

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

**FAREDE OLUŞTURULAN LEİSHMANİASİS MODELİNDE
KONVANSİYONEL YÖNTEMLERLE ENFEKSİYON TAKİBİNİN
YAPILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali Hussein M. AFANDI

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN -AL

ANKARA

HAZİRAN 2013

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİMDALI

**FAREDE OLUŞTURULAN LEİSHMANİASİS MODELİNDE
KONVANSİYONEL YÖNTEMLERLE ENFEKSİYON TAKİBİNİN
YAPILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALİ HUSSEİN M. AFANDI

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.FUNDA DOĞRUMAN -AL

ANKARA

HAZİRAN 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

~~Tıbbi Mikrobiyoloji~~ Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 18.04.2013

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi. Üniversitesi

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Meltem YALINAY GIRAK

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi. Üniversitesi
Doc. Dr. Funda DOĞRULMAN AL

İmza
Ünvanı Adı ve Soyadı
Gazi. Üniversitesi
Doc. Dr. Ecce KONAĞ

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Tablolar	v
Şekiller	vii
Grafiklar	viii
Kısaltmalar	ix
1- GİRİŞ	1
<i>Leishmania</i> spp ve Leishmaniasis	1
2- GENEL BİLGİLER	7
2-1- <i>Leishmania</i> parazitinin Morfolojisi	7
2-1-1-Amastigotlar	7
2-1-2- Promastigotlar	8
2-2-Prosiklik ve Metasiklik Evreler	8
2-3-Sınıflandırma	11
2-3-1-Altcins: <i>Leishmania</i>	11
2-3-2-Altcins: Viannia	11
2-4- <i>Leishmania</i> 'nın Yaşam Döngüsü	12
2-5- Klinik	14

2-6-Leishmaniasis ve İmmunolojisi	17
2-6-1- Patogenez	17
2-6-1-1-Invazif Determinantlar	17
2-6-1-2-Pato-antijenik Determinantlar	17
2-6-2-Parazit etkisi ve Bunu Belirleyen Faktörler	19
2-6-3-Konak Cevabı.....	20
2-6-4-İmmun Yanıt.....	20
2-6-4-1-Humoral İmmun Yanıt	21
2-6-4-2-Hücreseİ İmmun Yanıt.....	22
2-6-5-Parazit-Memeli Konak İlişkisi ve İmmünopatogenez	24
2-6-5-1-Doğal İmmün Yanıtın Aşılması.....	24
2-6-5-2-Adaptif İmmün Yanıtın Aşılması	26
3-LEISHMANİASİS'İN LABORATUAR TANISI	28
3-1-Etkene Yönelik Tanı	28
3-1-1-Direkt mikroskobi.....	29
3-1-2-Klasik kültür yöntemi	30
3-1-3-Mikrokültür.....	31
3-2-Serolojik Tanı	31
3-2-1-Direkt Aglütinasyon Testi (DAT)	34
3-2-2-İndirekt Hemaglütinasyon Testi	34
3-2-3-İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)	35
3-2-4-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	36

3-2-5-Western Blot.....	36
3-3-İndirekt yöntemler	37
3-3-1-Kompleman Birleşmesi Testi.....	37
3-3-2-Leishman'ın Deri İçi Testi (Montenegro Reaksiyonu)	38
3-4-Leishmaniasis Tanısında Moleküler Yöntemler	38
4-ÇALIŞMANIN AMACI	41
5-GEREÇ VE YÖNTEM	42
5-1-Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler	42
5-2-Fareler	44
5-3-Fare enfeksiyonu ve ELISA Yöntemi İçin <i>Leishmania</i> Suşunun Üretilmesi	46
5-4-Prosiklik ve Metasiklik Promastigotların İzolasyonu	49
5-5-Serum Örneklerinin Elde Edilmesi	51
5-6-Giemsa Boyamasının Hazırlanma Ve Yapılması.....	54
5-7-Mikrokültür.....	56
5-8-ELISA Testi	59
5-8-1-Solüsyonlar	59
5-8-1-1-Coating Buffer(Kaplama Tamponu	59
5-8-1-2-Süt Çözeltisi	59
5-8-1-3-PBS.....	59
5-8-1-4-PBS/Tween20	59
5-8-1-5-PBS/Tween20/Süt	59

5-8-1-6-Substrat Tamponu	59
5-8-1-7-Substrat Çözeltilisi	60
5-8-1-8-ELISA Uygulaması	60
5-8-1-8-1- Antijen Hazırlaması	60
5-8-1-8-2-ELISA Testinin Çalışılması	61
5-9-İstatistik Analiz.....	62
6-BULGULAR	63
6-1-Direkt Tanı	63
6-2-Mikrokültür Tanı	65
6-3-Serolojik Tanı	67
7-TARTIŞMA	70
8-SONUÇ	78
9-ÖZET	80
10-SUMMARY	82
11-KAYNAKLAR	84
12-EKLER	99
12-1-ETİK KURUL TUTANAĞI	99
12-2-TEŞEKKÜR	100
13-ÖZGEÇMİŞ	101

TABLÖLAR

Tablo 1.1 Akdeniz ölkelerde VL tahmin edilen sıklığı	4
Tablo 1.2 İnsanlarda enfeksiyona sebep olan önemli <i>Leishmania</i> türleri.....	5
Tablo 3.1 Yapılan çalışmalarda VL tanısı için kullanılan rekombinant antijenler Duyarlık ve özgüllüğü	33
Tablo 3.2 Ant-leishmanial tedavi sonrası iyileşen ve asemptomatik vakaları tespiti etmek için tanı yöntemlerinin karşılaştırılması	40
Tablo 5.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri	43
Tablo 5. 2 Çalışmada parazit formu ve parazit yüküne göre oluşturulan fare grupları.....	45
Tablo 6.1 Giemsa ile boyanan ince yayma sonuçları	64
Tablo 6.2 Giemsa yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı	65
Tablo 6.3 Mikrokültür yönteminin sonuçları	66
Tablo 6.4 Mikrokültür yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı	66
Tablo 6.5 3ay boyunca fare gruplarının OD ortalaması ve P değeri.....	69

ŞEKİLLER

Şekil1.1 Leishmaniasisin Dünyadaki dağılımı	6
Şekil2.1 <i>Leishmania</i> parazitinin amastigot formu	7
Şekil2.2 <i>Leishmania</i> parazitinin promastigot formu	8
Şekil2.3 Metasiklogenez Döngüsün	9
Şekil2.4 (a) Prosiklik promastigot (b) Metasiklik promastigot formları	10
Şekil2.5 Dişi <i>Phlebotomus</i> (Tatarcık)	13
Şekil2.6 <i>Leishmania</i> 'nın yaşam döngüsü	13
Şekil2.7 VL olgusunda hepatosplenomegali	14
Şekil2.8 Sağ üst kol lateralinde KL lezyonu	16
Şekil2.9 İmmun yanıt	24
Şekil5.1 Çalışmada kullanılan dişi BALB/ C fare	44
Şekil5.2 Fareye intraperitoneal parazit enfeksiyonu	45
Şekil5.3 40 ml'lik flaskta <i>Leishmania</i> kültürü	47
Şekil5.4 Flasktaki kültürde çiçek şeklinde görülen <i>Leishmania</i> promastigotları	48
Şekil5.5 Metasiklik Promastigo İzolasyonu Yöntemi	50
Şekil5.6 <i>L.infantum</i> Promastigot formları	51
Şekil5.7 Enfekte farelerin kuyruklarından kan alınması	52
Şekil5.8 Kan örneklerinden serum ayrılması	53
Şekil5.9 Hematokrit tüpünde oluşan buffy coat tabakası	53

Şekil5.10 Hematokrit tüpü cam keser aletiyle buffy coattun üstünden kesilmesi	54
Şekil5.11 Buffy coattan ince yayma perparatının hazırlanışı.....	55
Şekil5.12 Fareden alınan kandan ince yayma perparatında Giemsa boyalıamastigotformu(x1000	55
Şekil5.13 Mikropept ile buffy coat alınması	56
Şekil5.14 Alınan buffy coat'ın 70 µl RPMI 1640 içeren yeni ependorafa aktarılması.....	57
Şekil5.15 Alınan buffy coat tabakasının yeni eppendorfa aktarılması.....	57
Şekil5.16 Buffy coat ile kültür karışımının yeni hematokrit tüplerine aktarılması ve steril mumla iki tarafının kapatılması	58
Şekil5.17 İnverted mikroskopta x20 objektifte incelenen mikrokültürde görülen promastigotlar	58
Şekil5.18 ELISA test plakları.....	61
Şekil6.1 MP 'ları ile enfekte edilmiş balb/c farelerin giemsa boyama ile 3 hafta sonra yapılan yaymada görülen amstigotları	64

GRAFIKLER

Grafik6.1 MP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzelerinin OD ortalaması67

Grafik6.2 PP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzelerinin OD ortalaması68

Grafik6.3 TP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzelerinin OD ortalaması68

Grafik6.4 Aylık MP, PP ve TP gruplarının spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzelerinin OD ortalaması69

KISALTMALAR

VL	Visseral Leishmaniasis
KL	Kutanöz Leishmaniasis
MKL	Mukokütanöz Leishmaniasis
DKL	Diffüz Kutanöz Leishmaniasis
AKL	Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis
ZKL	Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis
ZVL	Zoonotik Visseral Leishmaniasis
AIDS	Edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ETDA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu
NNN	Novy-MacNeal ve Nicole
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
M P	Metasiklik promastigot
PP	Prosiklik promastigot
TP	Total promastigot
GPI	Glikozilfosfatidilinositol
GIPL	Glikozil-fosfolipid
LPG	Lipofosfo-glukan
PG	Fosfoglikan
PPG	Proteo-fosfoglikanlar

CPs Sistein proteaz
SDS Sodium Dodecyl Sulfate
MCP Makrofaj kemotaktik protein
DC Dentritik hücreler
İFAT İndirekt Fluoresan Antikor Testi
ELİSA Enzyme-linked Immunosorbent Assay
WB Western Blot
DAT Direkt Aglütinasyon Testi
C kompleman

1-GİRİŞ

***Leishmania* spp ve Leishmaniasis**

Leishmania türleri evrimlerini omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki konakta geçirirler. Omurgalı konak insan veya diğer memeliler, omurgasız konak ise tatarcıklardır. Omurgalılarda *Leishmania* amastigot kamçısız hareketsiz formunda, omurgasızlarda ise promastigot deniler hareketli kamçılı formu vektörün bağırsağında bulunur.^{1,2}

İnsan ve diğer memelilerde *Leishmania* parazitleri özellikle retikuloendotelial sistem hücrelerinin içerisinde amastigot formunda bulunmaktadır. Enfekte bir konağı ısırarak *Phlebotomus*'lar (tatarcık,kum sinekleri)kan emerken amastigotları almakta ve orta barsağında. Bu parazitlerin kamçılı formu olan promastigotlar meydana gelmektedir. bu süreç yaklaşık 1 hafta almaktadır. Promastigot şekli ise mekik veya iğ biçiminde kamçılı ve hareketlidir. 10-15 µm boyutlarındaki kamçılı promastigotlar 22-25 °C 'lik ısının sağlandığı çeşitli besiyerlerinde de in vitro olarak da üretilmektedirler. Amastigot şekli 2-3 µm boyutlarında yuvarlak-oval bir şekile sahip olup kamçısı yoktur ve hareketsizdir. Giemsa veya Wright boyası ile yapılan boyama sonrasında büyük bir nukleus yanında sitoplasma içerisinde nukleustan daha küçük bir çubuk şeklinde kinetoplast bulunmaktadır.³

Leishmania parazitinin bilinen 30'den fazla türü vardır. Bunların 12 türü insanları enfekte eder. ¹

Zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania*, Trypanozom ailesinin Kinetoplastida sınıfında yer almaktadır. ^{4,5,6}

Zoonotik bir enfeksiyon olan leishmaniasis, köpek ve diğer kemiricilerde de ortaya çıkar. Hastalığın klinik seyri, parazitin bulaşması, tropizmi ve patogenezi ile konağın immun sistemi arasındaki kompleks etkileşimlere bağlıdır. Klinik belirtileri; asemptomatik şekilden visseral leishmaniasis gibi ağır tablolarla seyreden değişik şekillerde olabilir. ⁷

VL; öldürücü leishmaniasis parazit hastalığı olup, tropik ve subtropikal bölgelerde görülür. *L.donovani*'ye Batı Afrika ve Hindistan'da *L.infantum* ise Avrupa, Kuzey Afrika ve Latin Amerika'da ilaca dirençi giderek çoğalırken erken tanı tedavide büyük önem taşır, doğru tanı doğru tedavi için önemlidir. VL tanısı zor ve invazivdir dalak aspirat alması ölüm riski taşır, lenf ve kemik iliği aspirasyonu gibi örnek alma invaziv yöntemlerdir. ^{8,9,10,11}

Türkiye'de, *L.donovani*, *L.infantum*, *L.tropica*, *L.major* türleri ile enfeksiyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bunlardan ilk iki tür insanlarda retiküloendotelial sistem hücrelerine yerleşerek iç organ leishmaniasis (VL)'ine neden olurlar. *L.tropica* ve *L.major* türleri ise deriye yerleşerek deri leishmaniosis(KL)'ine sebep olurlar. ^{12,13}

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği 6 hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır.

Ayrıca son zamanlarda bunlara Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL) eklenmiştir. Akdeniz bölgesinde de geniş bir yayılım gösteren leishmaniasis, eko-epidemiolojik açıdan Antroponotik Kutanöz Leishmaniasis (AKL), Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL) ve Zoonotik Visseral Leishmaniasis (ZVL) olarak ayrılabilir. ^{7,17,13,14,15,16} Şekil 1.1

WHO tarafından 1994 yılında AIDS sıklığındaki artışa paralel olarak VL olgularında da artış olduğu bildirilmiştir. ^{18, 19}

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı (Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence) raporunda her yılı yaklaşık 0.2 - 0.4 milyon VL ile 0.7-1.2 milyon KL vakası rapor edilmektedir. VL vakalarının %90'dan fazlası altı ülkede görünmektedir; Hindistan, Etiyopya, Brezilya, Bangladeş, Sudan ve Güney Sudan. KL daha yaygın olup vakaların üçte biri Amerika, Akdeniz havzası Batı, Orta Doğu ve Asya merkezine doğru ortaya çıkmaktadır. KL'in en sık görüldüğü ülkeler ise Afganistan, Cezayir, Kolombiya, Brezilya, İran, Suriye, Etiyopya, Kuzey Sudan, Kosta Rika ve Perudur. Hastalık nedeniyle VL vakalarının %10 ölümüne sebep olmakta, tahmini olarak yılda 20.000 -40.000 VL nedeniyle kişi hayatını yitirdiği bildirilmektedir. ⁹⁵ Tablo 1.1

Tablo 1.1. Akdeniz ülkelerde tahmin edilen VL sıklığı⁹⁵

Ülkeler	VL vakları /yıllar	VL tahmini yıllık sıklığı
Arnavut	114 /2004–2008	140 - 201 ¹
Cezayir	111 /2004–2008	130 - 200 ¹
Bosna-Hersek	2/ 2002–2005	2 - 3 ¹
Bulgaristan	7/ 2004–2008	8- 12 ¹
Hırvatistan	5/ 2004–2008	6- 8 ¹
Kıbrıs	2/ 2008	1-4 ¹
Mısır	1/ 2008	1 - 2 ¹
Fransa	18/ 2004–2008	20 - 30 ¹
Yunanistan	42/ 2004–2008	50 - 80 ¹
İsrail	2 /2003–2007	3 - 4 ¹
İtalya	134/ 2003–2007	160 - 240 ¹
Ürdün	0 /2004–2008	0 - 0
Lübnan	0/ 2004–2008	0 - 0
Libya	3/ 2004–2008	5 - 10 ²
Makedonya	7/ 2005–2009	9 - 13 ¹
Malta	2/ 2002–2005	3 - 4 ¹
Monaco	Bilgi yok	
Karadağ	3/ 2004–2008	4 - 5 ¹
Fas	152/ 2004–2008	300 - 610 ²
Filistin	5/ 2004–2008	10 - 20 ²
Portekiz	15 /2003–2007	20 – 30 ¹
Slovenya	Bilgi yok	
İspanya	117/ 2004–2008	140 - 210 ¹
Suriye	14/ 2004–2008	30 - 60 ²
Tunus	89/ 2004–2008	110 - 160 ¹
Türkiye	29/ 2003–2007	60 - 120 ²

Bu tahminlerden 2-4 katan daha fazla olduğu bildirilmiştir

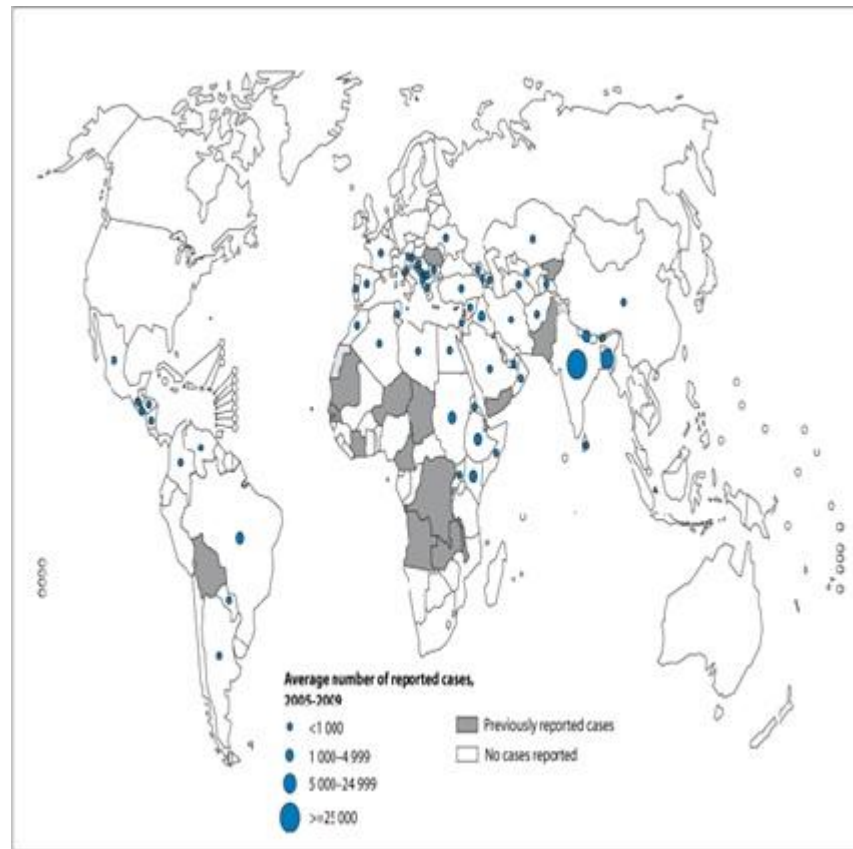
Leishmaniasis; tedavi ve kontrolünde yaşanan zorluklar nedeniyle, paraziter hastalıklar içinde sıtımdan sonra ikincil önemli hastalık olarak anılmaktadır. ¹⁵

Leishmania türlerinin insanlarda sebep oldukları klinik sendromlar ve bunların dünyadaki dağılımları tablo 1.2 'de gösterilmektedir.

Tablo1.2 İnsanlarda enfeksiyona sebep olan önemli *Leishmania* türleri. ²⁰

Türler	Klinik Tablo	Coğrafik lokalizasyon
<i>*L.(L.)donavani</i>	VL, PKDL	Hindistan, kuzey ve doğu Çin, Nepal Akdeniz havzası, Orta Doğu, Balkanlar,Asya, Kuzeybatı Çin ,Kuzey ve Sahra altı Afrika
<i>*L.(L.)infantum</i>	Visseral leishmaniasis	
<i>L.(L.)chagasi</i>	VL, KL (nadir)	Latin Amerika
<i>L.(L.)archibaldi</i>	VL, KL	Sudan, Kenya, Etiyopya
<i>L.(L.)major</i>	KL	Orta Doğu, Kuzeybatı Çin, Kuzeybatı Hindistan,Pakistan, Afrika
<i>*L.(L.) tropica</i>	VL, KL	Akdeniz havası, Orta Doğu,Batı Asya , Hindistan
<i>L.(L.) aethiopica</i>	KL, diffüz kutanöz leishmaniasis	Kenya, Etiyopya, Yemen
<i>L.(L.) mexicana</i>	KL. Nadiren mukozal leishmaniasis	Meksika ,Orta Amerika ,Teksas
<i>L.(L.) amazonensis</i>	VL, KL, diffüz kutanöz leishmaniasis,nadiren	Amazon havzası,Brezilya
<i>L.(L.) pifanoi</i>	KL, diffüz kutanöz leishmaniasis	Venezuela
<i>L.(L.) granhami</i>	KL	Venezuela
<i>L.(L.) venezuelensis</i>	KL	Venezuela
<i>L.(V.) braziliensis</i>	kutanöz leishmaniasis, mukozal leishmaniasis	Latin Amerika
<i>L.(V.) guyanensis</i>	kutanöz leishmaniasis	Amazon havası
<i>L.(V.) peruviana</i>	kutanöz leishmaniasis	Peru, Arjantin
<i>L.(V.) panamensis</i>	kutanöz leishmaniasis	Panama, Costa Rica

*Türkiye'de görülen *Leishmania* türleri



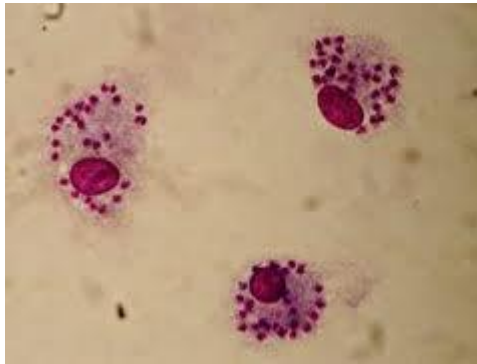
VL'de, *Leishmania* parazitini görerek tanı koymak için, kemik iliği, dalak, karaciğer ve lenf bezi aspirasyonu yapılabilmekte veya alınan periferik kan örneğinden santrifüj yardımıyla ayrılan çekirdekli hücreler incelenmektedir. KL'de ise lezyon kenarından alınan aspirasyon, kabuk veya punch biyopsi örnekleri kullanılmaktadır. Her iki klinik formda da örnekler alındıktan sonraki tanı koyma amaçlı yapılan işlemler büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.²²

2-GENEL BİLGİLER

2-1- *Leishmania* parazitinin Morfolojisi

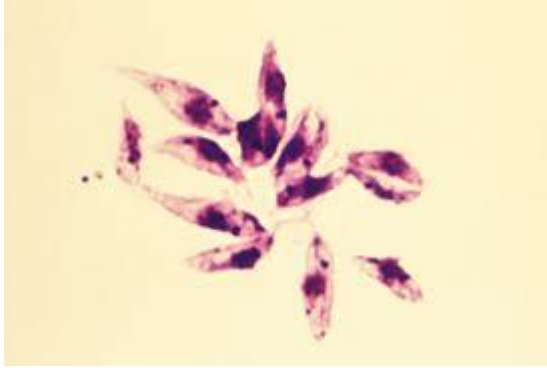
Leishmania türleri difazik hayat evresine sahiptir. İnsan ve diğer memelilerde amastigot, vektör olan kum sineklerinde ise promastigot formu bulunmaktadır.^{23, 24, 25,26}

2-1-1-Amastigotlar; yuvarlak veya oval şekilli, 2.5-6.8 µm büyüklüğünde hareketsiz olup, lökositler, monositler veya endotel hücreleri içerisinde tek tek veya gruplar halinde bulunabilirler. Sitoplazmada uca yakın büyük bir nükleus ve nükleusa bitişik kinetoplast bulunmaktadır. Kinetoplastta da nükleusdakinden farklı bir DNA bulunmaktadır. DNA'nın dizilimi türlere göre farklılık gösterdiği için tür ayrımında yardımcı olmaktadır. Bütün *Leishmania* türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondrium vardır. Sitoplazmada bulunan golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktivitelerinden ve parazitin beslenmesinden sorumludurlar. Amastigotlar kamçı cebi içinde bir kamçıya sahip olmakla beraber kamçı hücre dışına çıkmamaktadır.²⁷ Şekil 2.1



Şekil2.1 *Leishmania* parazitinin amastigot formu²¹

2-1-2- Promastigotlar; ise 15-20 µm boyunda, 1.5-5 µm genişlikte mekik şeklinde olup kamçılıdırlar. *Phlebotomus*'ların bağırsaklarında ve besi yerinde bulunan formudur. Ön uçundan çıkan serbest bir kamçısı vardır. Bu yapı hareket özelliği kazandırır. Kamçı kökü yanında yerleşmiş dokuz çift periferik ve bir çift merkezi lifden oluşan bir aksonemi vardır. Nükleus ve nükleolus merkezde bulunur. Nükleus membranında porlar vardır. Ayrıca sitoplazma içerisinde golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum bulunmaktadır.^{27,28,29} Şekil 2.2



Şekil2.2 *Leishmania* parazitinin promastigot formu.²¹

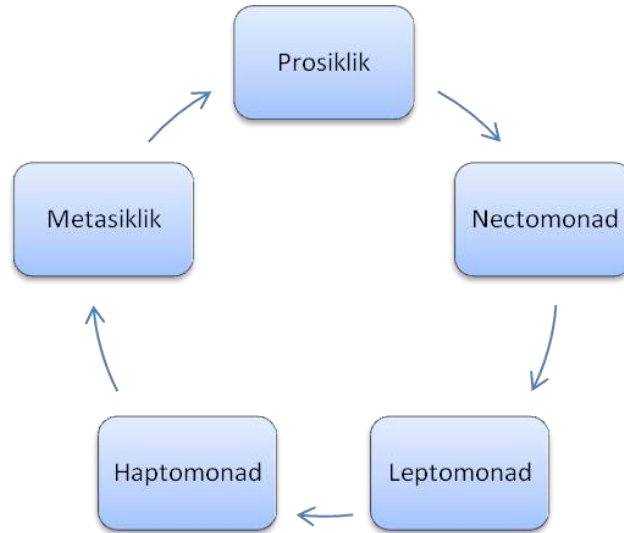
2-2-Prosiklik ve Metasiklik Evreler

Parazitin amastigot ve promastigot olarak iki hayat formu vardır. Dişi *Phlebotom* enfekte konaktan kan emerken amastigotları alır, vektörün barsağında promastigotlar oluşur. Promastigot, ekstraselüler olarak vektör barsağındaki mikrovillüslara tutunur.^{7,3} Bölünme yeteneği olan bu PP, bölünme yeteneğini kaybetmiş MP dönüştüğünde (metasiklogenez) memeli konak için enfektif olan formunu kazanır.³⁰ Şekil 4

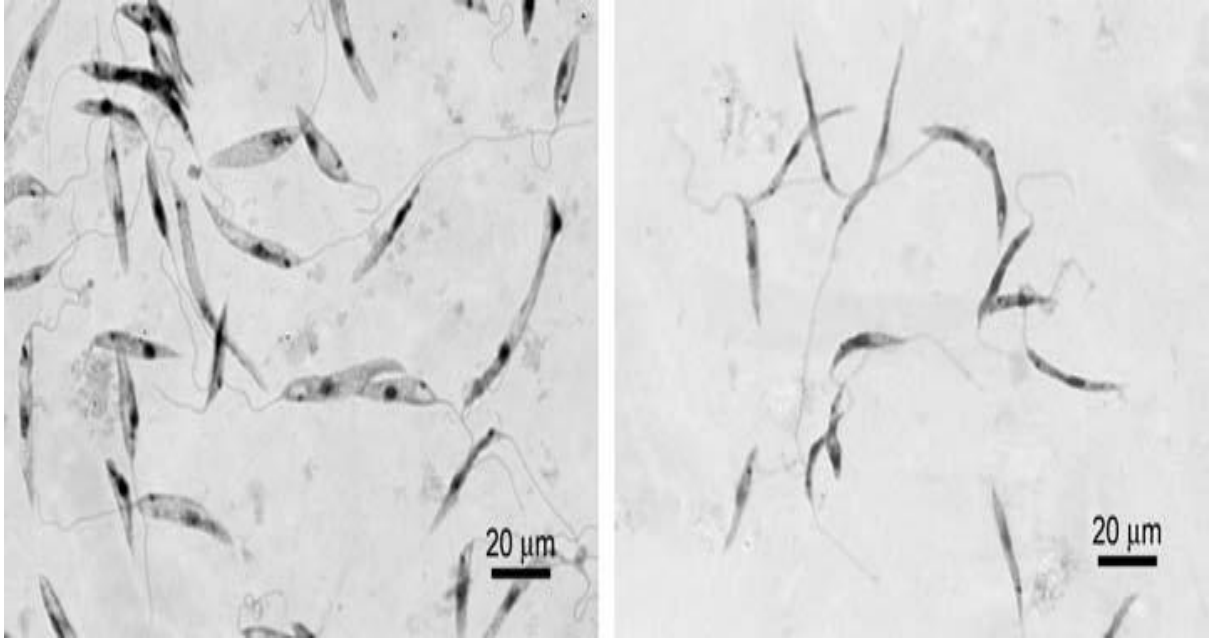
Vektör kan emmek için deri ile tekrar temasa geçer ve MP'u dermise enjekte eder. Leishmaniasis oluşumunda sadece MP'un enjekte edilmesi yeterli değildir. Promastigotun, mekanik hareketle dermin derin tabakalarına itilmesi gereklidir, aksi halde hedeflediği dermal kapillerlere ulaşması zordur. Çok daha önemli bir nokta, inokülasyon bölgesindeki doğal immün engellerin

aşılması gerekliliğidir. Vektörün tükrüğündeki hyaluronidaz-maksadılan gibi vazodilatatör etkili salgılar, enjeksiyon bölgesinde hızlı bir şekilde hareket ederek temel immün engellerin aşılmasını sağlar ve enfeksiyonun başlamasına yardımcı olur.³¹

MP,kültürlerde stasyonel fazda görülmektedir ve farklı yöntemlerle stasyonel fazdan izole edilmektedir.³⁰



Şekil2.3 Metasiklikogenez Döngüsü²¹



a

b

Şekil2.4 (a) Prosiklik promastigot ve (b) Metasiklik promastigot formları ⁹¹

Yapılan çalışmalarda MP formunu hücre membranında bulunan proteinleri PP formundan 130-250 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir ve *Leishmania* spp'inin virülans faktörünün hücre membranda olduğu tespit edilmiştir. ³⁰

MP formu PP formuna göre daha hareketli ve Giemsa boyası ile sivri kamçıları vücudunun iki katı uzunluktadır PP formu ise daha az hareketli ve Giemsa boyası ile geniş kamçısı kısa şekilde görünür. ³² Şekil 2.4

2-3-SINFLANDIRMA

Dünya Sağlık Örgütünce *Leishmania* türleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır ¹⁹

Alem: Protista

Altalem: Protozoa

Şube: Sarcomastigophora

Altşube: Mastigophora

Sınıf: Zoomastigophora

Ordu: Kinetoplastida

Aile: Trypanosomatidae

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

Cins: Leishmania

2-3-1-Altçins: Leishmania

Tür: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aetropica*, *Leishmania mexicana* (*L.mexicana*, *L.amazoensis*, *L.venezuelensis*, *L.pifanoi*, *L.enriettii*)

2-3-2-Altçins: Viannia

Tür: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L.braziliensis*, *L.colombiensis*, *L.equatorensis*, *L.peruviana*)
Leishmania guyanensis (*L.guyanensis*, *L.panamensis*, *L.shawi*),
Leishmania lainsoni, *Leishmania naifi*

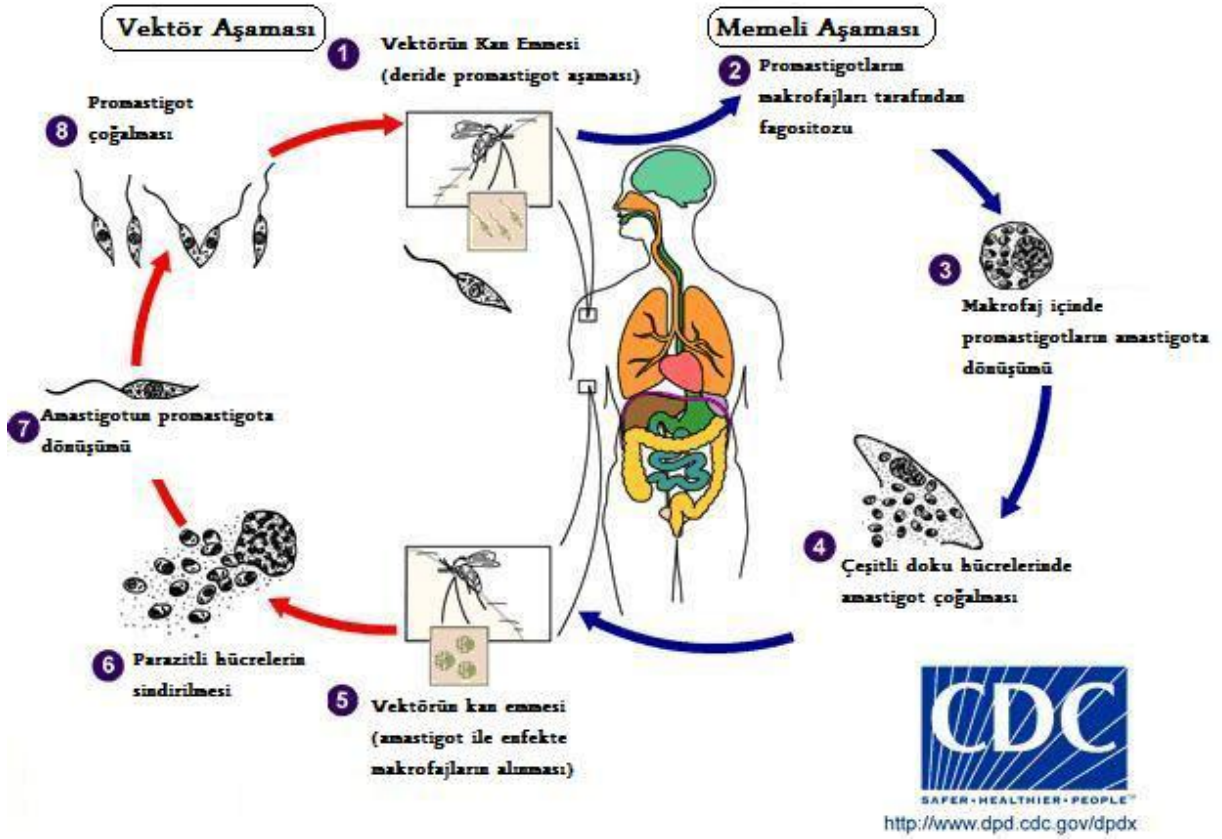
2-4-*Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

Leishmania türleri vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar, leishmaniasisli bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan parazitin amastigot şeklini almaktadır(şekil 2.5). Emilen kan, orta midede “peritrofik membran” adı verilen bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri ile bu membran içine salgılanmaktadır. *Leishmania*'ların bir kısmı makrofajların lizis olması esnasında sindirilirken kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot şekline dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlamaktadır.

Enfektif promastigotları barındıran vektör tatarcık, kan emmek için bir omurgalı konağı soktuğu zaman belli bir miktardaki promastigotları da gidiş yönü kan akımının aksine olduğu halde inoküle etmemektedir. Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerdeki serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosit edilmektedir. Fagosit edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedirler. Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabilmekte (*L.tropica*) veya iç organlara göç edebilmektedir (*L.infantum*). Enfekte makrofajlar kan yoluyla deriden öncelikle dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere neden olmaktadırlar.^{4, 7} Şekil 6, 2



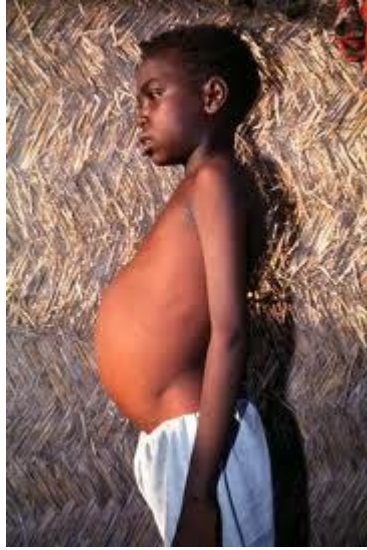
Şekil2.5 Dişi *Phlebotomus* (Tatarcık) ²¹



Şekil2.6 *Leishmania*'nın yaşam döngüsü ²¹

2-5- Klinik

(VL) de amastigotları tüm RES hücrelerinin içerisinde bulmak mümkündür. genellikle *L.infantum*, *L.donovani* veya *L.chagasi* neden olmaktadır. Ancak nadirde olsa Orta Doğu'da *L.tropica*'nın ve Güney Amerika'da *L.amazonensis*'in sebep olduğu olgularda bildirilmektedir. VL'de belirtiler arasında ateş, halsizlik, iştahsızlık fagositoz yapan hücreler paraziti fagositoz yapmasıyla birlikte lenf düğümlerinde görülür. Dalak ve karaciğerde anormal büyüme ortaya çıkar. Ateş şiddetli ve aralıklı olarak seyir edilir. Hastalık ilerdikçe splenomegali karında ağrı ve şişlik görünür, kilo kaybı, hepatosplenomegali, anemi, lökopeni, hipergamaglobulinemi yer almaktadır. Şekil 2.7



Şekil2.7 VL olgusunda hepatosplenomegali ²¹

Bu hastalık Kala-Azar olarak da adlandırılmaktadır. Bunun yanında bazı hastalarda enfeksiyon tamamen asemptomatik seyretmekte ve kendi kendine sınırlayan bir özellik göstermektedir. Enfeksiyon özellikle küçük çocuklarda ve HIV gibi immun yetmezik yapan bir hastalıkla birlikte görülmesi ilerleyici hastalık oluşumunu etkileyen faktörlerdir.^{33, 34, 35, 36}

Post –kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL), Afrika ve Hindistan’da VL olgularının tedavisi sonrası, yaklaşık 2 yıllık bir süreçte başlayan ve deri lezyonları olarak görülen, 20 yıl gibi uzun sürelerde devam edebilen bir hastalıktır.³⁷

Kutanöz leishmaniasis (KL) inkübasyon dönemi birkaç hafta ile birkaç ay arasında değişebilmektedir. Küçük kuru kabuklu tek bir lezyondan, geniş, derin ve skar bırakarak iyileşen birden fazla lezyona kadar değişen ülserler meydana gelebilmektedir. Lezyon özellikleri etken *leishmania* türüne göre değişmektedir. *L.tropica* “kuru” kabuklu, yavaş ilerleyen ve tedavi edilmeyen olgularda bir yıl kalan lezyonlara neden olurken, *L.major* ve *L.braziliensis* “ıslak” zeminli, geniş ve birkaç ayda iyileşebilen lezyonlara neden olmaktadır.

³ Şekil 2.8



Şekil2.8 Sağ üst kol lateralında KL lezyonu ²¹

Diffüz Kutanöz leishmaniasis (DKL) ise ülserleşmeyen bir papül olarak başlayan lezyonun etrafında satellit lezyonları meydana gelmekte ve bu lezyonlar hastanın tüm yaşamı boyunca kalabilmektedir. *L.tropica* sebep olduğu lezyonlar, İran ve Orta Asya'da yaygın olarak görülmektedir. Genellikle yüzde görünmektedir. ³

2-6-Leishmaniasis ve Immunolojisi

2-6-1- Patogenez

Parazite ait faktörler ve konağın savunma mekanizmaları patogenezi direk olarak şekillendirmektedirler. Immünopatogeneizde, memeli konağın genetik alt yapısı doğrultusunda oluşturduğu immün yanıt ile vektörün çevresel ve genetik faktörleri rol alıyor olsa da; pek çok mikroorganizma ile enfeksiyon sırasında olduğu gibi ilk ve anahtar görevi gören elemanlar *Leishmania* türlerinin moleküler determinantlarıdır. Bu determinantlar; enfeksiyon için gereken invazif determinantlar ve immünopatolojiden sorumlu determinantlar şeklinde ikiye ayrılabilir.^{38,39}

2-6-1-1-Invazif Determinantlar: Parazit için primer konak hücre olan makrofajların enfekte edilmesi, fagolizozomlar veya parazitofor vakuollerde başarılı hücre içi yaşam için gereken virülans faktörleri ile gerçekleşir. Bunlar arasında; glikozilfosfatidilinositol(GPI), glikozil-fosfolipid (GIPL), lipofosfoglikan (LPG), fosfoglikan (PG), proteo-fosfoglikanlar (PPG), leishmanolizin (gp63) ve sistein proteaz (CPs) sayılabilir. Enfeksiyon için zorunlu olduğu saptanan bu faktörlerin immünopatolojide rol oynamadıkları belirtilmektedir.

2-6-1-2-Pato-antijenik Determinantlar: Enfekte hücreden köken alan bazı parazite özgül antijenlerin, konak immün yanıtı ile negatif yönde etkileşerek, immünopatoloji olarak gözlenen klinik semptomlardan sorumlu olduğu düşünülmektedir.^{38, 39, 40}

VL'li hastalarda, enfekte makrofajların konaktaki diğer elemanlarla (immün sistem hücreleri gibi) etkileşimleri sonucunda ortaya çıkan bu antijenik epitoplara karşı, çok yüksek miktarda *Leishmania*'ya özgü ancak koruyucu olmayan antikorlar saptanmaktadır. Klinik semptomlardan da sorumlu olduğu düşünülen bu antijenlerin immünopatogeneizde rol oynadığı kabul edilmektedir.³⁸

Bu determinantlar; hücre iskeleti proteinleri (kinesin=rK39, tübülün), şaperonlar, ısı şok proteinleri (HSP 60, 70, 83, LmSti1), ribozomal proteinler (eIF, LiPO, Lip2a, Lip2b) nükleozomlar, histon proteinleri ve glikozomlar (TPI, TSA, LACK, LeIF gibi antijenler) gibi protein komplekslerinin içinde bulunan sitoplazmik özgün epitoplardır.^{38, 39}

Tüm determinantlar leishmaniasis oluşturabilmek için immün sistemin belirli kompartmanları ile etkileşime girerler. İnvazif determinantlar, yani virülen fenotipe indirek olarak katkıda bulunan virülans faktörleri, *Leishmania*'nın immün ve immün olmayan engelleri aşarak intraselüler enfeksiyon oluşturmaya olanak sağlar. Devam eden kronik süreçte, bazı intraselüler amastigotlar ölür ya da lizise uğrar ve amastigotların bir takım sitoplazmik molekülleri (pato-antijenik determinantlar) ortaya saçılır. Bu özgün epitoplara karşı gelişen konak immün yanıtı, *Leishmania*'ya karşı immünite sağlamakta yetersiz kalır ve leishmaniasiste gözlenen klinik semptomlara neden olur.³⁸

Leishmaniasis immünopatogenezi üç ayrı aşamayı içine alan bir etkileşim zinciri olarak ele alınabilir. Hastalık patogenezinde en çok role sahip olduğu belirtilen “parazit-memeli konak ilişkisi ” aşamasıdır.⁴¹

Başlangıçta makrofaj içersine giren promastigot, amastigot formuna dönuştükten sonra hızlı bir çoğalma sürecine girmektedir. Aynı anda ise konağın doğuştan edinilmiş yanıtı ve antijene spesifik immun cevapları (hücreyel ,geç tip hipersensitivite) devreye girerek asemptomatik veya kendiliğinden iyileşen yada iyileşmeyen bir enfeksiyon olamak üzere farklı görüntülerde klinik tabloları meydana getirmektedirler. En ideal koşullarda makrofajların aktive olması ile tetiklenen leishmanisidal aktivite, Th1 hücrelerine bağımlı olarak dentirik hücreler (DC), CD4+ T hücreleri ve sentezlenen proinflamatuvar sitokinler (IL-12,IFN- γ ve TNF α) tarafından denetlenmektedirler.²⁴

2-6-2-Parazit etkisi ve Bunu Belirleyen Faktörler

Leishmania parazitleri, makrofaj ve DC mekanizmaları, hücre içersinde bulunan yapıları bozarak öncelikle humoral immun cevaptan kaçış yollarını bulmaktadırlar. Makrofaj içersinde gen eksresyonlarını, kinaz ve fosfatazların fonksiyonlarını bozarak makrofaj cevabını ve sitokin sentezini, yüzey moleküllerinin oluşumunu, reaktif, oksijen ürünlerinin salınımını engellemektedirler. DC'lerin göçünü inhibe ettikleri gibi bunların T hücreleri aktive etmesini de engellemektedirler. Özellikle yüzey membran metaloproteazı olan gp63, komplemana bağımlı hücre lizisini engelleyip makrofaj içersinde girmeyi sağlamaktadır. *Leishmania*'da homoloğu bulunan aktive C kinaz reseptörü (LACK) ise baskılıyıcı Th2 CD4+ hücre cevabını oluşturmaktadır. Sonuç olarak amastigotlar makrofaj içersindeki fagolizozom içersindeki asidik ortama adapte olarak hayatta kalmayı başarmaktadırlar.²⁴

2-6-3-Konak Cevabı

Enfeksiyon bölgesinde yoğun bir mücadeleye girişen konak, çeşitli hücrelerini(nötrofiller, monositler, NK, makrofajlar, DC) antijeni tanımında görevli reseptör mekanizmalarını (toll-like reseptör) ve çeşitli eriyik molekülleri (kompleman,IL-1 α ,IL-12 ve TNF α 'i de içeren sitokinler) bölgeye toplar. Anti-leishmanial IgG'nin kronik ve iyileşmeyen hastalarda yüksek oluşu da göz önüne alınarak savunmada işlev görmediği anlaşılmaktadır.²⁰

2-6-4-İmmun Yanıt

Fare modellerinde çalışmak kolay olmakla birlikte özellikle hamsterlerdeki *L.donovani* ile oluşan ilerleyici özellikteki enfeksiyon, insanlardaki VL kliniğine çok benzemektedir. Yapılan çalışmalarda *L.donovani* enfeksiyonu inoküle edildiğinde, ilk hafta amastigotların deride kalıp hücre içerisinde bölündükleri gözlenmiştir.4-6 hafta arasında ise bir granuloma oluşumu dikkat çekmekte iken 8.haftada derideki parazitlerin büyük çoğunluğunun kaybolduğu gözlenmektedir. Bundan sonra ilk olarak karaciğere yerleşirken ve karaciğerdeki bölünme ve sayı artışı çok hızlı olurken, dalağa yerleşenler ömür boyu bu organda kalmakta ve "güvenli bir liman" görevi gören dalak sayesinde yavaşça gelişimlerine devam etmektedirler.²⁰

Yapılan çalışmalarda amastigotların 8.haftadan sonra karaciğer kupffer hücreleri içinde yerleştiği ve hem dalak hemde karaciğerde IFN- γ ve IL-12 üreten hücrelerin sayısı az olduğunda parazitin erken dönem çoğalmasının daha kolay olduğu gösterilmiştir. Parazit gelişiminin ilk 4 haftada IL-12 'den bağımsız olduğu hem enfeksiyona hassas C57BL/6 farelerde, hemde IL-12 p40 eksikliği olan özel fare suşlarında bu gelişimin aynı olması ile gösterilmiştir. Çalışmalarda *L.major* enfeksiyonunun ilk 4-6 haftalık yavaş ilerleyen, IL-12 p40, IFN- γ , CD40 ve iNOS sunan hücrelerin etkileşimi ile

gerçekleşmektedir. Enfeksiyonun genellikle gerilime aşamasında karaciğerde görülen granulomlar immun sistemi baskılanmış farelerde ve ilerleyen sistemik tutuluşlu VL olgularında gözlenmemektedir. Karaciğerde granuloma oluşumu için, CD40+, CD80+ hücrelerinin, IFN- γ , IL-12 sentezinin gerekliliği gösterilmiş olup, dolaşımdaki monosit ve TNF- α 'nın granuloma içerisinde parazitin öldürülmesi için şart olduğu gösterilmiştir. Tekrar enfeksiyon alınması durumunda ise artık karaciğer enfeksiyona dirençli olup, hemen toplanan CD8+ hücrelerinden meydana gelen granulomalar enfeksiyonu ortadan kaldırmaktadırlar. CD8 hücrelerinin özellikle uzun dönem immun belleğin korunmasında *Leishmania* enfeksiyonlarında temel rolü oynadığı gösterilmiştir.²⁰

Dalakta parazit geç dönemde ortaya çıkıp, yavaş yavaş bölündükleri için ömür boyunca oradaki varlıkları devam edebilmektedir. BALB/c farelerde *L.donovani* enfeksiyonu sırasında IL-14 bulunmadığı durumlarda IL-10, IL-12, IFN- γ ve TGF- β varlığı birlikte göstermiştir. Özellikle IFN- γ 'a cevap vererek NO sentezi gerçekleştiren hücrelerin dalakta bulunmaması, parazitin buradaki uzun süreli varlığını açıklayabilmektedir. Akut VL olgularının kanlarında artmış IL-10 sentezi yanında IL-14, IL-13 ve IgE seviyelerinde arttığı gözlenmektedir.²⁵

2-6-4-1-Humoral İmmun Yanıt: Leishmaniasis enfeksiyonları, hasta serumunda anti-leishmania antikorlarının varlığı ile karakterizedir. KL'de aktif lezyon döneminde antikor titreleri genellikle çok düşük olarak bildirilmekle birlikte bazı çalışmalarda antikor takiplerinin *L.braziliensis* enfeksiyonlarında tanı ve prognoz takibinde kritik öneme sahip olduğu vurgulanmaktadır. Ancak VL olgularında bu antikor seviyeleri tipik olarak çok yüksek olarak saptanmaktadır.²⁶

VL'de Th1 kökenli IFN- γ 'nın IgG1 ve IgG3 izotiplerini, Th2 kökenli IL-4 ve IL-5'in ise IgG4'ü düzenlediği düşünülmekle birlikte, bu antikorların korunma ve patogenezdaki rolleri tam olarak bilinmemektedir.²⁷

Son çalışmalarda IgG'nin enfeksiyondan koruma etkisi olmadığı gibi, enfeksiyonun ilerlemesine sebep olan faktörlerden olduğu saptanmıştır. BALB/c fareler dışarıdan IgG eklenmesinin hem daha büyük lezyonlara hemde daha fazla miktarda IL-10 sentezine neden olduğu bildirilmektedir. Artan antikor titreleri son yıllarda DAT, ELİSA, dot-ELİSA, immunoblot, hızlı strip test, İFAT, IHA gibi spesifik serodiagnostik yöntemlerle tespit edilerek tanı konma amacıyla kullanılmakla birlikte Leishmaniasis tanısı hala güçlüğünü devam ettirmektedir.²⁸

2-6-4-2-Hücreseİ İmmun Yanıt: KL'de konağın derisinde bulunan DC'ler *Leishmania* parazitlerini fagosit ederek doğuştan sahip olunan immunité ile edinseİ immunité arasında ilk köprü görevini gerçekleştirmektedirler.

Fagositözü gerçekleştiren DC'lerin yüzeyinde bulunan class I ve class II major histocompatibilite (MHC) moleküllerinin belirginleşmesi, CD40 CD54, CD60 ve CD86 gibi yardımcı moleküllerinin yüzeye çıkış ve IL-12 p40 sentizi ile enfekte DC'leri deriden en yakındaki lenf nodlarına transfer edilip burada T hücrelerine antijeni sunması gerçekleşmektedir.²⁹

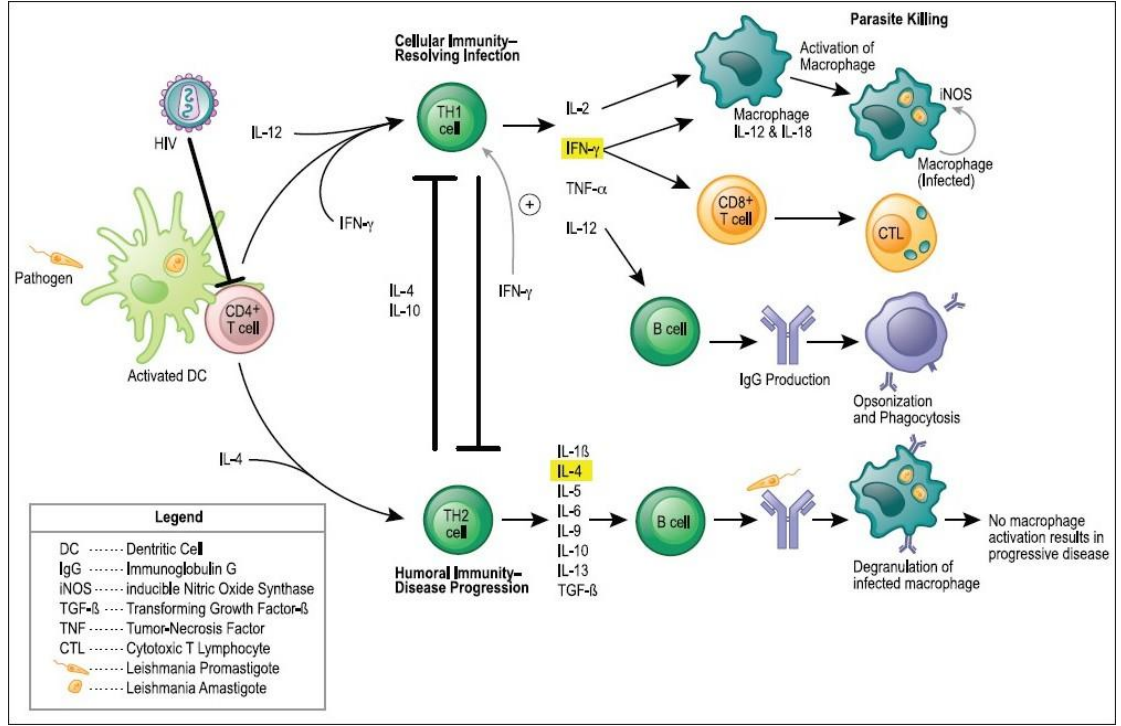
Yapılan fare çalışmalarda DC'lerin lenf noduna geçişinde CCR2 ve CCR7 moleküllerinin sunumu ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Genetik olarak bu moleküllerden yoksun olan farelerde bu göçün gerçekleşemediği gösterilmiştir.³²

VL'de çeşitli kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin Th1 cevabının oluşumunu etkilediği gösterilmiştir. Özellikle CCR5 ve MIP-1 α 'nın eksikliğinin enfeksiyonun erken fazındaki IFN- γ cevabını azalttığı gösterilmiştir. Ancak bu

cevabın enfeksiyonun kronikleşmesi ile düzeldiği gösterilmiştir. *Leishmania* ile konağın enfekte olması sonucunda karaciğerde hızlı bir CCL2, MIP-1 α ve CXCL10 birikmesi olduğu gözlenmektedir. Enfeksiyon sonrasında da yüksek konsantrasyonda varlığını devam ettiren CXCL10'un karaciğere Th1 hücre toplanmasını tetiklediği buna karşılık dalaktaki CCL2 yoğunluğunun ise Th2 sitokinlerinin sentezini attırarak bu bölgede parazitin varlığının devam etmesine neden olduğu gösterilmiştir.³²

Th1, Th2 hücre gelişiminde rol oynayan immunolojik faktörler ile ilgili özellikle fare modellerinde yapılan çalışmalar, insan ve hayvan leishmaniasis olgularında parazitlerle konak arasındaki etkileşim anlamak konusunda yardımcı olmaktadır. Enfekte kişilerin lenfositlerine bakıldığında belirgin bir IFN- γ ve çok zayıf bir IL-4 varlığı dikkat çekmektedir. Aynı şekilde ağır enfeksiyonda IL-4 sentezi öne çıkarmaktadır. VL ve KL' de iyileşme görüldüğünde, biopsi örneklerinde IL-10, IL-12 ve IFN- γ seviyelerinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Yapılan çalışmalarda sitokin sentezinin tek bir hücre üzerinde belirginleşmesinden çok, hem Th1 hemde Th2 hücrelerden sentezlenen sitokinlerin varlığı dikkat çekmektedir.

İnsan çalışmaları ile kıyaslandığında, özellikle fare modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilerin, leishmaniasisden korunma çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.³³ Şekil 2.9



Şekil2.9 İmmün yanıt ²¹

2-6-5-Parazit-Memeli Konak İlişkisi ve İmmünopatogenez

2-6-5-1-Doğal İmmün Yanıtın Aşılması

İnoküle edilen promastigotun ilk hedefi makrofajlardır. Metasiklik promastigot, makrofajdaki C reseptörü 1-3, mannoz fukoz reseptörü ve Fc reseptörünü kullanarak tutunmayı gerçekleştirir. Anti-leishmanial antikorlar ve C parazitin yüzeyinde birikmeye başlar. Bu noktada parazitin yüzeyinde bulunan LPG ve gp63 çok önemli rol oynar.^{41,42, 43, 44,45}

C3 molekülü aktif litik formu olan C3b ile LPG ve gp63'ün yüzeyine tutunur ve klasik yoldan C aktivasyonu yapar. *Leishmania*'lar C3b ile opsonize olmaları sayesinde CR1-3'ü kullanarak reseptöre bağlı endositozla makrofaj içine girer. Ancak yüzeylerinde eksprese ettikleri kalın LPG ve gp63, parazitleri C5-9 litik kompleks etkisinden korur.^{42, 43}

Benzer biçimde IgM'ye bağlı immünoaderans mekanizmaları da, C bağlı lizis gelişmeden çok önce Fc reseptörü yolu ile fagositoza olanak sağlamaktadır. Burada dikkat çeken bir başka nokta, çok az sayıda parazitin makrofajlarda olmasıdır. Diğer bir çok mikroorganizma için sorun olacak bu durum *Leishmania*'lar için avantaj olarak kullanılmaktadır, çünkü görmezden gelmek "ignorance" tetiklemek yolu ile de doğal bağışıklığın ilk basamaklarında konağa üstün gelebilmektedirler. Chang ve McGwire'ın ortaya koyduğu şekilde, LPG ve gp63 invazyon sonrası down regüle edilmektedir ki bu regülasyon da parazitin hedeflediği gözden kaçma ve düşük immünojenite olgularını desteklemektedir. Promastigotların fagositozunu takiben, tutunma ve bağlanmada önemli rol oynayan parazit ürünleri ve virülans faktörleri tekrar devreye girer. Hücre içi öldürme ve degradatif makrofaj yolları ile interfere olarak parazitin zarar görmeksizin makrofaj içinde yaşamasını ve çoğalmasını sağlarlar.^{43,44}

LPG molekülünün fonksiyonları şu şekilde özetlenebilir:

1. Adezyon moleküllerini (ICAM ve VCAM) ve makrofaj kemotaktik protein-1'i (MCP-1) inhibe ederek makrofaj göçünü engeller.
2. Oksijen radikalleri ile NO ve NOS2 inhibisyonu ve protein kinaz C (PKC) sinyal yolunun inhibisyonu üzerinden oksidatif yıkımı engeller.^{42,44}
3. Fagozom-endozom füzyonunu geciktirir. gp63'ün fonksiyonları ise şöyledir:

1. Makrofaj içi oksidatif yıkım inhibisyonu yapar. 2. Proteaz aktivitesi ile lizozomal sitoliz ve degradasyondan korunma sağlar.

Bu etkilere, tükrüğün makrofaj anti-leishmanial aktivite baskılama etkisi ve vazodilatasyon etkisi eklendiğinde, parazit promastigottan, dirençli olan amastigot formuna dönüşecek zamanı kazanır (immün yanıt oluşumunu erteleyerek ve geçici olarak baskılayarak zaman kazanır) ve yeterli derecede çoğalarak asıl hedefi olan yeni hücreleri enfekte edecek kapasiteye ulaşır. Bu kapasite sağlandıktan sonra fagozom-sekonder lizozom füzyonu gerçekleşir ve parazitofor vakuol oluşur. Bunu takiben makrofajlar parazit tarafından lizise uğratılır. Enfeksiyon bölgesine gelen diğer mononükleer fagositler ve antijen sunan hücre (ASH) kapasitesine sahip hücreler - özellikle DH- sekonder enfeksiyon hedefi haline gelir.⁴³

2-6-5-2-Adaptif İmmün Yanıtın Aşılması

Kutanöz lezyonlarla seyreden, tedavisiz bile %95 oranında spontan iyileşebilen KL etkeni *L.major* ile tedavisiz %95 ölümle sonuçlanan ve visseral özellik gösteren VL etkeni *L.donovani*'nin patogenezi, hayvan (özellikle fare) modelleri üzerinde yapılan çalışmalar ile bugünkü düzeye ulaşmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar iki etkenin de her iki tipte hastalık oluşturabileceğini gösterir niteliktedir. *Leishmania* enfeksiyonun gidişi, koruyucu hücresel immün yanıt ile patoloji meydana getiren ve hastalığı ağırlaştıran immün yanıt arasındaki kompleks etkileşimler sonucunda belli olmaktadır. Farelerin *L.major* ile enfeksiyonları, hastalık patogenezinin aydınlatılması açısından önemli olmanın yanı sıra, immün yanıt fonksiyonlarının anlaşılmasını da sağlayan çok değerli bir modeldir. Bazı fareler (C7BL-6), *L.major* ile enfekte edildikten sonra kutanöz lezyonlar geliştirirler ve hastalığı bölgesel lenf nodlarında sınırlandırır. Bu hayvanlar

insandaki KL'ye model olmaktadır. Enfeksiyonu kontrol edemeyen ve sistemik hale getiren fareler (BALB/C) ise, insandaki VL ya da DKL immünopatogenezi için model teşkil eder.^{43,44}

Leishmania enfeksiyonlarına direnç ya da duyarlılıktan sorumlu olan immünolojik yolların açığa çıkarılması, immün sistemin Th1/Th2 dengesine bağlı olan, hücresel-hümoral polarizasyon farklılığını ortaya koymuştur. Th1/Th2 dengesi, patojenin tipine ve vir lans faktörlerine, ASH'lerin "na ve" T hücreleri ile etkileşimlerine ve salgılanan sitokinlere bağlı olarak gelişmektedir. Th1/Th2 dengesinin Th2 yönüne kayması veya Th1 yanıtının baskılanması leishmaniasisten sorumlu olarak d    n lmektedir. Adaptif immün yanıtın *L.major* ve *L.donovani* tarafından modülasyonu ve hastalık gidi ine ait bilgiler deneysel hayvan modellerinden köken almaktadır.^{43,44}

3-LEİSHMANİASİS'İN LABORATUAR TANISI

3-1-Etkene Yönelik Tanı

Parazitolojik yöntemler yüksek özgüllük fakat, düşük duyarlılık gösterir. Doku, dalaktan aspirat, lenf nodlarından ve kemik iliğinden alınan örneklerle direkt mikroskopi yöntemiyle yüksek özgüllük fakat duyarlılıkta farklılık görülmüştür. Duyarlılık dalaktan alınan örneklerde (%93-99) iken kemik iliğinde (%53-86) ve lenf bezlerinde (%53-65) olarak saptanmıştır. Dalaktan aspirat alması ölüm riski taşır, lenf ve kemik iliği aspirasyonu da invaziv yöntemlerdir. Klasik kültür yöntemlerinde dalak ve kemik iliği aspirasyonu yüksek özgüllük gösterir fakat, uzun zaman alması ve emek yoğun olması, konsantrasyon riski taşıması yapımını zorlaştırır. Son yıllarda geliştirilen mikrokültür yöntemi (MCM) daha yüksek duyarlılık, düşük maliyet ve sonuçlar kısa zamanda elde edilmesi mümkün olmuştur.^{46, 47,48}

Tanıda epidemiyolojik veriler, klinik ve laboratuvar bulguları ile serolojik tanı yöntemleri önem taşımaktadır. Etkensel tanı ise her zaman için ön plandadır. Klinik VL ile sıtma, bruselloz, verem, döneke humma, tifo, paratifo, sepsis, histoplazmoz gibi hastalıklarla karıştırılabilir. Hepatit, enfeksiyöz mononükleoz, lösemi chagas hastalığı, akut sistozomiyaz, hepato-splenik sistozomiyaz, PKDL, lepra ve sifilisten ayırt edilmelidir. Bunlardan dolayı tanımında laboratuvar metodlarının büyük önemi vardır. Kala-azar'la sıtma birlikte bulunabilir.^{4,12}

Kala-azar sonrası deri leishmaniasis'i lepra ile karıştırılabilir. Endemik bölgelerde uzun süren ates, ilerleyici kilo kaybı, hepatosplenomegali, pansitopeni ve hipergamaglobulinemi VL 'i akla getirmelidir.^{7, 4, 17, 13}

KL veya VL'den şüphelenilen olgularda, kesin tanı alınan örneklerde amastigotların görülmesi ile konmaktadır. VL olgularında ,kemik iliği, dalak aspirasyon materyalleri incelenirken KL'dan alınan örneklerin incelenmesi gerekmektedir. Direk Giemsa boyama ile örnekler incelenirken aynı zamanda NNN besiyerinde yapılan ekimler sonucunda besiyerinde üreyecek promastigotların takip edilmesi ile de tanı konmaktadır. Ayrıca anti-leishmanial antikorların gösterildiği İFAT, rk39 antijenin kullanıldığı ELİSA testleri ile hızlı test olarak kullanılan rk39 dipstick testleri ve spesifik DNA'nın gösterildiği moleküler teknikler tanı amaçla kullanabilmektedirler.³

3-1-1-Direkt mikroskopi

Kan, kemik iliği ve dalak ponksiyon materyali ve karaciğer aspirasyonundan hazırlanan yayma preparatlar Giemsa ile boyanır ve mikroskobun (X100) büyütmesinde incelenir. Kemik iliğinde parazit ilk enfeksiyonlarda % 94, relapslarda % 64 oranında bulunur. Dalak ve karaciğer aspirasyonunda parazitin bulunma oranı % 96 -98'dir. Ancak her iki yöntemde de hayatı tehdit edici derecede kanama riski vardır. Eğer büyümüş lenf nodu varsa oradan da biyopsi yapılabilir. Tanıda kemik iliği aspirasyonu en güvenli yöntemdir.^{12, 50, 51}

3-1-2- Klasik kültür yöntemi

Kala-azar'lı hastalardan alınan kemik iliği, karaciğer, dalak ponksiyon materyalleri ya da sitratlı kan leishmaniasis'in tanısı için en eskiden beri kullanılan ve günümüzde de en uygun olan N.N.N. besiyerine ekilir. 23-25°C'lik etüvde 21-30 gün inkübe edilir. Besiyerlerinde leishmania'nın ara şekli olan promastigotların üremesiyle kesin tanı konur.^{4, 12, 50, 51 , 52}

Kültür ile tanının duyarlılığı, kültür ortamına inokülasyon sırasında aseptik koşullara dikkat edilmesi ve daha sonraki günlerde kültürlerin dikkatlice incelenmesiyle arttırabilmektedir. Ancak tanının hemen mümkün olmaması kültür yönteminin dezavantajıdır. Eğer yeterince dikkat edilmezse kontaminasyon riski bulunduğu unutulmamalıdır.²²

Leishmania üretiminde kullanılan diğer besiyerleri (RPMI 1640 - Medium 199 - Schneider's Drosophila Medium - Nutrient Broth) sayılabilir Ancak etkenin izolasyonu için N.N.N. besiyeri kullanılmalı ve üremeyi takiben istenirse diğer sıvı besiyerlerine aktarılmalıdır. Hayvan inokulasyonları, ponksiyon materyallerini laboratuvar deney hayvanlarına inoküle edilerek, bunların iç organlarında leishmania'ları görmekle de tanıya gidilebilir.^{3, 52}

3-1-3-Mikrokültür

Parazitolojik yöntemlerle vakaların yalnız %30-40'ına tanı koymak mümkündür. İç organlardaki hastalığın periferik kan ile tespiti %26 oranındadır. Yeni bir kültür tanı yöntemi olan Mikrokültür yöntem duyarlılığı çok güçlü olup, hastaların %80-95'ine, neredeyse tamamına mümkün hale getirildi. Tanı koymak için diğer yöntemlerle en az 1 ay, bazen 6 aya kadar uzanan zamana ihtiyaç duyulurken yeni mikrokültür yöntemiyle süre maksimum 1 haftaya indi. Ekonomik açıdan da diğer yöntemlere nazaran 100-130 kez daha ucuza olduğu belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda hasta lezyonlarından alınan örnekleri ile mikrokültür ve klasik kültür yöntemleri arasındaki karşılaştırmada mikrokültür yönteminin duyarlılığı% 83-97 olup 4-7 gün içinde elde edilmektedir klasik kültür yöntemi ile duyarlılık % 20-40 olup 15- 30 gün gibi daha uzun sürede elde edilmiştir.⁴⁶

3-2-Serolojik Tanı

VL'in düşünülmesi durumunda tanıda yardımcı olmak amacıyla dünyanın birçok bölgesinde yüksek duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testler uygulanmaktadır. Serolojik yöntemlerde amaç akut fazda artan anti-paraziter antikorların titrelerini tayin ederek tanıya yardımcı olmaktadır. Serolojik testlerin pozitif olması leishmaniasis'de çok değerli olmakla birlikte seronegatif vakalarda diğer parazitolojik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile birden fazla test uygulamanın serolojik tanının değerini arttırabileceği bildirilmektedir.⁴

Aglütinasyon testleri: Direkt Aglütinasyon Testi (DAT) veya idrarda kullanılan lateks Aglütinasyon testi (LAT) rutin olarak VL tanısında kullanılıyor. DAT yöntemiyle, serum, idrar plazma, çok kolay ve yaygın olarak kullanılan yöntemdir, duyarlılığı (%90-100), özüllüğü (%95-100) rutin olarak kullanılmaktadır. (LAT), (KAtex®) testi; idrarda oluşan anti-leishmania antikorlarıyla lateks boncularına kaplanmış *L.donovani* antijenin arasındaki reaksiyona dayanır.

ELISA ve Western Blotting, crud ve farklı molekül ağırlıklı antijenler kullanılmıştır. Ancak bu tekniklerde deneyimli kişiler tarafından uygulanması gerekmektedir. Çeşitli yüzeyi antijenleri, ribosomal protein, nükleer protein, histon ve kinesin-related protein, humoral immün yanıtı oluşturduğu saptanmıştır dolayısıyla VL tanısında kullanabilir.

Uzun zamandır uygulanan İndirekt Fluoresan Antikor (İFA) testine ek olarak, İndirekt Hemaglütinasyon Testi (IHA)'de, rK39 özgül antijeninin kullanıldığı hızlı tanı testi (rK39 dipstik) rekombinat antijenleri crud/total antijenlerden daha duyarlı ve özgüldür, rekombinat antijenler arasında kinesin-related protein (rK39) en umut verici antijendir, rK39 immunochromatographic strip test (ICT) çok hızlı ve kolayca uygulanan serolojik yöntemdir. Anti-leishmanial antikorların saptanması için sero-epidemiolojik çalışmalarda yaygın kullanılan antijenlerdir. Tabloda 3.1 gösterilmiştir. ^{53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69}

Tablo 3.1 Yapılan çalışmalarda VL tanısı için kullanılan rekombinant antijenler Duyarlık ve özgüllüğü.^{8,59,60}

antijen türü	Duyarlık	özgüllük
rK39	88–100	86–100
rK26	100	100
rK9	95	100
rKRP42	94.6	99.6
rKE16	100	100
rGene B protein	97	92
Purified LPG	92	92
rHSP70	89–100	100
rGRP78	89	90
rHSP83	88–90	100
rlepp12	100	100
rpaplee22	100	100
rH2A	100	91
rH2B	100	92
rH4	47	–
L. infantum P0 ribosomal protein	93	96
rLiP2a	50	100
rLiP2b	100	40
rP20	68	95
rLACK	97	84
rCysteine proteinase	80	99
rA2	60–87	100
rPeroxiredoxin	–	–
rORFF	100	–
Tandem-repeat Proteins, LinJ16.1750, LinJ22.1590, LinJ33.2870, mLinJ28.2310	97	-
Q protein	100	-

3-2-1-Direkt Aglütinasyon Testi (DAT)

İnsanda ve köpeklerde VL tanısında kullanılan serolojik bir yöntemdir. Afrika trypanosomiasis enfeksiyonlarının ayırmasında ELİSA ve IFAT testlerine göre üstün olduğu belirlenmektedir. Bu test basitliğinin yanı sıra, özel konjugeye gereksinim göstermemesi, insan ve bütün hayvanların serumlarıyla çalışma imkanı verebilmesi nedeniyle de oldukça ekonomiktir.⁷⁰

DAT yüksek duyarlık ve özgüllüğü sahip olması, özel cihazlara gereksinim göstermemesi, antijenin uzun süre ve kolayca saklanabilmesi gibi teknik avantajları yanında basit ve ekonomik olmasından dolayı endemik bölgelerde yer alan bütün hastanelerde, rutin ve sero-epidemiolojik çalışmalarda rahatlıkla kullanılmaktadır.⁷⁰

3-2-2-İndirekt Hemaglütinasyon Testi

Bu yöntemde sadece eriyik antijenler kullanılmaktadır. Eriyik antijenle N.N.N. ve diğer, besiyerlerinde üretilen leishmania'nın promastigot şekillerden hazırlanır. Eriyik promastigot antijen solüsyonu -70°C'lik derin dondurucu veya liyofilize edilerek kullanılacağı zamana kadar saklanır. İnsan veya koyun eritrositleri uygun fosfat tampon solüsyonu ile veya FTS ile yıkandıktan sonra tannik asit ile duyarlaştırılan eritrositler antijenle kaplanır.⁷¹

3-2-3-İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT)

Goldman tarafından geliştirilen Fluoresan antikor testi Ameobiasis'de patojen amiplerin ayırımında kullanılmasından sonra, diğer protozoon ve helmint hastalıklarının tanısında da kullanılmaya başlanmıştır. Kala - azar hastalığının tanısında kullanılan bu test, tüm immunoparazitoloji laboratuvarlarında sıklıkla uygulanmaktadır. Antijen olarak *Leishmania*'nın promastigot şekilleri kullanılır.⁷¹

Bu test, VL için alışlageldik biçimde uygulanmakta, herhangi bir farklılık içermemektedir. Hasta tamıyla iyileştikten sonra 9 -12 ay sonra da pozitif saptanabilmektedir. Bunun yanı sıra erken dönemde de pozitiflik saptanabildiği için hastaları erken yakalamada ve relapsları belirlemede de uygun bir testir.²²

KL'de tanı amaçlı olarak tek başına kullanılmaması önerilmektedir. Uzun süreli devam eden, dokuya veya mukozaya invaze olmuş lezyonu bulunan, uzun süredir çok sayıda titre düzeyi olguların hemen hemen tamamında VL hastalarında saptanan düzeyden yüksek olmamaktadır. Diğer hastalıklarda olduğu gibi visseral leishmaniasisde de testlerde kullanılan antijen önem taşımaktadır. IFAT'ın hassasiyet ve özgüllüğünün saptanmasında amastigot veya promastigot antijen olması yanında kullanılan leishmania suşu ve izole edildiği bölgede uygulanıp uygulanmadığı da önem taşımaktadır.²²

3-2-4-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

VL tanısında ve seroepidolojik çalışmalarda kullanılan önemli testlerden biridir. Promastigot veya amastigot eriyik antijeni kullanılmaktadır.²²

Parazit hastalıklarının etkenleri direkt olarak görülemediği veya görülmesi zor olduğu zamanlarda bu hastalıkların tanısının yapılabilmesi için uygulanmakta olan serolojik tanı yöntemlerindendir.⁷³

Son zamanlarda ELISA çalışmaları daha spesifik olan rekombinant *Leishmania* antijenlerin (gp63, rK39, gp70-2 ve dp 72) kullanıldığı testler üzerine yoğunlaşmıştır.^{72, 74, 75}

3-2-5-Western Blot

Leishmaniasisde bu test daha çok araştırma amaçlı ve eriyik haldeki leishmaial antijenlerle uygulanmaktadır. IFAT ve ELISA 'ya göre daha hassas olduğu kabul edilmektedir.⁷⁰

Eriyik *Leishmania* antijeni ve moleküler standartlara Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) poliacrylamide jel elektrofrezi uygulandıktan sonra jeldeki polipeptidler nitrosellüloz membrana geçirilmektedir. Bu membran, 3 mm genişliğinde uzunlamasına kesilerek normal ELISA işlemi uygulanmaktadır. ELISA da olduğu gibi spesifik antijenler kullanılabilir. VL hastalarının serumları 12-120 kD arasında moleküler ağırlıktaki bir çok antijeni kapsamaktadır. 14-16 kD antijenleri leishmaniasis için en yüksek hassasiyeti göstermektedirler. Aynı şey 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.⁷²

3-3-İndirekt Yöntemler

Kala-azar olgularında gamma-globulinlerde artma ve albumin miktarında azalma olduğu bilindiğinden, şüpheli hastalarda globulin-albumin oranını saptamak gerekmektedir. Kala-azar hastalarının serumundaki immun globulin artışları genellikle IgG ve bazen de IgM şeklindedir. Albumin-globulin oranının değişmesi esasına dayanarak geliştirilen bazı testler Kala-azar'ın tanısında kullanılmaktadır. Bunlardan Napier'in Aldehit (Formol-Jel) testi, Chopra'nın Antimon ve Şia'nın presipitasyon testlerini sayabiliriz.^{4,52}

3-3-1-Kompleman Birleşmesi Testi

Kala-azar tanısında kullanılan ilk serolojik testlerden birisidir. Bu test için antijen, enfekte deney hayvanlarının dalak ve karaciğerlerinden, *L.donovani* kültür formlarından ve asit - fast basillerden hazırlanmaktadır. Kompleman Birleşmesi testinin esası; antijenin bağışık serumlar ile karıştırılıp, bu karışıma kompleman eklendiğinde, antijenin özel antikoru ile birleşirken komplemanı da bağlayıp tesbit etmesidir.⁷¹

3-3-2-Leishman'ın Deri İçi Testi (Montenegro Reaksiyonu)

Epidemiyolojik Leishmaniasis çalışmalarında önemli bir araçtır. İlk kez Montenegro tarafından; kültürde üreyen *L. donovani* promastigot şekilleri fenolle inaktive edildikten sonra deri içine verilerek yapılan bir testir. 1 ml'sinde 6-10 milyon promastigot şekiller bulunan solüsyondan 0.1- 0.2 ml deri içine verilir. Allerjik olan bu test 48-72 saat sonra okunur. Pozitif olgularda enjeksiyon yerinde 5 mm yada daha geniş bir eritem oluşur. Bu test Kala-azar olgularında başlangıçta negatif olup, tedavi sonrası veya kronik hale geçtikten sonra pozitifleşir. Genellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılır.^{4, 3, 7, 71}

3-4-Leishmaniasis Tanısında Moleküler Yöntemler

Enfekte organlardan elde edilen örneklerde, genelde parazitin az miktarda veya atipik morfolojide bulunması, kültür yöntemindeki kontaminasyon riski nedenlerle *Leishmania* parazitlerinin saptanmasında güçlükler olabilmektedir. Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Bu nedenle hasta kanı gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak PCR uygulanabilir. Tanıda kullanılan serolojik metotlar, daha önce parazitlerle karşılaşılıp karşılaşmadığının bir göstergesi olarak yardımcı, duyarlı ve özgüdür. Ancak, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli değildir. Eski ve yeni olguları tam olarak ayıramayabilir. Diğer patojenlerle çapraz reaksiyonlar olabilir. Moleküler tekniklerde, incelenecek örneğin az miktarda olması ya da örnekte parazitin az olması testi fazla etkilememekte, örnekten birkaç farklı inceleme yapılmasına olanak sağlamaktadır. *Leishmania* türlerinin saptanması ve tanımlanması için genellikle her parazitte birçok kopyası bulunan

"maxisirküler" ve "minisirküler" kinetoplast DNA'sı (KDNA) hedef seçilmektedir.

Ayrıca sitoplazmada ve nükleusta çok miktarda kopyası bulunan 16S rRNA genleri, küçük alt ünite rRNA genlerinin belli kısımlarından hazırlanan problemlerin kullanıldığı PCR ile, parazitler spesifik ve duyarlı olarak tanımlanabilirler. ^{76, 77, 78, 79, 80, 81, 82} Tablo 3.2

Tablo3.2 Ant-leishmanial tedavi sonrası iyileşen ve asemptomatik vakaları tespiti etmek için tanı yöntemlerinin karşılaştırılma çalışması.^{83,84}

Testler	Alınan örnek	Tedavi sonrası	asemptomatik vakalar	Notlar
Kültür (klasik ve mikrökültür yöntemi)	,kan ,Lenf nod,kemik iliği ve dalak aspiratı	+	+	Düşük duyarlık
Serolojik yöntemler DAT	Serum, idrar	-ve	+	Duyarlığı ve özgüllüğü yüksek ,fakat zaman alıcıdır
ELISA and immunoblotting Soluble antigens	Serum, idrar	-ve	+++	Aseptomatik olgulara tanı koymak için idealdir fakat ;geçmiş enfeksiyonda yararlı değil
Rekombinant antijenleri	Kan , serum, idrar	-ve/++	-ve/+++	Sadece birkaç antijenle geçmiş enfeksiyonda kullanabilir
LAT/KAtex	idrar	++	+++	Düşük duyarlı çoğu zaman HIV hastalarında kullanılır
Moleküler yöntemler PCR	,kan ,Lenf nod,kemik iliği ve dalak aspiratı	++++	++++	Geçmişte ki ve ve şimdiki enfeksiyonlar ayırt etmez
PCR-ELISA	Kan ve serum	-	++++	
Real-time PCR	kan ,Lenf nod,kemik iliği ve dalak aspiratı	+++++	+++++	Mükemmel ama pahalı
QT-NASBA	Duodenal Karaciğer,	+++++	+++++	

Duyarlılık aralığı, +=30–45%, ++=45–60%, +++=60–75%, ++++=75–90%, +++++=95 100%, -ve= testin uygun olmadığı

4-ÇALIŞMANIN AMACI

Leishmania infantum (MONI/EP126) suş ile BALB/C farelerde VL fare modeli oluşturmak ve enfekte farelerde enfeksiyonun mikroskopik, kültür ve serolojik olarak ELISA yöntemiyle üç aylık sürede takibinin yapılması amaçlandı. Parazitin farklı promastigot formlarının immun yanıt üzerine etkisi farelerdeki anti-leishmania IgG yanıtının ELISA yöntemiyle saptanan OD ölçümleriyle yorumlanmaya çalışıldı.

5-GEREÇ VE YÖNTEM

5-1-Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasal maddeler

1. Bisturi
2. İnsülin enjektör (ROY-Med)
3. Ependorf
4. Gazlı bez
5. Otomatik Pipet (Beta-Pette)
6. Thoma lamında (Menzel superior)
7. Santrifüj tüp
8. Santrifüj cihazı (Boeco)
9. Derin dondurucu (Uğur)
10. 0.22 Mm Filter (Coring Ny 14831)
11. Biyogüvenlik kabin (Metissafe)
12. Ters (invert) mikroskop (Leica)
13. Hasas terazi (Kern_{pfb})
14. Vorteks cihazı (Boeco)
15. +4 °C, -20° C ve -80 °C bozdaolabı (Uğur)
16. Otoklav (Sanyo)
17. Hematokrit tüp (Lamtek)
18. Cam keser aleti
19. Lam (Gitoglas)
20. Şale
21. Mikroskop (Olympus Cx31)
22. Etüv (Ünve)
23. Nano drop (Thermo)
24. Su banyosu (Temette Junior Te-8)

25. PH metre

26. ELISA 96 kuyulu plakları

27. ELISA çoklu plak yıkama cihazı (Thermo)

28. ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre) (Thermo)

Tablo 5.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besiyerleri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA
RPMI1640 –L glutamin	Fenol redli ve fenol redsiz besiyerleri GIBCO Invitrogen
DMEM	GIBCO
Ficoll	SIGMA
PBS	MEDICAGO AB
EDTA	APPLICHEM
Gentamciin	GIBCO
Tween20	SIGMA
Yağsız Süt Tozu	FLUKA
Alkalın fosfataz (AP) konjuge IgG	MILLIPORE
Sodyum Karbonat Na_2CO_3	SIGMA
Sodyum bikarbonat, NaHCO_3	MERCK
Sodyum azid, NaN_3	SIGMA
Çinko Klorür, ZnCl_2	APPLICHEM
MgCl_2 Magnezyum klorür,	FLUKA
Glisin,	FLUKA
paranitrofenil fosfat(PNFF , pNPP)	SIGMA
FBS-fetal bovine serum	GIBCO INVITROGEN

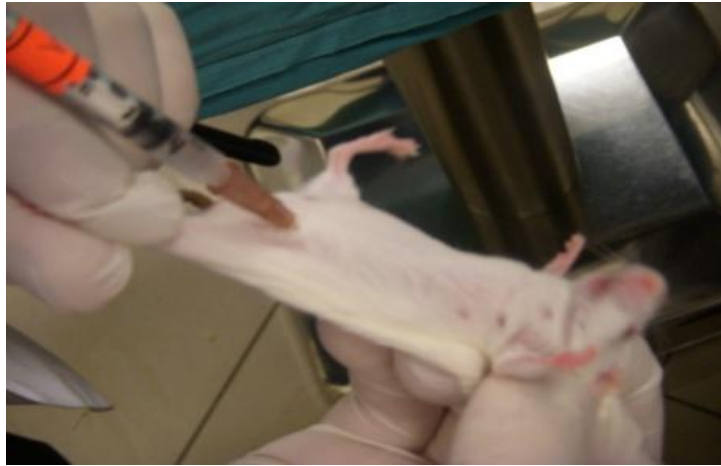
5-2-Fareler :

Farelerde VL enfeksiyonu oluşturmak için *Leishmania infantum* (MONI/EP126) Yıldız Teknik Üniversitesi Kıymya – Metalürji Fakóltesi Biyomühendislik Anabilim Dalından Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'den temin edildi. Çalışmada 17 tane BALB/ C (6-8 haftalık dişi) fare kullanıldı.Şekil 5.1



Şekil5.1 Çalışmada kullanılan dişi BALB/ C fare

Fare enfeksiyonu, enfeksiyonun sonrasındaki takipleri ve örnek alınması Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde (GÜDAM) yapıldı. Farelerin 11 tanesi parazitin (MP, PP ve TP) üç farklı formuyla 3×10^6 parazit /ml şeklinde intraperitoneal olarak enfekte edildi, kontrol grubu altı fareden oluşturuldu. Şekil 5.2 Tablo 5.2



Şekil5.2 Fareye intraperitoneal parazit enfeksiyonu

Tablo5.2 Çalışmada parazit formu ve parazit yüküne göre oluşturulan fare grupları

Fareler	Parazit Formu	Parazit Yüğü
4 tane	TP	3×10^6 parazit /ml
4 tane	MP	3×10^6 parazit/ml
3 tane	PP	3×10^6 parazit/ml
6 tane	Konrol	-

Enfekte edilen farelerden 3 ay boyunca her hafta farelerin kuyruklarında kan alınarak ince yayma preparatı hazırlanması, mikrokültür yapılması ve ELİSA yöntemi ile anti-leishmania IgG' seviyesi saptanma amacıyla kullanıldı.

5-3-Fare enfeksiyonu ve ELISA Yöntemi İçin *Leishmania* Suşunun Üretilmesi

L.infantum parazitinin üremesi için %10'lük fetal bovin serum (+L-glutamin) ve gentamcin (60 mg/ml) içeren RPMI 1640 besiyeri kullanıldı. Derin dondurucu (-80°C) ortamında saklanan suşlar oda sıcaklığında çözöldükten sonra hazırlanmış RPMI 1640 besiyerine aktarıldı. Kültür 27 °C 'de inkübe edildi. Kültürde üreyen (1-2 günde itibaren) parazitler inverted mikroskopta kontrol edildi. Kültürün pasajı haftada bir kez yeni flaska 5 ml besiyeri eklenerek ve üzerine 5×10^5 parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit aktararak yapıldı. 7-10 günlük inkübasyon sonrasında üreyen promastigotlar fareye enfeksiyonu ve ELISA yöntemi için antijen eldesi amacıyla toplandı.²²

Uygulama

1-Steril ortamda (biyogüvenlik kabininde bek kullanarak) besiyerleri hazırlandı .

2- İnaktif (56 °C de 30 dk) FBS 0.22 µm filtreden geçirilip besiyerine %10 olacak şekilde eklendi.

3- Gentamcin (60 mg/ml) 1µl/1ml besiyerine olacak şekilde eklendi .

4-Hazırlanan besiyeri steril plastik tüplere (50 ml'lik) bölünerek +4 °C'de saklandı.

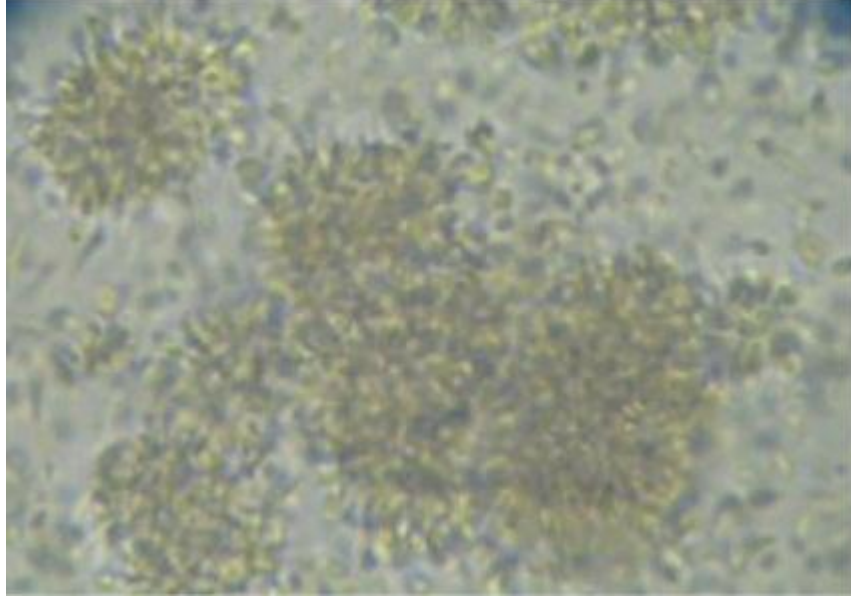
5- *L.infantum* paraziti -80 C°'den(oda sıcaklığında çözüldükten sonra) alınıp hazırlanmış besiyerine 5000 parazit /ml olarak şekilde 40 ml'lik flask(yatay pozisyonda) ve 50 ml'lik plastik tüplere(dikeyi pozisyonda) 30 ml besiyeri ekleyerek kültür yapıldı. Şekil 5.3



Şekil5.3 40 ml'lik falskta *Leishmania* kültürü

6-Kültür ortamı her gün inverted mikroskopta kontrol edilerek promastigotlar arandı.

7- promastigotlar 5 - 9 gün arasında bol olarak (çiçek şeklinde) ürediğinde, ficol dansite gradient yöntemiyle MP, PP ve TP formlar elde edildi. Şekil 5.4

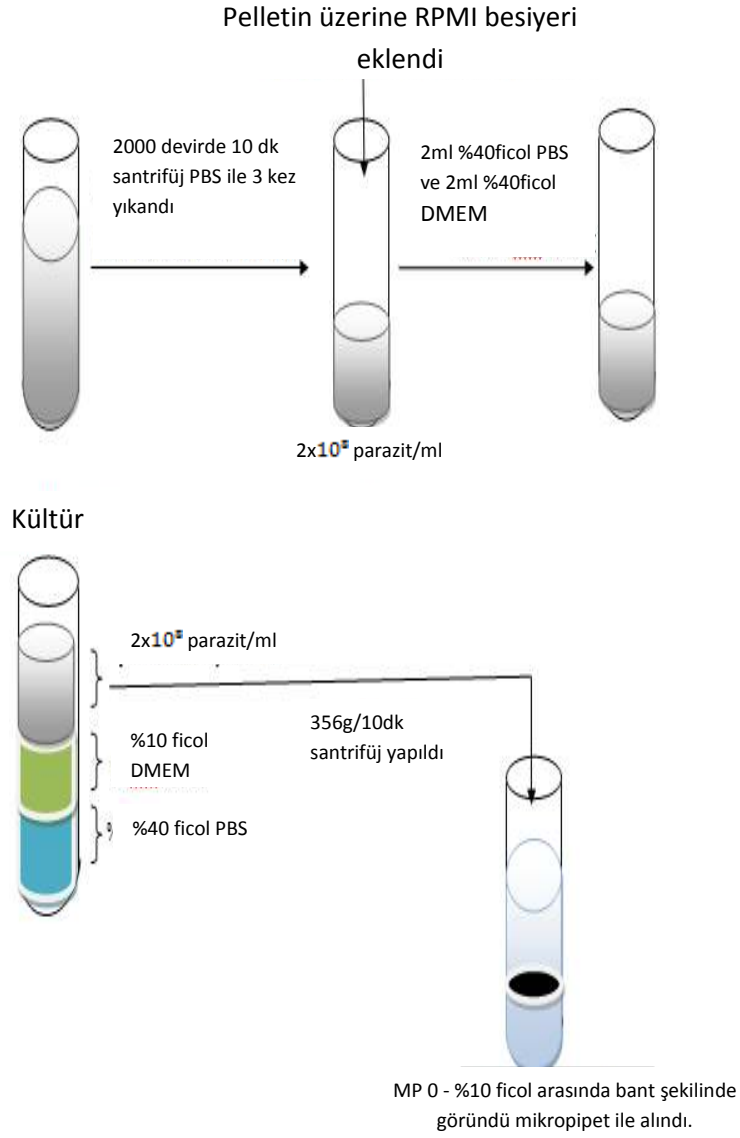


Şekil5.4 Flaskteki kültürde çiçek şeklinde görülen *Leishmania* promastigotları

Parazitlerin Thoma Lamında Sayımı, hareketli parazitleri fikse etmek amacı ile kültürden alınan 100µl örneğin üzerine 1:1 oranında %2'lik formalin eklenerek ve 5 dakika bekletildikten sonra. Daha sonra fikse edilen hücrelerin Thoma lamında sayımı yapıldı.

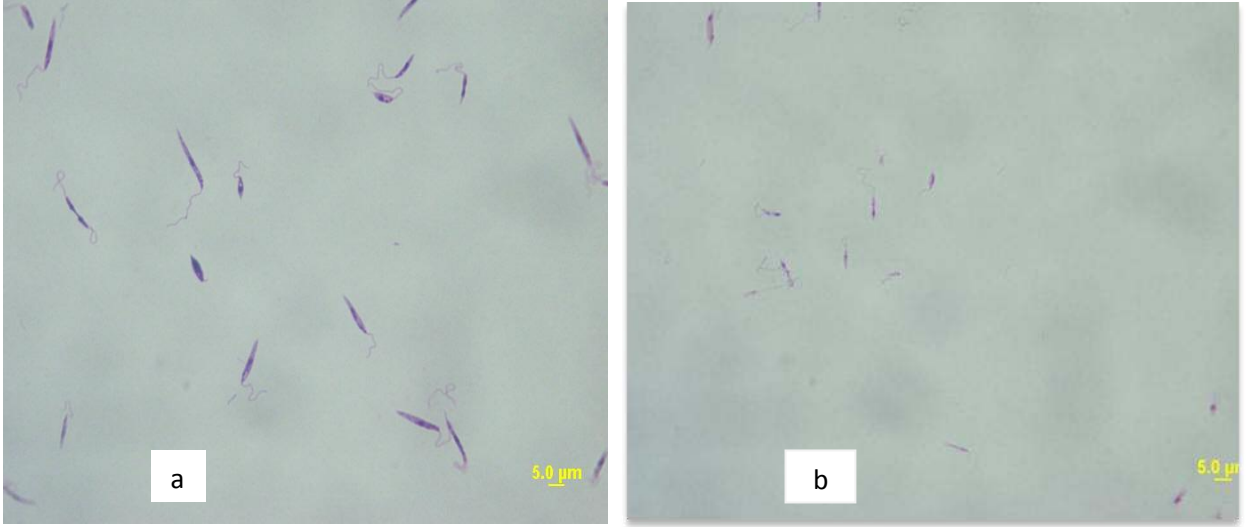
5-4-Prosiklik ve Metasiklik Promastigotların İzolasyonu

1. *Leishmania infantum* paraziti RPMI1640 kültürde 7-9 gün sonra 25 °C'de stasyonelfaza geçerek metasiklik oranı artar. Kültürü 11 güne kadar bekletilince metasiklik formunun ayrıştırılması sağlanır.
2. Bu amaçla ficol dansite gradient yöntemiyle MP ve PP'lar elde edildi.⁹⁵
3. Prosiklik form logaritmik fazında 4-5 günlük kültürden izole edildi.
4. Metasiklik form kültürde 7-9 gün üredikten sonra kültür DMEM ile 2000 devirde 10 dk 3 defa yıkandı .
5. Parazit sayısı 2×10^8 parazit /ml RPMI1640 olarak hazırlandı.
6. Ficol; 2 ml %40 'lık ficol PBS'te ve 2 ml %10 'luk ficol ise DMEM ile hazırlandı.
7. 15 ml'lik santrifüj tüpüne 2 ml parazit konsantrasyonun üzerine %40 'lık ficol PBS, %10 'luk ficol DMEM eklendi ve 365 g/10 dk santrifüj yapıldı.
8. Metasiklik formu % 0 ve% 10 ficoll tabakaları arasında bant şeklinde görüldü ve mikropipet kullanarak izole edildi. Şekil 5.5



Şekil5.5 Metasiklik Promastigot İzolasyon Yöntemi⁹⁵

9- MP, PP ve TP forumlarının sayısı 3×10^6 parazit /ml şekilde hazırlandıktan sonra farelere intraperitoneal olarak enfekte edildi.
Şekil 5.6



a- *L. infantum* Promastigotların Metasiklik Formu

b- *L. infantum* Promastigotların prosiklik Formu

Şekil 5.6 *L.infantum* Promastigot formları

5-5-Serum Örneklerinin Elde Edilmesi

Enfekte olan farelerden 12 hafta boyunca hafta da bir defa Giemsa boyama, mikrokültür ve ELİSA testler için kuyruktan kan alındı. Her fareden 70µL civarında kan alınarak 30 - 40µL PBS ile sulandırılmış EDTA içeren eppendorflar konuldu, santrifüj yapıldıktan sonra serum yeni eppendorfa aktarıldı, ELİSA için -80°C’de saklandı.

Uygulama

- 1- Kuyruk iodin ile temizlendi ve steril bisturiyle kuyruk kesildi, ilk kesmede kuyruk ucundan 1 cm uzaklıkta kesim yapıldı. Daha sonraki haftalarda ise kesik ucun 1 mm yukarisından kesim yapıldı ve kan alındı. Şekil 5.7



Şekil5.7 Enfekte farelerin kuyruklarından kan alınması

a-bistüri ile kesim

- 2- Kuyruk elle sağılarak kanlar steril pipet kullanarak 30 -40µL EDTA içeren ependorflara aktarıldı. Şekil 5.8 b

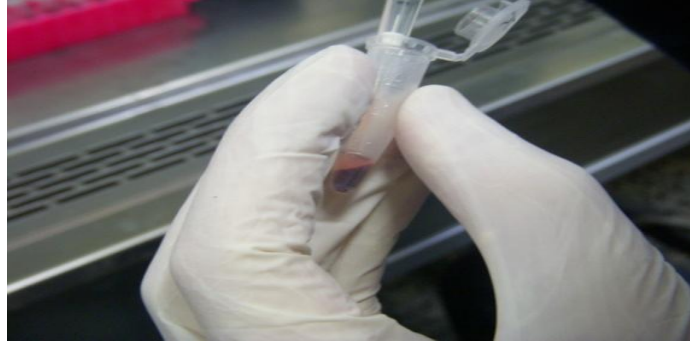


Şekil5.7 Enfekte farelerin kuyruklarından kan alınması

b-pipetle kan alma

- 3- Ependorflar +4 °C 3500 devirde 10 dakika da santrifüj yapıldı.

- 4- Serum yeni eppendorfa aktarıldı ve ELİSA için -80°C'de saklandı.
- 5- Serumlar ayrıldıktan sonra dipte kalan kanın üzerine 40µL RPMI1640 besiyeri eklendi. Şekil 5.8



Şekil5.8 Kan örneklerinden serum ayrılması

- 6- RPMI1640 besiyeriyle karıştırılan kan hemokrit tüplerine ve tüplerin bir tarafı ateş ile kapatıldı diğer ucu ise açık bırakıldı.
- 7- Hematokrit tüpleri ateşte eritilmiş mum içeren cam tüplere hemokritler açık tarafı üste ateş ile kapatılmış tafıda alt pozisyonda yerleştirildi 3500 devirde 5 dakika santrifüj edildi.
- 8- Hematokrit tüpleri santrifüjden sonra tüpte görünen ince beyaz tabakanın üstünden cam keser aletiyle kesilip pipetle buffy coat'ın 1-5µL alındı. Şekil 5.9 , 5.10



Şekil5.9 Hematokrit tüpünde oluşan buffy coat tabakası



Şekil5.10 Hematokrit tüpü cam keser aletiyle buffy coattun üstünden kesilmesi

- 9- Ayrılan buffy coat ile Giemsa boyama ve mikrokültür testi yapıldı .

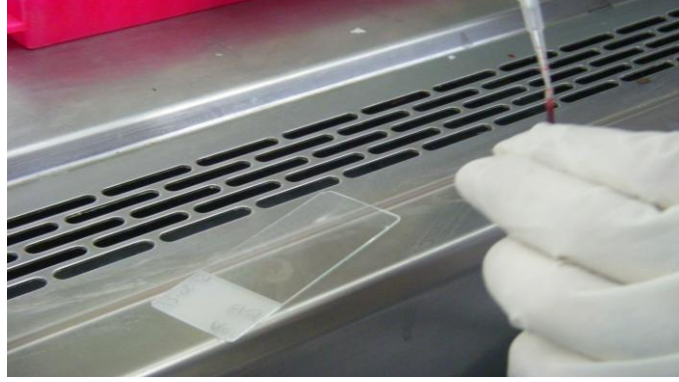
Buffy coat: EDTA 'lı kanın santrifüj edilmesi ile beyaz kan hücrelerinin toplandığı “buffy coat” olarak isimlendirilir.

5-6-Giemsa Boyamasının Hazırlanma Ve Yapılması

%10'luk giemsa boyası hazırlandı, 10 ml stok giemsa boyası ve 90 ml PBS şale içerisinde hazırlandı .

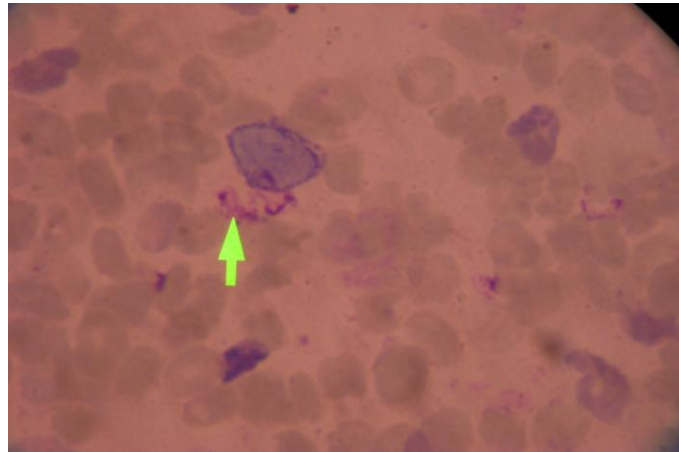
Uygulama

- 1- Kan örneklerden ayrılan buffy coat ile yapıldı.
- 2- Lamların üzerine buffy coattan ince yayma yapıldı . Şekil 5 .11



Şekil5.11 Buffy coattan ince yayma perparatının hazırlanışı

- 3- Lamlar havada kurutuldu ve saf metanolda 5 dk fikse edildi.
- 4- Lamlar havada kurutulduktan sonra 30 dk Giemsa boyasında bekletildi.
- 5- Çeşme suyla yıkandı ve havada kurtuldu.
- 6- 100'lük objektif ile imersiyon yağ kullanılarak mikroskopta amastigot formu incelendi. Şekil 5 .12



Şekil5.12 Fareden alınan kandan ince yayma perparatında Giemsa boyalı amastigot formu (x100)

5-7-Mikrokültür

%10'luk FBS ile hazırlanan RPMI1640 besiyeri kullanıldı. Steril hematokrit tüpler besiyeri ve buffy coat aktarıldıktan sonra steril mumla kapatılıp 25-27 °C de inkübe edildi.

Uygulama

1-Kan örneklerden ayrılan buffy coat ile yapıldı. Şekil 5. 13



Şekil5.13 Mikropept ile buffy coat alınması

2-Alınan buffy coat 1-5µL RPMI1640 içeren yeni eppendorfa aktarıldı.

Şekil 5. 14



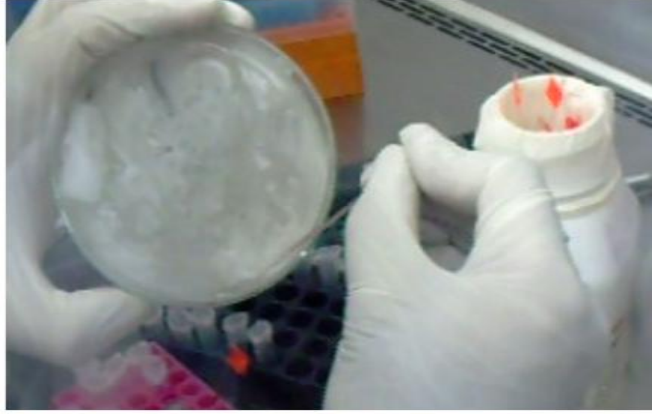
Şekil5.14 Alınan buffy coat'ın 70 µl RPMI 1640 içeren yeni eppendorfa aktarılması

3-Karıştırılıp yeni hematokrit tüplerine aktarıldı. Şekil 5.15

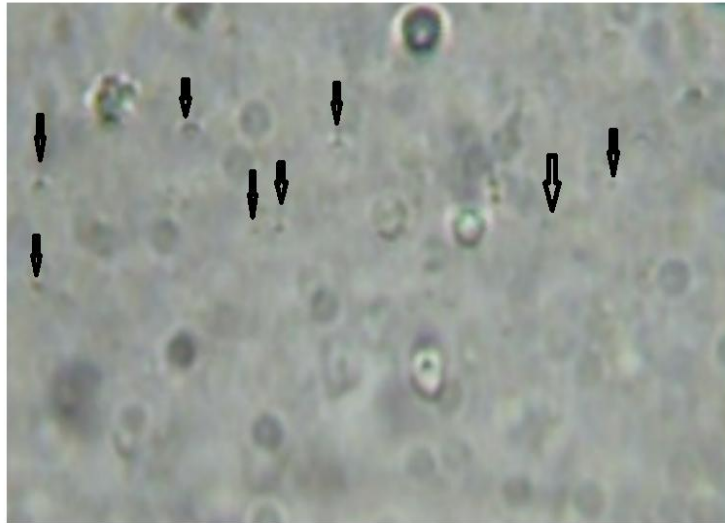


Şekil5.15 Alınan buffy coat tabakasının yeni eppendorfa aktarılması

4- steril mumla iki tarafları kapatılarak etiketlenip 25- 27 C'lik sıcaklıkda 7 gün boyunca inkübe edilerek her gün inverted mikroskopta x20 objektifte kontrol edilerek hareketli promastigotlar arandı. Şekil 5.16, 5.17



Şekil 5.16 Buffy coat ile kültür karışımının yeni hematokrit tüplerine aktarılması ve steril mumla iki tarafının kapatılması



Şekil 5.17 Inverted mikroskopta x20 objektifte incelenen mikrokültürde görülen promastigotlar

5-8-ELISA Testi

5-8-1-Solüsyonlar

5-8-1-1-Coating Buffer (kaplama tamponu) PH:9,6

Coating buffer solüsyonu sodium karbonat (Na_2CO_3 1,59 g), sodium bikarbonat (NaHCO_3 2,93 g), sodium azid (NaN_3 0,2 g) ve distile su ile 1lt'ye tamamlanarak pH'ısı 9,6 olacak şekilde hazırlandı.

5-8-1-2-Süt Çözeltisi

100ml coating buffer solüsyonuna 2 g süt tozu ekleyip vorteksleyerek hazırlandı.

5-8-1-3-PBS(PH 7,4)

PBS tablet kullanarak hazırlandı.

5-8-1-4-PBS/Tween20

PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklenip hazırlandı.

5-8-1-5-PBS/Tween20/Süt

PBS/Tween20 çözeltisine %2 olacak şekilde süt tozu eklenip hazırlandı.

5-8-1-6-Substrat Tamponu (PH:10,4)

Çinko klorur, (0,02 g ZnCl_2), Magnesium klorur (0,04 g MgCl_2) ve 1,5 g Glisin 200 ml distile suya eklenip PH'sı 10.4 ayarlayarak hazırlandı .

5-8-1-7-Substrat Çözeltisi

(1/1) oranında 1 µg paranitrofenil fosfat(PNFF pNPP sigma) 1 ml substrat tamponunda çözündürüldü Kullanılacağı gün taze olarak hazırlandı.

5-8-1-8-ELISA Uygulaması

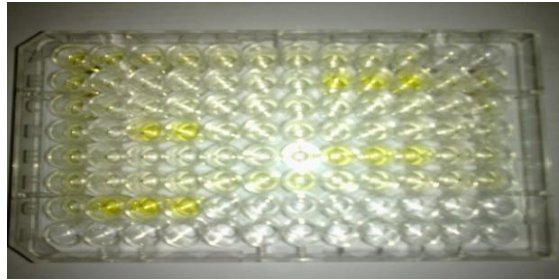
Bu test için fiziksel veya kimyasal işlemlerle organizmanın antijenik özelliklerinin bozulmadan eriyik antijen hazırlanması gerekmektedir.

5-8-1-8-1- Antijen Hazırlaması

- 1- Flaskta hazırlanan besiyerinde (RPMİ 1640) yapılan ekimden sonraki 7- 8. günde alınan promastigotlar (+4 °C) soğuk PBS ile 2-4 kez 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.
- 2- Promastigotların bulunduğu tüpüne distile su eklenerek sulandırıp 5 kez sıvı nitrojende dondurulup 37°C'lik su banyosunda çöz yapıldı ve parazitin parçalandığı mikroskopta kontrol edildi.
- 3- Bu işlem sonrasında hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla 9000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi.
- 4- Antijen olarak kullanılarak üzere üstteki berrak sıvın kısım toplandı.
- 5- 0,05 M karbonat kaplama solüsyonu (coating buffer) (pH: 9,6) içinde antijen dilüsyonları hazırlandı ve nano drop cihazı ile protein ölçülerek son konsantrasyon 7µg /100µl protein ölçümü antijen olarak kullanıldı.
- 6- Her kuyucuğa kuyu başına 7µg /100µl antijen solüsyonu eklenip 4°C'de gece boyu inkübe edildi.
- 7- ELISA plakları PBS /Tween20 ile 3 defa yıkanıp%2'lik süt tozu kaplama solüsyonu (coating buffer içinde) ile 37°C'de 1 saat inkübe edildi ve 3 defa PBS/Tween 20 ile yıkandı.
- 8- Plaklar kuruduktan sonra kullanana kadar -20'de saklandı.

5-8-1-8-2-ELISA Testinin Çalışılması

- 1- Serum örneklerinin 1/100 dilüsyonları (kontrol ve enfekte tüm farelerin) %2 PBS/Tween20/Süt içinde hazırlandı.
- 2- Dilüe edilen serumlar ELISA plaklarındaki kuyulara 100µl olacak şekilde eklendi.
- 3- ELISA plakları 1 saat 37°C'de nemli ve karanlık ortamda inkübe edilip 3 defa PBS/Tween20 ile yıkama yapıldı .
- 4- Alkelen fosfataz (AP) konjuge IgG antikorlar 1/1000 oranında PBS/Tween20 ile sulandırılarak her kuyuya 100µl olacak şekilde eklendi.
- 5- ELISA plakları 1 saat 37°C'de oda sıcaklığında inkübe edilip kuyular PBS/Tween20 ile 5 kez yıkama yapıldı.
- 6- Her kuyuya substrat ilaveli substrat tamponundan 100 µl eklenir 30-45 dk karanlıkta inkübe edildi.
- 7- ELISA Plaklar oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. Oluşan renk değişimi, ELISA okuyucusu ile 450 nm'de okumalar gerçekleştirilerek belirlendi. Şekil 5.18



Şekil5.18 ELISA test plakları

- 8- Farelerde oluşan anti-leishmania IgG için ölçülen OD düzeyleri her dört haftalık ölçümlerin ortalamaları hesaplandı ve aylık karşılaştırıldı.

5-9- İstatistik Analiz

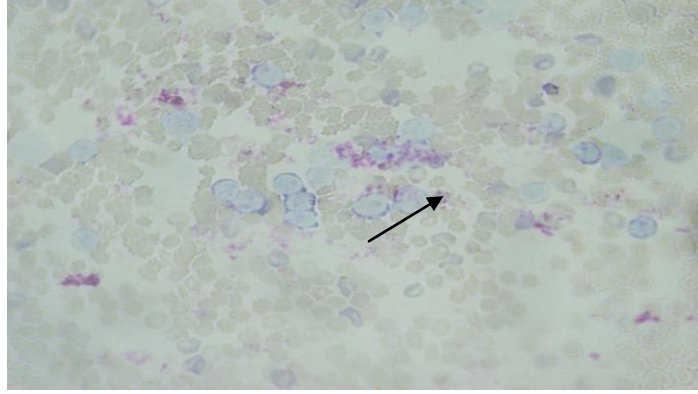
Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 16.0 for Windows) programı ile Mann-Whitney U testiyle farklı promastigot formlarının oluşturduğu IgG yanıtının OD'lerinin karşılaştırılması amacıyla istatistiksel analizi yapıldı $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

6-BULGULAR

Çalışmamızda, VL fare modeli oluşturmak amacıyla BALB/C fareleri , %10'lük fetal bovin serum RPMI 1640 besiyerinde üretilen *L.infantum* parazitinin TP, PP ve MP formlarıyla enfekte edildi. Formlar ficol dansite gradiyent yöntemiyle ayrıldı ve fareler 3×10^6 parazit/ ml yüküyle intraperitoneal olarak enfekte edildi. Enfeksiyonun takibinde üç farklı yöntem kullanıldı. Enfekte olan farelerden 12 hafta boyunca hafta da bir defa Giemsa boyama, mikrokültür ve ELISA testler için kuyruktan kan alındı.

6-1-Direkt Tanı

Kuyruktan alınan kanlardan ince yayma perparatı hazırlanıp Giemsa boyasıyla boyandı. Örnekler ışık mikroskobunda 100x objektif ile incelendi. MP grupta birinci hafta incelenmesinde amastigot görünmedi ancak; ikinci haftada pozitif olarak saptandı. PP grupta Giemsa boyaması ile birinci ve ikinci hafta da amastigot görünmedi. Üçüncü hafta pozitif görüldü. TP grubunda giemsa boyamasıyla birinci hafta negatif olarak saptandı, ancak ikinci haftada pozitif görüldü. Şekil 6.1 Tablo 6.1 Giemsa yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı Tablo 6.2



Şekil6.1 MP 'ları ile enfekte edilmiş balb/c farelerin giemsa boyama ile 3 hafta sonra yapılan yaymada görülen amstigotları

Tablo6.1 Giemsa ile boyanan ince yayma sonuçları

Fare grupları	Haftalar	Giemsa
MP grup	1.hafta	-
	2.hafta	+
	3.hafta	+
PP grup	1.hafta	-
	2.hafta	-
	3.hafta	+
TP grup	1.hafta	-
	2.hafta	+
	3.hafta	+
Kontrol	1.hafta	-
	2.hafta	-
	3.hafta	-

Tablo6.2 Giemsa yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı

Haftalar	Duyarlilik	Özgüllük
1.hafta	%25	%100
2.hafta	%72,7	%100
3.hafta	%81,8	%100

6-2-Mikrokültür Tanı

Kuyruktan alınan kanlardan hematokrit tüpler içine RPMI1640 besiyeriyle mikrokültür yapıldı. MP grubu birinci hafta alınan kanlar mikrokültür 24 saat sonra incelen kültürlerde ters (invert) mikroskop ile hareketli promastigot gözlendi(pozitif). PP grubunda birinci haftada mikrokültürde negatif iken ikinci haftada pozitif olarak saptandı. TP grubunda birinci hafta mikrokültür testiyle pozitif tespit edildi. Tablo 6.3 Mikrokültür yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı Tablo 6.4.

Tablo6.3 Mikrokültür yönteminin sonuçları

Fare grupları	Haftalar	Mikrokültür
MP grubu	1.hafta	+
	2.hafta	+
	3.hafta	+
PP grubu	1.hafta	-
	2.hafta	+
	3.hafta	+
TP grubu	1.hafta	+
	2.hafta	+
	3.hafta	+
Kontrol	1.hafta	-
	2.hafta	-
	3.hafta	-

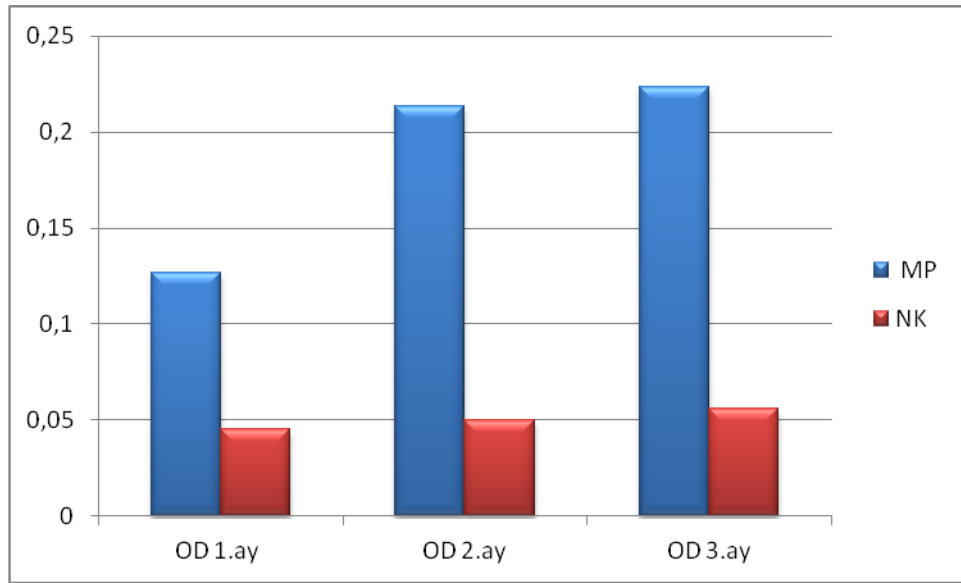
Tablo6.4 Mikrokültür yönteminin özgüllüğü ve duyarlılığı

Haftalar	Duyarlılık	Özgüllük
1.hafta	%72,5	%66
2.hafta	%100	%83
3.hafta	%100	%83

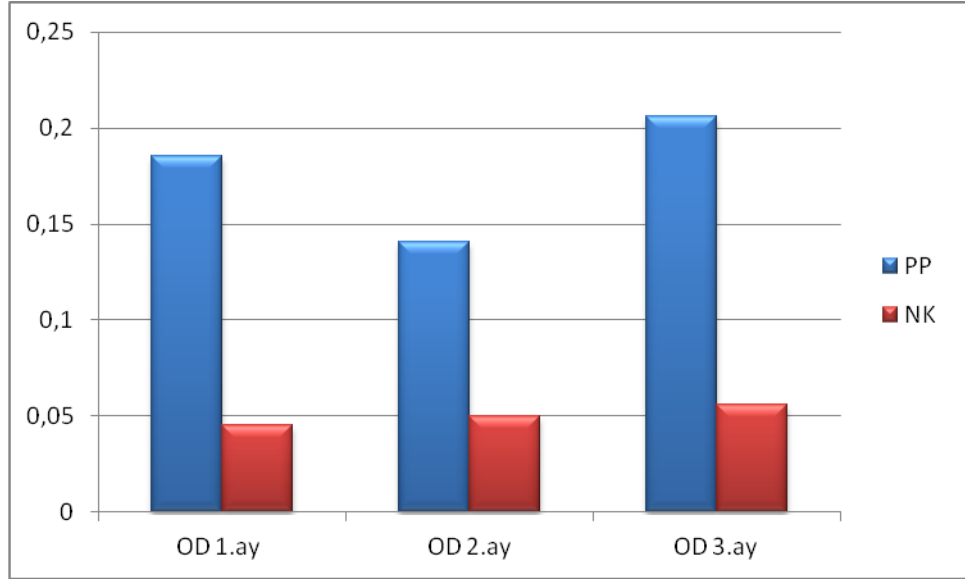
6-3-Serolojik Tanı

Giemsa ve mikrokültür yöntemlerinin yanı sıra ELISA testiyle serumda oluşan anti-leishmania IgG' seviyesi 3 ay boyunca takip edildi.

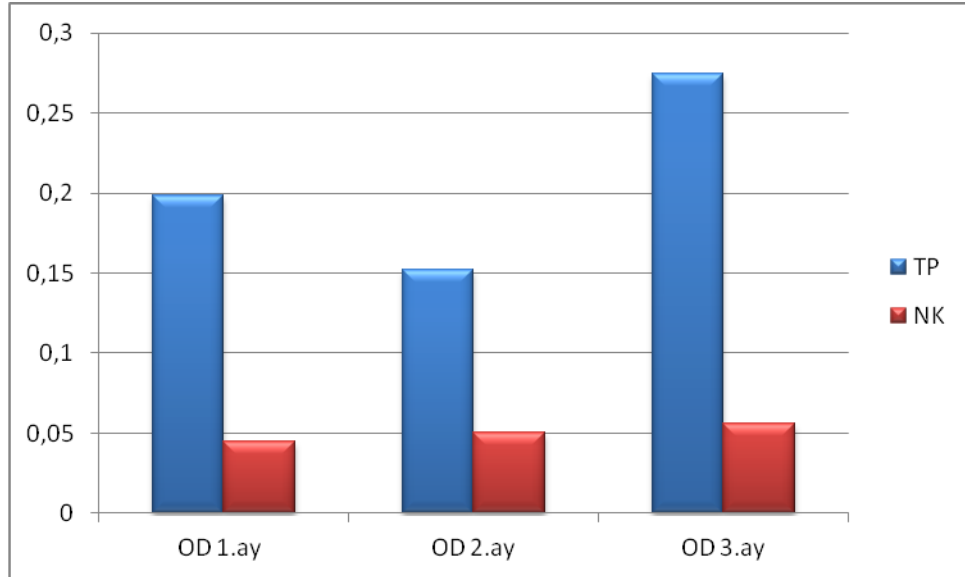
MP, PP ve TP gruplarının aylık sonuçları grafiklerde ve tablolarda sunuldu.grafik 6.1, 6.2 , 6.3 , 6.4 Tablo 6.5



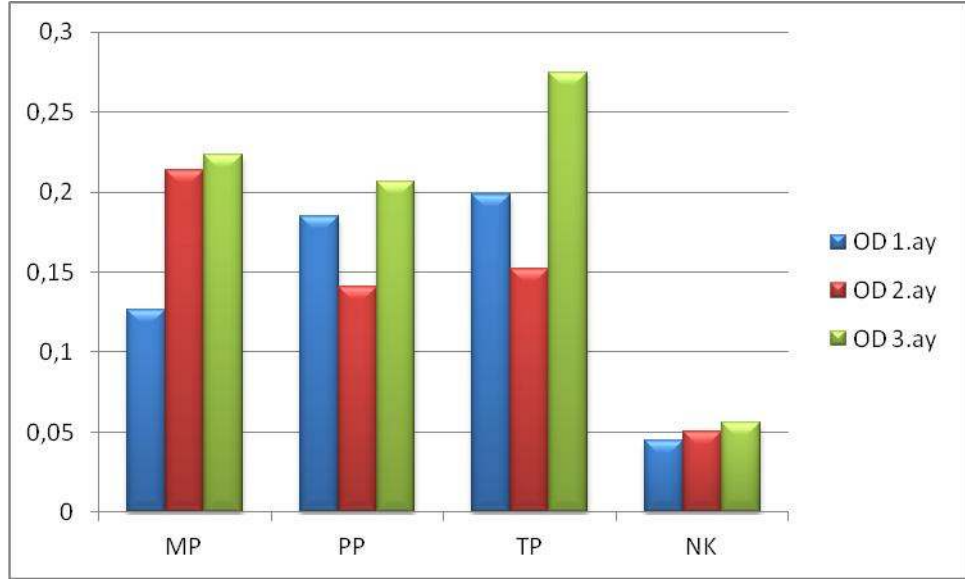
Grafik6.1 MP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzeylerinin OD ortalaması



Grafik6.2 PP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzeylerinin OD ortalaması



Grafik6.3 TP grubunun aylara göre spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzeylerinin OD ortalaması



Grafik 6.4 Aylık MP, PP ve TP gruplarının spektrofotometrik olarak ölçülen anti-leishmania IgG düzeylerinin OD ortalaması

Enfekte edilen tüm fare gruplarında spektrofotometred 450 nm’de ölçülen anti-leishmania IgG antikorların OD düzeyleri ayrı ölçümlerin yapıldığı kontrol grubuna OD düzeylerinden farkının istatistiksel olarak anlamlı olduğu sapandı. Tablo 6.3

Tablo 6.5 3 ay boyunca fare gruplarının OD ortalaması ve P değeri

Fare grupları	OD 1.ay	OD 2.ay	OD 3.ay
MP	0.12655	0.2137	0.2232
P değeri	0.003	0.003	0.003
PP	0.18508	0.1406	0.20625
P değeri	0.006	0.006	0.006
TP	0.1981	0.15175	0.2746
P değeri	0.004	0.004	0.004
NK	0.045	0.05	0.056

7-TARTIŞMA

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği 6 hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; VL, KL ve MKL olmak üzere 3 farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır.^{13,14,15,16}

Ayrıca son zamanlarda bunlara Diffüz Kutanöz Leishmaniasis (DKL) eklenmiştir. Akdeniz bölgesinde de geniş bir yayılım gösteren leishmaniasis, eko-epidemiolojik açıdan AKL, Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL) ve Zoonotik Visseral Leishmaniasis (ZVL) olarak ayrılabilir.^{7,17}

WHO tarafından 1994 yılında AIDS sıklığındaki artışa paralel olarak VL olgularında da artış olduğu bildirilmiştir.^{7, 18, 19}

Zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania*, trypanozom ailesinin kinetoplastida sınıfında yer almaktadır.^{4,5,6} Zoonotik bir enfeksiyon olan leishmaniasis, köpek ve diğer kemiricilerde de hastalık yapar. Hastalığın klinik seyri, parazitin bulaşması, tropizmi ve patogenezi ile konağın immun sistemi arasındaki kompleks etkileşimlere bağlıdır. Klinik belirtileri; asemptomatik şekilden VL gibi ağır tablolara seyreden değişik şekillerde olabilir.⁷

VL öldürücü parazit hastalığıdır, tropik ve subtropik bölgelerde, hastalığın etkeni leishmania parazitidir, *L.donavani* Batı Afrika ve Hindistan *L.infantum* Avrupa, kuzey Afrika ve Latin Amerika, her yıl yaklaşık 0.5 milyon yeni vaka rapor edilmektedir, VL hastalığı nedeni ile 50000 kişi hayatını kayıp edilmektedir.⁸³

VL'nin Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu bölgelerinde, KL'nin ise Güney-doğu ve Akdeniz bölgelerinde endemik olarak görüldüğü bildirilmiştir. Bu bölgelerde yaşayan yaklaşık 20 milyon insan leishmaniasis riski altında yaşamaktadır.⁹⁴

Leishmania enfeksiyonlarının kontrolünde, hücresel immünite ile beraber, parazitin virulans faktörleri, tropizmi, patojenitesi ve konağın genetik alt yapısına bağlı olarak geliştirdiği immünite ile vektörün evrimsel açıdan sahip olduğu avantajların tamamının rol aldığı etkileşimler sorumludur. Konakla etkileşimlerinde, doğal bağışık yanıtı aşamaları en temel ve hastalığın gidişini belirleyen en önemli basamaktır. Hayvan deneyleri, tüm bu modifikasyon ve interferens mekanizmalarının, iki farklı tipte immünopatogenez şemasına yol açtığını ortaya koymuştur. KL'de tipik olarak Th1 tipi yanıtın Th2 tipi yanıtı polarize olması ve hastalığın kronik-persistan hale gelmesi söz konusudur. VL'de ise, bir çok doku ve organ aynı anda enfekteldir. Vektörün, parazitin enfektif formunu intradermal olarak enjekte etmesini takiben, parazit ya makrofajlar tarafından retiküloendoteliyal sisteme geçer ya da direk kana karışarak sistemik dolaşıma katılır. Hepatik enfeksiyon kendisini sınırlarken, dalakta parazitin çoğalması önlenemez ve harabiyet belirgin hale gelir. Hayvan modelleri ve insan hastalığından elde edilen verilerin ışığında, yakın gelecekte hastalığın endemik olduğu bölgelerde kullanılması uygun olan yeni immünoterapötik yaklaşımlar geliştirilmesine çalışılmaktadır.^{88, 89}

İlaça direnç artışı giderek çoğalırken erken tanı tedavide büyük önem taşır, doğru tanı doğru tedavi için önemlidir ve hastalığın iyileşmesinde çok yararlıdır. Ateş, splenomegali ve pansitopeni tablosu ile gelen hastalarda VL tanısının akla getirilmesi ve öncelikle serolojik testler yapıldıktan sonra pozitif olarak saptanan hastalardan kemik iliği incelenmesi yapılmalıdır.⁸⁸

VL tanısı zor ve invaziftir, dalak aspirat alması ölüm riski taşır, lenf ve kemik iliği aspirasyonu gibi örnek alma invazif yöntemlerdir.⁸⁸

Leishmaniasis tanısında çeşitli yöntem kullanılmaktadır; Direkt mikroskopi, Kültür yöntemleri (Klasik kültür ve mikrokültür yöntemi), serolojik testler ise serumda antikor araştırmasına dayalı bir yöntemlerdir. VL'in düşünüldüğü halde tanısında duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testler uygulanmaktadır. Serolojik olarak DAT, LAT, (LAT), (KAtex®), Western Blotting (İFA), (rK39 dipstik) ve ELISA örnek olarak verilebilir. Anti-leishmanial antikorların saptanması için sero-epidemiyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Serolojik testlerin en önemli testlerinden olana ELISA yöntemi çok yaygın olarak kullanılmaktadır, duyarlı ve özgüdür. Ancak, immünitesi baskılanmış kişilerde güvenli değildir. Serolojik yöntemlerin dezavantaj tedaviden sonra uzun süre antikorların pozitif seyretmesi nedeniyle geçirilmiş, yeni ve asemptomatik olguları tam olarak ayırt edilmemesidir.^{8, 9, 10, 11, 22}

VL'in tanısında moleküler tanı yöntemleride kullanılmaktadır . Parazitin direkt saptanmasına yönelik yöntemler güvenli olmasına karşın hassasiyet düşüktür. Bu nedenle hasta kanı gibi kolaylıkla elde edilebilecek bir örnek kullanılarak PCR uygulanabilir.^{76, 77}

Çalışmamızda, *Leishmania infantum* (MONI/EP126) suş ile BALB/C farelerde VL fare modeli oluşturmak ve enfekte farelerde enfeksiyonun mikroskobik, kültür ve serolojik olarak ELISA yöntemiyle üç aylık sürede takibinin yapılması amaçlandı. Parazitin farklı promastigot formlarının immun

yanıt üzerine etkisi farelerdeki anti-leishmania IgG yanıtının ELISA yöntemiyle saptanan OD ölçümleriyle yorumlanmaya çalışıldı.

TP, PP ve MP formlarının enfeksiyonunda hangi form daha etken, daha virülans olduğunu ve aralarındaki immün yanıt farkını takip etmek için, üç farklı yöntem kullanıldı; Giemsa (ince yayma perparat), mikrokültür yöntemleriyle 3 hafta boyunca her hafta bir defa yapıldı, ELISA ise üç ay boyunca her hafta bir kez TP, PP ve MP karşı oluşan antikor yanıt farkını, aynı zamanda yöntemler arasındaki duyarlılık farkını ortaya çıkarmak amacıyla yapıldı. Fare kuyruklarından alınan kanlar ile ince yayma perparat hazırlanıp Giemsa boyasıyla direkt mikroskopi ve mikrokültür yöntemleriyle birinci hafta itibariyle incelendi. Direkt mikroskopi ile birinci haftada enfekte edilen 3 grupta da (MP, PP ve TP) negatif olarak saptandı; ancak ikinci haftada MP ve TP farelerinde pozitif iken PP farelerinde sadece üçüncü haftada pozitifdir. (Tablo 6.1) Mikrokültür yöntemiyle birinci haftada MP ve TP grupları pozitif iken PP grubu negatiftir fakat ikinci haftada pozitif olarak saptanmadı. Tablo 6.3

Giemsa ve mikrokültür yöntemlerinin yanı sıra ELISA testiyle serumda oluşan anti-leishmania IgG' seviyesi 3 ay boyunca takip edildi. MP grubunun OD ortalaması birinci aydan itibaren üçüncü ay kadar sabit artış görüldü (grafik 6.1), PP ve TP farelerde elde edilen OD ortalaması artış görünür iken ikinci ayda antikor yanıtında düşüş görüldü, ve üçüncü ayda tekrar artış saptandı. (grafik 6.2, 6.3)'te gösterilmiştir.

MP grubunun birinci ayda OD ortalamasının (0.12655), PP ve TP (0.18508 0.1981) gruplarından düşük olduğu görüldü. İkinci ayda ise MP grubunun OD ortalaması (0.2137) diğer iki gruptan da PP ve TP

(0.1406,0.15175) yüksek olduğu saptandı. Üçüncü ayda MP grubunun OD ortalaması 0.2232, PP grubundan 0.20625 yüksek iken TP grubundan (0.2746) düşük olduğu görüldü. Tablo 6.5 garfik 6 .4

Enfekte edilen tüm fare gruplarında spektrofotometred 450 nm'de ölçülen anti-leishmania IgG antikorların OD düzeleri ayrı ölçümlerin yapıldığı kontrol grubuna OD düzelerinden farklının istatistiksel olarak anlamlı olduğu sapandı. Enfekte edilen grupların anti-leishmania IgG OD düzeylerinin kontrol grubuna göre istatikselsel olarak yüksek saptanmasına karşın, grup için aylık antikor ölçümlerinde anlamlı fark saptanmamıştır. ($P>0.05$)

VL tanısında Direkt mikroskobi yöntemiyle yüksek özgüllük fakat duyarlılıkta farklılık dalaktan alınan örneklerde (%93-99) iken kemik iliğinde (%53-86) ve lenf bezlerinde (%53-65) görülmüştür.¹²

Fakat başka çalışmalarda dalak ve karaciğer aspirasyonuda parazitin bulunma oranı %96 -98'dir. Ancak her iki yöntemde de hayatı tehdit edici derecede kanama riski vardır.⁴⁷

Bizim çalışmamızda periferik kandan yapılan ince yayma perpartlarının direkt mikroskobi yöntemiyle duyarlılığı (%25 - 81,8) iken özgüllüğü ise %100 olarak saptandı.

KL'de hasta lezyonlarından alınan örneklerinde mikrokültür yöntemin duyarlılığı %83-97 olup 4-7 gün içinde sonuç verdiği klasik yöntemi ise duyarlılığı % 20-40 olup 15- 30 günde sonuçlanmaktadır.⁴⁶

VL şüpheli hastalarda Periferik kan ve kemik iliği örneklerin kullanarak mikrokültür ve klasik kültür yöntemleri karşılaştırmasında mikrokültür yöntemiyle kemik iliğinde %100 ve Periferik kan %77.8 –100 klasik kültür yöntemiyle ise %37.5 –100 kemik iliğinde ve%0 –100 Periferik kanda ise oranında parazit saptanmıştır. ⁹²

Bizim çalışmamızda periferik kandan yapılan mikrokültür yöntemiyle duyarlılığı %72,5 - 100 özgüllüğü ise %66 - 83 olarak saptandı.

Mikrokültür yöntemiyle ELISA, IFAT ve PCR yöntemler arasındaki duyarlılık ve özgüllüğü karşılaştırması amacıyla asympotomatik fare kanları kullanıldı. Duyarlılıkları ELISA için %17.64, IFAT için %,8.82 ve PCR için %5.88 saptanırken mikrokültürde %100 görünmüştür. ⁹³

Çalışmamızda aynı anda kan örneklerine uyguladığımız direkt mikroskop %25 - 81,8 ve mikrokültür yöntemi %72,5 - 100 arasındaki duyarlılık sonucunda mikrokültür yöntemi daha duyarlı olduğu belirlenmiştir.

MP, PP ve TP'ların hangi formunun enfeksiyon oluşturmak için daha etkin, daha dirençli ve daha virülan olduğunu tespit etmek için çalışmalar yapılmıştır.

KL oluşturmak amacıyla BALB/C (KL hassas tür) ve C57BL/6 (KL dirençli tür) farelerine *L. amazonensis* parazitinin MP formu (10^4 parazit/ml) ve TP'lar (10^7 parazit/ml) ayak tabanından verilmiştir. Farelerin iki türünde de MP ve TP enfeksiyon sonucu aynı sitokinlerin salgılandığı ve benzer klinik tablo olduğu gözlenmektedir. MP'un dozu leishmaniasis oluşturmak için gereken TP dozundan 10-100 kat az olduğu bildirilmiştir. Aynı

Çalışmada ayrıca 6 haftalık dişi BALB/C farelere MP dozu (10^4 parazit/ml) ve TP (10^7 parazit/ml) kuyruktan verilmiştir. Üç hafta sonra fareler sakrefe edilmiştir, dalak , karaciğerden ince yayma preparat yapıp Giemsa boyasıyla direkt bakılmıştır, MP formuyla enfekte edilen farelerin dalak ve karaciğerde de total ile enfekte edilen farelerden parazit yükü olarak daha çok olduğu tespit edilmiştir.⁸⁵

MP ve PP forumlarının taze insan serum ile 37 °C 30 dakika inkübe edildi. MP formunun kompleman aracılı lizize daha dirençli olduğu saptanmıştır.⁹⁰

Aynı sayıda *L.chagasi* MP ve TP formuyla enfekte edildi. Enfekte edilen farelerde MP formuyla edilen ferelerde TP ile olandan parazit yükü olarak üç kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada parazit membranında bulunan proteinler ölçerek WB yöntemiyle stasyonel fazdan izole edilen MP formunun log fazındaki PP formundan 130-250 kat fazla olduğu saptanmıştır, bu çalışmada MP formu PP formundan virölans olduğu, parazitin virölans faktörü membranda olduğu tespit edilmiştir.⁸⁶

Çalışmamıza elde edilen sonuçlar MP 'un virölansına yönelik yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu saptanmıştır. MP ile enfekte edilen grupta Geimsa boyama ve mikrokültür yöntemiyle PP formla enfekte gruba göre daha erken enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. MP ve TP grupları birinci haftada Geimsa ile parazit saptanmaz iken mikrokültür yöntemiyle ilk haftadan itibaren parazit üremesi görölmüştür. PP ile enfekte grupta parazit ancak ikinci haftada mikrokültür ile saptanır iken, üçüncü haftada ince yayma perparatlarında amastigotlar görönmüştür.

ELISA sonuçlarında birinci ayda üç grupta da kontrol grubuna göre antikor yanıt vardır ancak PP ve TP gruplarının OD değeri MP grubundan yüksek olduğu görünür iken ikinci ayda MP grubunun OD değeri diğer iki gruptan da yüksek iken üçüncü ayda MP ve TP grupları PP grubundan yüksek olduğu saptandı. İstatistiksel analizde MP farelerde P değeri($P<0.003$) üç ay boyunca TP grubundan düşüktür ,ayrıca TP grubunun P değeri($P<0.004$) PP grubundan P değeri($P<0.006$) düşük olarak saptandı.

MP ile enfekte grupta ilk ayda diğer enfekte gruplara göre antikor düzeyi daha düşük saptanmıştır. İstatistiksel olarak bu fark anlamlı olmasında enfeksiyon sonrasında ilk dönemde MP'in immun sisteminden kaçış ve makrofaj içerisinde sinyal, gen ekspresyonu gibi fonksiyonları inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.⁹⁶

Elde edilen sonuçlara göre TP ve MP'lar enfeksiyon oluşturmak için PP formundan daha enfektif görülmüştür. Mikrokültür yöntemi erken tanı koymak ve MP ve PP ayrımını yapmak imkanların sağlamaktadır.

Deneyisel çalışmalarda aşı üretimi için parazitin formlarının eldesi ve aşı hedeflerinin aday gen bölgelerinin belirlenmesi amacıyla farklı promastigot formların üzerinde çalışmalar sürdürülmelidir.

8- SONUÇ

Leishmaniasis tanısında farklı yöntemleri kullanılmaktadır; direkt mikroskopi, kültür yöntemleri (klasik kültür-NNN- ve mikrokültür yöntemi), moleküler yöntemler ve serolojik testlerdir. Serolojik testler serumda antikor araştırılmasına ve antijen aramaya dayalı yöntemlerdir. VL'in düşünüldüğünde yüksek duyarlılık ve özgüllükte olan serolojik testler uygulanmaktadır. Serolojik testlere DAT, LAT, (KAtex®), Western Blotting (İFA), (rK39 dipstik) ve ELISA örnek olarak verilebilir. Sero-epidemiolojik çalışmalarda serolojik testler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda *Leishmania infantum* (MONI/EP126) suşu ile BALB/C farelerde VL fare modeli oluşturmak ve enfekte farelerdeki enfeksiyonun mikroskopik, kültür ve serolojik olarak ELISA yöntemiyle üç aylık sürede takibinin yapılması amaçlandı. Parazitin farklı promastigot formlarının immun yanıt üzerine etkisi, farelerdeki anti-*leishmania* IgG yanıtının ELISA yöntemiyle spektrofotometrik olarak saptanan OD düzeylerinin ölçümleriyle yapıldı. Enfektif fare grupları prosiklik promastigot (PP), metasiklik promastigot (MP) ve her iki formu içeren total promastigotlarla (TP) enfekte edildi. Aynı zamanda kontrol grubu olarak sağlıklı fareler kullanıldı.

MP ile enfekte edilen grupta Geimsa boyama ve mikrokültür yöntemiyle PP formla enfekte edilen gruba göre daha erken enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda aynı anda kan örneklerine

uyguladığımız direkt mikroskopinin duyarlılığı %25 – 81,8 mikrokültür yönteminin ise duyarlılığı %72,5 - 100 arasında saptanmıştır.

ELISA sonuçlarında birinci ayda üç grupta da kontrol grubuna göre antikor yanıtının yüksek olduğu, ancak PP ve TP gruplarının OD düzeylerinin MP grubundan yüksek olduğu gözlenmiştir. İkinci ayda MP grubunun OD düzeyinin diğer iki gruptan da yüksek olduğu, üçüncü ayda ise MP ve TP gruplarının OD düzeylerinin PP grubundan daha yüksek olduğu saptandı. MP ile enfekte grupta ilk ayda diğer enfekte gruplara göre antikor düzeyinin daha düşük saptanması, enfeksiyon sonrasındaki ilk dönemde MP'in immun sisteminden kaçış mekanizmaları ve makrofaj içerisinde sinyal yollarını, gen ekspresyonu gibi fonksiyonları inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mikrokültür yöntemi leishmaniasis tanısında kısa sürede sonuçlanan, pratik, güvenilir ve düşük maliyeti olan bir yöntem olup, direk mikroskopik incelemeye ve klasik kültür yöntemine göre daha üstündür. Promastigot formunun prosiklik ve metasiklik formlarının enfeksiyon patogeneğinde etkinliklerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Bu farklı formların tedavi direnci ve enfeksiyon seyri üzerinde farklı etkileri olabileceği düşünülmekte olup, hayvan modellerinin farklı formların farklı antijenik yapılarının ortaya çıkarılmasında ve yeni tedavi ve aşı seçeneklerinin geliştirilmesinde faydalı olacağı görüşüne varılmıştır.

9-ÖZET

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü Tropikal Hastalıkları Araştırma Merkezi'nin önemli kabul ettiği altı hastalıktan birisidir. Bu hastalıkta; Visseral Leishmaniasis (VL), Kutanöz Leishmaniasis (KL) ve Mukokutanöz Leishmaniasis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo ortaya çıkmaktadır.

VL; öldürücü leishmaniasis parazit hastalığı olup, tropikal ve subtropikal bölgelerde görülür. *L.donovani* Batı Afrika ve Hindistan'da, *L.infantum* ise Avrupa, Kuzey Afrika ve Latin Amerika'da yaygın suş olarak görülmekte olup, ilaca direncin giderek artması nedeniyle erken tanı, tedavide büyük önem taşımaktadır. VL tanısı zor ve invazivdir. Dalak aspirasyonu tanıda duyarlılığı yüksek olmasına rağmen hayati riski taşımakta, lenf ve kemik iliği aspirasyonu ise invaziv yöntemlerdir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı (Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence) raporunda her yılı yaklaşık 0.2 - 0.4 milyon VL vakası rapor edilmektedir. VL vakalarının %10 kadarı ölümlle sonuçlanmaktadır. Tahmini olarak yılda 20.000 - 40.000 VL nedeniyle kişi hayatını yitirdiği bildirilmektedir.

Çalışmamızda *Leishmania infantum* (MONI/EP126) suşu ile BALB/C farelerde VL fare modeli oluşturmak ve enfekte farelerdeki enfeksiyonun mikroskopik, kültür ve serolojik olarak ELISA yöntemiyle üç aylık sürede takibinin yapılması amaçlandı. Parazitin farklı promastigot formlarının immun yanıt üzerine etkisi, farelerdeki anti-*leishmania* IgG yanıtının ELISA yöntemiyle spektrofotometrik olarak saptanan OD düzeylerinin ölçümleriyle yapıldı.

Enfektif fare grupları prosiklik promastigot (PP), metasiklik promastigot (MP) ve her iki formu içeren total promastigotlarla (TP) enfekte edildi. Aynı zamanda kontrol grubu olarak sağlıklı fareler kullanıldı.

MP ile enfekte edilen grupta Geimsa boyama ve mikrokültür yöntemiyle PP formu ile enfekte edilen gruba göre daha erken enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda aynı anda kan örneklerine uyguladığımız direkt mikroskopinin duyarlılığı %25 - 81.8 mikrokültür yönteminin ise duyarlılığı %72.5 - 100 arasında saptanmıştır. Mikrokültür yöntemi leishmaniasis tanısında kısa sürede sonuçlanan, pratik, güvenilir ve düşük maliyeti olan bir yöntem olup, direk mikroskopik incelemeye ve klasik kültür yöntemine göre daha üstündür.

ELISA sonuçlarında birinci ayda üç grupta da kontrol grubuna göre antikor yanıtının yüksek olduğu, ancak birinci PP ve TP gruplarının OD düzeylerinin MP grubundan yüksek olduğu gözlenmiştir. İkinci ayda MP grubunun OD düzeyinin diğer iki gruptan da yüksek olduğu, üçüncü ayda ise MP ve TP gruplarının OD düzeylerinin PP grubundan daha yüksek olduğu saptandı. MP ile enfekte grupta ilk ayda diğer enfekte gruplara göre antikor düzeyinin daha düşük saptanması, enfeksiyon sonrasındaki ilk dönemde MP'in immun sisteminden kaçış mekanizmaları ve makrofaj içerisinde sinyal yollarını, gen ekspresyonu gibi fonksiyonları inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deneyisel çalışmalarda aşı üretimi için parazitin formlarının eldesi ve aşı hedefi olarak aday gen bölgelerinin belirlenmesi amacıyla faklı promastigot formların üzerinde çalışmaların sürdürülmesi faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler:Leishmaniasis, hayvan model, tanı, serolojik, ELISA

10- SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially fatal parasitic disease of the tropics and the subtropics. *Leishmania. donovani* in East Africa and the Indian subcontinent and *Leishmania. infantum* in Europe, North Africa, and Latin America. With the increasing incidence of drug resistance in endemic areas, early case-finding and accurate diagnosis for effective treatment is an essential component of VL control. VL diagnosis was complex and invasive (direct microscopic examination of splenic, lymph gland, or bone marrow aspirate).

According to the report published by the World Health Organization about the leishmaniasis, Based on these estimates, approximately 0.2 to 0.4 cases and 0.7 to 1.2 million VL and Cutaneous Leishmania (CL) cases, respectively, occur each year Using an overall case-fatality rate of 10%, we reach a tentative estimate of 20,000 to 40,000 leishmaniasis deaths per year.

In our research we have injected the BALB / C mice with *Leishmania infantum* (MONI/EP126) for create the leishmaniasis disease and follow infection with three method microscopy, culture and serological Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) method. Aimed to evaluated the infection by three month period and in infection, we used three different promastigote forms effect of the parasite on the immune response in mice of different forms of anti-leishmania IgG OD measurements was determined by ELISA.

The mice groups was; procyclic promastigot (PP), metacyclic promastigot (MP), containing two forms total promastigotes (TP) and healthy mice were used in control group.

In our studies we found the MP group Geimsa staining and microculture method was early infection before PP group. Direct microscopy sensitive %25 - 81.8 whereas the microculture method was %72.5 - 100 as a result the microculture method is more sensitive than direct microscopy method.

Microculture method a short time, resulting diagnosis of leishmaniasis, quick, reliable and low-cost method. Microculture method is better than direct microscopic and classical culture method.

According to the results, in ELISA's method the response of the three groups according to the control group in three months was high. In the first month, in PP and TP groups the OD levels were higher than the level in MP group. In the second month MP group was higher than the two groups. In the third month MP and TP groups were higher than the PP group. OD levels in MP group were low in the first month due to infection escape from the immune responses that would otherwise be directed against it. However, it is also necessary to inhibit numerous macrophage functions, particularly those involved in immune surveillance and macrophage activation, at either the protein or gene expression level.

In experimental studies, In order to determine gene regions vaccine targeted for vaccine production, it is recommended to obtain parasite forms and . continue to work on the different forms of promastigote.

Keywords: Leishmaniasis, animal modelling, diagnosis, serology, ELISA

11-KAYNAKLAR

1- Lainson R, Shaw J J. Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W & Killick-Kendrick R, editors . The Leishmaniasis in Biology and Medicine vol. Orlando: Academic Press, 1987 . p 1-120.

2- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int. J. Parasitol 2007;37:1097–1106. [PubMed: 17517415],

3- Pearson RD, De Queiroz Sousa A, Jeronimo SMB,. *Leishmania* Species :viseral(kala-azar), Cutaneous ,and Mucosal leishmaniasis .In Mandell,Douglas,and Bennett's Principles and Practice of infection Diseases.sixth ed. Eds.Mandell GL, Bennett JE,Dolin R.Elsevier Churchill Livingstone,Philadelphia, 2005, 265,2460-2492.

4- Pearson RD, Sousa ADQ, Jeromino SMB. *Leishmania* species : visceral (kala-azar) , cutaneous and mucosal leishmaniasis. In:Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.editors. Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.Fifth edition.Philedelphia: Churchill Livingstone ,2000 : 2831-44

5-Ak M , özbel Y, özensoy S, Turgay N. Visseral Leishmaniasis. İmmun yetmezlikte önemi Artan Parazit Hastalıkları. Editör. Özcel M A. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları . Ege Üniversitesi Basım Evi- Bornova. İzmir , 1995,s.69-107

6-Desjeux, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.; 2004: 27(5):305-18

7-Kılıç SS . Kala-azar ve Diğer *Leishmania* Enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Editörler.Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, 2002 cilt 1, s 685-696

8-Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control Nat Rev Microbiol, 2007 ,5:873–882

9-Mondal S, Bhattacharya P, Ali N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther, 2010 ,8:919–944

10-Srivastava P, Mehrotra S, Tiwary P, Chakravarty J, Sundar S. Diagnosis of Indian visceral leishmaniasis by nucleic acid detection using PCR. PLoS One, 2011 , 6:e19304

11-Boelaert M, El-Safi S, Hailu A, Mukhtar M, Rijal S, Sundar S, Wasunna M, Aseffa A, Mbui J, Menten J, Desjeux P, Peeling RW Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2008 , 102:32–40

12-Kuman H A. *Leishmania* Türleri. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Editörler. Editörler.Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul, .2002 cilt 2, s.1870-1878

13-Herwaldt BL. Leishmaniasis. The Lancet ,1999; 354: 1191-9.

14-Kocabaş E, Antmen B, Alhan E, Yıldıztaş D, Aksaray N. Çocukluk çağında kala-azar. Cukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1998;23(2):95-101

15-Köktürk A, Baz K, Aslan G, Kaya I T, Yazıcı C A, İkizoğlu G, Camdeviren H. İçel’de Kutanöz Leishmaniasis’in Durumu. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2002 : 26(4):367-369

16-Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001:95:239–43.

17-Pearson RD, Sousa ADQ, Jeromino SMB. *Leishmania* species : visceral (kala-azar) , cutaneous and mucosal leishmaniasis. In:Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.editors. Douglas and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases.Fifth edition.Philedelphia: Churchill Livingstone, 2000 : 2831-44

18-Bulle B, Millon L, Bart LM, Gallego M, Gambarelli F, Portus, M, Schnur L, Jaffe C L, Fernandez B S, Alunda J M. Piarroux R. Practical Approach for Typing Strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. J. Clin. Microbiol.; 2002 : 40 (9): 3391–3397.

19-World Health Organization web sayfası [http: / www.who.int/dr/diseases/leish/default.htm](http://www.who.int/dr/diseases/leish/default.htm) Erişim tarihi: 11.05.2013.

20-Wilson ME,Jerónimo SMB,Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *leishmania* species.Microb pathog ,2005: 38(4):147-60

21-Centers for Disease Control and Prevention web sayfası [http: / www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm)/ Erişim tarihi: 19.04.2013.

22-Korkmaz M , Ok U Zeki.Editörler .Parazitolojide Laboratuvar . Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:23_ İzmir, 2011, 20-307,308

23-Merdivenci, A. Medikal Entomoloji Ders Kitabı, 3. basım. İ.U. Cer. Tıp. Fak yayınları, Rektörlük : no 2811, Dekanlık no :74, Hilal Matbaacılık Koll. Şti., İstanbul. 1981

24-Markell, E. K., John, D. T. ve Krotoski, W. A. Markell and Voge's Medical Parasitology, W.B. Saunders Company, 7 th Edition., 1992: 148-160.

25-TDR News. WHO/TDR-CTD/HH. 1990. 90.1.P,14-15.

26-Unat, E. K. Tıp Parazitolojisi. İst. Univ. Cerr. Tıp Fak. Yayın, 1991: no:162, 564-565.

27-KUMAN H.A., N. ALTINTAŞ. Protozoon Hastalıklar. Ege Üniversitesi Basımevi. İzmir, 1996:79-100 s.

28-Byrceson, A.D.M. Leishmaniasis, Manson's Tropical Diseases, Ed: G. C. Cook, Twentieth Edition, WB Saunders Company Ltd., London, 1996: p.1213-1245.

29-Ohan, V. ve Yaşarol, Ş. *Leishmania*'ların Morfolojisi, Fizyolojisi ve Evrimi, Leishmaniasis, Ed: Ş. Yaşarol, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, 1981 : No:2, 11-25.

30-Da Silva, R. and Sacks, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. Infection and Immunity . ,1987:55, 2802–2806.

- 31-De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M: Leishmanial infection: Analysis of its first steps. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003, 98: 861-870. 8
- 32-Pinto-Da-Silva, L. H., Fampa, P., Soares, D. C., Oliveira, S. M., Souto-Padron, T. and Saraiva, E. M. The 3A1-La monoclonal antibody reveals key features of *Leishmania (L) amazonensis* metacyclic promastigotes and inhibits procyclics attachment to the sand fly midgut. International Journal for Parasitology , 2005: 35, 757–764.
- 33-Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev , 1997;10:298-319
- 34-Reus M, García B, Vázquez V, Morales D, Fuster M, Sola J .Visceral leishmaniasis: diagnosis by ultrasound-guided fine needle aspiration of an axillary node. Br J Radiol , 2005: 78:158–160
- 35-Del Olmo ML, Aller de la Fuente R, Velayos Jiménez B, Fernández Salazar L, González Hernández JM .Visceral leishmaniasis diagnosed by duodenal biopsy. Rev Esp Enferm Dig , 2009 :101:439–440
- 36-Artan R, Yilmaz A, Akçam M, Aksoy NH .Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. J Gastroenterol Hepatol, 2006: 21:299–302
- 37-El Hassan AM, Ghalib HW, Zijlstra EE. Post -kala-azar dermal leishmaniasis in the Sudan: Clinical features, pathology and treatment. trans R Soc Trop Med Hyg , 1992: 83:245-248
- 38-Chang KP, McGwire BS: Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid Biol Dis, 2002, 1: 1.

- 39-Rivas L, Moreno J, Canavate C, Alvar J: Virulence and disease in leishmaniasis: What is relevant for the patient? Trends Parasitol, 2004, 20: 297-301.
- 40-Requena JM, Alonso C, Soto M: Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol Today, 2000, 16: 246-250.
- 41-Pearson RD, Sousa ADQ, Jeronimo SM: *Leishmania* Species: Visceral (Kala-Azar), Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis, p: 2831-2841. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed, 2005. Churchill Livingstone, Philadelphia.1
- 42-Alexander J, Satoskar AR, Russhell DG: *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. J Cell Sci 1999, 18: 2993-3002. 6
- 43-Bogdan C, Rollinghoff M: The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. Int J Parasitol 1998, 28: 121-134
- 44-Sacks D, Sher A: Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol, 2002, 3: 1041-1047. 10
- 45-Sacks D, Noben-Trauth N: The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol, 2002, 2: 845-858.

46-Allahverdiyev, A.M., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M. ve Memisoglu, H.R. "A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis", Am J Trop Med Hyg, 2004: 70: 294-297.

47-Maurya R, Mehrotra S, Prajapati VK, Nylén S, Sacks D, Sundar S .Evaluation of blood agar microtiter plates for culturing *leishmania* parasites to titrate parasite burden in spleen and peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol, 2010: 48:1932–1934

48-Siddig M, Ghalib H, Shillington DC, Petersen EA .Visceral leishmaniasis in the Sudan: comparative parasitological methods of diagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg , 1988: 82:66–68

49-Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. The Lancet Infect Dis , 2002;2:494-501.

50-Schallig HDFH, Schone GJ, Koron CCM, Hailu A, Chappius F, Veeken .Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis .Med Microbiol Immunol, 2001:190:69-1

51-Aviles H, Belli A, Armijos A, Monroy F P, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J. Parasito; 1999; 85(2): 181-7.

52-Budak S, Akısu C, Dağcı H. Diğer Tanı Materyalleri ve Uygun Tanı Yöntemleri. özcel MA, Altıntaş N. editörler. Parazit Hastalıklarında Tanı. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No :15, İzmir. 1997, 97-148

53-Ertabaklar H, özkan TA, özensoy S, özbel Y, Babür C, Esen B, Uğurlu M. Corum da Çocuklarda Visseral Leishmaniasis İncelenmesi.Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2003 : 27(4) :233-236.

54-Özensoy S, Özbel Y, Gül M A, Ertabaklar H, Şakru N, Taylan A Ö, Hökelek M. İnsan ve Köpeklerden Alınan Klinik örneklerle Leishmaniasis Tanısı İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Uygulanması .Türkiye Parazitoloji Dergisi, 2002:26(3):23944

55-Sreenivas G, Ansari NA, Singh R, Subba Raju BV, Bhatheja R, Negi NS, Salotra R .Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. Br J Biomed Sci ,2002 :59:218–222

56-El Harith A, el Mutasim M, Mansour D, Fadil Mustafa E, Arvidson H .Use of glycerol as an alternative to freeze-drying for longterm preservation of antigen for the direct agglutination test. Trop Med Int Health ,2003.8:1025–1029

57-El Mutasim, Mansour MD, Abass EM, Hassan WM, el Harith A Evaluation of a glycerol-preserved antigen in the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis at rural level in eastern Sudan. J Med Microbiol , 2006: 55:1343–1347

- 58-Jacquet D, Boelaert M, Seaman J, Rijal S, Sundar S, Menten J, Magnus E .Comparative evaluation of freeze-dried and liquid antigens in the direct agglutination test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis (Itma-Dat/VI). Trop Med Int Health, 2006: 11:1777–1784
- 59-Chappuis F, Rijal S, Jha UK, Desjeux P, Karki BM, Koirala S, Loutan L, Boelaert M .Field validity, reproducibility and feasibility of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in rural Nepal. Trop Med Int Health , 2006: 11:31–40
- 60-Sundar S, Singh RK, Bimal SK, Gidwani K, Mishra A, Maurya R, Singh SK, Manandhar KD, Boelaert M, Rai M . 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 , 2007: 12:284–289
- 61-Mandal J, Khurana S, Dubey ML, Bhatia P, Varma N, Malla N Evaluation of direct agglutination test, rK39 test, and ELISA for the diagnosis of visceral leishmaniasis. AmJTrop Med Hyg , 2008 : 79:76–78
- 62-Bhattarai NR, Van der Auwera G, Khanal B, De Doncker S, Rijal S, Das ML, Uranw S, Ostyn B, Praet N, Speybroeck N, Picado A, Davies C, Boelaert M, Dujardin JC .PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for kala-azar. Trop Med Int Health , 2009 :14:404–411
- 63-Oliveira E, Pedras MJ, de Assis IE, Rabello A . Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg , 2009 :103:1279–1281

64-El-Safi SH, Abdel-Haleem A, Hammad A, El-Basha I, Omer A, Kareem HG, Boelaert M, Chance M, Hommel M Field evaluation of latex agglutination test for detecting urinary antigens in visceral leishmaniasis in Sudan. East Mediterr Health J , 2003 : 9:844–855

65-Ghatei MA, Hatam GR, Hossini MH, Sarkari B . Performance of latex agglutination test (KAtex) in diagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. Iran J Immunol , 2009: 6:202–207

66-Vilaplana C, Blanco S, Domínguez J, Giménez M, Ausina V, TÚral C, Muñoz C Noninvasive method for diagnosis of visceral leishmaniasis by a latex agglutination test for detection of antigens in urine samples. J Clin Microbiol , 2004 :42:1853–1854

67-Singh DP, Goyal RK, Singh RK, Sundar S, Mohapatra TM In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of kala azar. J Health Popul Nutr , 2010 : 28:281–285

68-Takagi H, Islam MZ, Itoh M, Islam AU, Saifuddin Ekram AR, Hussain SM, Hashiguchi Y, Kimura E . Short report: production of recombinant kinesin-related protein of *Leishmania donovani* and its application in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. AmJTrop Med Hyg , 2007: 76:902–905

69-Mohapatra TM, Singh DP, Sen MR, Bharti K, Sundar S. Comparative evaluation of rK9, rK26 and rK39 antigens in the serodiagnosis of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dev Ctries , 2010 : 4:114–117

70-Özcel M. Ali, Özbel Y, Ak M. Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:22_ İzmir 2007, 5-196-210

71-Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı.2'nci baskı. Barış Yayınları. Fak.Kitabevi. 1995, 275-285

72-Salotra P, Raina A, Negi N S. Immunoblot analysis of the antibody response to antigens of *Leishmania donovani* in Indian kala-azar. Br J Biomed Sci. 1999 ; 56 : 263-267.

73-Kaul P, Malla N, Kaur S, Mahajan RC, Ganguly NK. Evaluation of a 200-kDa amastigote-specific antigen of *L. donovani* by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of visceral leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000 ; 94: 173- 175.

74-Garcia L S, Bruckner D A. Diagnostic medical parasitology. 2nd. Ed., American Society for Microbiology, 1993 . Washington, DC.

75-Reithenger R, Quinnell RJ, Alexdar B, Davies CR .Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dos comparative study using an immunchoromatographic dipstick test, Enzyme Linked Immunosorbent and PCR. J. Clin Microbiol. 2002 :40(7):2352-356

76-Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamote J, Bastien P. Comparision of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood .J. Clin.Microbiol, 2001:39 (2):613-17

77-Osman O F , Oskam, L , Zijlstra, E E, Kroon N C, Schoone, G J, Khalil E T, El-Hassan, A M , Kager P A. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol.; 1997 : 35(10): 2454-2457.

78-Aviles H, Belli A, Armijos A, Monroy F P, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J. Parasito; 1999; 85(2): 181-7.

79-Sambrook J , Russell R W. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.New York, 2001; 8-22

80-Van Eys, G. J. J. M., G. J. Schoone, N. C. M. Kroon, and S. B. Ebeling. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 1992; 51 :133–142.

81-Schonian G , Nasereddin A , Dinse N , Schweynoch C , Schallig H D, Presber W, Jaffe C L. Diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported Clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47(1):349-58. 9- Yılmaz

82-AY. Mikrobiyolojide Kullanılan Moleküler Tanı Yöntemleri. 13. Ulusal Parazitoloji Kongresi Konya özet Kitabı , 2003: s 80-83

83-Basiye FL, Mbuchi M, Magiri C, Kirigi G, Deborggraeve S, Schoone GJ, Saad AA, El-Safi S, Matovu E, Wasunna MK . Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. Trop Med Int Health, 2010 : 15:806–810

84-Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, Büscher P, Schoone GJ, Schallig HD, Laurent T, Haleem A, Osman OF, Eltom AM, Elbashir MI, El-Safi S . Diagnostic accuracy of the *Leishmania* OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of leishmaniasis in Sudan. PLoS Negl Trop Dis , 2010 : 4:e776

85-FELIZARDO*, T. C., TOMA L. S., . BORGES N. B, LIMA G.M. C. A. and ABRAHAMSOHN I. A. *Leishmania. amazonensis* infection and dissemination in mice inoculated with stationary-phase or with purified metacyclic promastigotes, Sao Paulo, SP, Brasil , 2007: 1730, 05508-900,

86- C, Chen Y, Sudan B, Donelson J E, Wilson M E. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms .Published in final edited form as: Proteomics Clin Appl. 2010 January ; 4(1): 4–16. doi:10.1002/prca.200900050

87-Alexander J, Satoskar AR, Russhell DG: *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. J Cell Sci, 1999, 18: 2993-3002.

88-Engwerda CR, Ato M, Kaye PM: Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol , 2004, 20: 524-530.

- 89-Kaye PM, Svennson M, Ato M, et al: The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 2004, 201: 239-253
- 90-Yao C, Chen Y, Sudan B, Donelson J E, Wilson M E. *Leishmania chagasi*: Homogenous metacyclic promastigotes isolated by buoyant density are highly virulent in a mouse model. *Experimental Parasitology* , 2008 129–133
- 91-Yurdakul P. Immunopathogenesis of leishmania infections .*Mikrobiyoloji Bülten* , 2005; 39: 363-381
- 92-Allahverdiyev AM, Bağirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabaş E, Koksall F. The value of new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg*, 2005: 73(2): 276-280
- 93-Allahverdiyev, A M., Bağirova, M., Cakir-Koc R., Elcicek S., Oztel O N., Canim-Ates S., Abamor E S. ve Yeşilkır-Baydar, S. "Utility of the Microculture Method in Non-Invasive Samples Obtained from an Experimental Murine Model wit Asymptomatic Leishmaniasis (Baskıda)", *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87(1), 2012, pp. 81–86 doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0034
- 94-Alptekin, D., Kasap, M., Luleyap, U., Kasap, H., Aksoy, S. ve Wilson, M.L. "Sandflies (Diptera: Psychodidae) associated with epidemic cutaneous leishmaniasis in Sanliurfa, Turkey", *Journal of medical entomology*, 1999.36: 277-281

95-Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE , 2012. 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671

96-Olivier M, Gregory j D, Forget G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. CMR, 2005 . p. 293–305

12-EKLER

12-1-ETİK KURUL TUTANAĞI



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/147-12288
KONU :

30.06./2011

Sayın
Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN AL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Funda DOĞRUMAN AL ve Ali AFANDI'den oluşan, G.Ü.ET-11.069 kod numaralı ve "*Farede Oluşturulan Leishmaniasis Modelinde Farklı Tanı Yöntemlerinin Kullanılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-11.069 and entitled "*The Use of the Various Different Diagnostic Methods in Leishmaniasis Mouse Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

12-2-TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca akademik bilgisini ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, beni araştırmaya yönlendiren, tesvik eden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocam. Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN AL' a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve bilgileri ile bana yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri hocalarıma Manevi desteklerini eksik etmeyen, her zaman yanımda olan Yrd.Doç.Dr.Merve AYDIN' a, Dr.Esra HALİL'a yüksek lisans öğrencilerine Tuğçe Nil YANTIRA' ya, İkiz Oğuz'a .doktora öğrencisi Ali FUAD'a ve Gülcan KORKMAZ'a

Çalışmalarım sırasında bana gösterdiği hoşgörü, ilgi ve desteklerinden dolayı Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölüm Öğretim Üyesi Prof. Dr. Adil M. ALLAHVERDİYEV, Yrd. Doç. Dr. Melahat BAĞIROVA'ya ve doktora , yüksek lisans öğrencilerine Serhat Elçiçek,Serkan YAMAN, Olga Nehir ÖZTEL, Gökçe Ünal Serap YEŞİLKIR, Dr.Sezen CANIM, Dr.Rabia ÇAKIR, ve Emrah Şefik ABAMOR 'a

Akademik hayatın devam etmesi ve olgunlaşmasında maddi, manevi her türlü desteği veren Türkmeneli Kültür Merkezi'ne ve Türkmeneli Vakfı'na

Ayrıca öğrenim hayatım boyunca her türlü zorluğa rağmen hiçbir desteği benden esirgmeden bugünlere gelmeme vesile olan sevgili annem Faeza AFANDİ'ye sevgili babam Hussein AFANDİ'ye , sevgili erkek ve kız kardeşlerime

Değerli arkadaşlarıma Faisal AFANDİ'ye ,Faez AZEEZ'e,Mahir SAAD'e Necmettin AFANDİ'ye ve Fahat Abbasa ALİ'a bütün içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

Ali AFANDİ

Haziran, 2013

13-ÖZGEÇMİŞ

Adı: Ali

Soyadı: AFANDI

Doğum yeri ve Tarihi: Telafer – Irak / 09.06.1986

Eğitimi:

2010-2013 Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, Ankara,

2009-2010 Gazi Üniversitesi Türkçe Öğretim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (TÖMER), Ankara

2005-2009 Musul Üniversitesi, Fen- Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji ABD, Musul .Irak

2001-2005 Telafer Erkek Lisesi, Telafer

Yabancı Dili: İngilizce-Arapça

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
Ankara Mikrobiyoloji Derneği