiste hiç bir klinik belirti olmadığından dolayı invaziv yöntemler kullanılmamaktadır. Ayrıca invaziv yöntemler oldukça zor olup bazen hasta açısından hayati tehlikelere neden olmaktadır. Bazen de tekrarı yapılamamaktadır. İnvaziv olmayan serolojik yöntemlerin ise duyarlılığı asemptomatik leishmaniasiste oldukça düşüktür ve tanı açısından pek önem taşımamaktadır. Kullanılan yöntemler arasında mikroskopik, kültür ve moleküler yöntemler oldukça önemlidir. Bunun nedeni mikroskopik ve kültür yöntemlerinde direk olarak parazitin gözle görülmesi, moleküler yöntemlerde ise DNA analizinin yapılmasıdır. Ancak kullanılan bu yöntemlerin duyarlılığı örnekteki parazit sayısına bağlı olduğundan, asemptomatik leishmaniasisin tanısını oldukça zorlaştırmaktadır. Bugün

asemptomatik leishmaniasisde özellikle donör kanlarında *Leishmania* parazitlerinin belirlenmemesi de mevcut yöntemlerin yetersizliğine dayanmaktadır. Buna göre de leishmaniasis tanısında az sayıda parazit içeren örneklerde bile tanı konulmasını sağlayan yeni yöntemlerin uygulanması oldukça önemlidir. Bu açıdan son yıllarda dünyanın çeşitli bölgelerinde leishmaniasisten şüpheli kişilerin tanısında kullanılan ve yüksek duyarlılık ve spesifiklik gösteren MKY'nin, asemptomatik leishmaniasislerde ve özellikle donör kan örneklerinde leishmaniasis tanısında kullanılan diğer yöntemler ile kıyaslanarak incelenmesi önemlidir.

DENEYSEL ÇALIŞMALAR**3.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler****3.1.1 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar**

Deneyisel çalışmalarımızda aşağıdaki cihazlar kullanıldı.

- Bidistile Su Cihazı (GFL, 2104)
- Buzdolabı No-Frost (Arçelik, 5007 NF)
- CO₂ İnkübatörü (New Brunswick Innova CO-150)
- Derin (-40°C) dondurucu (GFL, 6341)
- Elektroforez Sistemi (Thermo EC1000-90)
- ELISA okuyucu (ThermoLabsystem, Multiskan Ascent)
- ELISA Yıkayıcı (ThermoLabsystem, Wellwash 4Mk 2)
- Etüv (Mettler, UM 500)
- Hassas terazi (Precisa, XR 305A)
- Hassas terazi (Sartorius, CP 225D)
- Hematokrit Santrifüj (Heraeus, Pico 17)
- Isıtıcıli Magnetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001)
- İnkübatör (Mettler, BE 500)
- Görüntüleme Sistemi (BioRad)
- Laminar-hava akışlı kabin (Heraeus, KS12)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, MD 554)
- Mikroskop (Olympus, BX 51)

- Otoklav (Hirayama, Hiclave HVE-50)
- pH metre (Hanna, pH 211)
- Santrifüj (Sigma, Benchtop 1-15)
- Santrifüj (Sigma, Benchtop 2-5)
- Soğutmalı Etüv (MMM Medcenter, Friocell 111)
- Soğutmalı Santrifüj (Eppendorf, 5810R)
- Su Banyosu (GFL, 2104)
- Su Saflaştırma Sistemi (Millipore MilliQ Elix 5)
- Ters (invert) mikroskop (Olympus, CKX41)
- Thermal Cycler-PCR (Techne, TC-312)
- TriokularFluoresan ve yansıma-kontrast mikroskobu (Leica, DMR HC)
- UV transilluminatör (Vilbert-Lourmat)
- UV/VIS Spektrofotometre (Jasco V-530)
- Vorteks (Heidolp, Reax top)

3.1.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Agar Bacto	BD	214010
Agaroz	Bioron	604001
Borik Asit	Applichem	A2940
DMSO	Applichem	A7248
EDTA	Applichem	A5097
Etanol	Riedel De Haen	32221
Fenol Solüsyon	Sigma	P4557
Fetal Dana serumu	Biochrom AG	S0113
Formaldehid (% 37)	Applichem	A0877
Formalin solusyon	Sigma	HT501128
Gentamisin	Sigma	G1397
Giemsa solusyon	Merck	109204
Gliserin	Sigma	G2289
Glisin	Fluka	50049
Hidroklorik asit	Merck	100314
IgG (ALP-anti-Human)	İnvitrogen	627122

IgG (FITC-Anti human)	Chemicon	AP112F
IgM (FITC-Anti human)	Chemicon	AP114F
İmmersiyon Yağı	Sigma-Aldrich	56822
İzo amil alkol	Applichem	100385N
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	04243
Kloroform	Carlo Erba	438603
L-glutamin	Biochrom AG	K0283
Metanol	Merck	106009
MgCl ₂	Merck	105833
Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich	S7795
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Merck	106580
NaCl	Sigma-Aldrich	13423
NaHCO ₃	Merck	106329
NaN ₃	Merck	106688
Parafin	J.T. Baker	3925
Penisilin/streptomisin	Biochrom AG	A2213
PNFF	Sigma-Aldrich	N4645
Potasyum klorür	Riedel De Haen	12636
pUC Mix Marker	Fermentas	SM0301
RPMI 1640	Biochrom AG	F1215
Schneider insect medium	Sigma	S0146
SDS	Sigma	L4390
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck	106345
Sodyum hidroksit	Riedel De Haen	062303
Süt tozu	Fluka	70166
TEMED	Sigma	T7024
Tripsin	Biochrom	L2103
Tripsin EDTA	Biological Industries	030515B
Tris-Base	Applichem	A2264
Tris-HCl	Sigma	T2913
Trizma base	Sigma	T6066
Tween 20	MP	194841
ZnCl ₂	Merck	108815
β-Mercaptoetanol	Amresco	0482
Whatman Kağıdı	Whatman	3MM Chr

3.2 Çalışma grubunun oluşturulması

İstanbul'daki kan merkezlerinden elde edilen donör kan örneklerinde, *Leishmania* Parazitlerinin yeni mikro kültür yöntemi ve diğer bazı yöntemler ile karşılaştırmalı incelenmesini amaçlayan doktora tezi için İstanbul Üniversitesi, Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'ndan onay alındı (EK-A). Çalışmanın konusu Kasım 2008-Nisan 2011 dönemini kapsayan kesitsel, randomize ve metodolojik temelinde planlandı. Buna göre; Çapa Kızılay Kan Merkezi'ne kan vermek için başvuran 18-65 yaş aralığında sağlıklı 343 kişi çalışma grubunu oluşturdu.

Değişik yaş ve meslek grubu gönüllü kan donörleri ilgili formu (EK-B) doldurdu ve imzaladı. Çalışmaya dahil edilen donörlerin adı, soyadı, yaşı, cinsiyeti, mesleği, ev ve iş adresleri, telefon numarası kaydedildi.

3.2.1 Donör Kan Örneklerinin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Gönüllü kan donörlerinin sağ, ön kol yüzeysel venlerinden intravenöz yolla 2 adet tüpe (EDTA içeren ve içermeyen) kan örnekleri alındı. Steril alınan tüm kan örnekleri soğuk ortamda 1-2 saat içinde tüm deneylerin uygulandığı Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarına ulaştırıldı. EDTA'lı tüplere kan konulduktan sonra düzenli bir şekilde karıştırılarak kanın pıhtılaşması önlendi. Laboratuvara getirilen EDTA içeren tüplere mikroskopik ve mikrokültür yöntemi uygulandı. EDTA içermeyen tüpler 4.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar 2 ml'lik steril eppendorf tüpler içine alınarak donör numaralandırılması yapıldıktan sonra serolojik testlerin uygulanma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

3.3 Deneysel çalışmalarda kullanılan Yöntemler

3.3.1 Mikroskopik Yöntemler

3.3.1.1 Yayma Örneklerinin Giemsa ile Boyanması

Donörlerden direk kandan ve buffy coat katmanından olmak üzere temizlenmiş lam (Metzel gloser) üzerine yayma yapıldı. Lam üzerindeki örnek kurutuldu ve metanol ile 5

dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Kurutulan lamalar 1:10 oranında sulandırılmış Giemsa boyasında 25-30 dakika 37°C etüvde bekletilerek boyama işlemi gerçekleştirildi. Giemsa ile boyanmış örnekler çeşme suyu ile yıkandı, kurutuldu. Son olarak ışık mikroskopunda (100x) immersiyeon yağı kullanılarak incelendi [68].

3.3.2 Kültür Yöntemleri

Donör kan örnekleri klasik kültür (NNN agar) ve MKY ile incelenmiştir.

Fosfat-tuz tamponu (PBS) Hazırlanması

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,62 gr Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ tartılıp 800-900 ml distile suda çözündürüldü. pH 7.4'e ayarlandı ve son hacim deiyonize suyla 1 litreye tamamlandı. 1 atm basınç, 121°C sıcaklık ayarlanmış otoklavda cam şişeler içersinde 20 dakika steril edildi.

RPMI 1640 Medyumunun Hazırlanması

100 ml RPMI 1640 içersine % 1 L-glutamin ve 0.5 ml gentamisin eklenerek stok hazırlandı. Yıkama işlemlerinde serumsuz RPMI 1640 besiyeri medyumunu kullanıldı. Kültürde kullanılmak üzere buradan 45 ml alınıp 5 ml FDS eklenerek % 10 FDS içeren besiyeri hazırlandı. Ayrıca pH ayarı HEPES ile sağlandı [165].

Donör kan örneklerinden buffy coat katmanının ayrılması

EDTA içeren kan tüpleri +4°C' de 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra altta kalan kısmın 2 katı kadar PBS ilave edilerek elde hafifçe yıkama amacıyla tüpler alt üst edildi. Tekrar +4°C' de 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldı. Yıkama işlemi üst faz renksizleşinceye kadar tekrarlandı. Son yıkamada PBS yerine serumsuz RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Üst faz atıldı ve bu şekilde +4°C' de 4.000 rpm'de 30 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz ile alt faz arasındaki ince sınırdaki alandaki sıvı otomatik pipet yardımıyla (Eppendorf Pipette 10-100 µl) alındı. Alınan sıvı 2 adet kapiler tüpe aktarıldı. Tüplerin bir ucu macun ile kapatıldı ve macunlanan uç dışta, açık olan uç merkezde kalacak şekilde kapiler tüpler,

hematokrit santrifüjde 8 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası koyu renkli faz ile açık renkli faz arasındaki ince sınırdaki buffy coat katmanı ayrıldı.

3.3.2.1 Klasik Kültür Yöntemi

EDTA'lı tüplere alınan donör kanlarından elde edilen buffy coat katmanından yaklaşık 100-150µl kadar alınıp, NNN agara ekim yapıldı.

NNN Besiyeri Hazırlanması

4.5 g bakteriyolojik agar 100 ml distile su eklenerek otoklavda 121°C'de 20 dakikada steril edildi. 50-55°C ye kadar (el ve yanak yakmayacak kadar ısı) soğutuldu. 15–20 ml defibrine tavşankanı soğuyan besiyerine eklendi. Son olarak bakteri kontaminasyonunun engellenmesi amacıyla 250 µl gentamisin (50mg/ml) ilave edilerek karıştırıldı. Önceden pastör fırınında steril edilmiş vidalı kapaklı cam tüplere hazırlanan besiyerinden 2.5–3 ml dökülerek 45° eğimde soğutuldu. Kapakları kapatılan tüplerden bir kaçı 24 saat 37°C de bekletilerek kontaminasyon kontrolü yapıldı. Diğer hazırlanan tüpler +4°C de 1–2 ay saklanmak üzere buzdolabına yerleştirildi. Kullanılacağı zaman içerisine 1–2 ml steril serum fizyolojik eklendi ve kullanmadan önce oda sıcaklığına gelinceye kadar beklendi [2].

3.3.2.2 Mikro Kültür Yöntemi (MKY)

EDTA'lı tüplere alınan donör kanlarının yıkama işlemi sonucu elde edilen her donöre ait buffy coat katmanı önceden hazırlanan içerisinde ~100-200µl % 30 serum içeren RPMI 1640 ya da Schneider'in besiyeri olan eppendorf tüplerine aktararak karıştırıldı. Hazırlanan karışımın, önceden pastör fırınında 175°C'de 1 saat tutularak sterilize edilmiş kapiler tüplere aktarıldı. Uçları steril eritilmiş parafin ile kapatılan en az 2'şer adet mikro kültürler hazırlandı ve 27°C'lik etüve kondu. Hazırlanan mikrokültürler 1-5 gün [51] yerine 1-10 gün süresince 20 büyütmede ters mikroskopta takip edildi.

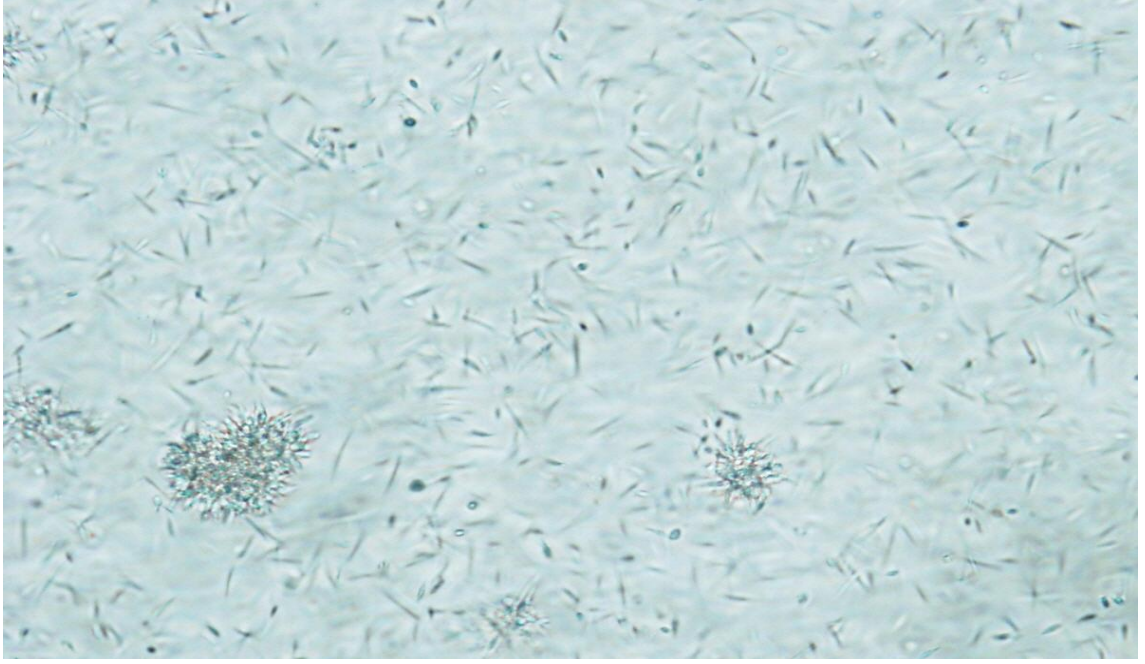
3.3.3 Serolojik Yöntemler

Leishmania Promastigot Kültürlerinin Yapılması

VL etkeni olan *L. infantum* (MON-1) ile KL etkeni olan *L. tropica* (MHOM/TR/99/EP39) promastigotları, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Seray Özensoy Töz ve Prof. Dr. Yusuf Özbel'den temin edildi. *Leishmania* parazitlerinin kültürü % 10 FDS içeren RPMI 1640 besiyerlerinde 27°C soğutmalı etüvde gerçekleştirildi. Parazitlerin gelişimi ve morfolojik durumu ters (invert) mikroskopta günlük olarak incelendi. Kültürün pasajı haftada bir kez yapıldı. Pasaj öncesi kültürden örnek alındı, ortamın pH'ı parazitlerin morfolojileri, hareketlilikleri incelendi ve sayımları yapıldı. Flaska 7.5 ml besiyeri eklendi ve üzerine 3×10^5 parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı. *Leishmania* promastigotlarının kültürü bu şekilde devam ettirildi. Hazırlanan kültürler serolojik yöntemler için antijen hazırlanmasında kullanıldı.



Şekil 3. 1 *Leishmania infantum* Kültürü (40x)



Şekil 3. 2 *Leishmania tropica* Kültürü (40x)

Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı

Kültür ortamındaki parazitler hareketli oldukları için thoma lamında sayılması zordur. Bu nedenle homojenliği sağlanmış kültürden ~50–100µl alındı ve 1:1 oranında % 2'lik formalinle karıştırılarak 5–10 dakika bekletildi. Daha sonra Thoma lamında (Marienfeld) aşağıdaki formül kullanılarak sayım yapıldı:

Parazit sayısı = Ortalama hücre sayısı x Seyreltme katsayısı x Thoma lamı sabiti

Parazit sayısı: 1 ml'deki parazit sayısı

Ortalama hücre sayısı: Thoma laminın alt ve üst kısmında bulunan 16 karedeki hücrelerin aritmetik ortalaması

Seyreltme katsayısı: Sayım için yapılan seyreltme katsayısı

Thoma lamı sabiti: 10.000

Promastigotlarının Dondurulması ve Saklanması

Kültürün genel durumunun iyi olduğu invert mikroskop ile incelendikten sonra pasaj aşamasına gelen hücreler donduruldu. Süspansiyon halindeki kültürden 1.8 ml kriyo

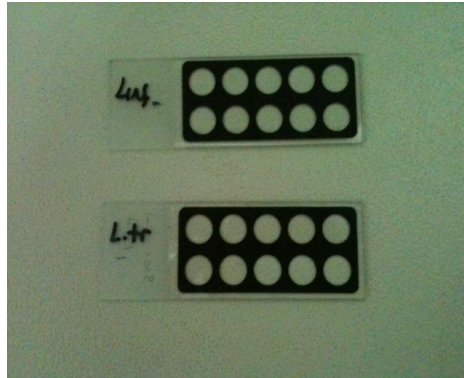
tüpe alınıp, 0.2 ml steril DMSO yavaşça eklendi. 1 saat +4°C’de, 24 saat -40°C’de bekletilip sıvı azot tankına konuldu.

3.3.3.1 İmmünofloresan Antikor Testi (IFAT)

Elde edilen tüm donör kan örneklerinin serumları 1/2’den 1/128’e kadar seyreltildi. Bu dilüsyonlardan 1/32; 1/64 ve 1/128 oranlarına IFA testi uygulandı. IFAT ile hem IgG hem de IgM antikorları araştırıldı.

Antijen Hazırlanması

IFA testinde kullanılacak olan antijen lamaları hem *Leishmania infantum* hem de *Leishmania tropica* suşlarından hazırlandı. Ticari olarak satın alınmış olan teflon kaplı lamalar deterjan ve musluk suyu ile uygun şekilde yıkandıktan sonra % 96’lık etanol içeren şale içinde 10 dakika bekletildi. Hava akımı altında uygun şekilde kurutulan lamalar kullanıma hazır hale getirildi. Promastigot kültüründen sayımı yapılan parazitler yaklaşık mililitrede 2.0-3.0 milyon hücre olacak şekilde teflon kaplı lamadaki her kuyucuğa 10 µL damlatıldı. Parazitle kaplanan lamalar oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan lamalar -40°C’de muhafaza edildi.

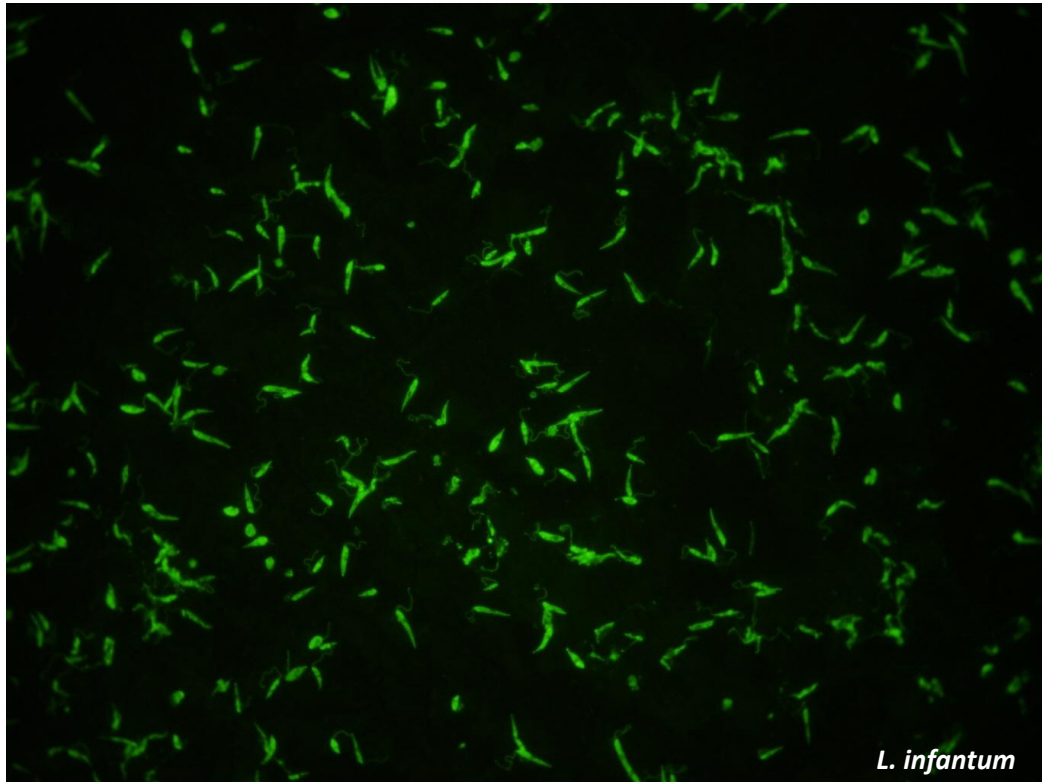


Şekil 3. 3 *L. infantum* ve *L. tropica* antijenleri kaplı kuyucuklu IFAT lamaları

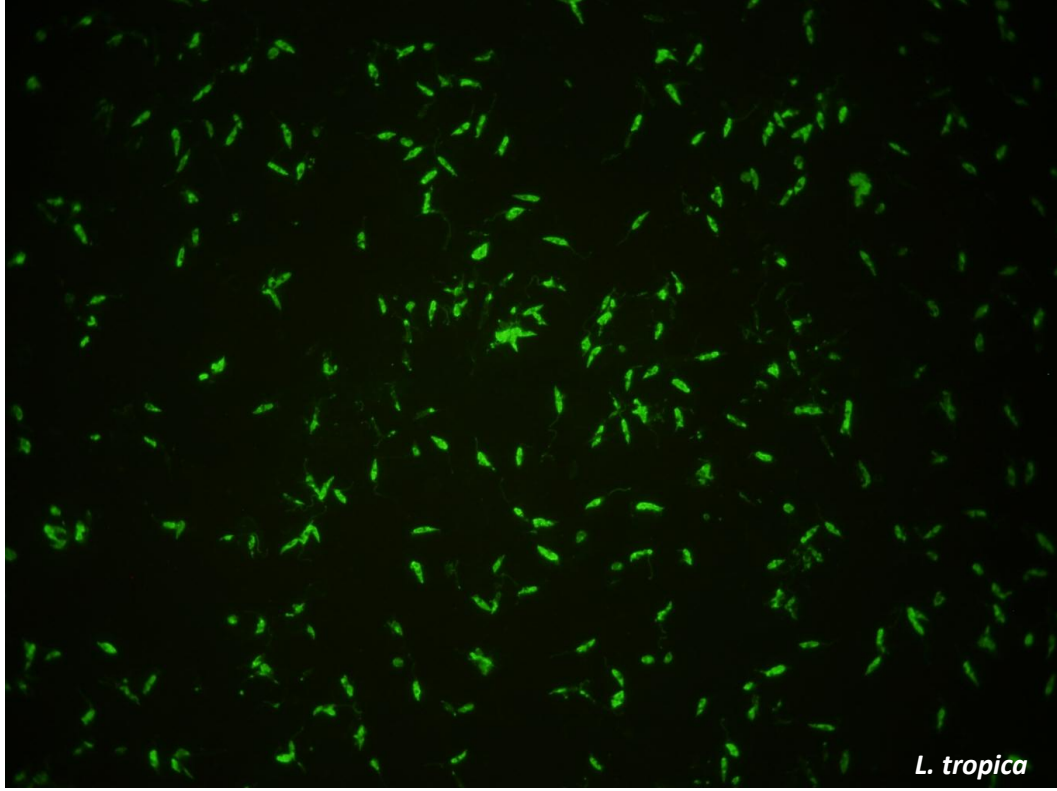
IFA Testinin Uygulanması

1/32; 1/64 ve 1/128 oranlarına seyreltilmiş donör serumları ~10µL olacak şekilde antijenle kaplı kuyucuklara nemli ortamda ilave edildi. Lamalar 30 dakika inkube edildikten sonra nemli ortamdan çıkarılarak içerisinde PBS bulunan şale içerisine

yerleştirildi ve burada 15 dakika bekletildi. Bu süre bittikten sonra lamalar içinde PBS olan bir piset ile hafifçe üstten yıkandı. Lamlar bir peçete üstüne konup, hafifçe alttan (antijen bulunmayan tarafı) silindi. Daha sonra lamlar yeniden nemli ortama alındı. Önceden 1:50 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan IgM ve IgG antikorları lam üzerindeki kuyucuklara damlatıldı. Antikorlar ile de 30 dakika inkubasyondan sonra yine şalede PBS içine kondu ve 15–20 dakika bekletildi. Yine piset içindeki PBS ile yıkandı. Nemliken, kurutmadan üzerine 1- 2 damla gliserin damlatıldı. Lamel ile kapatıldı ve fazla suyu süzdürölerek altı silindi. Hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Hazırlanan preparatlar immün flüoresan mikroskopta 20 veya 40'lık objektif ile bakıldı. Çalışmada Çukurova Üniversitesi'nden temin edilen KL ve VL tanısı konmuş hasta serumları pozitif kontrol olarak değeriendirildi.



Şekil 3. 4 Pozitif kontrol olarak kullanılan hasta serumunun IFAT görüntüsü (40x)



Şekil 3. 5 Pozitif kontrol olarak kullanılan hasta serumunun IFAT görüntüsü (40x)

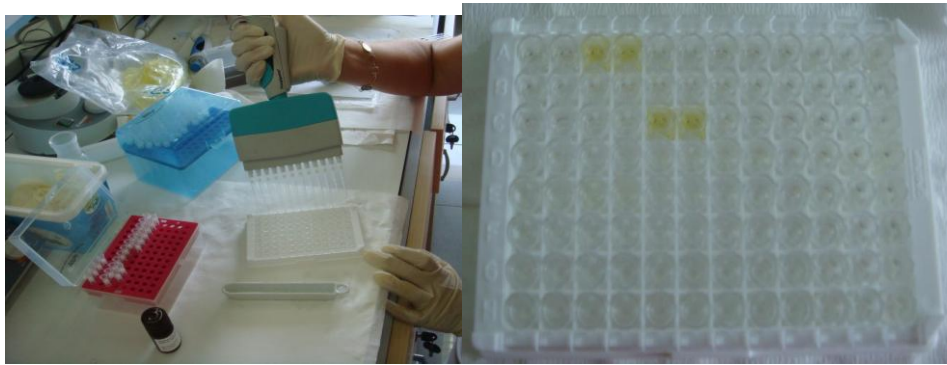
3.3.3.2 Enzim bağlanan immünosorbent testi (ELISA)

Ticari kit ile ELISA Yönteminin Yapılması

EDTA'sız tüplerden ayrılan donör kan örneklerinin serumları ticari olarak piyasada bulunan ELISA (İnBios Kalazar Detect™ ELISA System, Seattle, USA) kiti kullanım kılavuzuna uygun olarak laboratuvarında çalışıldı. VL etkenine karşı olan bu kitin antijen olarak *L. donovani* kompleksini kullandığı içeriğinde belirtilmiştir. Çalışma uygulaması ilk basamakta 10 µl alınan serum 490 µl kit tamponu ile sulandırarak 1: 50 dilüsyon hazırlandı. Kitten çıkan negatif kontrol ile pozitif kontrol ve sonra sırasıyla devam eden kuyucuklara seyreltilmiş donör örneklerinden 100'er µl ilave edilerek 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 6 kez 300 µl yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanarak kurutma kâğıdı ile kurutuldu. İkinci aşamada 100 µl kullanıma hazır anti-human IgG işaretli Horse Radish Peroksidaz Enzimi (HRP) damlatılarak 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tekrar 6 kez 300 µl yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. Üçüncü aşamada kuyucukların üzerine 150 µl son yıkama tamponu

ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonra tekrar plate 6 kez yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl tetrametilbenzidin substrat ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletildi. Son olarak 50 µl durdurma solüsyonu damlatılarak zaman kaybetmeden 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutularak sonuçlar değerlendirildi.

Elde edilen absorbens değerleri reaktiflerin kontrolü için negatif ve pozitif kontrol ortalamaları alınarak pozitif kontrol negatif kontrole bölündü. Çıkan oranın en az 8 olması eğer oran bu değer altında ise yöntemin tekrarı gerektiği ticari kitin kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde uygulandı.



Şekil 3. 6 ELISA Yöntemi uygulaması

Kültürden Hazırlanan Farklı Antijenler ile ELISA Yönteminin Yapılması

Ticari olarak VL etkenine karşı alınan kitte *L. donovani* antijeni kullanıldığından donör kan örneklerinin serumlarına laboratuvarımızda tarafımızca hazırlanan *L. infantum* ve *L. tropica* antijenleri kullanılarak da ELISA yöntemi uygulandı. Çalışma uygulaması için öncelikle laboratuvarımızda sürekli kültürü yapılan *L. infantum* ve *L. tropica* suşlarından 1×10^8 parazit sayımları yapıldı. Sayımı yapılan parazitler 3 kez PBS ile 3.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı ve -20°C'de 2 saat donduruldu. Sonra oda sıcaklığına alınarak eritilen parazitler 1:40 oranında distile su ile resüspanse edildi. Daha sonra 3 kez sıvı nitrojende dondurulup ve 37°C'lik su banyosunda eritilmenin ardından 10.000 g'de 15 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası antijenleri içeren süpernatant ayrılarak 96 kuyucuklu plate her kuyucukta 0.5 µg/ml olacak şekilde 100 µl kaplama çözeltisi ile kaplandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi.

Ertesi gün buzdolabından alınan plate 3 kez PBS ile yıkandı. 1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 ve 0,2 g NaN_3 , tartılıp 1000 ml distile suda çözündürülmesi ve pH 7.2'e ayarlanan kaplama solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan % 2'lik süt tozu içeren kaplama solüsyonundan 100'er µl her kuyucuğa eklendi ve 37°C'de 1 saat inkube edildi. Daha sonra 3 kez PBS'de yıkandı. Serumlar % 0,05 tween içeren % 2'lik süt tozlu PBS (PBS/T/ST) ile 1:100 oranında seyreltilerek hazırlandı ve her kuyucuğa 100 µl eklendi. 37°C'de 1 saat inkubasyonun ardından yine PBS/T/ST solüsyonunda 1:2000 oranında seyreltilmiş olan alkalın fosfataz konjuge edilmiş IgG ilave edildi. 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı.

0,02 g ZnCl_2 , 0,04 g MgCl_2 ve 1,5 g glisinin 200 ml'de distile suda çözündürülmesi ile hazırlanan ve pH 10.4'e ayarlanan substrat tamponunda PNFF substratı (25mg/25ml) hazırlandı. PNFF substratından kuyucuklara 100 µL eklenir ve 45 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilir. 45. ve 60. dakikalarda 405 nm'de okuma yapıldı. Optik Densite (OD) > 0.500 olan değerler pozitif olarak kabul edildi.

3.3.3.3 İmmünokromatografik test (ICT)

EDTA'sız tüplerden ayrılan donör kan örneklerinin serumlarına rK39 antijenine özgün kalazar tespitine dayalı ticari hızlı test (Dipstick-Kalazar Detect™ Rapid Test) kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi uygulandı. Buna göre testin belirtilen kısmına 10-20µl serum damlatılıp 5 dakika beklendi. Daha sonra testin içinde bulunan tampon solüsyonda 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Kontrol çizgisinin yanı sıra pozitif çizgi kısmında da kırmızı çizgi belirmesi ile test pozitif olarak kabul edildi.

3.3.4 Moleküler Yöntemler

3.3.4.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tez çalışmasında donör kan örneklerine moleküler yöntemlerden PCR uygulandı. PCR *Leishmania* tanısında kullanılmasına rağmen; parazit sayısına bağlı olarak duyarlılık çalışmalarının yetersizliğinden dolayı ve donör kanlarında da parazit sayısının az olduğu göz önüne alınarak; öncelikle kültür ortamından elde edilen parazitlerin sayısına göre duyarlılık incelendi. PCR'ın parazit sayısına göre duyarlılığının tespiti için öncelikle

sürekli kültürü yapılan *Leishmania infantum* suşundan sayım yapıp tüm seyreltmelerin DNA izolasyon çalışmaları yapıldı. İzole edilen parazit sayımları 10^7 ; 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10 ve 1 parazit olacak şekilde yapıldı.

Ayrıca asemptomatik *Leishmania* enfeksiyonlarının belirlenmesi için tarafımızca yapılan başka bir çalışmada mikro kültürü yapılmış perifer kan örneklerinde PCR yönteminin daha yüksek duyarlılıkta olduğu bilindiğinden, bu durum göz önüne alınarak donör kan örneklerine mikro kültürü yapılmış perifer kanlardan PCR yöntemi uygulandı.

DNA izolasyonu

DNA izolasyonu fenol-kloroform-izoamil alkol prosedürüne göre uygulandı. Buna göre 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, % 0.5 SDS ve pH 8.0'e ayarlanmış lizis tamponundan 300 µl alınarak ve 1 µl proteinaz K (100 mg/ml) ilave edilerek farklı sayımlardaki 100µl hacimdeki örnekler eklendi. Bir gece boyunca 56°C'de inkübe edildi. Ertesi gün örneklerin üzerine 2 kat hacimde fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ilave edildi ve iyice alt üst edilerek +4°C'de 30 dakika bekletildi. Sonra 12.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Başka bir tüpe alınan süpernatantın üzerine 2 kat hacimde kloroform ilave edildi. Karışım alt üst ederek +4°C'de 30 dakika bekletildi. Tüpler tekrar 12.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Yeni bir tüpe aktarılan süpernatantın üzerine 1 ml soğuk etanol ilave edildi ve yavaşça alt üst edip -20°C'de bir gece bekletildi. 12.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım dikkatlice uzaklaştırıldı. Oda sıcaklığında kurutulan tüplerin dibinde pellet oluştuğu görüldü. Pellet 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA ve pH 8.0'e ayarlanmış Tris-EDTA (TE) tamponunda 20 µl alınarak çözdürüldü [166]. Pellet olarak izole edilen DNA'nın miktar tayini için UV spektrofotometre kullanılarak 260nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml ye karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 50$$

Ayrıca izole edilen DNA'nın saf (protein veya RNA kontaminasyonu olmayan DNA) olduğunu anlamak için de 260 nm'deki absorbansın 280 nm'deki absorbansına oranına bakılır bu oran 2'den küçük 1,5'dan büyükse elde ettiğimiz DNA saf DNA'dır. Yeterli saflıkta DNA elde edilmesinden sonra PCR yöntemi ile DNA amplifikasyonuna geçilir.

PCR Amplifikasyonu

Leishmania'ya özgü seçilen hedef DNA dizisinin her iki ucuna özgü spesifik primerler ve kullanıma hazır DNA polimeraz (Taq polimeraz) da içeren 2X PCR Master Mix ticari olarak temin edildi. *Leishmania* parazitinin, miniekson gen bölgesine ait olan primerler kullanıldı. Bu primer çiftleriyle (Fme 5' TAT TGG TAT GCG AAA CTT CCG 3' ve Rme 5' ACA GAA ACT GAT ACT TAT ATA CGC 3') *Leishmania* parazitleri için özel bir DNA parçası olan 378-424 bp güçlendirilir [167]. PCR son hacim 25 µl olacak şekilde 2X Master Mix, her primerden 100 pM, kalıp DNA, saf su ve DMSO ilavesiyle hazırlandı. PCR ile döngü sayısına göre üstel oranda artan düzeyde ve ilgilenilen DNA bölgesinin elde edilmesini sağlandı. Buna göre termal siklus cihazına (PCR) yerleştirilen örneklerle 45 siklus; 5 dakika 94°C'de ilk denatürasyon, 94°C'de denatürasyon (1 dak.), 54°C'de tutunma (1 dak.), 72°C'de uzama (1,5 dak.) ve 72°C'de son uzama (7 dak.) olacak şekilde uygulandı. Yapılan PCR analizine, pozitif kontrol olarak *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica* suşlarından izole edilen DNA ve negatif kontrol olarak da DNA içermeyen örnekler de ilave edildi [168].

Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez ile PCR ile çoğaltılmış DNA molekülü, görüntülenmesi amacıyla agaroz ile hazırlanan jele yüklendi ve elektrik alanda belirli bir süre boyunca yürütülerek boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlandı. PCR ürünlerini görüntülemek için 108 g Tris-Base, 55 g Borik asit ve 8,3 g EDTA, tartılıp 1000 ml distile suda eritildi ve pH 8.8'e ayarlanan TBE tamponu hazırlandı. Hazırlanan TBE tamponundan 30 ml alınarak, 0,6 g agaroz ve 2 µl EtBr ilavesiyle % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Oda sıcaklığında jelin iyice soğuyarak tamamen polimerize olması sağlandıktan sonra PCR ürünlerinden ve DNA ölçeğinden (marker) 2'şer µl alınıp 4 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jele yüklendi. Voltaj, 110-120 Volt olarak ayarlandı. Yükleme boyasının açık mavi fraksiyonu jelin 2/3'üne ulaştığında elektroforez durduruldu ve UV transilluminatör cihazının üzerine konuldu. Ultraviyole ışığı altında görüntülendi. Ardından elde edilen görüntüler fotoğraf makinesi ile kaydedildi.

3.4 İstatistik

Çalışmaya alınan donörlerden elde edilen veriler SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Science, version 19.0 for Windows; SPSS, Inc, Chicago, IL) istatistik programında değerlendirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde Pearson'ın bağımsız ki-kare testi ve Kappa tutarlılık testi kullanılmıştır.

DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

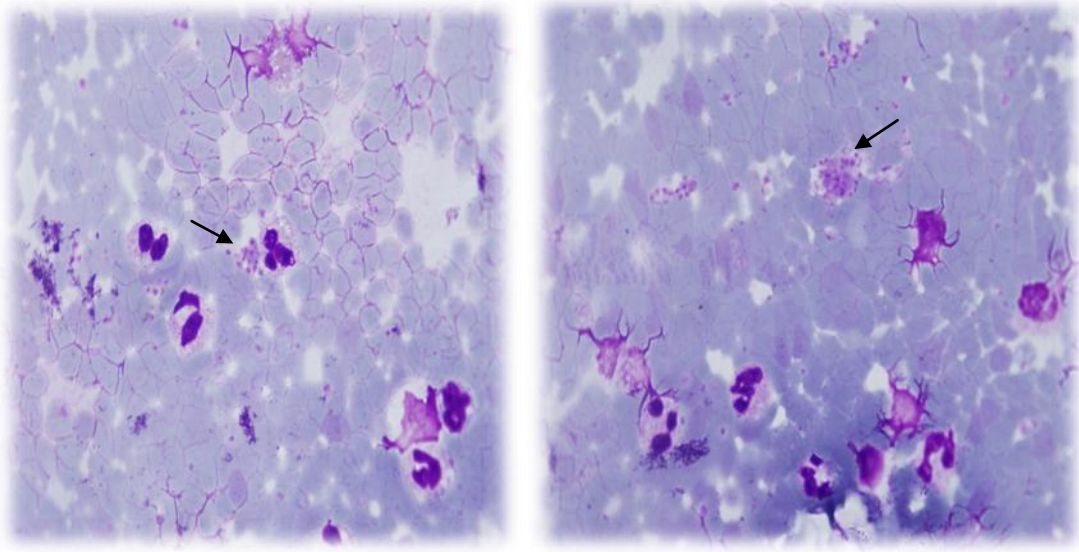
Bu çalışmada ilk kez olarak donör kan örneklerinde *Leishmania* parazitlerinin tanısı için daha duyarlı bir yöntemin belirlenmesi hedeflenmiştir. Hedefe ulaşmak için son yıllarda geliştirilmiş olan ve donör kan örneklerinde leishmaniasisin tanısında şimdiye kadar kullanılmayan yeni MKY ile leishmaniasisin tanısında kullanılan diğer yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda Çapa Kızılay Kan Merkezinden temin edilen donör kan örnekleri mikroskopik (yayma), kültür (klasik ve mikro kültür), serolojik (IFAT, ELISA ve ICT) ve moleküler yöntemler (PCR) ile incelenmiştir. Kasım 2008-Nisan 2011 tarihlerini kapsayan dönem içinde merkeze kan vermek için başvuran, sağlıklı 343 donörde bu çalışma yapılmıştır. Bu donörlerin 39'u (% 11) kadın, 304'ü (% 89) erkek, yaş aralığı da 18-65 olarak saptanmıştır. Temin edilen bütün örneklerle öncelik yayma, MKY, IFAT ve ELISA yöntemleri uygulandı. Ancak bu yöntemlere göre pozitiflik saptanan örneklerle de klasik kültür, ICT ve PCR yöntemleri uygulanmıştır. Farklı yöntemler ile incelenen toplam 26 donörde en az bir yöntem ile *Leishmania*'ya göre pozitif sonuç tespit edilmiştir. Bu 26 donörün demografik bilgileri (yaş, cinsiyet, doğum yeri ve oturduğu yer) çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 *Leishmania* pozitif sonuç veren donörlerin bazı demografik bilgileri

SIRA NO	DONÖR NO	CİNSİYET	YAŞ	MESLEK	DOĞUM YERİ	YAŞADIĞI YER
1	1	E	64	ŞOFÖR	DENİZLİ	İSTANBUL
2	27	E	42	ŞOFÖR	TRABZON	İSTANBUL
3	63	E	29	SER. MESLEK	MALATYA	İSTANBUL
4	71	E	41	SER. MESLEK	TEKİRDAĞ	İSTANBUL
5	73	E	49	SER. MESLEK	İSTANBUL	İSTANBUL
6	74	E	21	ÖĞRENCİ	İSTANBUL	İSTANBUL
7	83	K	27	SER. MESLEK	EDİRNE	İSTANBUL
8	84	E	22	SER. MESLEK	DİYARBAKIR	İSTANBUL
9	89	E	48	SER. MESLEK	İÇEL	KOCAELİ
10	100	E	40	SER. MESLEK	KONYA	İSTANBUL
11	106	E	28	SER. MESLEK	MARDİN	İSTANBUL
12	116	E	19	ÖĞRENCİ	SİNOP	İSTANBUL
13	124	E	29	SER. MESLEK	İSTANBUL	İSTANBUL
14	126	E	34	İŞSİZ	KIRŞEHİR	İSTANBUL
15	137	E	47	SER. MESLEK	İSTANBUL	İSTANBUL
16	145	E	54	SER. MESLEK	İSTANBUL	İSTANBUL
17	147	E	22	SER. MESLEK	İSTANBUL	İSTANBUL
18	149	E	54	EMEKLİ	MALATYA	İSTANBUL
19	157	K	37	HEMŞİRE	ŞANLIURFA	İSTANBUL
20	161	K	25	HEMŞİRE	SAMSUN	İSTANBUL
21	176	E	27	ŞOFÖR	İSTANBUL	İSTANBUL
22	180	E	34	ŞOFÖR	ALMANYA	İSTANBUL
23	188	E	36	SER. MESLEK	ZONGULDAK	İSTANBUL
24	202	E	60	SER. MESLEK	ÇANAKKALE	ALMANYA
25	296	E	49	ESNAF	ŞANLIURFA	İSTANBUL
26	307	E	53	SER. MESLEK	AFGANİSTAN	İSTANBUL

4.1 Donör Kan Örneklerinin Mikroskopik olarak incelenmesi

Çalışmanın bu bölümünde donör kan örneklerinden 520 adet ince yayma (direk kandan 343 ve buffy coat katmanından 177) hazırlandı ve Giemsa yöntemi ile boyandı. Mikroskopik olarak her yayma örneği en az 45 dakika süresince incelendi. Tanı, mikroskopta *Leishmania* parazitlerinin 100X büyütmede amastigot formunun tespit edilmesi ile konuldu. İncelenen 520 adet yaymanın dördünde (4) *Leishmania* parazitleri tespit edildi (Şekil 4.1). Ayrıca *Leishmania* tespit edilen örnekler bu alanda uzman olan Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA tarafından da incelenerek, onaylandı.



Şekil 4. 1 Donör Kan Örneklerinde *Leishmania* parazitlerinin amastigot formu (Giemsa,100x)

Ancak, *Leishmania* parazitleri görülen 4 donör örneği de, buffy coat katmanından hazırlanan yaymalarda tespit edildi. Buna göre de, çalışmalarda ağırlıklı olarak buffy coat katmanından hazırlanan yaymalar yapıldı.

Sonuç olarak leishmaniasise göre mikroskopik olarak incelenen 343 donör kan örneğinin 4'ünde *Leishmania* parazitleri tespit edildi. Buffy coat katmanından hazırlanan yaymaların direk kandan hazırlananlara göre daha duyarlı olduğu belirlendi.

4.2 Donör Kan Örneklerinde *Leishmania* Parazitlerinin Kültür Yöntemleriyle incelenmesi

Deneylerde klasik ve mikro kültür yöntemleri kullanıldı.

Klasik Kültür Yöntemi: Klasik kültür yönteminde deneysel çalışmalar kısmında verildiği gibi tavşan kanı içeren NNN agar kullanıldı. Kültür ortamına buffy coat katmanından hazırlanan örnekler eklendi ve 28-45 gün gözlemlenerek hareketli promastigot varlığının takibi yapıldı. İncelenen 85 donör kan kültürünün sadece birinde (1) parazitlerin varlığı tespit edildi. Ayrıca bu pozitif çıkan donör örneği aynı zamanda diğer yöntemler (yayma, MKY, IFAT, ELISA ve PCR) ile de onaylandı.

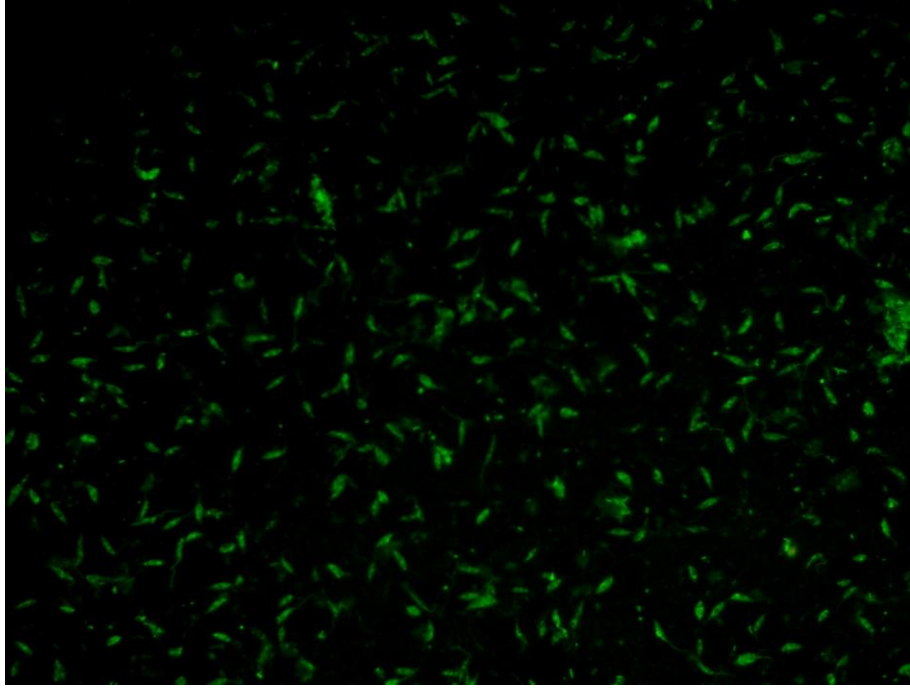
Mikro Kültür Yöntemi: Mikro kültür yönteminde ise deneysel çalışmalar kısmında verildiği gibi kültür hazırlandı. Sonuçların değerlendirilmesi MKY’de belirtildiği gibi 1-4 gün süresince değil, kullandığımız kanın donör kanı olduğunu göz önüne aldığımızdan 1-10 gün süresince incelendi. İncelenen 343 donör örneğinin on beşinde (15) *Leishmania* parazitlerinin hareketli promastigot formu, genellikle kültürün 3-4. günlerinde tespit edildi.

Sonuç olarak klasik ve mikro kültür yöntemleri ile toplam 427 donör kan örneği incelendi. Hem klasik hem de MKY ile toplam 15 donör kan örneğinde *Leishmania* parazitleri görüldü. Klasik kültür yöntemi ile ancak bir donör örneğinde ve MKY ile on beş donör örneğinde parazit tespit edildi. Pozitif çıkan bu 15 donör örneğinin sadece biri hem klasik kültür yöntemi hem de mikro kültür yönteminde pozitif olarak tespit edildi. Böylece mikro kültür yönteminin klasik kültür yöntemine göre, donör kan örneklerinde daha duyarlı olduğu görüldü.

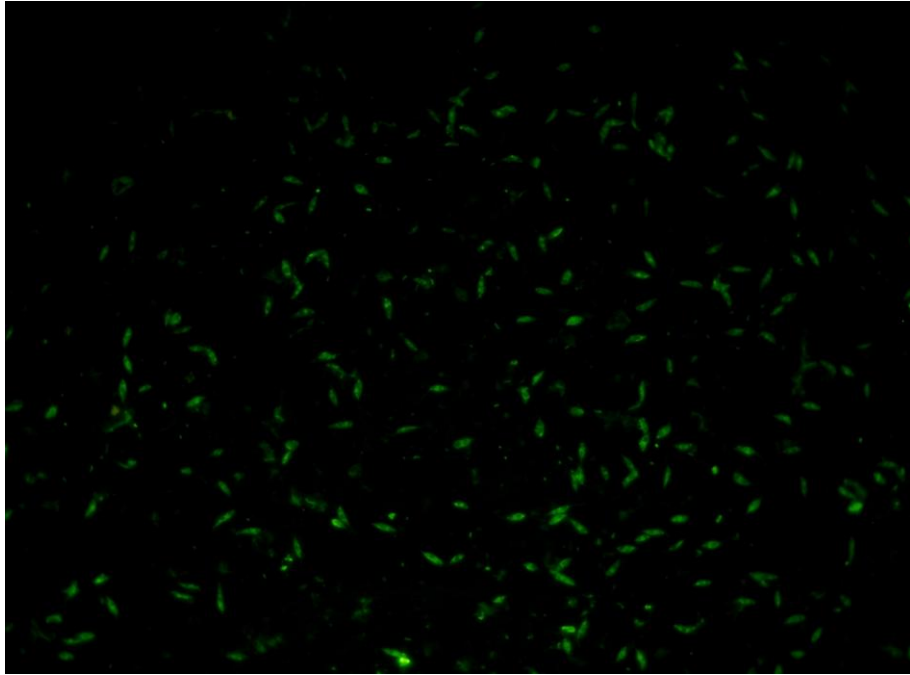
4.3 Donör Kan Örneklerinin Serolojik Yöntemlerle İncelenmesi

4.3.1 IFAT İncelemesi

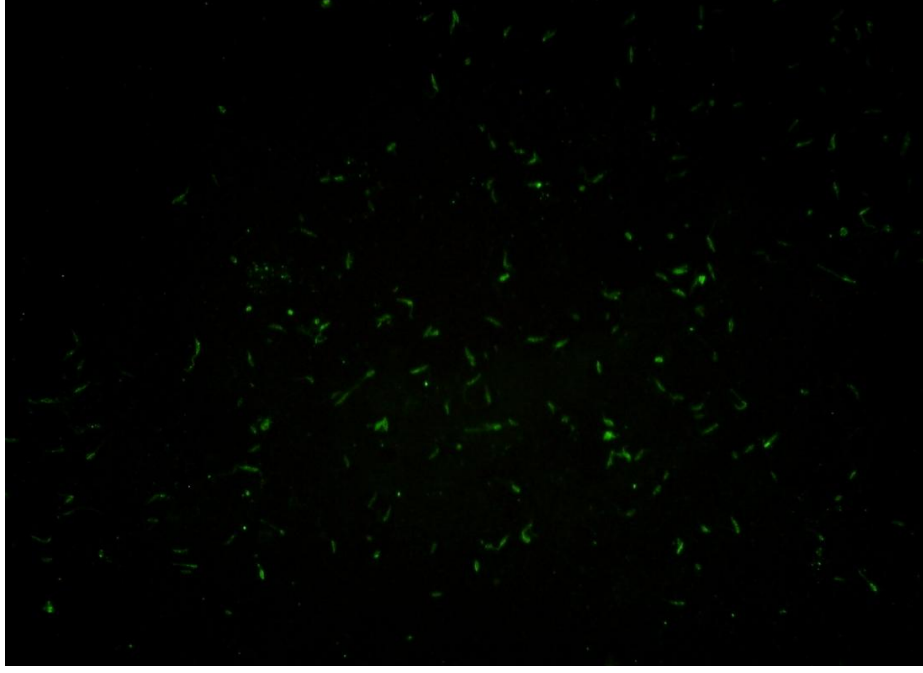
IFAT incelemesi amacıyla laboratuvarımızda sürekli kültürü yapılan *Leishmania* parazitlerinin farklı türlerinden (*L. infantum* ve *L. tropica*,) antijenler hazırlandı. Donör serumlarına deneysel çalışmalar kısmında verildiği gibi IFAT uygulanarak floresan mikroskopunda ışıma veren örnekler pozitif olarak değerlendirildi. Her iki antijene karşı donör kanlarında oluşan farklı antikorların (IgG ve IgM) pozitif örnek görüntüleri şekil 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.



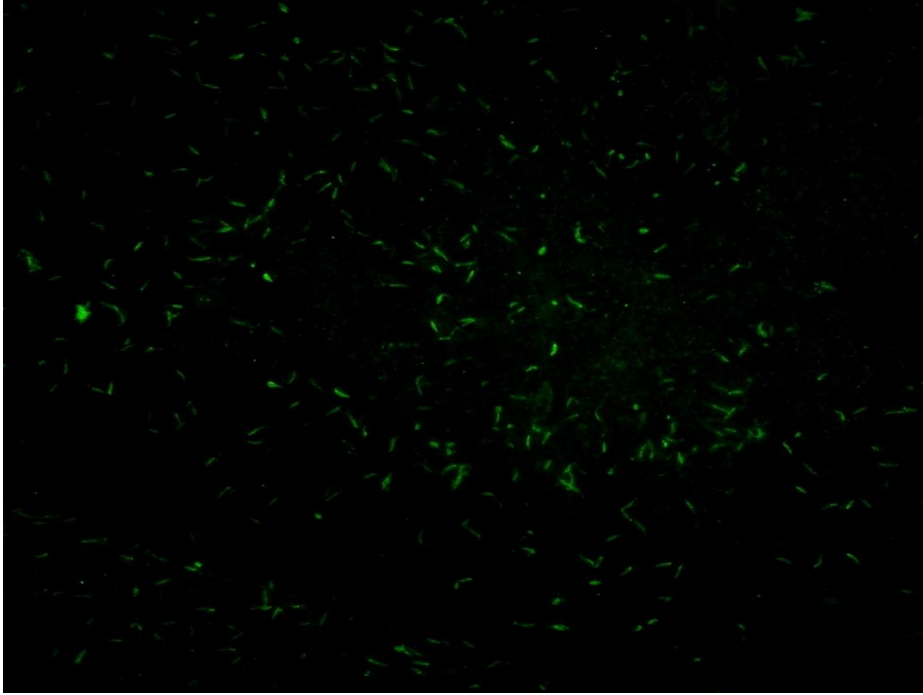
Şekil 4. 2 Antijen olarak *Leishmania infantum* kullanıldığında IgG antikoru pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (40x)



Şekil 4. 3 Antijen olarak *Leishmania infantum* kullanıldığında IgM antikoru pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (40x)



Şekil 4. 4 Antijen olarak *Leishmania tropica* kullanıldığında IgG antikoru pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (20x)



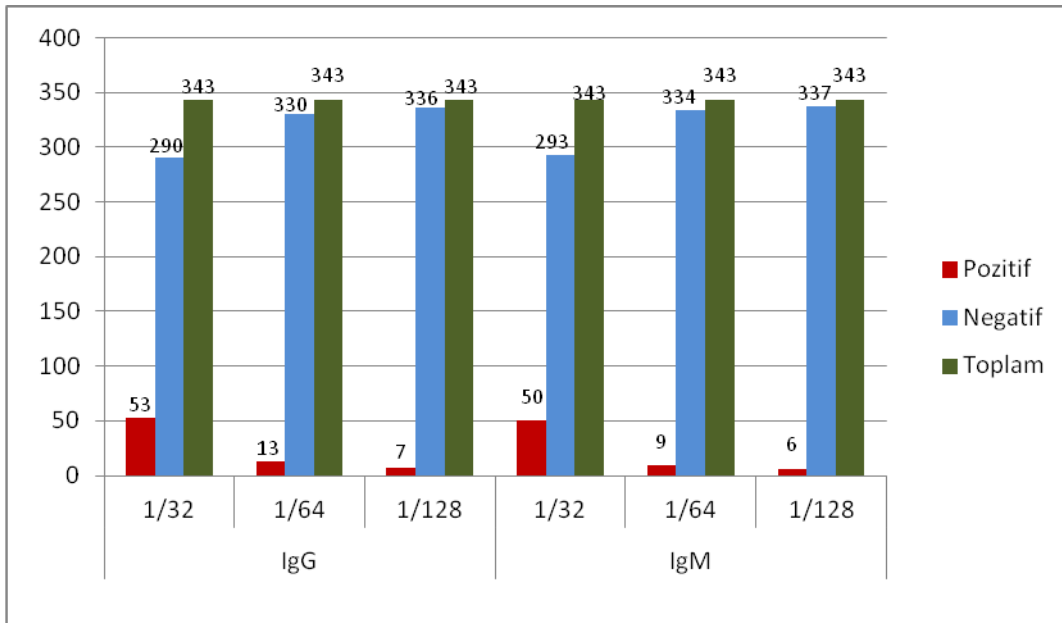
Şekil 4. 5 Antijen olarak *Leishmania tropica* kullanıldığında IgM antikoru pozitif olan donör serum örneğinin görüntüsü (20x)

Kan merkezinden elde edilen 343 donör kan örneği serumları farklı seyreltmelerde (1/32, 1/64, 1/128) hazırlandı ve IFA testi ile incelendi. 343 donör serumunda, *Leishmania* parazitlerine karşı antikorların (IgG ve IgM) varlığı hem *L. infantum* hem de *L. tropica* antijenlerine göre incelendi (Çizelge 4.2, 4.3 ve 4.4).

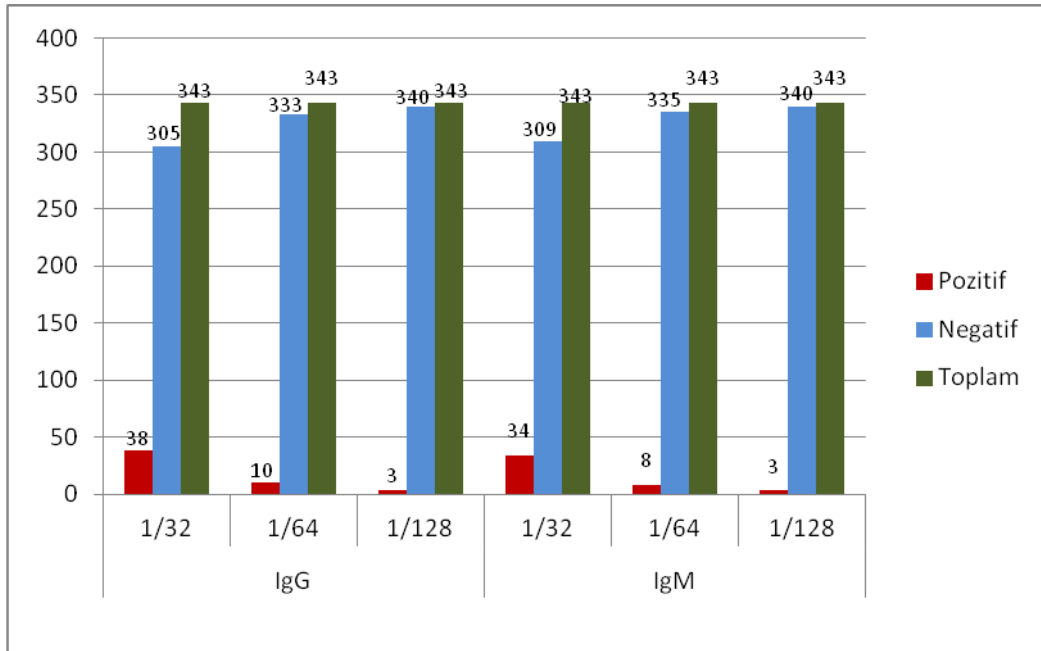
Çizelge 4.2 Donör kan örneklerinin farklı serum seyreltmelerinde *L. infantum* ve *L. tropica* antijenlerine karşı antikor varlığı

Antijen	<i>L. infantum</i>						<i>L. tropica</i>					
Antikor	IgG			IgM			IgG			IgM		
Seyreltme	1/32	1/64	1/128	1/32	1/64	1/128	1/32	1/64	1/128	1/32	1/64	1/128
Pozitif (%)	53 (15.4)	13 (3.7)	7 (2)	50 (14.5)	9 (2.6)	6 (1.7)	38 (11)	10 (2.9)	3 (0.8)	34 (9.9)	8 (2.3)	3 (0.8)
Negatif	290	330	336	293	334	337	305	333	340	309	335	340
Toplam Örnek	343											

Çizelge 4.3 *Leishmania infantum* antijenine karşı IgG ve IgM antikor varlığının farklı titrelerdeki sayısal dağılımı

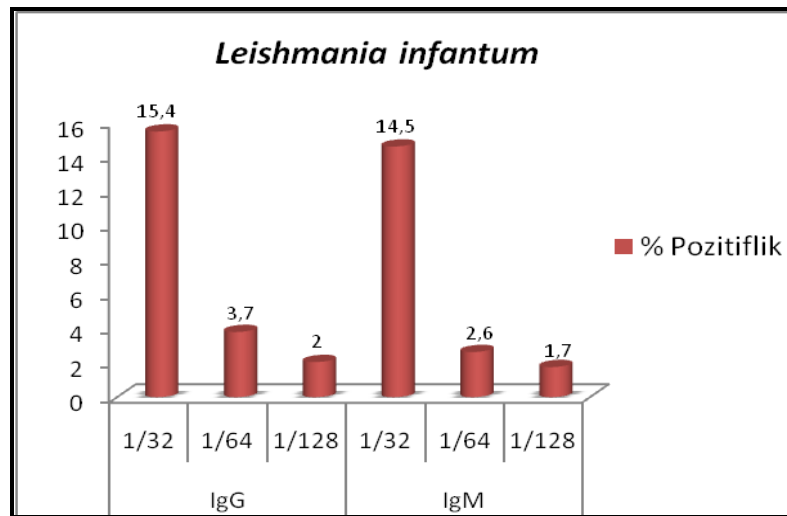


Çizelge 4.4 *Leishmania tropica* antijenine karşı IgG ve IgM antikor varlığının farklı titrelerdeki sayısal dağılımı



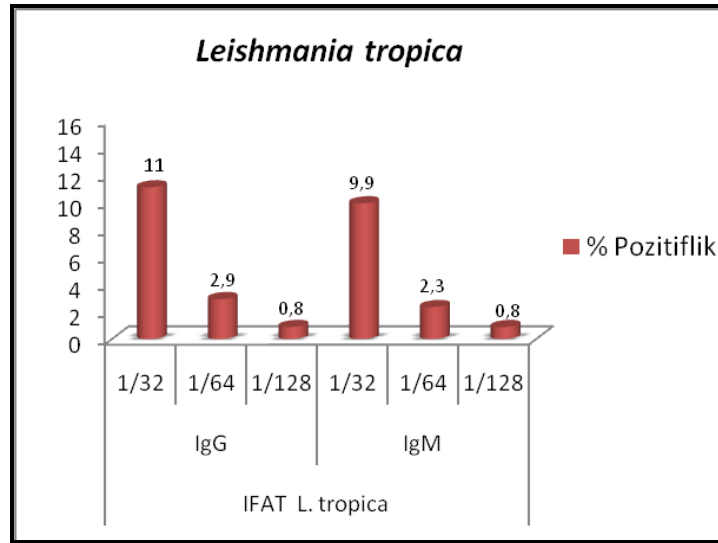
Antijen olarak *L. infantum* parazitleri kullanıldığında, 1/32 seyreltmede 53 (% 15.4), 1/64'de 13 (% 3.7) ve 1/128'de ise 7 (% 2) örnekte IgG antikor varlığı pozitif olarak tespit edildi. IgM değerlerinde ise, 1/32 seyreltmede 50 (% 14.5), 1/64'de 9 (% 2.6) ve 1/128'de de 6 (% 1.7) örnek pozitif olarak tespit edildi. Pozitif çıkan örneklerin yüzde olarak dağılımı çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 *L. infantum* antijeni kullanıldığında farklı titrelerdeki serum örneklerinin pozitiflik dağılımı (%)



Antijen olarak *L. tropica* parazitleri kullanıldığında, 1/32 seyreltmede, 38 (% 11), 1/64'de 10 (% 2.9) ve 1/128'de ise 3 (% 0.8) örnekte IgG antikor varlığı pozitif olarak tespit edildi. IgM değerleri ise, 1/32 seyreltmede 34 (% 9.9), 1/64'de 8 (% 2.3) ve 1/128'de de 3 (% 0.8) örnek pozitif olarak tespit edildi. Pozitif çıkan örneklerin yüzde olarak dağılımı ise çizelge 4.6'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 *L. tropica* antijeni kullanıldığında farklı titrelerdeki serum örneklerinin pozitiflik dağılımı (%)



Çizelgelerden de görüldüğü gibi IFAT ile incelenen 343 donör kan örneğinde her iki antijene karşı pozitiflik, farklı seyreltmelerde saptanmıştır. En çok pozitiflik *L. infantum* antijenine karşı IgG antikorunda görülmüştür (% 15.4). Tanı için önemli kabul edilen 1/32 ve 1/64 seyreltmelerde *L. infantum*, *L. tropica* antijenine göre daha yüksek pozitiflik göstermiştir. Aynı şekilde tanı değerinde de (1/128) *L. infantum*, *L. tropica* antijenine göre daha yüksek pozitiflik verdiği saptanmıştır.

İncelenen 343 donör örneğinden her iki antijene göre pozitif olan ortak donör örneklerinin (30) ve sadece *L. infantum* (41) ya da sadece *L. tropica* (25) antijenine göre pozitif olan donör örneklerinin farklı seyreltmelerdeki antikor dağılım çizelgesi ise 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Donörlerde *L. infantum* ve *L. tropica* antijenlerine karşı IgG ve IgM antikorlarının dağılımı

Sıra No	Donör No	<i>L. infantum</i>					
		1/32		1/64		1/128	
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
1	1	+	+	+	+	+	+
2	10	+	+	-	-	-	-
3	12	+	+	-	-	-	-
4	27	-	+	-	+	-	+
5	33	+	-	-	-	-	-
6	69	+	-	-	-	-	-
7	71	+	-	+	-	-	-
8	72	+	-	-	-	-	-
9	73	-	+	-	+	-	+
10	83	+	-	+	-	+	-
11	96	+	-	-	-	-	-
12	100	+	-	+	-	-	-
13	106	+	+	-	-	-	-
14	110	+	+	+	-	-	-
15	141	+	-	-	-	-	-
16	143	+	+	+	+	-	-
17	145	-	+	-	-	-	-
18	149	-	+	-	+	-	-
19	158	+	-	-	-	-	-
20	161	-	+	-	+	-	+
21	162	+	+	-	-	-	-
22	173	+	+	-	-	-	-
23	175	+	+	+	-	-	-
24	176	+	+	+	+	+	+
25	178	+	+	-	-	-	-
26	180	+	+	+	-	+	-
27	182	+	+	-	-	-	-
28	183	+	-	-	-	-	-
29	184	+	-	+	-	-	-
30	185	+	+	-	-	-	-
31	188	+	+	+	+	+	-
32	191	+	-	-	-	-	-
33	193	+	-	-	-	-	-
34	202	+	+	+	+	+	+
35	203	+	+	-	-	-	-
36	204	+	+	-	-	-	-
37	205	+	+	-	-	-	-
38	206	+	-	-	-	-	-
39	207	+	-	-	-	-	-
40	214	+	-	-	-	-	-
41	222	+	-	-	-	-	-
42	223	+	-	-	-	-	-
43	225	+	+	-	-	-	-
44	238	+	+	-	-	-	-
45	239	+	+	-	-	-	-
46	240	-	+	-	-	-	-
47	242	-	+	-	-	-	-
48	252	+	+	-	-	-	-
49	253	-	+	-	-	-	-
50	255	+	+	-	-	-	-
51	256	-	+	-	-	-	-
52	257	-	+	-	-	-	-
53	258	-	+	-	-	-	-
54	262	+	+	-	-	-	-
55	263	+	+	-	-	-	-
56	266	-	+	-	-	-	-
57	269	+	+	-	-	-	-
58	272	-	+	-	-	-	-
59	288	-	+	-	-	-	-
60	289	+	-	-	-	-	-
61	290	-	+	-	-	-	-
62	291	-	+	-	-	-	-
63	294	-	+	-	-	-	-
64	303	+	+	-	-	-	-
65	305	+	+	-	-	-	-
66	307	+	-	+	-	+	-
67	314	+	+	-	-	-	-
68	315	+	+	-	-	-	-
69	317	-	+	-	-	-	-
70	321	+	+	-	-	-	-
71	333	+	-	-	-	-	-
Toplam		53	50	13	9	7	6

Sıra No	Donör No	<i>L. tropica</i>					
		1/32		1/64		1/128	
		IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
1	12	-	+	-	-	-	-
2	27	-	+	-	+	-	+
3	31	-	+	-	-	-	-
4	39	+	+	-	+	-	-
5	61	-	+	-	-	-	-
6	63	+	-	+	-	+	-
7	74	-	+	-	+	-	+
8	77	-	+	-	-	-	-
9	83	-	+	-	-	-	-
10	84	+	-	+	-	+	-
11	88	+	-	-	-	-	-
12	89	-	+	-	+	-	+
13	97	-	+	-	-	-	-
14	101	+	-	-	-	-	-
15	103	+	+	+	+	-	-
16	106	-	+	-	-	-	-
17	110	+	-	-	-	-	-
18	124	+	-	+	-	+	-
19	129	+	-	+	-	-	-
20	145	+	-	-	-	-	-
21	151	+	-	+	-	-	-
22	156	-	+	-	-	-	-
23	159	+	+	-	-	-	-
24	161	-	+	-	+	-	-
25	162	+	+	+	-	-	-
26	173	+	-	+	-	-	-
27	175	+	+	-	-	-	-
28	180	+	+	-	-	-	-
29	182	+	-	-	-	-	-
30	190	+	+	-	+	-	-
31	193	-	+	-	-	-	-
32	200	+	-	-	-	-	-
33	204	+	+	-	-	-	-
34	205	-	+	-	-	-	-
35	206	+	-	-	-	-	-
36	207	+	-	-	-	-	-
37	216	+	-	-	-	-	-
38	222	+	+	-	-	-	-
39	223	+	-	-	-	-	-
40	258	-	+	-	-	-	-
41	279	+	+	-	-	-	-
42	287	+	+	-	-	-	-
43	288	+	-	-	-	-	-
44	289	+	+	-	-	-	-
45	290	-	+	-	-	-	-
46	294	+	+	-	-	-	-
47	295	+	-	-	-	-	-
48	296	+	+	-	-	-	-
49	303	+	+	-	-	-	-
50	305	+	+	-	-	-	-
51	307	+	-	+	-	-	-
52	314	-	+	+	+	-	-
53	315	-	+	-	-	-	-
54	317	+	-	-	-	-	-
55	335	+	-	-	-	-	-
Toplam		38	34	10	8	3	3

Sadece *L. infantum* ya da *L. tropica* antijene karşı antikor taşıyanlar mavi; her iki antijene karşı antikor taşıyan ortak donörler de kırmızı ile belirtilmiştir.

Çizelge 4.7'deki *L. infantum* ve *L. tropica* antijenlerine karşı oluşan IgG ve IgM antikorlarını taşıyan donörlerin dağılımı incelendiğinde, 343 donör kan örneğinin farklı serum seyreltmelerinin 71'inde *L. infantum* antijene karşı, 55'inde ise *L. tropica* antijenine karşı IgG ya da IgM antikor pozitif olduğu görülmektedir. Ancak 30 donör kanı örneğinde ise her iki antijene karşı da antikor olduğu tespit edilmiştir. Bu 30 donör ayrıntılı olarak incelendiğinde *L. infantum* antijenine karşı 8 donörün sadece IgG pozitif; farklı 8 donörün sadece IgM pozitif; 14 donörün ise hem IgG hem de IgM pozitif olduğu tespit edilmiştir. *L. tropica* antijenine karşı ise 10 donörün sadece IgG pozitif; 11 donörün sadece IgM pozitif; 9 donörün ise hem IgG hem de IgM pozitif olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca 2 donörde *L. infantum* antijenine karşı IgG antikor; *L. tropica* antijenine karşı IgM antikor pozitif tespit edilirken, 3 donörde de *L. infantum* antijenine karşı IgM antikor; *L. tropica* antijenine karşı IgG antikor pozitif tespit edilmiştir.

Böylece IFAT yöntemi ile incelenen 343 donör örneğinin hem *L. infantum* hem de *L. tropica* antijenine karşı farklı seyreltmelerinde toplam 96 donörde IgG ve IgM antikorlarının varlığı saptandı. İncelenen 343 donörde en çok pozitiflik *L. infantum* antijenine karşı IgG antikorunda görülürken *L. infantum* antijeni de *L. tropica* antijenine göre daha yüksek pozitiflik göstermiştir.

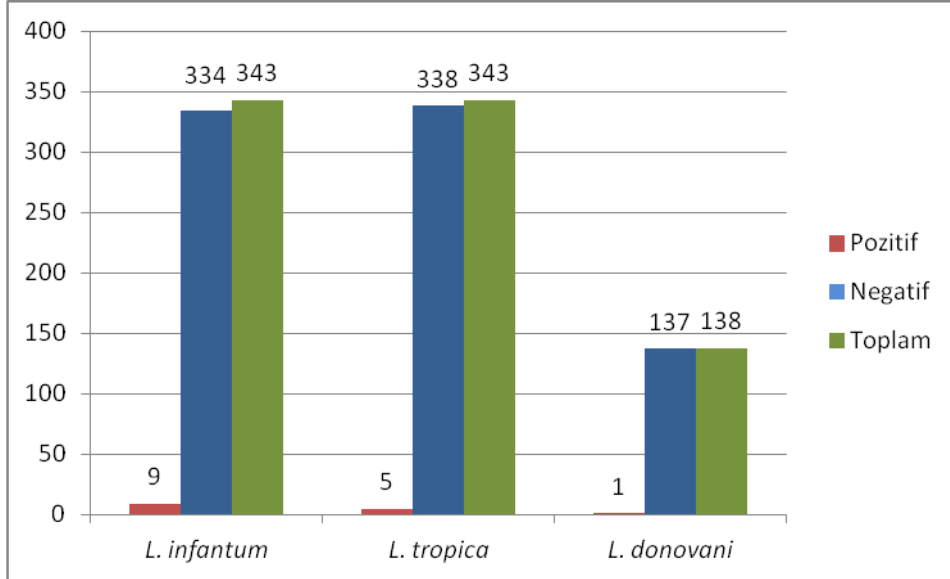
4.3.2 ELISA İncelemesi

Deneyler, hem ticari ELISA kiti (InBios Kalazar Detect™ ELISA System) hem de tarafımızca optimizasyonu yapılan ELISA ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda 138 adet donör kan serumunun incelenmesinde antijen olarak *L. donovani* içeren ticari ELISA kiti kullanıldı ve bir (1) donör örneğinde *Leishmania*'ya karşı pozitif sonuç elde edildi.

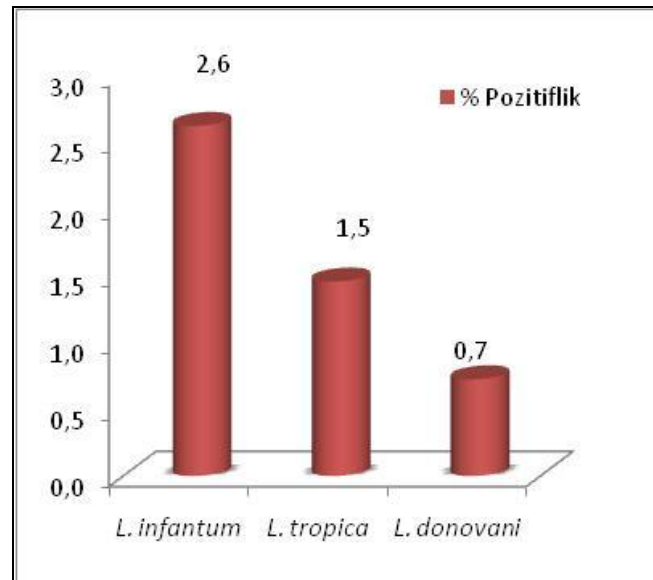
Ticari kitin çok pahalı olması, ayrıca VL etkeni olarak *L. donovani* içermesi nedeniyle kendimiz ELISA için laboratuvarımızda sürekli kültürü yapılan *L. infantum* ve *L. tropica* suşlarından antijenleri hazırlayarak yöntemi optimize ettik. Bu amaçla farklı miktarlarda (0.5; 1 ve 5 µg/ml) antijen, farklı konsantrasyonlarda (1:100 ve 1:200) serum ve yine farklı konsantrasyonlarda (1:750; 1:1000; 1:1500 ve 1:2000) antikor denemeleri yapıldı. Leishmaniasise karşı IgG antikor varlığı incelenen 343 adet donör kan serumunun incelenmesinde optimize ettiğimiz ELISA kullanıldı. *L. infantum*

antijenleri ile çalışılan örneklerin 9'unda (% 2.6) ve *L. tropica* antijenleri ile çalışılan örneklerin 5'inde (% 1.5) IgG tipi antikor pozitif olarak tespit edildi (Çizelge 4.8 ve 4.9).

Çizelge 4.8 Donör serum örneklerinin pozitif ve negatif dağılımı (ELISA)



Çizelge 4.9 Donör serum örneklerindeki IgG tipi antikor varlığının farklı antijenlere göre pozitiflik dağılımı (%)



Çizelgelerden de görüldüğü gibi 343 donör örneğine hazırladığımız *L. infantum* ve *L. tropica* antijenleri kullanılarak ELISA uygulanırken, *L. donovani* içeren ticari ELISA kiti ancak 138 donör örneğine uygulanmıştır.

Elde edilen ELISA sonuçlarına göre 9 donörde *L. infantum* antijenine karşı; 5 donörde *L. tropica* antijenine karşı ve 1 donörde de *L. donovani* antijenine karşı antikor varlığı tespit edilmiştir. Ayrıca sadece 1 donörde de hem *L. infantum* hem de *L. donovani* karşı antikor varlığı belirlenmiştir. Bu durum laboratuvarımızda kendimizce hazırlanan antijenlerle uygulanan ELISA yönteminin ticari alınan ELISA kitinden daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca kitte kullanılan antijenin ülkemiz için endemik olmayan bir türden elde edilmesi nedeniyle böyle bir tablonun ortaya çıktığı da düşünülmesi gereken bir gerçektir.

4.3.3 ICT İncelemesi

Çeşitli yöntemlerle (yayma, MKY, IFAT ve ELISA) incelenen 343 donör örneğinde *Leishmania*'ya göre pozitif olan (26) ve ayrıca rastlantısal olarak seçilen (112) toplam 138 örneğin serumları rK39 antijenine özgün kalazar tespitine dayalı hızlı test (Dipstick-Kalazar Detect™ Rapid Test) uygulandı. İncelenen 138 örnekten yalnız birinde (1) ICT ile *Leishmania*'ya karşı antikor varlığı pozitif tespit edildi. Bu pozitif çıkan örnek aynı zamanda diğer yöntemlerle (yayma, MKY, IFAT ve ELISA) de pozitif olduğu saptanmıştır. Böylece ticari olarak ICT donörlerde önerilmemesine rağmen bir donörde pozitiflik saptandı.



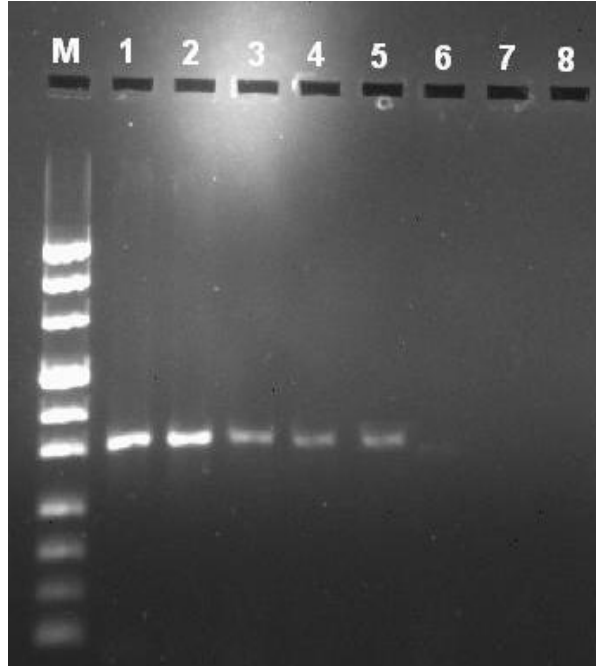
Şekil 4. 6 ICT ile pozitif çıkan donör serum örneği

4.4 Moleküler Yöntem Sonuçları

4.4.1 PCR İncelemesi

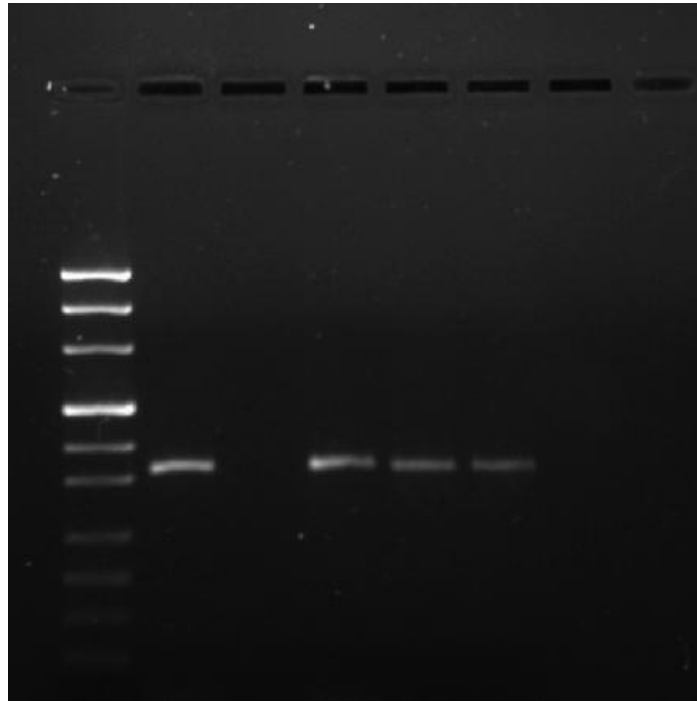
Leishmaniasisin tanısında moleküler yöntemlerden PCR kullanılmasına rağmen; bu yöntemin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi yöntemin duyarlılığının parazit sayısına bağlı olmasıdır. Ayrıca PCR'ın parazit sayısına bağlı olarak duyarlılık konusundaki bilgiler oldukça yetersizdir. Literatürde donör kan örneklerinde PCR'ın duyarlılığının yüksek olmaması konusundaki bilgiler göz önüne alınarak çalışmamamızın bu bölümünde öncelikle kültür ortamından elde edilen parazitlerin sayısına göre PCR duyarlılığı incelendi.

PCR'ın parazit sayısına göre duyarlılığının belirlemek için, çalışmalarımızda öncelikle laboratuvarımızda sürekli kültürü yapılan *L. infantum* suşundan örnekler alınıp ortamda 1 parazit olana kadar seyreltmeler yapıldı. (10^7 ; 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10 ve 1). Daha sonra ise yapılan tüm seyreltmelerde deneysel kısımda açıklandığı gibi DNA izolasyonu yapıldı.



Şekil 4. 7 PCR Yönteminin parazit sayısına bağlı olarak duyarlılığı
M, Marker; 1, 10^6 parazit (p); 2, 10^5 p; 3, 10^4 p 4, 10^3 p; 5, 10^2 p; 6, 10 p; 7, 1 p; 8, Negatif Kontrol

Elde edilen sonuçlar PCR yönteminin duyarlılığının en az 100 parazit için olduğunu gösterdi. PCR Yönteminin parazit sayısına bağlı olarak duyarlılığı şekil 4.7’de gösterilmiştir. Çalışmanın daha sonraki aşamasında, uyguladığımız bu PCR yöntemi, çeşitli yöntemlerle (MKY, yayma, IFAT ve ELISA) pozitif olan donör örneklerine uygulandı. Bu amaçla, PCR’ın yapılması için örnekler mikro kültürü yapılan kapiler tüplerden izole edildi. 343 donör örneğinde *Leishmania*’ya göre pozitif olan (26) ve ayrıca rastlantısal olarak seçilen (28) toplam 54 örneğe PCR uygulandı. İncelenen 54 donörün UV ışığı altında yapılan görüntülemesinde yalnız 3’ünde *Leishmania*’ya özgü DNA bantları görüldü ve pozitif kabul edildi.



Şekil 4. 8 MKY pozitif olan örneklerden elde edilmiş PCR pozitif çıkan örnekler

4.5 Donör Kanlarında Leishmaniasise Göre Pozitif Elde Edilen Sonuçların Karşılaştırılması

Daha önceki bölümlerde de belirtildiği gibi tüm donör örnekleri (343) mikro kültür, yayma, IFAT ve ELISA yöntemleri kullanılarak incelendi. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 MKY, Yayma, IFAT ve ELISA uygulanan örneklerin sonuçları

Donör Örnekleri	MKY	Yayma	IFAT (1/128)				ELISA	
			<i>L. infantum</i>		<i>L. tropica</i>		<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>
			IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	
Pozitif	15 %4,37	4 %1,17	7 %2,04	6 %1,75	3 %0,87	3 %0,87	9 %2,62	5 %1,46
Negatif	328	339	336	337	340	340	334	338
Toplam	343	343	343	343	343	343	343	343

Çizelgeden de görüldüğü gibi MKY ile 15, yayma ile 4, IFAT (*L. infantum*) ile IgG 7 ve IgM 6, IFAT (*L. tropica*) ile IgG ve IgM 3, ELISA (*L. infantum*) 9 ve ELISA (*L. tropica*) 5 örnek *Leishmania* pozitif olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında ise tanı değerine göre pozitif çıkan 26 donör örneğinin her biri farklı yöntemlerle (NNN agar, ICT ve PCR) kıyaslanarak incelendi. Buna göre, en az bir yöntem ile *Leishmania* parazitleri tespit edilen 26 donör örneği çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11 En az bir yöntem ile *Leishmania* parazitleri tespit edilen donör örnekleri

Sıra No	Donör No	Yayma	NNN Agar	MKY	IFAT (1/128)	ELISA	ICT	PCR
1	1	+	+	+	+	+	-	+
2	27	-	-	+	+	-	-	-
3	63	-	-	-	+	+	-	-
4	71	-	-	-	-	+	-	-
5	73	-	-	+	+	+	-	+
6	74	-	-	-	+	+	-	-
7	83	-	-	-	+	-	-	-
8	84	-	-	-	+	+	-	-
9	89	-	-	-	+	+	-	-
10	100	-	-	-	-	+	-	-
11	106	-	-	+	-	-	-	-
12	116	-	-	+	-	-	-	-
13	124	-	-	-	+	+	-	-
14	126	-	-	+	-	-	-	-
15	137	-	-	+	-	-	-	-
16	145	-	-	+	-	-	-	-
17	147	-	-	+	-	-	-	-
18	149	-	-	-	-	+	-	-
19	157	-	-	+	-	-	-	-
20	161	-	-	-	+	+	-	-
21	176	+	-	+	+	+	-	-
22	180	-	-	-	+	-	-	-
23	188	-	-	+	+	-	-	-
24	202	+	-	+	+	+	+	-
25	296	+	-	+	-	-	-	+
26	307	-	-	+	+	+	-	-
Toplam		4	1	15	15	14	1	3

Çizelgeden görüldüğü gibi pozitif çıkan her bir donör örneği uygulanan yöntemle göre değişmektedir. Bu durumda hangi yöntemin daha duyarlı olduğundan bahsetmek mümkün değildir. Bu nedenle uygulanan yöntemlerden hangisinin daha duyarlı olduğunu belirlemek amacıyla 343 donörde kullanılan her bir yöntem (yayma, MKY, IFAT ve ELISA) temel alınarak diğer yöntemlerle (NNN agar, ICT ve PCR) kıyaslandı.

4.5.1 Mikro kültür yöntemi ile *Leishmania* pozitif olan örneklerin diğr yöntemler ile karşılaştırılması

MKY ile *Leishmania* pozitif olan örneklerin diğr yöntemler ile karşılaştırılması izelge 4.12’de verilmiştir. Buna göre 343 donör örneğinin 15’i mikro kültür yöntemine göre pozitif çıkmıştır. Bu donörlerden 8’i sadece MKY ile pozitiflik gösterirken, diğr 7’si mikro kültür yöntemine ek olarak başka yöntemlerle de onaylanmıştır. Ayrıca bu 7 donör ayrıntılı olarak incelendiğinde; 1 no’lu donör beş yöntemle (yayma, NNN agar, IFAT, ELISA ve PCR); 202 no’lu donör dört yöntemle (yayma, ICT, IFAT ve ELISA); 73 no’lu donör  yöntemle (IFAT, ELISA ve PCR); 176 no’lu donör  yöntemle (yayma, IFAT ve ELISA); 296 no’lu donör iki yöntemle (yayma ve PCR) ve 307 no’lu donör iki yöntemle (IFAT ve ELISA) 27 ve 188 no’lu donörler ise sadece IFAT ile pozitif olarak değrlendirilmiştir.

Çizelge 4.12 Mikro kültür ve Yayma yöntemi ile *Leishmania* pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Sıra No	Donör No	MKY	Yayma	NNN Agar	ICT	ELISA			IFAI (1/128)				PCR
						L. infantum	L. tropica	L. donovani	L. infantum		L. tropica		
									IgG	IgM	IgG	IgM	
1	1	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	
2	27	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	
3	73	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	
4	106	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	116	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	126	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	137	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	145	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	147	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	157	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	176	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	
12	188	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
13	202	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	
14	296	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
15	307	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	
Toplam		15	4	1	1	5	0	1	7		1	3	

4.5.2 IFAT Yöntemi ile VL ve KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

IFAT Yönteminde *L. infantum* antijeninin kullanılması ile pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması çizelge 4.13'de verilmiştir. Buna göre 343 donör örneğinin 10'u IFAT (*L. infantum*) pozitif çıkmıştır. Bu donörlerden 2'si sadece IFAT yöntemi ile pozitiflik gösterirken, diğer 8'i IFAT yöntemine ek olarak başka yöntemlerle de onaylanmıştır. Ayrıca bu 8 donör ayrıntılı olarak incelendiğinde; IFAT yöntemine ek olarak; 1 no'lu donör beş yöntemle (yayma, NNN agar, mikro kültür, ELISA ve PCR); 202 no'lu donör dört yöntemle (yayma, ICT, mikro kültür ve ELISA); 73 no'lu donör üç yöntemle (mikro kültür, ELISA ve PCR); 176 no'lu donör üç yöntemle (yayma, mikro kültür ve ELISA); 307 no'lu donör iki yöntemle (mikro kültür ve ELISA); 27 ve 188 no'lu donörler sadece mikro kültür yöntemiyle ve 161 no'lu donör de sadece ELISA yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir.

IFAT Yönteminde *L. tropica* antijeninin kullanılması ile pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması çizelge 4.14'de verilmiştir. Buna göre 343 donör örneğinin 6'sı IFAT (*L. tropica*) pozitif çıkmıştır ve bu donörlerin 6'sı da başka yöntemlerle onaylanmıştır. Ayrıca bu 6 donör ayrıntılı olarak incelendiğinde, IFAT yöntemine ek olarak; 27 no'lu donör sadece MKY ile; 63, 74, 84, 89 ve 124 no'lu donörler ise sadece ELISA yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.13 IFAT ile VL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Sıra No	Donör No	IFAT (1/128)		ELISA		MKY	Yayma	NNN Agar	PCR	ICT
		<i>L. infantum</i> IgG	<i>L. infantum</i> IgM	<i>L. donovani</i> IgG	<i>L. infantum</i>					
1	1	+	+	-	+	+	+	+	+	-
2	27	-	+	-	-	+	-	-	-	-
3	73	-	+	+	+	+	-	-	+	-
4	83	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	161	-	+	-	+	-	-	-	-	-
6	176	+	+	-	+	+	+	-	-	-
7	180	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	188	+	-	-	-	+	-	-	-	-
9	202	+	+	-	+	+	+	-	-	+
10	307	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Toplam		10		1	1	7	3	1	2	1

Çizelge 4.14 IFAT ile KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Sıra No	Donör No	IFAT (1/128)		ELISA		ICT	Yayma	NNN Agar	MKV	PCR
		<i>L. tropica</i>	IgG	<i>L. tropica</i>	IgM					
1	27	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2	63	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	74	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	84	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5	89	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6	124	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Toplam	6	6	5	0	0	0	1	0		

4.5.3 ELISA Yöntemi ile VL ve KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

ELISA Yönteminde *L. infantum* ve *L. donovani* antijeninin kullanılması ile pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması çizelge 4.15’de verilmiştir. Buna göre 343 donör örneğinin 9’u ELISA (*L. infantum*, *L. donovani*) ile pozitif çıkmıştır. Bu donörlerden 3’ü sadece ELISA yöntemi ile pozitiflik gösterirken, diğer 6’sı ELISA yöntemine ek olarak başka yöntemlerle de onaylanmıştır. Ayrıca bu 6 donör ayrıntılı olarak incelendiğinde; ELISA yöntemine ek olarak; 1 no’lu donör beş yöntemle (yayma, NNN agar, mikro kültür, IFAT ve PCR); 202 no’lu donör dört yöntemle (yayma, ICT, mikro kültür ve IFAT); 73 no’lu donör üç yöntemle (mikro kültür, IFAT ve PCR); 176 no’lu donör üç yöntemle (yayma, mikro kültür ve IFAT); 307 no’lu donör iki yöntemle (mikro kültür ve IFAT) ve 161 no’lu donör ise sadece IFAT yöntemi ile pozitif olarak değerlendirilmiştir.

ELISA Yönteminde *L. tropica* antijeninin kullanılması ile pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması çizelge 4.16’de verilmiştir. Buna göre 343 donör örneğinin 5’i ELISA (*L. tropica*) ile pozitif çıkmıştır ve bu donörlerin 5’i de IFAT yöntemiyle onaylanmıştır.

Çizelge 4.15 ELISA ile VL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Donör No	Sıra No	ELISA		IFAT (1/128)	ICT	Yayma	NNN Agar	MKV	PCR
		<i>L. donovani</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>					
1	1	-	+	+	-	+	+	+	+
63	2	-	-	-	-	-	-	-	-
71	3	-	+	-	-	-	-	-	-
73	4	+	+	-	-	-	-	+	+
100	5	-	+	-	-	-	-	-	-
149	6	-	+	-	-	-	-	-	-
161	7	-	+	-	-	-	-	-	-
176	8	-	+	+	-	+	-	+	-
202	9	-	+	+	+	+	-	+	-
307	10	-	+	+	-	-	-	+	-
Toplam		9		4	1	3	1	5	2

Çizelge 4.16 ELISA ile KL etkenine karşı pozitif olan örneklerin diğer yöntemler ile karşılaştırılması

Donör No	Sıra No	ELISA	IFAT (1/128)	ICT	Yayma	NNN Agar	MKY	PCR
		<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>					
63	1	+	+	-	-	-	-	-
74	2	+	-	-	-	-	-	-
84	3	+	+	-	-	-	-	-
89	4	+	-	-	-	-	-	-
124	5	+	+	-	-	-	-	-
Toplam		5	3	0	0	0	0	0

4.6 İstatistiksel Değerlendirme

Tüm donörlere uygulanan serolojik (IFAT ve ELISA) ve parazitolojik (Yayma ve MKY) yöntemlerden en az bir yöntemle göre pozitiflik saptanan donörlerin laboratuvar tanı testlerinden elde edilen sonuçlar arasındaki ilişki istatistiksel olarak Pearson'ın bağımsız ki-kare testi ve Kappa tutarlılık testi ile tespit edildi ve p değerleri <0.05 anlamlı kabul edildi. Kappa (κ) istatistik tanı yöntemleri arasındaki uyumluluğunun değerlendirmesinde kullanıldı. Kappa değeri= 0.00-0.40 ise zayıf, 0.41-0.80 ise orta, 0.81- 1.00 ise iyi (mükemmel) uyumluluk olarak sınıflandırıldı.

Çalışılan 343 donörün yirmi altısı (% 7.58) parazitolojik ve serolojik yöntemlerin en az biri ile pozitif olarak tespit edildi. En az bir yöntem ile pozitif veren bu sonuçlara göre 26 donörün muhtemelen enfekte olduğu kabul edilerek yapılan değerlendirmede; asemptomatik leishmaniasisi tespit etmede yöntemlerin hassasiyeti MKY için % 58, yayma için % 15, NNN agar için % 4, PCR için % 11 ve ICT için % 4 olarak hesaplandı. Ayrıca IFAT-L. infantum için % 38 ile IFAT-L. tropica için % 23 ve ELISA-L. infantum için % 35 ile ELISA-L. tropica için % 19 duyarlılık belirlendi (Çizelge 4. 17).

Farklı yöntemler ile elde edilen sonuçların (pozitif-negatif) MKY, yayma, IFAT ve ELISA yöntemlerinin ikili karşılaştırması ile anlamlı bir ilişkinin ortaya çıktığı görüldü (Pearson testi, her biri için $p<0.001$) (Çizelge 4. 18).

Tanısal olarak ikili test değerlendirmelerinde yayma ile MKY testlerinde kappa katsayısının orta güçte ($\kappa = 0.41$) bir bağıntı olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde IFAT ile MKY için yine orta güçte ($\kappa = 0.442$) bir bağıntı görülmüştür. Ancak yayma ve IFAT için ($\kappa = 0.303$); ELISA ile MKY için ($\kappa = 0.303$); yayma ve ELISA için ($\kappa = 0.321$) oranlarında zayıf bir bağıntı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte serolojik yöntemler olan IFAT ve ELISA için oranın son derece iyi ($\kappa =0.703$) olduğu görülmüştür (çizelge 4.18) .

Çizelge 4.17 Donör örneklerine uygulanan farklı tanı yöntemlerinin sonuçları: yöntemlerin duyarlılığı

Kan Donörleri		Pozitif donör sayısı / Negatif donör sayısı									
Toplam çalışan	Enfekte olmuş ^a	IFAT			ELISA		Yayma	MKY	NNN Agar	PCR	ICT
		<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>						
343	26	10/343	6/343	9/343	5/343	4/343	15/343	1/85 ^c	3/54 ^d	1/138 ^c	
Yöntemin Duyarlılığı ^b		10/26	6/26	9/26	5/26	4/26	15/26	1/26	3/26	1/26	
		%38	%23	%35	%19	%15	%58	%4	%11	%4	

^a En az bir yöntem ile pozitif çıkan donör sayısı enfekte kabul edildi

^b Duyarlılık = pozitif donör sayısı / kabul edilen toplam enfekte donör sayısı X 100

^c Çalışılan örnek sayısı belirtildi

^d PCR, MKY çalışan kapiler tüplerde

Çizelge 4.18 Çeşitli tanı yöntemleri ile elde edilen (pozitif-negatif) sonuçların istatistiksel analizi

	MKY (P)	MKY (N)	Pearson's Ki-Kare	KAPPA	
Yayma	D	D	p	χ ²	
				κ	
	(P)	4	0	<0.001	88,499
	(N)	11	328		0,41
IFAT	(P)	7	8	<0.001	67,094
	(N)	8	320		0,442
ELISA	(P)	5	10	<0.001	31,458
	(N)	10	318		0,303
Yayma	IFAT (P)	IFAT (N)	Pearson's Ki-Kare	KAPPA	
	D	D	p	χ ²	
				κ	
	(P)	3	1	<0.001	48,274
	(N)	12	327		0,303
ELISA	(P)	11	3	<0.001	192,148
	(N)	4	325		0,748
Yayma	ELISA (P)	ELISA (N)	Pearson's Ki-Kare	KAPPA	
	D	D	p	χ ²	
				κ	
	(P)	3	1	<0.001	51,992
	(N)	11	328		0,321

D: Donör Sayısı; N: Negatif; P: Pozitif; κ: Kapa katsayısı; p: Olasılık Değeri

D: Donör Sayısı; N: Negatif; P: Pozitif; κ : Kapa katsayısı; p: Olasılık Değeri

4.7 Tartışma

Leishmaniasis, klinik ve epidemiyolojik açıdan ciddi bir halk sağlığı problemi olarak önemini korumaktadır. Dünya’da 12 milyon kişinin *Leishmania* ile enfekte olduğu, 350 milyona yakın kişinin ise bu hastalığa yakalanma riski altında olduğu bilinmektedir [1, 5]. Türkiye’de ise yaklaşık 20 milyon kişi bu enfeksiyonun tehdidi altındadır [12]. Leishmaniasis insanlara enfekte kum sineğinin (tatarcığın) kan emmesi ile bulaşmaktadır [8, 21]. Fakat leishmaniasisin vektör aracılığı dışında diğer yollarla; kan nakliyle [8, 22-27, 169, 170] laboratuvar kazalarıyla [28, 29], cinsel ilişki ile [8, 30], anne karnında bebeğe [31], *Leishmania* ile enfekte hamsterın ısırganıyla [32] ve organ transplantasyonu [8, 33] ile bulaştığı rapor edilmiştir. Son yıllarda rejeneratif tıp açısından önemli olan kök hücre transplantasyonlarına ilgi giderek artmaktadır. Ayrıca hücre transplantasyonu ile çeşitli enfeksiyon etkenlerinin yanında laboratuvarımızda yapılan bir çalışma ile *Leishmania* parazitlerinin de bulaşabildiği rapor edilmiştir. Ancak *Leishmania*’nın bulaşmasının en önemli nedenlerinden biri de donör kanı aracılığıyla hastalığın yayılmasıdır. Ayrıca kan bankalarında depo edilen kanların uzun süre saklanmasıyla da *Leishmania* parazitlerinin canlılık ve enfektifliklerini korudukları gösterilmiştir [8, 37, 38]. Donör kanı aracılığıyla hastalığın bulaşması sadece epidemiyolojik açıdan değil aynı zamanda kan alıcılarının sağlığı için de hayati önem taşımaktadır.

Leishmaniasisin epidemiyolojisinde donör kanlarının önemini belirlemek amacıyla dünyada farklı endemik bölgelerde donör kanları üzerine yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Türkiye’de ise asemptomatik leishmaniasise karşı donör kanları ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Donör kanlarındaki *Leishmania* parazitlerinin kaynağı asemptomatik leishmaniasisli hastalardır. Asemptomatik leishmaniasis, periferik kanda parazit dolaşımının bulunduğu ancak tespit edilemeyen, hiçbir klinik veya hematolojik değişiklik bulunmayan asemptomatik (subklinik) periyot ile başlar. Non-endemik bölgelerde de asemptomatik leishmaniasis bulgularına rastlandığı bilinmektedir [171]. Asemptomatik enfeksiyonun sebebi parazitin virulanslığı veya hastanın hücresel immün sistemine bağlı olabilir. Bazen de klinik iyileşme sağlandıktan sonra parazitlerin hala vücutta kalarak asemptomatik olarak devam ettiği gösterilmiştir [2, 9, 89]. VL’nin

kan transfüzyonu ile bulaşması, İngiltere, Belçika, Fransa, Hindistan'ın endemik olmayan bölgelerindeki yurtdışı seyahat geçmişi bulunmayan bireylerde de belirlenmiştir [2, 41, 45]. Aseptomatik bireyler yıllarca hastalık taşıyıcısı olabilirler [96]. Hatta aseptomatik *Leishmania*'nın inkübasyon süresinin 30 yıla kadar çıkabildiği rapor edilmiştir [8, 97, 98]. Dünya sağlık örgütünün açıklamalarına göre, semptomatik olarak ilerleyen hastaların sayısı, aseptomatik bireylerin sadece % 5–20'sini oluşturmaktadır [9]. Bunun nedeni mevcut tanı yöntemlerinin yetersizliğidir. Leishmaniasisin tanısı hastalığın klinik semptomlarına bağlı olup, antileishmanial antikor titreleri veya hastadan elde edilmiş çeşitli örneklerde parazitin tespit edilmesine dayalıdır. Ancak aseptomatik leishmaniasisli kişilerde antikor titreleri ve örneklerde parazit sayısının düşük olmasından dolayı mevcut tanı yöntemlerinin duyarlılığı oldukça düşüktür [172]. Buna göre de aseptomatik leishmaniasisin tespit edilmesinde duyarlılığı daha yüksek, yeni yöntemlere acilen ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda semptomatik leishmaniasis tanısında oldukça yüksek duyarlılığa sahip olan ve halen dünyanın çeşitli bölgelerinde uygulanan MKY'nin aseptomatik leishmaniasis, özellikle de donör kanlarındaki duyarlılığına ait herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada ilk kez olarak MKY ile leishmaniasis tanısında kullanılan diğer yöntemler (yayma, IFAT, ELISA) kıyaslanmıştır.

Mikroskopik yöntemde klinik açıdan leishmaniasisten şüpheli kişilerde iç kanama gibi önemli riskler taşıyan invaziv yöntemlerle elde edilen örneklerde *Leishmania* parazitlerinin amastigot formunun görülmesi ile tanı konulmakta ve duyarlılığın % 50-60 olduğu bilinmektedir [173]. Ayrıca mikroskopik tanıda araştırmacının yeteneği, deneyim ve eğitimi oldukça önemlidir. Ancak bizim çalışmamızda mikroskopik inceleme için örnekler direk kan ve buffy coat katmanından hazırlanarak incelendi. Sonuçlar buffy coat yönteminin direk kana göre daha duyarlı olduğunu gösterdi. Ancak kullandığımız her iki yöntemle göre incelenen donör örneklerinin % 1.16'sında pozitiflik görüldü. Literatürde yapılan bir çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak mikroskopik inceleme Hindistan'ın Bihar endemik bölgesinde aseptomatik sağlıklı kişilerde periferik kanlardan hazırlanan yaymalar incelenmiştir. İncelenen 450 kişinin 6'sının (% 1.3) *Leishmania*'ya göre pozitif olduğu saptanmıştır [44]. Elde ettiğimiz sonuçlar non-endemik bölgede yapılmasına rağmen endemik bölge ile benzerlik

göstermiştir. Ancak mikroskopik yöntemin her iki bölge için duyarlılığının oldukça düşük olduğu görülmüştür.

Leishmaniasisin tanısında antikorların tespit edilmesi temeline dayanan serolojik yöntemlerde çok kullanılmaktadır. Serum örneklerinde spesifik *Leishmania* antikorlarının belirlenmesi amacıyla jel difüzyon, IHA, IFAT [174], ELISA [175], DAT [176], ICT, kompleman fiksasyon, karşı akımlı immünoelektroforezi ve western blotting analizi [177, 178] gibi pek çok serolojik test kullanılmaktadır [136]. Ancak serolojik testler enfeksiyonun ilk ayları boyunca negatif de olabilmektedirler. Kullanılan testin duyarlılığının % 95 ile % 100 arasında olduğu, ancak asemptomatik kişilerde humoral immün cevabın da düşük olduğu gösterilmiştir [179]. Serolojik çalışmalarda asemptomatik enfeksiyon prevalansı % 2,4 ile 17 arasında değiştiği bilinmektedir [180-183]. Biz ise çalışmamızda serolojik yöntemlerden yaygın olarak kullanılan IFAT, ELISA ve ICT yöntemlerini kullandık. IFAT ve ELISA yöntemlerinde hem VL (*L. infantum*) hem de KL (*L. tropica*) etkeni olan suşlar kullanıldı. IFAT ile incelenen 343 donör kan örneğinde tanı değeri kabul edilen 1/128 seyreltmede *L. infantum* antijenine karşı 10 donörde (% 2.9) antikor tespit edilirken, *L. tropica* antijenine karşı 6 donörde (% 1.74) antikor tespit edilmiştir. Ayrıca IFAT ile IgG ve IgM antikoruna karşı yapılan değerlendirmede; *L. infantum* antijeni kullanıldığında IgG ve *L. tropica* antijeni kullanıldığında IgM antikoru daha çok pozitiflik verdiği görülmüştür.

ELISA ile incelenen 343 donör kan örneğinde *L. infantum* antijenine karşı 9 donörde (% 2.62) antikor tespit edilirken, *L. tropica* antijenine karşı 5 donörde (% 1.45) antikor tespit edilmiştir. ICT ile incelenen 138 donörün ise 1'inde pozitiflik (% 0.7) görülmüştür. Böylece serolojik çalışma sonuçları incelendiğinde donör kan örneklerinde antikor varlığı (% 0.7-2.9) saptandı. Alınan sonuçların literatürde endemik bölgelerde yapılan çalışmalar ile benzerlik gösterdiği görüldü. Ancak yapılan diğer çalışmalarda bizim çalışma sonuçlarımızda IFAT ve ELISA yöntemlerinin duyarlılığının düşük olduğu görüldü. Literatürde ICT yönteminin donör kan örneklerinde kullanımı uygun görülmemektedir. Bizim yaptığımız çalışmada ICT'nin % 0.7 pozitiflik verdiği görüldü. Bu ise, duyarlılığı çok düşük olsa bile kolay uygulanabilirliği nedeniyle diğer yöntemlerin kullanılmasının mümkün olmadığı durumlarda bu yöntemin kullanılmasının mümkün olduğunu göstermektedir.

Serolojik yöntemlerin semptomatik hastalarda yüksek spesifiklik ve duyarlılığa sahip olmasına rağmen, asemptomatik insan ve hayvanlarda oldukça düşük duyarlılığa sahip olmaları ve donör kanlarında antikor titresinin düşük olması nedeniyle çok fazla tercih edilmemektedirler [48, 135, 136]. Ayrıca, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli değildir. Eski ve yeni olguları tam olarak ayıramayabilir. Diğer patojenlerle çapraz reaksiyonlar verebilir.

Leishmaniasisin tanısında kullanılan diğer spesifik yöntemlerden birisi PCR'dır. Bu yöntemin şimdiye kadar yapılan çalışmalarda duyarlılığının en fazla semptomatik leishmaniasis de görüldüğü ve asemptomatik sağlıklı bireylerde ise semptomatiklere göre daha düşük olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda PCR yöntemi ile donör kan örneklerinde parazitlerin varlığını belirlemeden önce kullandığımız PCR yönteminin duyarlılığı parazit sayısına göre belirlendi. Buna göre PCR'ın duyarlılığının 100 parazit ve üzerinde olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle deneylerimizde PCR yöntemi mikro kültür yapılmış örnekler ile çalışıldı. PCR çalışılan 54 örnekten 15'i mikro kültür yöntemi ile pozitif olmasına rağmen PCR ile bu örneklerin sadece 3'ü pozitif çıkmıştır. Diğer mikro kültür negatif olan donörlerin (39) hiç birinde ise PCR'ın pozitif olduğu görülmemiştir. Bu durum iki farklı yönden açıklanabilir. Birincisi MKY pozitif olan örneklerde PCR'ın duyarlılığının düşük olması, incelenen örneklerde promastigot sayısının 100'ün altında olduğunu göstermektedir. İkincisi ise MKY ile negatif olan örneklerde ise PCR'ın pozitif olmaması MKY'nin PCR'a göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Öyleki MKY pozitif örneklerinden farklı olarak yaklaşık 3 kat olan MKY negatif olan örneklerden hiç birinin, PCR'ı pozitif değildir. MKY ile ise, kültür ortamında bir parazit bulunduğunda bile pozitif tanı konulabilmektedir. Böylece yaptığımız çalışma sonuçları PCR yönteminin duyarlılığının MKY ile elde edilen sonuçları destekleme gücüne sahip olamadığını net bir şekilde göstermektedir. Parazit sayısına bağlı olarak PCR duyarlılığı ile ilgili çalışma sonuçları PCR'ın duyarlılığının ancak 100 ve üzeri olduğu durumlarda uygulanabileceğini göstermiştir.

Literatürde donör kan örneklerinde leishmaniasise göre PCR uygulanmasında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalar bizim çalışmalarımızdan farklı olarak endemik bölgelerde yapılmıştır. Çalışmalarımızdaki düşük pozitifliğin nedeni olarak non-endemik bölgede çalışılması ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca

genellikle moleküler tekniklerde parazitin az miktarda veya atipik morfolojide bulunması, kültür yöntemindeki kontaminasyon riski gibi nedenler, *Leishmania* parazitlerinin saptanmasında güçlükler neden olabildiği bilinmektedir [28, 59]. Bunlara ek olarak PCR'ın pahalı, uygulanmasının zor ve ölü parazit varlığında da yanlış pozitiflik vermesi gibi dezavantajları da bilinmektedir.

Çalışmanın son aşamasında donör kan örneklerinde parazitleri tayin etmek için klasik ve mikro kültür yöntemleri kullanıldı. Literatürde klasik kültür yönteminin duyarlılığı ile ilgili yapılan çalışmalarda semptomatik leishmaniasisli hastalarda invaziv yöntemlerle elde edilen örnekler kullanıldığında yöntemin duyarlılığının % 61-75 aralığında olduğu [184, 185] saptanırken asemptomatik leishmaniasiste ise duyarlılığın % 0.4-4.4 aralığında olduğu gösterilmiştir [8, 40]. Kültür yöntemlerinin en büyük avantajı mikroskopik olarak gözlemlenebilen hareketli promastigotların tespitine dayanmasıdır. Ancak yöntemin en büyük dezavantajı örnekteki parazit yoğunluğuna bağlı olması ve kültür takibinin uzun sürmesidir. Hatta asemptomatik leishmaniasis örneklerinde 6 aya kadar beklenen çalışmalar bilinmektedir [2, 39, 40].

Yaptığımız çalışmada da klasik kültür yönteminin duyarlılığı % 4 olarak bulunmuştur ve elde edilen bu sonuçlar dünyanın *Leishmania*'ya göre çeşitli endemik bölgelerinde yapılan çalışmalarla uygunluk göstermektedir (% 0.4-4.4).

Son yıllarda Allahverdiyev ve arkadaşları [51] tarafından geliştirilen mikro kültür yöntemi ile VL ve KL olgularının tanısında yüksek duyarlılık ve spesifiklik olduğu gösterilmiştir. Klasik kültür yönteminden farklı olarak yöntemin örnekteki parazit sayısına ve kültürde kullanılan besiyerine bağlı olmadığı negatif olan kişilerde bile pozitif sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Kan örneklerinde yöntemin yayma pozitiflerde duyarlılığı % 100 olurken, yayma negatiflerde duyarlılığın yine % 100 olduğu gösterilmiştir [6].

Ayrıca önerilen bu yöntem Türkiye'de ve dünyanın diğer bölgelerinde leishmaniasisten şüpheli hastalarda uygulanmış ve diğer yöntemlere nazaran yüksek duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir [52, 113, 114, 124, 125]. Yöntemin klasik kültürden farklı olarak parazit sayısına bağlı olmaması ve çok kısa sürede (1-5 gün) tanı konulabilmesi, çok ekonomik olması ve yüksek duyarlılığı dikkate alınarak şimdiye kadar donör kanlarında kullanılmayan MKY çalışmamızda ilk kez olarak donör kanlarında incelendi. Buna göre

yaptığımız çalışmada 343 donör örneğinin 15'inde (% 4.37) *Leishmania* parazitlerinin hareketli promastigot formu tespit edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada ilk kez olarak asemptomatik sağlıklı donörlerden non-invaziv olarak elde edilen örneklerde parazitlerin yüksek duyarlılığı mikrokültür yöntemi ile tespit edilebilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Böylece elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önceleri klinik açıdan şüpheli olan kutanöz ve visseral leishmaniasisin tanısında kullanılan mikro kültür yönteminin yeni bir potansiyel kullanım alanını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca serolojik tanının da duyarlılığının artırılması için iki suşun birlikte kullanılmasının önemi ilk kez olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar DSÖ tarafından ihmal edilmiş tropikal hastalıklar listesinde yer alan leishmaniasisin dünya genelinde özellikle endemik bölgelerde hem hayvan hem de insanlarda gerçek prevalansının belirlenmesi açısından oldukça önemli olabileceğini düşündürmektedir.

Tezin amacına uygun olarak çalışmamızda kullanılan MKY'nin, kullanılan diğer yöntemler ile kıyaslanması ile duyarlılığı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla temel prensip olarak 343 donörün en az bir yöntemle pozitiflik gösteren sonuçları dikkate alınarak; MKY için % 58, yayma için % 15, NNN agar için % 4, PCR için % 11 ve ICT için % 4 olarak hesaplandı. Ayrıca IFAT-*L. infantum* için % 38 ile IFAT-*L. tropica* için % 23 ve ELISA-*L. infantum* için % 35 ile ELISA-*L. tropica* için % 19 duyarlılık belirlendi (çizelge 4.17).

Elde edilen sonuçlar ilk kez olarak Türkiye'de endemik olmayan bir bölge olan İstanbul'da donör kan örneklerinde MKY'nin yüksek duyarlılıkta olduğunu gösterdi. Ayrıca muhtemelen enfekte olduğu kabul edilen 26 donöre (% 7.58) göre yapılan duyarlılık tayinine göre MKY en yüksek olduğu (% 58), daha sonra ise serolojik yöntemlerden IFAT (% 38) ve ELISA (% 23) yöntemlerin duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak serolojik yöntemlerin duyarlılığının yüksek olduğu bilinse de tanı amaçlı kullanılmasında çapraz reaksiyon vb. gibi problemler çıkardığı da bilinmektedir. Buna karşılık olarak kültür yöntemlerinin mikroskopik olarak parazit tespitine dayanması, serolojik yöntemlere göre daha ucuz ve kolay uygulanabilir olması yöntemi donör kanlarında kullanımının daha avantajlı hale getirmektedir. IFAT ve ELISA yöntemlerinin birbirleri arasında da kappa değerine göre yüksek uyumluluk göstermesi ise ($\kappa = 0,748$) her iki yöntemin korelasyonunu göstermektedir. Mikroskopik olan yayma yöntemi ise

daha spesifik olmasına rağmen asemptomatik leishmaniasiste daha düşük duyarlılık göstermiştir (% 15). PCR ise % 11 duyarlılık göstermiştir.

Ayrıca serolojik sonuçların duyarlılığı tür ayrımı yapılmadan değerlendirildiğinde, çalışmamız önemli bir sonucu ortaya koymuştur. Buna göre; genellikle yapılan çalışmalarda sadece antijen olarak bir tür (VL ya da KL etkeni) kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda ise aynı anda iki türün de kullanılması uygulanan serolojik yöntemin duyarlılığının artmasına neden olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar Türkiye’de VL’ye neden olan etkenin sadece *L. infantum* değil aynı zamanda *L. tropica* veya her iki türün hibrid bir etkenine neden olması ile ilgili düşünceleri desteklemektedir.

Non-endemik bir bölge olan İstanbul Türkiye’nin en kalabalık nüfusuna sahip olan ve halen birçok bölgeden sıcak göç alan ilidir. Yerleşik nüfus dışında tedavi amacıyla diğer şehirlerden de İstanbul’a gelen hastalar olmaktadır. Bu nedenle tarafımızdan laboratuvarımızda donör kanlarında leishmaniasisin tanısı ile ilgili yoğun çalışmalar sürdürülmüş ve bu hastalığın tanısında yeni mikro kültür yönteminin daha hızlı ve daha duyarlı bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Uluslararası düzeyde ilk kez olarak bu yeni yöntemin belirlenmesi % 80 tanısı konulmayan insan sağlığı için tehlikeli olan bu hastalığın tanısında yeni ümitlere yol açacaktır. Ayrıca Çapa Kızılay Kan merkezinden alınan bilgiye göre, en az bir yöntemle pozitif kabul edilen 26 donörün 5’i düzenli kan veren ve bugüne kadar 10-17 kez kan bağışında bulunmuş kişilerdir. Bu konu üzerinde durulması gereken önemli bir halk sağlığı problemidir. Bu nedenle kan bankalarından temin edilen kanlar, kan ihtiyacı olan kişilere verilmeden önce mutlaka leishmaniasise göre kontrol edilmelidir. Kan alıcıları genellikle ameliyat durumu olan ya da kanser ve daha farklı hastalıkları olan kişilerdir. Bu durum asemptomatik leishmaniasis olan donörlerden alınan kanların, bağışıklık sistemi yetersiz olan kan alıcıları için hayati riskler oluşturabileceği gibi önemli bir sorunu da ortaya çıkarmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER**5.1 Sonuç Değerlendirilmesi**

Bu çalışmada ilk kez olarak donör kan örneklerinde, leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler ile son yıllarda geliştirilmiş ve VL şüpheli hastaların tanısında yüksek duyarlılık gösteren ancak şimdiye kadar asemptomatik leishmaniasis veya donör kanlarındaki duyarlılığı bilinmeyen MKY kıyaslanmıştır. Bu amaçla Türkiye’de ilk kez olarak non-endemik bir bölge olan İstanbul’da donör kan örnekleri mikroskopik (yayma), kültür (klasik ve mikro kültür), serolojik (IFAT, ELISA ve ICT) ve moleküler yöntemler (PCR) ile incelendi. Uygulanan yöntemler ile aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

5. Mikroskopik inceleme sonucunda 343 adet donör kan örneğinin dördünde (4) (% 1.16) *Leishmania* parazitleri tespit edildi. Uygulanan buffy coat katmanı ile direk kandan hazırlanan yaymalar kıyaslandığında, buffy coat katmanının daha duyarlı olduğu görüldü.
6. Donör kanlarının klasik ve mikro kültür yöntemleri ile yapılan incelemeleri sonucunda 343 donörden on beş (15) (% 4.37) adet donör pozitif tespit edildi. Bu donörlerden biri (1) hem klasik hem de mikro kültür yöntemi ile pozitif çıkarken, on dördü (14) sadece MKY ile pozitif çıktı.
7. Donör kan örnekleri serolojik yöntemlerden IFAT, ELISA ve ICT ile incelenmiş ve kullanılan farklı *Leishmania* türleri ile aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.
 - IFAT yönteminde antijen olarak *L. infantum* parazitleri kullanıldığında, 1/32 seyreltmede IgG % 15.4 ve IgM % 14.5, 1/64’de IgG % 3.7 ve IgM % 2.6 ve 1/128’de ise IgG % 2 ve IgM % 1.7 pozitiflik gösterirken;

antijen olarak *L. tropica* parazitleri kullanıldığında ise, 1/32 seyreltmede IgG % 11 ve IgM % 9.9, 1/64'de IgG % 2.9 ve IgM % 2.3 ve 1/128'de ise IgG ve IgM'in % 0.8 pozitiflik olduğu görüldü.

- ELISA yönteminde ise kit ve tarafımızca optimize edilen yöntemlerin kullanılması sonucunda IgG antikoruna karşı *L. infantum* antijeni ile % 2.6, *L. tropica* antijeni ile % 1.5 ve *L. donovani* antijeni ile de % 0.7 pozitiflik tespit edildi. Ayrıca sadece 1 donörde de hem *L. infantum* hem de *L. donovani* karşı antikor varlığı belirlendi. Böylece tarafımızca hazırlanan antijenlerle uygulanan ELISA yönteminin ticari alınan ELISA kitinden daha duyarlı olduğunu gösterdi.
- ICT yöntemi ise ticari olarak temin edilen rK39 antijenine özgün kalazar tespitine dayalı ticari hızlı test ile uygulanması sonucunda ise bir (1) donör pozitif olarak tespit edildi.

Serolojik yöntemlerin kıyaslanması sonucunda ICT yönteminin duyarlılığının en düşük IFAT ve ELISA yöntemlerinin ise yüksek olduğu görüldü. *Leishmania* türlerine göre incelemede ise *L. infantum* antijenine karşı antikor pozitifliğinin *L. tropica* antijenine göre daha fazla olduğu görüldü.

8. PCR yöntemi ile incelenen 54 donör örneğinin üçü (3) pozitif olarak tespit edildi.

Uygulanan yöntemler ile 343 donörden 26'sında (% 7. 58) en az bir yöntem ile pozitiflik saptandı. Donör kanlarına uygulanan yöntemlerin duyarlılığı bu pozitif 26 donörün muhtemelen enfekte olduğu kabul edilerek değerlendirildi. Duyarlılığın MKY için % 58, yayma için % 15, NNN agar için % 4, PCR için % 11 ve ICT için % 4 olduğunu gösterdi. Ayrıca IFAT-*L. infantum* için % 38 ile IFAT-*L. tropica* için % 23 ve ELISA-*L. infantum* için % 35 ile ELISA-*L. tropica* için % 19 olduğunu gösterdi. Sonuçlar MKY'nin uygulanan diğer yöntemlerden daha yüksek duyarlılıkta olduğunu gösterdi.

L. infantum ve *L. tropica* antijeni ayrı ayrı kullanıldığında serolojik yöntemlerin duyarlılığının MKY'ne göre daha düşük olduğunu ancak her iki tür sonuçları birlikte değerlendirildiğinde ise MKY ile serolojik yöntemlerin benzer sonuçlar verdiği görüldü. Sonuçlar farklı suşların birlikte kullanılması ile uygulanan serolojik yöntemlerin duyarlılığı arttırdığını gösterdi.

Böylece bu çalışmada ilk kez olarak kan bankalarından elde edilen donör kan örneklerinde leishmaniasis tanısında kullanılan yöntemler ile MKY'nin kıyaslanması sonucunda asemptomatik leishmaniasis ve donör kanlarında leishmaniasisin tanısı için MKY'nin daha duyarlı, daha hızlı ve daha ekonomik olduğu belirlendi.

Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda ilk kez olarak İstanbul gibi non-endemik bir bölgede donör kanlarında *Leishmania* parazitlerinin olduğu görüldü.

5.2 Öneriler

Elde edilen sonuçlara dayanarak öneriler aşağıda belirtilmiştir.

1. Donör kan örneklerinde leishmaniasisin tanısı için ilk aşamada özellikle MKY'nin uygulanması ve pozitif çıkan örneklerin diğer yöntemlerle de desteklenmesi,
2. İstanbul gibi non-endemik olan illerde donör kanlarının leishmaniasise göre incelenmesi,
3. Türkiye'nin non-endemik bölgesinde donör kanlarında *Leishmania* parazitlerinin tespit edilmesi ile leishmaniasise göre endemik olan bölgelerinde de kan bankalarının leishmaniasise göre incelenmesi,
4. Özellikle kan bankalarına düzenli olarak kan veren donörlerin, leishmaniasise göre kesinlikle incelenmesi,
5. İmmün sistemin baskılanmasını gerektiren durumlarda (organ transplantasyonu gibi) kan donörü ve alıcı hastanın kesinlikle leishmaniasise göre incelenmesi gerekmektedir.

Ayrıca gerek *Leishmania* tanısındaki hekim bilgilendirilmelerinin arttırılması, gerekse de kan bankalarındaki kanların leishmaniasise göre taranması gibi düzenlemelerin yapılması amacıyla TC Sağlık Bakanlığının bu sorunu dikkate alması için çalışmalar başlatılmalıdır.

- [1] Organization., W.H., (2010). Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Technical Report Series: 949.
- [2] Riera, C., Fisa, R., Lopez-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jimenez, M., Muncunill, J., Seden, M., Mascaro, M., Udina, M., Gallego, M., Carrio, J., Forteza, A., ve Portus, M., (2008). Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48:1383-1389.
- [3] Wirth, D.F., Rogers, W.O., Barker, R., Jr., Dourado, H., Suesebang, L., ve Albuquerque, B., (1986). "Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis", *Science*, 234:975-979.
- [4] Allahverdiyev, A., Bagirova, M., Koc, R.C., Oztel, O.N., Elcicek, S., Ates, S.C., ve Karaca, T.D., (2010). "Approaches and Problems in Vaccine Development against Leishmaniasis", *Turkiye Parazitoloj Derg*, 34:122-130.
- [5] Cakan, H., Saribas, S., Oz, V., Polat, E., Aslan, M., ve Kocazeybek, B., (2010). "Patients with suspected visceral leishmaniasis in Istanbul", *African Journal of Microbiology Research* 4:103-109.
- [6] Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Uzun, S., Alabaz, D., Aksaray, N., Kocabas, E., ve Koksall, F., (2005). "The value of a new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood", *Am J Trop Med Hyg*, 73:276-280.
- [7] Islam, M.Z., Itoh, M., Mirza, R., Ahmed, I., Ekram, A.R., Sarder, A.H., Shamsuzzaman, S.M., Hashiguchi, Y., ve Kimura, E., (2004). "Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 70:78-82.
- [8] Cardo, L.J., (2006). "*Leishmania*: risk to the blood supply", *Transfusion* 46:1641-1645.
- [9] Romero, H.D., Silva Lde, A., Silva-Vergara, M.L., Rodrigues, V., Costa, R.T., Guimaraes, S.F., Alecrim, W., Moraes-Souza, H., ve Prata, A., (2009). "Comparative study of serologic tests for the diagnosis of asymptomatic visceral leishmaniasis in an endemic area", *Am J Trop Med Hyg*, 81:27-33.

- [10] Dujardin, J.C., Campino, L., Canavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbel, Y., ve Boelaert, M., (2008). "Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis", *Europe. Emerg Infect Dis*, 14:1013-1018.
- [11] Bodur, H., Korkmaz, M., Akıncı, E., Çolpan, A., Sırrı Eren, S., Erbay, A., (2003). "Viseral Layşmanyaz: İki Olgu Bildirisi", *Klimik Dergisi* 2:95-97.
- [12] Uzun, S., Durdu, M., ve Memisoglu, H., (2002). "Yesterday and today of cutaneous leishmaniasis in Turkey (Türkiye'de Kutanöz Leishmaniasis' in dünü, bugünü)", *T Klin J Med Ethics, Law History*, 10:133-138.
- [13] Ok, U.Z., Balcioglu, I.C., Taylan Ozkan, A., Ozensoy, S., ve Ozbel, Y., (2002). "Leishmaniasis in Turkey", *Acta Trop*, 84:43-48.
- [14] Bayırlıoğlu, Ş. (2011). Visseral Leishmaniasis Rezervuarı Olan Köpeklerde Bu Hastalığın Epidemiyolojisinin Real Time-PCR Yöntem ile Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [15] Çakan, H., (2006). Visseral Leishmaniasis Tanısında Karşılaşılan Sorunlar, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- [16] Dilmeç, F., Matur, A., Soner, U., Karakaş, M., ve Hamdi, R., (2004). "Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde deri lezyonlarından izole edilen *Leishmania* sp. DNA'larının restriksiyon endonükleazlarla karşılaştırılması", *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1:21-27.
- [17] Uzun, S., Durdu, M., Culha, G., Allahverdiyev, A.M., ve Memisoglu, H.R., (2004). "Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey", *J Parasitol*, 90:853-859.
- [18] Özkan, A.T., (2003). Leishmaniasis ve Ülkemizdeki Durumu. Aylık Epidemiyoloji Raporu 2:49-51.
- [19] Ertuğrul, M.B., Ertabaklar H., Uyar G., Ertuğ S., ve Sakarya S., (2005). "Bir Olgu Nedeniyle Visseral Leishmaniasis Tanı ve Tedavisinin Tartışılması", *Ankem Derg*, 19:48-51.
- [20] Serin, M.S., Daglioglu, K., Bagirova, M., Allahverdiyev, A., Uzun, S., Vural, Z., Kayar, B., Tezcan, S., Yetkin, M., Aslan, G., Emekdas, G., ve Koksall F., (2005). "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", *Diagn Microbiol Infect Dis*, 53:209-214.
- [21] Roberts, L.J., Handman, E., ve Foote, S.J., (2000). "Science, medicine, and the future: Leishmaniasis". *BMJ*, 321:801-804.
- [22] Mathur, P., ve Samantaray, J.C., (2004). "The first probable case of platelet transfusion-transmitted visceral leishmaniasis", *Transfus Med*, 14:319-321.
- [23] Chung, H., Chow, H., ve Lu, J. (1948). "The first two cases of transfusion kala-azar", *Chin Med J*, 66:325-326.

- [24] Kostman, R., Barr, M., Bengtsson, E., Garnham, P., ve Hult, G., (1963). "Kala-azar transferred by exchange blood transfusion in two Swedish infants", Volume 384.
- [25] Mauny, I., Blanchot, I., Degeilh, B., Dabadie, A., Guiguen, C., ve Roussey, M., (1993). "Visceral leishmaniasis in an infant in Brittany: discussion on the modes of transmission out endemic zones", *Pediatric*, 48:237-239.
- [26] Singh, S., Chaudhry, V.P., ve Wali, J.P., (1996). "Transfusion-transmitted kala-azar in India", *Transfusion*, 36:848-849.
- [27] Kubar, J., Quaranta, J.F., Marty, P., Lelievre, A., Le Fichoux, Y., ve Aueuvre, J.P., (1997). "Transmission of *L. infantum* by blood donors". *Nat Med*, 3:368.
- [28] Sundar, S., ve Rai, M., (2002). "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis", *Clin Diagn Lab Immunol*, 9:951-958.
- [29] Cruz, I., Morales, M.A., Noguer, I., Rodriguez, A., ve Alvar, J., (2002). "*Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users", *Lancet*, 359:1124-1125.
- [30] Symmers, W.S., (1960). "Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain", *Lancet*, 1:127-132.
- [31] Caldas, A.J., Costa, J.M., Gama, M.E., Ramos, E.A., ve Barral, A., (2003). "Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report", *Acta Trop*, 88:39-43.
- [32] Manson-Bahr, P.E.C., (1987). "Diagnosis, Late of Overseas Development Administration", Volume II, (London).
- [33] Meinecke, C.K., Schottelius, J., Oskam, L., ve Fleischer, B., (1999). "Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child", *Pediatrics*, 104:e65.
- [34] Zuk, P.A., (2011). "Viral transduction of adipose-derived stem cells", *Methods Mol Biol* 702:345-357.
- [35] Kotton, C.N., ve Lattes, R. (2009). Parasitic infections in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*, 9 Suppl 4:234-251.
- [36] Allahverdiyev A.M., Bagirova M., Elcicek S., Cakir Koc R., Yesilkir Baydar S., Findikli N., ve Oztel O. N. (2011). "Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis", *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 85:535-539.
- [37] Grogil, M., Daugirda, J.L., Hoover, D.L., Magill, A.J., ve Berman, J.D., (1993). "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.
- [38] Cardo, L.J., Salata, J., Harman, R., Mendez, J., ve Weina, P.J., (2006). "Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside", *Transfusion*, 46:896-902.
- [39] le Fichoux, Y., Quaranta, J.F., Aueuvre, J.P., Lelievre, A., Marty, P., Suffia, I., Rousseau, D., ve Kubar, J., (1999). "Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia

in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France", J Clin Microbiol, 37:1953-1957.

- [40] Riera, C., Fisa, R., Udina, M., Gallego, M., ve Portus, M., (2004). "Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods", Trans R Soc Trop Med Hyg, 98:102-110.
- [41] Otero, A.C., da Silva, V.O., Luz, K.G., Palatnik, M., Pirmez, C., Fernandes, O., ve Palatnik de Sousa, C.B., (2000). "Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors", Am J Trop Med Hyg, 62:128-131.
- [42] Colomba, C., Saporito, L., Polara, V.F., Barone, T., Corrao, A., ve Titone, L., (2005). "Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy)", Transfus Apher Sci, 33:311-314.
- [43] Silva, L.A., Romero, H.D., Nogueira Nascentes, G.A., Costa, R.T., Rodrigues, V., ve Prata, A., (2011). "Antileishmania immunological tests for asymptomatic subjects living in a visceral leishmaniasis-endemic area in Brazil", Am J Trop Med Hyg, 84:261-266.
- [44] Sharma, M.C., Gupta, A.K., Das, V.N., Verma, N., Kumar, N., Saran, R., ve Kar, S.K., (2000). "*Leishmania donovani* in blood smears of asymptomatic persons", Acta Trop, 76:195-196.
- [45] Dey, A., ve Singh, S., (2006). "Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature", Indian J Med Microbiol, 24:165-170.
- [46] Atasoy, A., (2005). Ege Bölgesinde Köpeklerde Visseral Leishmaniasis'in Seroprevalansı, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- [47] Campino, L., Cortes, S., Pires, R., Oskam, L., ve Abranches, P., (2000). "Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction", Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 19:396-398.
- [48] Özbel, Y.T.Ö., (2007). "Leishmaniosis", Volume 1.Baskı, (İzmir: Meta Basım Matbacılık Hizmetleri).
- [49] Özcel, M.A., ve Özbilgin, A., (1995). "Güney Doğu Anadolu Projesini Tehdit Eden Parazit Hastalıkları", (Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi).
- [50] Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Francino, O., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., ve Alberola, J., (2010). "*Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold standard"", Am J Trop Med Hyg, 82:251-256.
- [51] Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., ve Memisoglu, H.R., (2004). "A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis". Am J Trop Med Hyg, 70:294-297.
- [52] Boggild, A.K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Adai, V., Tulliano, G., Llanos-Cuentas, A., ve Low, D.E., (2007). "Evaluation of a microculture method

for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru", J Clin Microbiol, 45:3680-3684.

- [53] Unat, E.K., (1981). "Leişmanyazların tarihçesi. In Leishmaniasis", Ş. Yaşarol, ed. (Ankara: Ulusal Parazitoloji Kongresi).
- [54] Elçicek, S., (2009). Polimerlerin *Leishmania*-Konak Hücre Etkileşimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [55] Özçelik, S., (1999). Kamçılı Protozoonlar ve Yaptıkları Hastalıklar, (Ankara: Güneş Kitapevi).
- [56] Töre, O., (1996). "Protozooloji", (İstanbul: Bursa Güneş&Nobel Tıp Kitabevleri).
- [57] Kuman, H.A., ve Altıntaş, N., (1996). "Protozoon Hastalıklar", (İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi).
- [58] Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el-Hassan, I.M., ve el-Hassan, A.M., (2003). "Post-kala-azar dermal leishmaniasis", Lancet Infect Dis, 3:87-98.
- [59] Eroğlu, F., (2008). Kutanöz Leişmanyozlu Hastalarda Etken Türlerin PCR-RFLP Yöntemi ile Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [60] Güneş, K., (2006). Klinik örneklerde PZR – RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Bölümünün Uzunluk Değişkenliği) Yöntemi kullanılarak *Leishmania* Parazitlerinin TÜR Tayini, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [61] Saygı, G., (2002). "Temel Tıbbi Parazitoloji", Genişletilmiş 2. baskı Edition, (Sivas: Es-Form Ofset Ltd Şti).
- [62] Banuls, A.L., Hide, M., ve Prugnolle, F., (2007). "*Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans", Adv Parasitol, 64:1-109.
- [63] Descoteaux, A., ve Turco, S.J., (2002). "Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection", Microbes Infect, 4:975-981.
- [64] Özcel, M., (1997). "Parazit Hastalıklarında Tanı" Volume 1., Baskı, (İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi,).
- [65] Brewster, S., Aslett, M., ve Barker, D.C., (1998). "Kinetoplast DNA minicircle database", Parasitol Today, 14:437-438.
- [66] Chiodini, P.L., Moody, A.H., ve Manser, D.W., (2003). "Atlas of Medical Helminthology and Protozoology", (London: Elsevier Science Limited).
- [67] Unat, E.K., Yücel, A., Altaş, K., ve Samastı, M., (1995). "Unat'ın Tıp Parazitolojisi", Volume 15, (Doyuran Matbası).
- [68] Garcia, L.S., (2001). "Diagnostic medical parasitology", 4th Edition, (Washington, D.C.: ASM Press).

- [69] Bryceson, A., (1996). "Manson's Tropical Diseases", 20th Edition, (London: WB Saunders Ltd).
- [70] Çakır, R. (2008). Polimerlerin Toksisitesinin İncelenmesinde Yeni Kültür Modelinin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [71] Sacks, D.L., (1989). "Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes", Experimental Parasitology, 69:100-103.
- [72] Turco, S.J., ve Descoteaux, A., (1992). "The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites", Annu Rev Microbiol, 46:65-94.
- [73] Jeronimo, S.M., ve Pearson, R.D., (1992). "The *Leishmania*. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival", Subcell Biochem, 18:1-37.
- [74] Despommier, D.D., (2000). "Parasitic Diseases", (Apple Trees Corporation LLC. S.).
- [75] Health, C.f.D.C.P.C.f.G. Life cycle of *Leishmania* spp. http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm. 20 Nisan 2011.
- [76] Cattand, P., Desjeux, P., Guzman, M.G., Jannin, J., Kroeger, A., Medici, A., Musgrove, P., Nathan, M.B., Shaw, A., ve Schofield, C.J., (2006). "Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis".
- [77] Desjeux, P., (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives", Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 27:305-318.
- [78] Ertuğ, S., Aydın, N., Gültekin, B., ve Doyuran, E.S., (2002). "2001 Yılında Aydın il sağlık müdürlüğü'ne ihbar edilen iç organ ve deri leishmaniasis olguları", ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1:9-12.
- [79] Akman, A., Durusoy, Ç., Seçkin, D., ve Alpsoy, E., (2007). "Antalya'da Görülen Kutanöz Layflmanyazis Olgularının Epidemiyolojik Özellikleri", Turkderm 41:93-96.
- [80] Kikuth, W., ve Schmidt, H., (1937). "Contribution to the progress of antimony therapy of kala azar", Chinese Med J, 52:425-432.
- [81] Cabello, I., Caraballo, A., ve Millan, Y., (2002). "Leishmaniasis in the genital area", Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 44:105-107.
- [82] Memişoğlu HR, Kotogyan, A., Acar MA, ve Özpoyraz M., (1994). Leishmaniosis. In Dermatoloji, K.A. Tüzün Y, Aydemir EH, Baransü O, ed. (İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri), 220-230.
- [83] Desjeux, P., (2004). "Leishmaniasis", Nat Rev Microbiol, 2:692-693.
- [84] W.H.O., (1990). Control of leishmaniasis: Report of a WHO Expert Committee, Technical Report Series 793. (World Health Organization).
- [85] Berman, J.D., (1997). "Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years", Clin Infect Dis, 24:684-703.

- [86] Ak, M., Özbel, Y., Özensoy, S., ve Turgay, N., (1995). "Visceral Leishmaniasis immun yetmezlikte Önemi Artan Parazit Hastalıkları", Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 12:69-119.
- [87] Bettini, S., ve Gradoni, L., (1986). "Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis", *Insect science and its application*, 7:241-245.
- [88] Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., ve Marty, P., (2011). "Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human", *Acta Trop*, 119:69-75.
- [89] Gama, M.E., Costa, J.M., Gomes, C.M., ve Corbett, C.E., (2004). "Subclinical form of the American visceral leishmaniasis", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99:889-893.
- [90] Pittaluga, G., (1923). "Enfermedades de los países cálidos y parasitología general", (Jiménez y Molina).
- [91] Badaro, R., Jones, T.C., Carvalho, E.M., Sampaio, D., Reed, S.G., Barral, A., Teixeira, R., ve Johnson, W.D., (1986). "New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis", *J Infect Dis*, 154:1003-1011.
- [92] Jeronimo, S., Teixeira, M.J., Sousa, A.Q., Thielking, P., Pearson, R.D., ve Evans, T.G., (2000). "Natural history of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up", *Clinical infectious diseases*, 30:608-609.
- [93] Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., ve Moreno, J., (1997). "*Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years", *Clin Microbiol Rev*, 10:298-319.
- [94] Marty, P., Lelievre, A., Quaranta, J.F., Rahal, A., Gari-Toussaint, M., ve Le Fichoux, Y., (1994). "Use of the leishmanin skin test and Western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France)", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88:658-659.
- [95] Pineda, J.A., Gallardo, J.A., Macias, J., Delgado, J., Regordan, C., Morillas, F., Relimpio, F., Martin-Sanchez, J., Sanchez-Quijano, A., Leal, M., ve Lissen, E., (1998). "Prevalence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients in southern Spain", *J Clin Microbiol*, 36:2419-2422.
- [96] Biglino, A., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuglio, A., Romano, A., ve Ferroglio, E., (2010). "Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic", *J Clin Microbiol*, 48:131-136.
- [97] Martinez, J.E., Alba, Arias, L., Escobar, M.A., ve Saravia, N.G., (1992). "Haemoculture of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 86:392-394.

- [98] Gasser, R.A., Jr., Magill, A.J., Oster, C.N., ve Tramont, E.C., (1991). "The threat of infectious disease in Americans returning from Operation Desert Storm", *N Engl J Med*, 324:859-864.
- [99] Kamiura, A., Immune Evasion. In *Analysis, Leishmania*, Volume 2011. (Parasites and Pestilence).
- [100] Desjeux, P., (2001). "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95:239-243.
- [101] Naser Rezaei Azizi, S., (2008). Bodrum Yarımadasında Leishmaniasis Epidemiyolojisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [102] T.C.Sağlık Bakanlığı, (2004). Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi.
- [103] T.C.Sağlık Bakanlığı, (2005). Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü <http://www.saglik.gov.tr/istatistikler/temel2005/sekil-57-58.htm>. 26 Nisan 2011,
- [104] Berman, J.D., Waddell, D., ve Hanson, B.D., (1985). "Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate", *Antimicrob Agents Chemother*, 27:916-920.
- [105] Murray, H.W., (2001). "Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis", *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2185-2197.
- [106] Berman, J., (2003). "Current treatment approaches to leishmaniasis", *Curr Opin Infect Dis*, 16:397-401.
- [107] W.H.O. Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/> In 14, Ocak 2011.
- [108] Schallig, H.D., ve Oskam, L., (2002). "Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification", *Trop Med Int Health*, 7:641-651.
- [109] Singh, S., (2006). "New developments in diagnosis of leishmaniasis", *Indian J Med Res*, 123:311-330.
- [110] Rosenblatt, J.E., (2009). "Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites", *Clin Infect Dis*, 49:1103-1108.
- [111] Aydenizöz, M., Yağcı, B.B., Özkan, A.T., Duru, S.Y., ve Gazyağcı, A.N., (2010). "Kırıkkale'deki Köpeklerde Mikrokültür Yöntemi ve IFAT ile Visseral Leishmaniosis Prevalansının Araştırılması", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34:1-5
- [112] Ihalamulla, R.L., Rajapaksa, U.S., ve Karunaweera, N.D., (2006). "Microculture for the isolation of *Leishmania*, modified to increase efficacy: a follow-up to a previous study", *Ann Trop Med Parasitol*, 100:87-89.
- [113] Hide, M., Singh, R., Kumar, B., Banuls, A.L., ve Sundar, S., (2007). "A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients", *Acta Trop*, 102:197-200.

- [114] Boggild, A.K., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Martinez-Medina, D., Llanos-Cuentas, A., ve Low, D.E., (2008). "Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru", *Am J Trop Med Hyg*, 79:847-852.
- [115] Chang, K., Fong, D., ve Bray, R., (1985). "Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. Leishmaniasis", *Human Parasitic Diseases*, 1:1-30.
- [116] Gholamhosseinian, A., ve Vassef, A., (1988). "Superiority of hemoglobin to hemin for cultivation of *Leishmania tropica* promastigotes in serum-free media", *J Protozool*, 35:446-449.
- [117] Somanna, A., Mundodi, V., ve Gedamu, L., (2002). "*In vitro* cultivation and characterization of *Leishmania chagasi* amastigote-like forms", *Acta Trop*, 83:37-42.
- [118] Gupta, N., Goyal, N., ve Rastogi, A.K., (2001). "*In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*", *Trends Parasitol*, 17:150-153.
- [119] Sadigursky, M., ve Brodskyn, C.I., (1986). "A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates", *Am J Trop Med Hyg*, 35:942-944.
- [120] Pan, A.A., ve Pan, S.C., (1986). "*Leishmania mexicana*: comparative fine structure of amastigotes and promastigotes *in vitro* and *in vivo*", *Exp Parasitol*, 62:254-265.
- [121] Jackson, J.E., Tally, J.D., ve Tang, D.B., (1989). "An *in vitro* micromethod for drug sensitivity testing of *Leishmania*", *Am J Trop Med Hyg*, 41:318-330.
- [122] Grimaldi, G., Jr., Tesh, R.B., ve McMahon-Pratt, D., (1989). "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World", *Am J Trop Med Hyg*, 41:687-725.
- [123] Scott, P., Pearce, E., Natovitz, P., ve Sher, A., (1987). "Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes", *J Immunol*, 139:221-227.
- [124] Novruzova, M.S. (2010). Leyşmaniozun mikrobioloji diaqnostikasında müxtəlif üsulların müqayisəli qiymətləndirilməsi. Doktora Tezi, Azərbaycan Devlet Üniversitesi, Bakü.
- [125] Ihalamulla, R.L., Rajapaksa, U.S., ve Karunaweera, N.D., (2005). "Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions -- Sri Lankan experience", *Ann Trop Med Parasitol*, 99:571-575.
- [126] Cortes, D.F., Carneiro, M.B., Santos, L.M., Souza, T.C., Maioli, T.U., Duz, A.L., Ramos-Jorge, M.L., Afonso, L.C., Carneiro, C., ve Vieira, L.Q., (2010). "Low and high-dose intradermal infection with *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* in C57BL/6 mice", *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105:736-745.
- [127] Muldrew, K., ve McGann, L.E., (1994). "The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury", *Biophys J*, 66:532-541.

- [128] Miyake, Y., Karanis, P., ve Uga, S., (2004). "Cryopreservation of protozoan parasites", *Cryobiology*, 48:1-7.
- [129] Callow, L.L., ve Farrant, J., (1973). "Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var major at different cooling rates", *Int J Parasitol*, 3:77-88.
- [130] Anchordoguy, T.J., Rudolph, A.S., Carpenter, J.F., ve Crowe, J.H., (1987). "Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing", *Cryobiology*, 24:324-331.
- [131] McGann, L.E., ve Farrant, J., (1976). "Survival of tissue culture cells frozen by a two-step procedure to -196 degrees C. I. Holding temperature and time", *Cryobiology*, 13:261-268.
- [132] Bhattacharya, J., Chandra, G., ve Hati, A.K., (1991). "A simple method for cryopreservation of *Leishmania donovani* promastigotes", *Indian J Med Res*, 93:245-246.
- [133] Attar, Z.J., Chance, M.L., el-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C., ve Hommel, M., (2001). "Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis", *Acta Trop*, 78:11-16.
- [134] Singh, D.P., Goyal, R.K., Singh, R.K., Sundar, S., ve Mohapatra, T.M., (2010). "In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala-azar", *J Health Popul Nutr*, 28:281-285.
- [135] Handemir, E., Kaya N, Şenlik B., ve Kamburgil K., (2002). "Askeri Personelde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı", *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1:31-33.
- [136] Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., ve Deplazes, P., (2005). "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs", *J Clin Microbiol*, 43:5515-5519.
- [137] Matossian, R.M., Kurban, A.K., ve Malak, J.A., (1975). "Circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis: their detection by immunofluorescence", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 69:450-452.
- [138] Ozbel, Y., Oskam, L., Ozensoy, S., Turgay, N., Alkan, M.Z., Jaffe, C.L., ve Ozel, M.A., (2000). "A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays", *Acta Trop*, 74:1-6.
- [139] Rosario, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., ve Carneiro, M., (2005). "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100:197-203.
- [140] Erhan, H., (2006). Mersin İli Mut İlçesi'ndeki Değişik Yaş Gruplarında Leshmania Antikor Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

- [141] Kumar, R., Pai, K., Pathak, K., ve Sundar, S., (2001). "Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis", Clin Diagn Lab Immunol, 8:1220-1224.
- [142] Sundar, S., Maurya, R., Singh, R.K., Bharti, K., Chakravarty, J., Parekh, A., Rai, M., Kumar, K., ve Murray, H.W., (2006). "Rapid, noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis in India: comparison of two immunochromatographic strip tests for detection of anti-K39 antibody", J Clin Microbiol, 44:251-253.
- [143] Sundar, S., Reed, S.G., Singh, V.P., Kumar, P.C., ve Murray, H.W., (1998). "Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis", Lancet, 351:563-565.
- [144] Bern, C., Jha, S.N., Joshi, A.B., Thakur, G., ve Bista, M.B., (2000). "Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal", The American journal of tropical medicine and hygiene, 63:153-157.
- [145] Sundar, S., (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis", Trop Med Int Health, 6:849-854.
- [146] Jelinek, T., Eichenlaub, S., ve Loscher, T., (1999). "Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis", Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 18:669-670.
- [147] Toz, S.O., Chang, K.P., Ozbel, Y., ve Alkan, M.Z., (2004). "Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey", J Parasitol, 90:1484-1486.
- [148] Abdallah, K.A., Nour, B.Y., Schallig, H.D., Mergani, A., Hamid, Z., Elkarim, A.A., Saeed, O.K., ve Mohamadani, A.A., (2004). "Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudanese patients", Trop Med Int Health, 9:1127-1131.
- [149] Teran-Angel, G., Schallig, H., Zerpa, O., Rodriguez, V., Ulrich, M., ve Cabrera, M., (2007). "The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis", Biomedica, 27:447-453.
- [150] el Harith, A., Kolk, A.H., Leeuwenburg, J., Muigai, R., Huigen, E., Jelsma, T., ve Kager, P.A., (1988). "Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis", J Clin Microbiol, 26:1321-1325.
- [151] Schoone, G.J., Hailu, A., Kroon, C.C., Nieuwenhuys, J.L., Schallig, H.D., ve Oskam, L., (2001). "A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies", Trans R Soc Trop Med Hyg, 95:400-401.
- [152] Sundar, S., Singh, R.K., Bimal, S.K., Gidwani, K., Mishra, A., Maurya, R., Singh, S.K., Manandhar, K.D., Boelaert, M., ve Rai, M., (2007). "Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study", Trop Med Int Health, 12:284-289.
- [153] La Placa, M., Pampiglione, S., Borgatti, M., ve Zerbini, M., (1975). "Complement fixation and intradermal skin test with partially purified "proteic" and

- "polysaccharidic" antigens from *Leishmania donovani*", Trans R Soc Trop Med Hyg, 69:396-398.
- [154] Pampiglione, S., Manson-Bahr, P.E., Giungi, F., Giunti, G., Parenti, A., ve Canestri Trotti, G., (1974). "Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis", Trans R Soc Trop Med Hyg, 68:447-453.
 - [155] Bray, R.S., ve Munford, F., (1967). "On the maintenance of strains of *Leishmania* from the Guianas", J Trop Med Hyg, 70:23-24.
 - [156] Haldar, J.P., Saha, K.C., ve Ghose, A.C., (1981). "Serological profiles in Indian post kala-azar dermal leishmaniasis", Trans R Soc Trop Med Hyg, 75:514-517.
 - [157] Altıntaş N, ve Yazar, S., (1997). Western Blot (Immunoblotting):Parazit hastalıklarında tanı, (İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15).
 - [158] Salotra, P., Raina, A., ve Negi, N.S., (1999). "Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar", Br J Biomed Sci, 56:263-267.
 - [159] De Almeida Silva, L., Romero, H.D., Prata, A., Costa, R.T., Nascimento, E., Carvalho, S.F., ve Rodrigues, V., (2006). "Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis", Am J Trop Med Hyg, 75:739-743.
 - [160] Schonian, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H.D., Presber, W., ve Jaffe, C.L., (2003). "PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples", Diagn Microbiol Infect Dis, 47:349-358.
 - [161] Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Reynes, J., Lamothe, J., ve Bastien, P., (2001). "Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood", J Clin Microbiol, 39:613-617.
 - [162] Morales, M.A., Chicharro, C., Ares, M., Canavate, C., Barker, D.C., ve Alvar, J., (2001). "Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*", Trans R Soc Trop Med Hyg, 95:104-107.
 - [163] Mahdi, M., Elamin, E.M., Melville, S.E., Musa, A.M., Blackwell, J.M., Mukhtar, M.M., Elhassan, A.M., ve Ibrahim, M.E., (2005). "Sudanese mucosal leishmaniasis: isolation of a parasite within the *Leishmania donovani* complex that differs genotypically from *L. donovani* causing classical visceral leishmaniasis", Infect Genet Evol, 5:29-33.
 - [164] Quispe Tintaya, K.W., Ying, X., Dedet, J.P., Rijal, S., De Bolle, X., ve Dujardin, J.C., (2004). "Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex", J Infect Dis, 189:1035-1043.
 - [165] Allahverdiyev, A.M., Koc, R.C., Ates, S.C., Bagirova, M., Elcicek, S., ve Oztel, O.N. (2011). "*Leishmania tropica*: the effect of darkness and light on biological activities in vitro", Exp Parasitol, 128:318-323.

- [166] Marques, M.J., Volpini, A.C., Genaro, O., Mayrink, W., ve Romanha, A.J., (2001). "Simple form of clinical sample preservation and Leishmania DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction", *Am J Trop Med Hyg*, 65:902-906.
- [167] Myjak, P., Szulta, J., de Almeida, M.E., da Silva, A.J., Steurer, F., Lass, A., Pietkiewicz, H., Nahorski, W.L., Goljan, J., Knap, J., ve Szostakowska, B., (2009). "Usefulness of PCR method for detection of *Leishmania* in Poland", *Pol J Microbiol*, 58:219-222.
- [168] Spanakos, G., Piperaki, E.T., Menounos, P.G., Tegos, N., Flemetakis, A., ve Vakalis, N.C., (2008). "Detection and species identification of Old World *Leishmania* in clinical samples using a PCR-based method", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102:46-53.
- [169] Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Acedo-Sanchez, C., Pineda, J.A., Macias, J., ve Sanjuan-Garcia, J., (2002). "*Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing", *Exp Parasitol*, 100:71-74.
- [170] Palatnik de Sousa, C.B., Gomes, E.M., de Souza, E.P., dos Santos, W.R., de Macedo, S.R., de Medeiros, L.V., ve Luz, K., (1996). "The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*. a new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar", *Rev Soc Bras Med Trop*, 29:153-163.
- [171] Ho, M., Siongok, T., Lyerly, W., ve Smith, D., (1982). "Prevalence and disease spectrum in a new focus of visceral leishmaniasis in Kenya", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76:741-746.
- [172] Ozensoy, S., Ozbel, Y., Turgay, N., Alkan, M.Z., Gul, K., Gilman-Sachs, A., Chang, K.P., Reed, S.G., ve Ozel, M.A., (1998). "Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey", *Am J Trop Med Hyg*, 59:363-369.
- [173] de Freitas, E., Melo, M.N., da Costa-Val, A.P., ve Michalick, M.S., (2006). "Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors", *Vet Parasitol*. 137:159-167.
- [174] Mancianti, F., ve Meciani, N., (1988). "Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis", *Am J Vet Res*, 49:1409-1411.
- [175] Ashford, D.A., Badaro, R., Eulalio, C., Freire, M., Miranda, C., Zalis, M.G., ve David, J.R., (1993). "Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test--enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis", *Am J Trop Med Hyg*, 48:1-8.
- [176] el Harith, A., Slappendel, R.J., Reiter, I., van Knapen, F., de Korte, P., Huigen, E., ve Kolk, A.H., (1989). "Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir", *J Clin Microbiol*, 27:2252-2257.
- [177] Aisa, M.J., Castillejo, S., Gallego, M., Fisa, R., Riera, M.C., de Colmenares, M., Torras, S., Roura, X., Sentis, J., ve Portus, M., (1998). "Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern", *Am J Trop Med Hyg*, 58:154-159.

- [178] Gottstein, B., Deplazes, P., Arnold, P., Mehlitz, D., Reiter, I., ve Eckert, J., (1988). "Immunodiagnosis of leishmaniasis in dogs by ELISA and mini-Western blot", *Schweiz Arch Tierheilkd*, 130:249-262.
- [179] Cardo, L.J., (2006). "Serological screening for *Leishmania infantum* in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Sicily, Italy)", *Transfus Apher Sci*, 34:233-234.
- [180] Moreno, E.C., Melo, M.N., Lambertucci, J.R., Serufo, J.C., Andrade, A.S., Antunes, C.M., Genaro, O., ve Carneiro, M., (2006). "Diagnosing human asymptomatic visceral leishmaniasis in an urban area of the State of Minas Gerais, using serological and molecular biology techniques", *Rev Soc Bras Med Trop*, 39:421-427.
- [181] Moreno, E.C., Goncalves, A.V., Chaves, A.V., Melo, M.N., Lambertucci, J.R., Andrade, A.S., Negrao-Correa, D., de Figueiredo Antunes, C.M., ve Carneiro, M., (2009). "Inaccuracy of enzyme-linked immunosorbent assay using soluble and recombinant antigens to detect asymptomatic infection by *Leishmania infantum*". *PLoS Negl Trop Dis*, 3:e536.
- [182] Cunha, S., Freire, M., Eulalio, C., Critosvao, J., Netto, E., Johnson, W.D., Jr., Reed, S.G., ve Badaro, R., (1995). "Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil", *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 89:155-158.
- [183] Werneck, G.L., Rodrigues, L., Santos, M.V., Araujo, I.B., Moura, L.S., Lima, S.S., Gomes, R.B., Maguire, J.H., ve Costa, C.H., (2002). "The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil", *Acta Trop*, 83:13-18.
- [184] Belhadj, S., Toumi, N.H., Dakhli, H., Kallel, K., Boussen, N., Ben Chaabane, T., ve Chaker, E., (2002). "Peripheral blood culture as a diagnostic modality for visceral leishmaniasis: apropos of 61 cases", *Med Trop (Mars)*, 62:155-157.
- [185] Karakoyun-Celik, O., Yalman, D., Bolukbasi, Y., Cakan, A., Cok, G., ve Ozkok, S., (2010). "Postoperative radiotherapy in the management of resected non-small-cell lung carcinoma: 10 years' experience in a single institute", *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 76:433-439.

ETİK KURUL TUTANAĞI



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 13/05/2009
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu
Toplantı Sayısı : 5

Sorumlu araştırmacılığını Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'in üstlendiği ve Kimya Bölümü Biyokimya Programında Doktora yapan Araştırma Görevlisi Dr.Sezen CANIM'ın yürüteceği 2009/1492 protokol numaralı "İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Leishmania Parazitlerinin Yeni Mikrokültür Yöntemi ve Diğer Bazı Yöntemler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi" başlıklı doktora tez çalışması kurulumuzda incelendi. Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.


Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU (T.Katılmadı)
Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sümer YAMANER (T.Katılmadı)
Genel Cerrahi A.D.



Aşağıdaki sorular, kan verecek kişi kanı alacak kişiyi korumak amacıyla hazırlanmıştır. Unutmayın ki, verdiğiniz kan korumasız, şuru kapalı, kanı reddetme şansı olmayan masum bir hastaya yada yeni doğmuş bir bebeğe verilir.

Örneğin, HIV testinin negatif olsa bile, **HIV taşıyıcısı** olabilir, kendinizi iyi hissetseniz dahi bu virüs bulaştırabilirsiniz.

Formu doldurduğunuz da kafanızda, kan vermek konusunda hala şüpheleriniz varsa, kimseye bir açıklama yapmadan kan bankasını terk edebilir veya kan bankası doktoruyla özel olarak görüşebilirsiniz.

Evet Hayır

- ☐ 1. Bugün kendinizi kan verecek kadar iyi hissediyor musunuz ?

☐ 2. Bugüne kadar sizde kan vermemenizi gerektiklini söyleyen (doktor, hemşire gibi) oldu mu ?

☐ 3. Hastane, doktor, hemşire, iğne ve kan tutması gibi korkularınız var mı ?

☐ 4. Son 3 ay içinde kan bağıştı yaptınız mı ?

☐ 5. Son 3 gün içinde aspirin veya benzeri bir ilaç kullandınız mı ?

☐ 6. Son 3 gün içinde diş hekimine gittiniz mi ?

☐ 7. Son 1 ay içinde aşı yaptırdınız mı ? Ne aşısı yaptırdınız :

☐ 8. Son 1 ay içinde ilaçla veya başka bir şekilde tıbbi tedavi gördünüz mü ?

☐ 9. Şeker hastası mısınız ? Veya tedavi görüyor musunuz ?

☐ 10. Sara (Epilepsi) hastası mısınız ? Veya tedavi görüyor musunuz ?

☐ 11. Bugüne kadar kalp, akciğer, böbrek hastalığı geçirdiniz mi ?

☐ 12. Bugüne kadar hiç sarılık (**10 yaş sonrası**), karaciğer iltihabı, karaciğer hastalığı geçirdiniz mi ?

☐ 13. Son 1 yıl içinde sarılikli bir kişiyi yakın ilişkii içinde oldunuz mu, size hepatit serumu verildi mi ?

☐ 14. Son 1 yıl içinde sizde kan veya kan ürünü verildi mi ? Doku veya organ nakli yapıldı mı ?

☐ 15. Son 1 yıl içinde önemli bir hastalık veya ameliyat geçirdiniz mi ?

☐ 16. Bugüne kadar kanser, kan hastalığı veya kanaama problemi bir hastalık geçirdiniz mi ?

☐ 17. Son 3 yıl içinde yurt dışında bulundunuz mu ?

☐ 18. Son 1 yılda kulak veya cildinizin bir yerini deldirdiniz mi ? Dövme, akupunktur yaptırdınız mı? Kaza ile iğne batması oldu mu ?

☐ 19. Bugüne kadar pıhtılaşma hastalığı (Hemofili gibi) nedeniyle faktör konsantrasi kullandınız mı? Böyle bir uygulama içerisinde olan bir şahısla bir kere bile olsa cinsel ilişkiniz oldu mu?

☐ 20. 1 yıl içinde kuduz aşısı oldunuz mu ? Şahipsiz veya şüpheli bir hayvan tarafından ısırıldınız mı ?

☐ 21. Son 1 yıl içinde frengi (Sifiliz) testinin "pozitif" oldu mu ? Bu süre içinde Sifiliz, bel soğukluğu hastası oldunuz mu veya Sifiliz tedavisi gördünüz mü ?

☐ 22. Bugüne kadar size büyüme hormonu (Growth hormon) verildi mi ?

☐ 23. Verem hastalığı geçirdiniz mi ? Yakın zamanda tekrarladı mı ?

☐ 24. Sedef hastalığı geçirdiniz mi ? Bu hastalık için ilaç (Tegison) kullandınız mı?

☐ 25. Silvilce tedavisi için ağzından ilaç alıyor musunuz ?

☐ 26. Son 3 yıl içinde sıtma hastalığı (malaria) geçirdiniz mi ? Sıtma tedavisi gördünüz mü ?

☐ 27. Son 1 yıl içinde para karşılığı cinsel ilişkide bulundunuz mu ?

☐ 28. Bugüne kadar homoseksüel biriyle, son 1 yıl içinde yabancı uyruklu biriyle cinsel ilişkide bulundunuz mu ?

☐ 29. Bugüne kadar uyuşturucu (eroін, esrar,v.s) kullandınız mı ? Uyuşturucu kullanan biriyle bir kere bile olsa, cinsel ilişkiniz oldu mu ?

☐ 30. AIDS' misiniz; şüpheniz var mı; bu özellikteki biriyle bir kez bile olsa cinsel ilişkiye girdiniz mi ?

☐ 31. Sadace kan testi yaptırmak için mi başgista bulunuyorsunuz ?

☐ 32. Bugüne kadar, beklemediginiz hızlı kilo kaybı, gece terlemeleri, deride mavi-mor lekeler, 1 aydan uzun süren bezeler, 10 günden fazla süren yüksek ateş, uzun süreli tedaviye cevap vermeyen یشhal, ağız içinde beyaz lekeler, alışılmadık yaralar oldu mü ?

☐ 33. Kadınlar için: Son iki ay içinde düşük veya kürtaj geçirdiniz mi? Hamilelik durumunuz var mı? Bugün adet gününüz mü, kanamanız var mı ?

Yukarıda ki, açıklamaları okudum. Kan vermem konusunda bir sakınca olmadığını düşünüyorum. Kanı alacak olan doktor, hemşire, laboratuvar teknisyenleri kan vermemin oluşturaileceği tıbbi yan etkilerden kanun karşısında kendim veya vekillerim tarafından yapılacak olan her türlü şikâyet ve tazminat taleplerinden sorumlu tutmayacağı bildiririm. Doktor ve / veya flebotomi uzmanı tarafından bütün kan verme işlemleri, oluşabilecek komplikasyonlar, yan etkiler ve riskler hakkında ayrıntılı olarak bilgilendirildim.

Protokol No

Adı Soyadı :
İmzası

Yayın Tarihi: 24.11.2008

KAN BANKASI BİLGİ FORMU (DEVAM)

Kan No	:		Merkez	☐	Bağış Tarihi :	/	/ 200.....
Donör No	:		Sivil Ekip	☐			
Kan Grubu	:	 RhD :	Askeri Ekip	☐			
Özel Grup	:		Mobil Ekip	☐			

KAN BAĞIŞÇISI KİMLİK, ADRES, KİŞİSEL BİLGİLERİ			
(Kan Bağışçısı tarafından doldurulacaktır)			
Adı	:		Anne Adı :
Soyadı	:		Baba Adı :
Doğum Yeri	:	İl :	T.C. Kimlik No :
	:	İlçe :	Nüfusta Kayıtlı Olduğu İl :
Doğum Tarihi	:	/...../.....	
	:		Ehliyet / Pasaport No :
	:		Cinsiyeti : ☐ Erkek ☐ Kadın
Adres	:		Meslek :
	:		Eğitim : ☐ İlköğretim ☐ Lise
	:		☐ Önlisans ☐ Lisans
	:		☐ Master ☐ Doktora
	:		☐ Evli ☐ Bekar
İl / İlçe	:		
Posta Kodu	:		Gönüllü Bağış ☐ Kaçınıcı :
Ev Tel. No	:		Hasta için ☐ Kaçınıcı :
Cep Tel. No	:		Sürekli donör olmak istiyorum ☐ Evet ☐ Hayır
İş Tel. No	:		Son bağış tarihi :
Faks No	:		/
	:		/ 200.....
	:		e-mail :
	:		@.....

Aferez:				Tam Kan ☐			
Tromboferez	☐	Plazmaferez	☐	Eritrosit S.	☐		
Lökoferez	☐	Eritroferez	☐	Trombosit S.	☐		
				TDP	☐		
Torba tipi :	Tekli ☐	Çiftli ☐	Üçlü ☐	Dortlü ☐	Kriopresipitat	☐	
Solüsyon :	CPD ☐	CPDA-1 ☐	CPD+SAG.M	☐	Beyaz Küre	☐	
Alınan Kan Miktarı	:	ml					
Özel	:	ml					
Standart(450±%10ml)	☐						
Tarama Testleri :				HBsAg ☐			
Anti-HCV ab ☐				RPR/VDRL ☐			
Anti-HIV 1/2 ab ☐							

VİTAL BULGULAR :		DÜŞÜNCELER :	
Boy	:	cm.	
Ağırlık	:	kg	
Nabız	:	/dk	
Hct	: %		
WBC	:	10 ³ / µl	
Vücut ısı	:	°C	
A.Tansiyon	:	/mmHg	
Hb	:	g/mL	
Plt	:	10 ³ / µl	
Kayıt Yapan	Kanı Alan		
Flebotomi Uzmanı	Flebotomi Uzmanı		
Kaşe - İmza	Kaşe - İmza		
	Doktor		
	Kaşe - İmza		

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sezen CANIM ATEŞ
Doğum Tarihi ve Yeri : 28.06.1979
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca
E-posta : scanim@yildiz.edu.tr; sezencaanim@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2005
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi	2002
Lise	Fen Bilimleri	Haydarpaşa Lisesi	1998

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2003-	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2002-2003	İstanbul Bilgi Üniversitesi	İdari Asistan

YAYINLARI

- **Uluslararası SCI Kapsamındaki Dergilerdeki Makaleler**

1. Allahverdiyev A.M., Cakir-Koc R., **Canim-Ates S.**, Bagirova M., Elcicek S., and Oztel O.N., “*Leishmania Tropica*: The Effect of Darkness and Light on Biological Activities *in vitro*” *Journal of Experimental Parasitology*, Issue:4 Vol.128: 318–323 (2011).
2. Allahverdiyev A.M., Bagirova M., Elcicek S., Oztel O.N., Cakir-Koc R., Novruzova M. and **Canim-Ates S.** “Growth of *L. tropica* Promastigotes in Urine Samples of Different Genders and the Role of Citrate in Culture” *Romanian Biotechnological Letters Journal*, Issue:1 Vol. 17: 6999-7004 (2012).

- **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

3. Novruzova M.S., Bagirova M.İ., **Canim S.**, Qurbanov A., Allahverdiyev A.M., The Investigation of Antibody Existence Against *Leishmania* Parasites In Patient Serums Infected By Different Antibodies, *Int. Journal of Natural and Engineering Science (IJNES)*, Issue 2, Vol. 3, pp.45-47 ISSN:1307-1149 (2009).
4. Novruzova M., Bagirova M., **Canim S.**, Qurbanov A., Allahverdiyev A.M, Investigation of immünoglobulin that was produced against *Leishmania* in blood serum of some infected patients, *Scientific Studies of Azerbaijan National Science Academy Microbiology Institute*, Vol. 6, (2009).

- **Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**

5. Allahverdiyev A., Bağirova M., Çakır-Koç R., Öztel O.N., Elçiçek S., **Canim-Ates S.** and Karaca T.D., “Approaches and Problems in Vaccine Development against Leishmaniasis” *Turkish Journal of parasitology (Türkiye Parazitoloji Dergisi)*, Issue 34, Vol. 2, pp. 122-130, 2010.

- **Bildiri (Uluslararası)**

1. **Canim-Ates S.**, Bagirova M.İ, Allahverdiyev A.M., Investigation of *Leishmania* Parasites with Different Methods In Human Blood Samples Taken From Blood Bank, First Congress of Euro-Asian Society of Infectious Diseases, Issue 4, Vol. 2, pp. 132, 1-3 December 2010, St. Petersburg Russia, (2010).

2. **Canim-Ates S.**, Bagirova M.I, Allahverdiyev, A. M, Investigation of Leishmania parasites in human blood samples taken from blood bank, XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA), pp. 855, 15-20 August 2010, Melbourne, Australia, (2010).
 3. **Canim S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., The Synthesis and Modification of Poly-2-Hydroxyethylmethacrilate Polymeric Gels with Different Structured Hydroxyapatite, European Polymer Congress 2009 (EPF 09), pp. 78, 12-17 July 2009, Graz, Austria, (2009).
 4. **Canim S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., Poly-2-Hydroxyethylmethacrilate Polymeric Gels Synthesis with Different Structured Hydroxyapatite, 34th Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS), pp. 317-318, 04-09. July 2009, Prague, Czech Republic, (2009).
 5. Ersoz M., Bagirova M., **Canim S.**, Allahverdiyev A., Investigation of Toxicity of Poly Acrylic Acid in Human Breast Cancer (MCF 7) and Mouse Fibroblast (L 929) Cells, International Conference for the 85. Birthday of Professor Tagizade, pp. 85-86, December 2008, Baku, Azerbaijan. (2008).
 6. **Canim S.**, E.Dalgakıran, A.B.Hazar Yoruc, Z.Mustafaeva, M.Mustafaev , Polymer-Metal Complexes for designe of Hydroxyapatite-Based polymer Composites, Biyomühendislik; Problemler ve Perspektifler Çalıştayı , pp. 222-228, 20–23 October 2004, İstanbul, Turkey, (2004).
- **Bildiri (Ulusal)**
7. Allahverdiyev A.M., Bağirova M., Cakir-Koc R., Elçiçek S., Öztel O.N., **Canim-Ates S.**, Abamor E.S and Yesilkir-Baydar S. “ *Leishmania* Parazitleri ile Enfekte Edilmiş Deneysel Hayvan Modellerinde Parazitlerin Varlığının Belirlenmesinde Mikro Kültür Metodunun Önemi” 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi ve Kafkasya ve Ortadoğu Paraziter Hastalıklar Sempozyumu, 4-10 Eylül 2011, Kars, Türkiye.
 8. **Canim-Ates S.**, “Kan Merkezlerindeki Gizli Enfeksiyon Tehlikelerinin Farkında mısınız?” YTÜ, Fikirler Pazarı, 24-25 Mayıs 2011, İstanbul, Türkiye.

9. **Canim-Ates S.**, Yeşilkır S., Bağirova M., “Donör Kan Örneklerinin IFAT Yöntemi ile *Leishmania* Parazitlerine Göre İncelenmesi” 16.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
10. Bağirova M., Allahverdiyev A.M., Çakır R., Elçiçek S., **Canim-Ates S.**, “*Leishmania* Parazitleri ile Enfekte Olmuş Uzun Süreli Fibroblast Kültüründe Enfektifliğin Mikrokültür Yöntemi ile Belirlenmesi” 16.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
11. Çakır R., Öztel O.N., **Canim-Ates S.**, Elçiçek S., Bağirova M., “Büyük Ölçekte *Leishmania* Parazitlerinin Üretilmesi: Kademeli Büyütme Yöntemi” 16.Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, Adana, Türkiye.
12. M.S.Novruzova, M.İ.Bağirova, **S.Canim**, A.İ.Qurbanov, A.M.Allahverdiyev “Farklı Enfeksiyon Antikorları Bulunan Hasta Serumlarında *Leishmania*’ya Karşı Antikor Varlığının İncelenmesi” 4.Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir, Türkiye.
13. M.İ.Bağirova, **S.Canim**, M.S.Novruzova, R.Çakır “*Leishmania* Parazitlerinin Promastigot Kültüründen Antijen Hazırlanmasının Optimizasyonu ve IFAT Yöntemi İle İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 6 – 10 Ekim 2008, Kıbrıs.
14. **S.Canim**, Z.Akdeste “Hidroksi Apatit (HA) ve Hidroksietilmetakrilat (HEMA) Yapılı Biyokompozitlerin Sentezi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 6 – 10 Ekim 2008, Kıbrıs.
15. **S.Canim**, Z.Ö.Özdemir Z.Akdeste “Farklı Yapılarda Hidroksi Apatit İçeren Poli-2-Hidroksietilmetakrilat Polimerik Jellerinin Sentezi ve Modifikasyonu”,II. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-02 Mayıs 2008, Şanlıurfa, Türkiye.
16. **S.Canim**, Z.Akdeste, A.B.Hazar, M.Öner, M.Mustafaev, “pHEMA Esaslı Peptid İçeren Fonksiyonel Biyokompozitlerin Geliştirilmesi”. XIX. Ulusal Kimya Kongresi, 30 Eylül – 4 Ekim 2005, Kuşadası, Türkiye.

- **Projeler**

1. "İstanbul'daki Kan Merkezlerinden Elde Edilen Donör Kan Örneklerinde, Yeni ve Klasik Tanı Yöntemleri ile *Leishmania*'nın İncelenmesi", Yardımcı araştırmacı, Y.T.Ü. Araştırma Fonu BAPK Projesi, Proje No: 29-07-04-02, 2009-2011.
2. "Leishmaniasis'e karşı aşı geliştirilmesinde polimerlere dayalı yeni bir yaklaşım: LPG-polimer konjugatları", Bursiyer Araştırmacı, TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu (SBAG) Projesi, Proje No: 108S170, 2008-2011.
3. "Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular", Yardımcı araştırmacı, DPT Şemsiye Projesi, Proje No: 25-DPT-07-04-01, 2004-2008.
4. "Aşı Uygulama Amaçlı Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi" DPT Projesi, Proje No: 23-DPT-07-04-02, 2004-2007.
5. "Diş restorasyon malzemelerinin Üretilmesi" DPT Projesi, Proje No: 24-DPT-07-04-01, 2004-2006.