

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

***LEISHMANIA* TÜRLERİNİN DNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI**

Uz. Bio. Fadime EROĞLU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

ADANA-2012

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

***LEISHMANIA* TÜRLERİNİN DNA DİZİ ANALİZİ İLE TANIMLANMASI**

Uz. Bio. Fadime EROĞLU
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF.2010.D.11 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No: TF.2010.D.11

ADANA-2012

KABUL VE ONAY FORMU

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Leishmania Türlerinin DNA Dizi Analizi İle Tanımlanması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20 / 04 / 2012

İmza

Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Mehmet KARAKAŞ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Doç. Dr. Derya ALABAZ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Prof. Dr. Süleyman YAZAR
Erciyes Üniversitesi
Jüri Üyesi

İmza

Prof. Dr. Macit İLKİT
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulununtarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans ve doktora eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, her yanılsımı büyük bir hoşgörüyle düzelten, öğretirken öğrenmeyi öğreten, danışman hocam Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail Soner KOLTAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Akdeniz Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Soner UZUN ve Adıyaman Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ahmet GENÇ, Çukurova Üniversitesi öğretim üyeleri Prof. Dr. Mehmet KARAKAŞ ve Doç. Dr. Derya ALABAZ'a teşekkür ederim.

Paylaşacak dostlarınız yoksa iyi şeylere sahip olmanın bir zevki de yoktur. Tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca iyi ve kötü günlerimi benimle paylaşan aileme ve Parazitoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca Tez çalışmasını TF.2010.D11 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Uzm.Bio. Fadime EROĞLU

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Leishmania'nın Morfolojisi	3
2.2.Leishmania'nın Yaşam Döngüsü	4
2.3.Leishmania'nın Moleküler Yapısı	5
2.4.Leyişmanyoz	6
2.4.1.Kutanöz Leyişmanyoz	7
2.4.1.1. Kutanöz Leyişmanyoz Epidemiyolojisi	7
2.4.1.2. Kutanöz Leyişmanyoz'un Klinik Tanısı	7
2.4.1.3. Kutanöz Leyişmanyoz'un Laboratuvar Tanısı	8
2.4.1.4. Kutanöz Leyişmanyoz İmmunolojisi	9
2.4.1.5. Kutanöz Leyişmanyoz'un Tedavisi	9
2.4.1.5.1. Sistemik Tedavi	9
2.4.1.5.2. İntralezyoner Tedavi	10
2.4.2. Visseral Leyişmanyoz	10
2.4.2.1. Visseral Leyişmanyoz Epidemiyolojisi	11
2.4.2.2. Visseral Leyişmanyoz'un Klinik Tanısı	11
2.4.2.3. Visseral Leyişmanyoz'un Laboratuvar Tanısı	12
2.4.2.4. Visseral Leyişmanyoz İmmunolojisi	13
2.4.2.5. Vissearl Leyişmanyoz'un Tedavisi	13
2.5. Leyişmanyoz Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	14
2.6. DNA Dizi Analizi	15

2.6.1. Otomatik DNA Dizi Analizi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Örneklerin Toplanması	19
3.1.1. Smear Örneklerinin Alınması	19
3.1.2. Kemik İliği Örneklerinin Alınması	20
3.2. Mikroskopik İnceleme Yöntemi	20
3.2.1. Smear Örneğinin Giemza Boyası ile Boyanması	20
3.2.2. Kemik İliği Örneğinin Giemza Boyası ile Boyanması	20
3.2.3. Smear ve Kemik İliği Örneklerinin Mikroskopik İncelenmesi	20
3.3. DNA İzolasyonu	21
3.4. PCR Yöntemi	23
3.4.1. Hedef Alınan Gen Bölgesi ve Primerler	23
3.4.2. PCR Reaksiyonu Karışımı	24
3.4.3. Termal Cyclers Programı	24
3.4.4. Agaroz Jel Elektrophorezi ve Örneklerin Yürütülmesi	25
3.5. Reastriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizimi	25
3.6. PCR Ürünlerinin Purifikasyonu	26
3.7. DNA Dizi Analizi Yöntemi	27
3.7.1. Dideoksi Terminasyon Reaksiyonu	27
3.7.2. Terminasyon Reaksiyon Ürününün Purifikasyonu	28
3.7.3. DNA Dizi Analizi Cihazının Çalışma Programı	28
4. BULGULAR	30
4.1. Mikroskopik İnceleme Yönteminin Sonucu	30
4.2. PCR Yönteminin Sonucu	31
4.3. RFLP Yönteminin Sonucu	32
4.4. DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonucu	33
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7. KAYNAKLAR	46
8. ÖZGEÇMİŞ	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1. Leishmania Amastigot Şeklinin İnce Yapısı	3
Şekil.2. Leishmania Promastigot Şeklinin İnce Yapısı	4
Şekil.3. Leishmania'nın Yaşam Döngüsü	5
Şekil.4. DNA Dizi Analizi İle Tanımlama İşlemi	15
Şekil.5. DNA Dizi Analizinde Kullanılan Nükleotitlerden dATP ve ddATP Molekülü	17
Şekil.6. Smear Örneğinin Alınması	19
Şekil.7. Kemik İliği Örneğinin Alınması	20
Şekil.8. DNA Dizi Analizi Cihazında Elde Edilen Analiz Görüntüsü	29
Şekil.9. Leishmania Amastigot Şekilleri (X100)	30
Şekil.10. PCR Yöntemi ile Pozitif Bulunan Örneklerin Agaroz Jel Görüntüsü	31
Şekil.11. PCR Yöntemi ile Pozitif Bulunan PCR Örneklerin RFLP Sonuçlarından Elde Edilen Agaroz Jel Görüntüsü	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. PCR Yönteminde Kullanılan Primerlerin Nükleotit Dizileri	23
Çizelge 2. Leishmania ITS1 Gen Bölgesi Şemazitesi	23
Çizelge 3. PCR Karışımında Kullanılan Protokol	24
Çizelge 4. PCR Yöntemi için Kullanılan Termal Cycler Programı	24
Çizelge 5. DNA Dizi Analizi Reaksiyon Kitinde DDNTP'lerin İşaretlendikleri Florasan Boya İsimleri ile Bunlara Karşılık Gelen Renkler	27
Çizelge 6. Kutanöz Leyişmanyoz'un Laboratuvar Tanısında Mikroskobik İnceleme ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması	31
Çizelge 7. Visseral Leyişmanyoz'un Labortuvar Tanısında Mikroskobik İnceleme ve PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması	32
Çizelge 8. Kutanöz Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L. tropica, L. infantum ve L.major Türlerinin Nükleotit Dizileri	34
Çizelge 9. Visseral Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L.infantum, L. donovani ve L. tropica Türlerinin Nükleotit Dizileri	35
Çizelge 10. Kutanöz Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L. tropica Türlerinin Gen Bankasına Kayıtlı Diğer L. tropica Türleri ile Karşılaştırılması	37
Çizelge 11. Kutanöz Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L. infantum ve L. major Türlerinin Gen Bankasına Kayıtlı Diğer L. infantum ve L. major Türleri ile Karşılaştırılması	38
Çizelge 12. Visseral Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L. infantum ve L. donovani Türlerinin Gen Bankasına Kayıtlı Diğer L. infantum ve L. donovani Türleri ile Karşılaştırılması	39
Çizelge 13. Visseral Leyişmanyoz'lu Olgulardan İzole Edilen L. tropica Türlerinin Gen Bankasına Kayıtlı Diğer L. tropica Türleri ile Karşılaştırılması	40

ÖZET

Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türlerinin tanımlanması hastalığın klinik özelliklerini belirlemek, hastalığın seyrini takip etmek ve hastalara uygun tedavi uygulamak için çok önemlidir. Leyişmanyoz'un epidemiyoloji ile ilgili klasik bilgilerde *Leishmania tropica* (*L. tropica*) ve *Leishmania major* (*L. major*)'un Kutanöz Leyişmanyoz'a, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) ve *Leishmania donovani* (*L. donovani*)'nin ise Visseral Leyişmanyoz'a neden olduğu bildirilmektedir.

Son yıllarda, *Leishmania* türlerinin genotiplerinin ve patojenitesinin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda KL hikâyesi olmayan VL olgularında *L. tropica*, VL hikâyesi olmayan KL olgularında ise *L. infantum* türleri izole edilmiştir. Bu durum literatürde rapor edilen klasik bilgilerin doğru olmadığı, *L. infantum* ile *L. tropica*'nın her iki formdaki Leyişmanyoz'a neden olabileceği ihtimalini ortaya çıkartmıştır.

Bu çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan *L. tropica* (%49), *L. infantum* (% 36), *L. major* (%15), Visseral Leyişmanyoz'lu olgularda *L. infantum* (%56), *L. donovani* (%31) ve *L. tropica* (%13) türleri izole edildi. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum* ve *L. major*'un haplotip, *L. tropica*'nın heterotip olduğu tespit edildi. Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum*, *L. donovani* ve *L. tropica*'nın haplotip olduğu tespit edildi. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum*'lar ile Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum*'ların nükleotit dizileri arasında benzerlik görülmektedir. Bu durum Kutanöz Leyişmanyoz olgularından izole edilen *L. infatum* türlerinin Visseral Leyişmanyoz'a neden olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz hikayesi olmayan Visseral Leyişmanyoz olgularında ise *L. tropica* türü tespit edildi.

Çalışmanın sonucunda Visseral Leyişmanyoz etkeni olarak bilinen *L. infantum*'un Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgularda da görülebileceği, Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olarak bilinen *L. tropica*'nın Visseral Leyişmanyoz'lu olgularda da görüldüğü saptandı.

Anahtar Kelimeler: Leishmania, Leyişmanyoz, DNA Dizi Analizi

ABSTRACT

Diagnosis of *Leishmania* species which has Laishmaniasis effect is very important for determination of clinic features of disease, pursuing the course of disease and apply proper therapy to patients. In the classical information about epidemiology, it is known that Laishmaniasis causes *Leishmania tropica* (*L. tropica*) and *Leishmania major* (*L. major*) causes Cutaneous Laishmaniasis, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) and *Leishmania donovani* (*L. donovani*) causes Visceral Laishmaniasis.

In the recent years, molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) have been developed in the determination of genotypes and pathogenicity of *Leishmania* species. As a result of these studies *L. tropica* was isolated in VL cases without KL story, *L. infantum* species were isolated in KL cases without VL story. This situation reveals the probability that classical information reported in literature may be wrong, *L. infantum* and *L. tropica* may cause Laishmaniasis in both forms.

In this study, *L. tropica* (49%), *L. infantum* (36%), *L. major* (15%) from Cutaneous Laishmaniasis; *L. infantum* (56%), *L. donovani* (31%) and *L. tropica* (13%) species in Visceral Laishmaniasis were isolated. It was seen that *L. infantum* and *L. major* from Cutaneous Laishmaniasis were haplotype, *L. tropica* from Cutaneous Laishmaniasis was heterotype. It was found that *L. infantum*, *L. donovani* and *L. tropica* from Visceral Laishmaniasis were haplotype. The *L. infantum*'s nucleotide series has similarity with nucleotide series of *L. infantum* isolated from cases with Visceral Laishmaniasis. This situation makes us think that *L. infantum* species isolated from Cutaneous Laishmaniasis cases may cause Visceral Laishmaniasis. In the study *L. tropica* species were determined in Visceral Laishmaniasis cases which have no Cutaneous Laishmaniasis story.

As a result of the study, it was determined that *L. infantum* which is known as the factor of Visceral Laishmaniasis can be observed in Cutaneous Laishmaniasis and that *L. tropica* which is known as the factor of Cutaneous Laishmaniasis can be observed in Visceral Laishmaniasis.

Kew Words: *Leishmania*, Laishmaniasis, DNA Sequencing

GİRİŞ

Yirmiden fazla *Leishmania* türünün sebep olduğu Leyişmanyoz, Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyoz olmak üzere iki temel formda görülmektedir. Kutanöz Leyişmanyoz (şark çıbanı, Antep çıbanı, Halep çıbanı, Delphi çıbanı, Yıl çıbanı, güzellik çıbanı) genellikle deriyi ve bazen de deri ve mukozoları tutan ve iz (skar) bırakarak iyileşen lezyonlar ile karakterize bir deri hastalığıdır. Visseral Leyişmanyoz ise ateş, kilo kaybı, karaciğer, dalak büyümesi gibi belirtiler ile ortaya çıkabilen ve tedavi edilmediğinde ölümle sonuçlanabilen bir hastalıktır^{1,2}.

Kutanöz Leyişmanyoz (KL) olgularının %90'ından fazlası İran, Afganistan, Suriye, Suudi Arabistan, Brezilya ve Peru'da; Visseral Leyişmanyoz (VL) olgularının %90'dan fazlası ise Bangladeş, Brezilya, Hindistan ve Sudan'da meydana gelmektedir. 1950'li yıllardan önce en fazla Güneydoğu Anadolu Bölgesinde olmak üzere Türkiye'nin Leyişmanyoz için endemik bir bölge olduğu, 1950'den sonra sivrisinek kontrolünde kullanılan DDT nedeniyle azaldığı, ancak 1960'dan sonra sivrisinek kontrol çalışmalarındaki yetersizlikten dolayı olgu sayısının arttığı bildirilmektedir. Son on yıldır ise özellikle Çukurova Bölgesinde Leyişmanyoz'un önemli bir halk sağlığı problemi olduğu rapor edilmektedir^{3,4,5}.

Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türlerinin tanımlanması hastalığın seyrini takip etmek ve hastalara uygun tedaviyi uygulamak için çok önemlidir. Leyişmanyoz'un epidemiyolojisi ile ilgili klasik bilgilerde *Leishmania tropica* (*L. tropica*) ve *Leishmania major* (*L. major*)'un Kutanöz Leyişmanyoz'a, *Leishmania infantum* (*L. infantum*)'un ve *Leishmania donovani* (*L. donovani*)'nin ise Visseral Leyişmanyoz'a neden olduğu bildirilmektedir^{6,7}.

Son yıllarda *Leishmania* türlerinin genotiplerinin ve patojenitelerinin belirlenmesinde polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda Kutanöz Leyişmanyoz hikâyesi olmayan Visseral Leyişmanyoz olgularında *L. tropica*, Visseral Leyişmanyoz hikâyesi olmayan Kutanöz Leyişmanyoz olgularında ise *L. infantum* türleri izole edilmiştir. Bu durum literatürde rapor edilen klasik bilgilerin eksik olduğunu, *L. infantum* ve *L. tropica*'nın her iki Leyişmanyoz enfeksiyonun etkeni olabileceği ihtimalini ortaya çıkartmıştır^{8,9}.

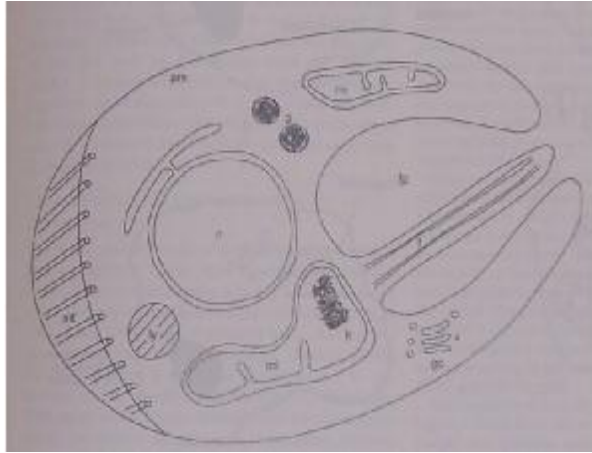
Bu alışmada Kutanöz Leyişmanyoz olgularından izole edilen *L. infantum* ve *L. tropica* ile Visseral Leyişmanyoz olgularından izole edilen *L. infantum* ve *L. tropica* türleri arasındaki farklılık ve benzerlikleri DNA dizi analizi ile tespit etmek amaçlanmıştır. Çalışmanın sonucunda literatürde belirtilen Kutanöz Leyişmanyoz olgularından izole edilen *L. infantum* ve *L. tropica* türlerinin Visseral Leyişmanyoz'a neden olup olmadığı sorusuna cevap bulunmuştur. Böylece Kutanöz Leyişmanyoz olguları ölümcül olan Visseral Leyişmanyoz'a maruz kalmadan tedavi edilecektir. Ayrıca bu çalışma ile literatürde eksik olan Çukurova Bölgesindeki Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türleri tanımlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Leishmania parazitleri ilk kez William B. Leishman tarafından 1901 yılında saptanmış ve isimlendirilmiştir. *Leishmania* cinsine ait türlerin yaşam devrelerinde morfolojik olarak, memeli konakta görülen “amastigot” ve vektörde görülen “promastigot” şekil olmak üzere iki farklı şekilde bulunmaktadır. Her iki şekilde de nükleus yuvarlak veya oval şekilde, kinetoplast oval veya çubuk şekilde görülmektedir. *Leishmania* türleri morfolojik bakımından birbirinden farklıdır. *Leishmania* türleri tedavi edilmediğinde vücutta iz bırakan deri enfeksiyonu Kutanöz Leyişmanyoz ve tedavi edilmediğinde ölümcül olan iç organlar enfeksiyonu Visseral Leyişmanyoz olmak üzere iki farklı Leyişmanyoz etkenidir^{1,2}.

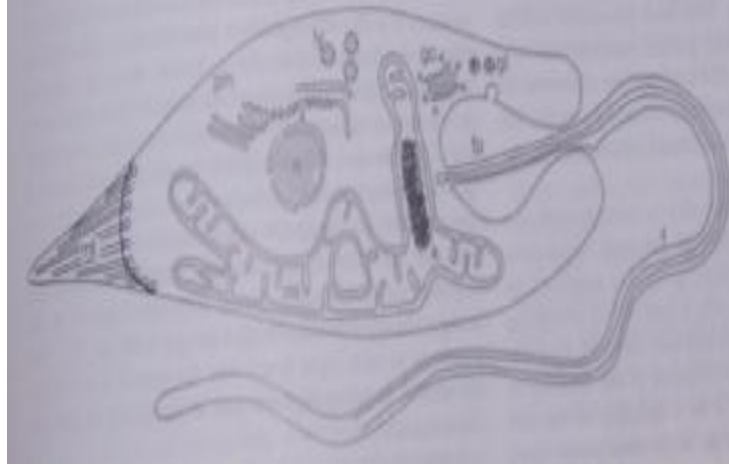
2.1. *Leishmania*’nın Morfolojisi

Leishmania türlerinin yaşamında amastigot ve promastigot şekilleri görülür. Amastigot şekil deride ve iç organlarda monositler, polimorf çekirdekli lökositler ve endotel hücrelerine yerleşir. Hücre içinde çoğalıp evrimini tamamlayınca hücre parçalanır ve bu yapılar hücre dışında da görülebilir. Amastigot şekil aeropdur ve besinlerini konak hücreden sağlar, boyuna ikiye bölünerek çoğalır. Giemsa ile boyanmış amastigotun sitoplazması mavi, çekirdeği pembe veya koyu kırmızı renkte görülür. Çekirdeğin yakınında bulunan ve parlak kırmızı menekşe renkte boyanan yapıya kinetoplast denir. Kinetoplast, omurgasız konaktaki kamçılı evrenin kamçısının çıktığı bölgedir^{1,2}. (Şekil 1)



Şekil 1: *Leishmania* amastigot şeklinin ince yapısı

Promastigot şekil tek kamçılı, mekik şeklindedir ve vektör vücudunda görülmektedir. Promastigot şekil omurgalı konak vücuduna girdiğinde vücut yüzeyindeki komplemanı bağlayabilme yeteneğine sahiptir. Promastigotlar hedef makrofajın yüzeyindeki kompleman reseptörlerine yapışarak, opsonize edilmiş bir şekilde makrofaj tarafından daha kolay fagosite edilmektedir^{2,3}. (Şekil 2)



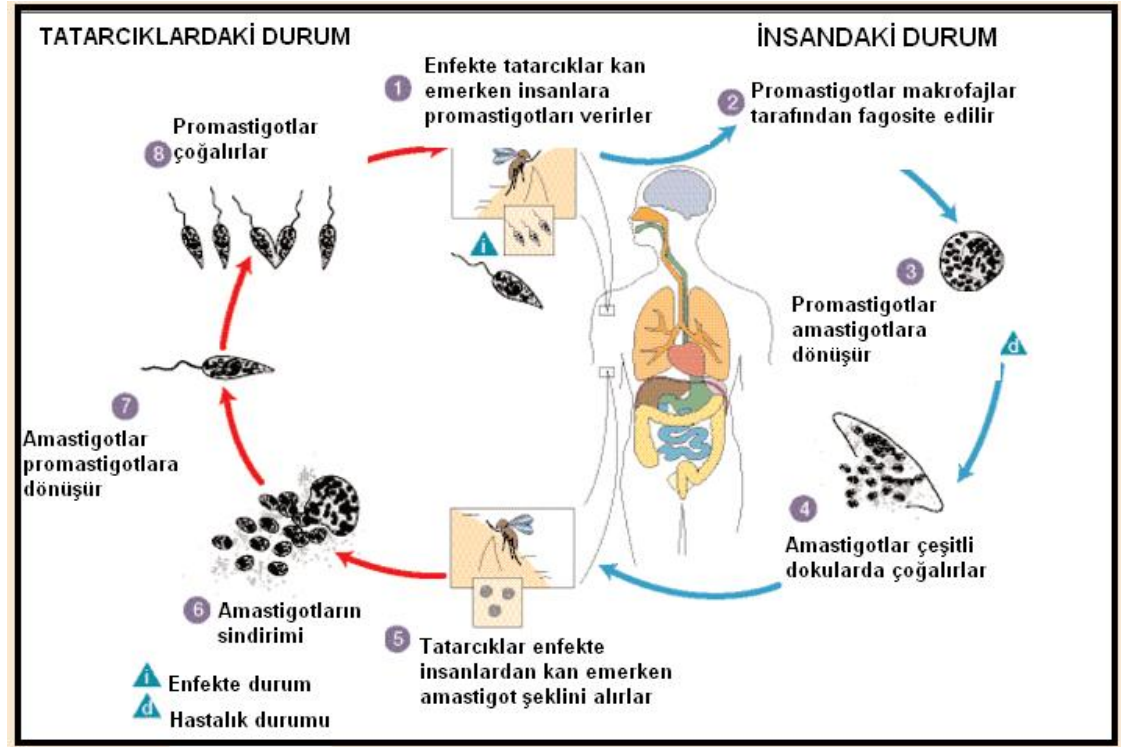
Şekil 2: *Leishmania* promastigot şeklinin ince yapısı

2.2. *Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

Leishmania türleri yaşam döngülerini biri omurgalı diğeri omurgasız iki konak vücudunda tamamlamaktadır. Bu yüzden *Leishmania* diheteroksen parazitler grubuna girmektedir. Yaşam döngülerinde eşeyli üreme görülmediği için konakları son veya ara konak olarak tanımlanmaz. Omurgalı konak insan ve diğer memelilerdir. Omurgasız konaklar ise *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* türü sineklerdir. Bu sinekler parazitin vektörüdür ve omurgalı konağa paraziti bulaştırmaktadırlar^{1,2,3}.

Leishmania türlerinin konak zinciri; omurgalı konak - tatarcıklar - omurgalı konak şeklinde uzanmaktadır. Leyişmanyozlu kişiden kan emen dişi tatarcık, amastigot içeren hücreleri de alır. Bu evre vektörün orta bağırsağında hemen promastigot şekle dönüşür ve çoğalır. Bu konaktaki son aşama metasiklik evredir ve eklembacaklıların hortumunda yerleşir. Kan emme esnasında bu evredeki parazitler, antikoagulan kompleman reseptörlerine tutunan parazit hücre içine girer ve orada defalarca ikiye bölünerek çoğalır. Çoğalma tamamlanınca hücre parçalanır, serbest kalan parazitler yeni

hücreleri enfekte eder. Çoğalma bu şekilde devam ederken dişi tatarcık enfekte insan veya omurgalı konaklardan kan emerse, parazitler onun vücuduna geçer ve döngü tamamlanmış olur^{4,5}. (Şekil 3)



Şekil 3: *Leishmania*'nın Yaşam Döngüsü

2.3. *Leishmania*'nın Moleküler Yapısı

Leishmania çekirdekte bulunan DNA'nın yanı sıra kinetoplast DNA (kDNA) olarak bilinen mitokondrial DNA'ya sahiptir. kDNA, minicircle ve maxicircle olmak üzere iki kısımdan oluşmuş bir DNA modeli içermektedir. Maxicircle, 20-35 kb büyüklüğünde, homojen, minicircle ise 0,5-1,5 kb kalınlığında olan heterojen dairesel DNA molekülüdür^{6,7}.

Leishmania genomlarında ardı ardına dizilmiş tekrarlanan genler bulunmaktadır ve olgun mRNA'ların polisistronik prekürsörleri olarak RNA'ya dönüşmektedirler. Bu mRNA'ların işlenme yöntemlerinin en özgünlerinin "trans-splicing" ve mitokondrial mRNA'ların "post-transkripsiyonel editing" ile işlenmesi olduğu düşünülmektedir¹⁰.

Tüm *Leishmania* türlerinde yüksek derecede korunan genler 1 Mb'dan büyük kromozomlarda bulunmaktadır. *Leishmania*'nın asıl gerekli olan genleri büyük

kromozomlarda bulunurken, diğer kromozomlar özel adaptasyonlar için ya da çok özel fonksiyonlar (yüzey proteazları, antijenler, sekresyon faktörleri vs.) için yardımcı gen kopyalarını taşımaktadır¹¹.

Leishmania genomunda 8300 protein kodlayan ve 900 RNA bulunmaktadır. Protein kodlayan genlerin yaklaşık %40'ı 2 ile 500 arasında üyesi bulunan toplam 662 ailede yer almaktadır¹².

Leishmania türleri yüksek derecede esnek bir kromozom organizasyonuna sahiptirler ve tür içinde bile kromozom büyüklüğü ve sayısında değişiklikleri görülmektedir. Tüm Eski Dünya suşlarında toplamda haploid genom için 35 Mb büyüklüğünde, 0,3 Mb ile 3 Mb arasında değişen 36 heterolog kromozom tanımlanmıştır^{13,14}.

2.4. Leyişmanyoz

Toplam olarak yirmiden fazla *Leishmania* tür veya alt türünün sebep olduğu Leyişmanyoz, Yeni Dünya'da 22, Eski Dünya'da ise 66 ülkede olmak üzere 4 kıtada toplam 88 ülkede endemik olarak görülürken, Güneydoğu Asya'da bulunmamaktadır^{15,16}.

Leyişmanyoz temel olarak iki ana klinik şekilde görülmektedir. Deri şekli olan Kutanöz Leyişmanyoz'da; lezyonlar genelde lokalize kalmakta, deri ülseri gelişmekte, kalıcı bir iz ile birlikte kendiliğinden iyileşebilmekte ve ömür boyu süren bir bağışıklık bırakmaktadır. İç organlarda yerleşen formu olan Visseral Leyişmanyoz'da ise; düzensiz ateş, kilo kaybı, dalak, karaciğer, lenf yumruları büyümesi ve anemi gibi önemli semptomlarla ortaya çıkmakta ve tedavi edilmezse ölümle sonuçlanmaktadır^{17,18}.

Visseral Leyişmanyoz kala azar, kara hastalık, karahumma, öldüren ateş, iç organlar leyişmanyozu gibi isimler ile bilinmektedir. Kutanöz Leyişmanyoz ise şark çıbanı, güzellik çıbanı, Halep çıbanı ve deri leyişmanyozu gibi isimler ile adlandırılmaktadır^{1,2}.

Leyişmanyoz ekoepidemiolojik açıdan sadece insandan-insana bulaşımı niteleyen "Antroponotik Kutanöz Leyişmanyoz", hayvanlardan insanlara bulaşımı niteleyen "Zoonotik Kutanöz Leyişmanyoz" ve "Zoonotik Visseral Leyişmanyoz" olarak ayrılabilir^{19,20}.

2.4.1. Kutanöz Leyişmanyoz

Kutanöz Leyişmanyoz, *Leishmania* türü parazitlerin neden olduğu deri ve mukozaları tutan, tedavi edilmediğinde vücutta iz bırakan bir deri hastalığıdır. Kutanöz Leyişmanyoz tedaviyle veya kendiliğinden düzeldikten sonra kişiye ömür boyu yeni enfeksiyonlardan koruyan kalıcı bir bağışıklık bırakmaktadır^{21,22}.

Kutanöz Leyişmanyoz, Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyozu ve Yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyozu olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ve *L. infantum* Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyozuna, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* Yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyozuna neden olmaktadır²³.

2.4.1.1. Kutanöz Leyişmanyoz Epidemiyolojisi

Akdeniz Havzası, Orta Doğu, Pakistan ve Hindistan'ın bir kısmındaki şehirlerde eski dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una *L. tropica*, Orta Asya, Güney Rusya, Orta Doğu ve Afrika'da kuru çöl bölgelerindeki kırsal alanlardaki Eski Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una ise *L. major* ve sporadik olarak *L. infantum* sebep olmaktadır. Meksika ve Güney Amerika'da görülen yeni Dünya Kutanöz Leyişmanyoz'una *L. braziliensis* ve *L. mexicana* sebep olmaktadır^{1,2}.

2.4.1.2. Kutanöz Leyişmanyoz'un Klinik Tanısı

Kutanöz Leyişmanyoz lezyonları tipik olarak vücudun elbise dışında kalan bölgelerinde ve özellikle baş-boyun bölgelerinde, el-kol bölgelerinde ve ayak-bacak bölgelerinde görülmektedir²⁴.

Kutanöz Leyişmanyoz her yaşta görülebilmektedir. Hastalarda görülebilecek lezyon sayısı 1 ile 20 arasında olabilmekte, her birinin çapı ve klinik özellikleri farklı olabilmektedir. Sekonder bakteriyel enfeksiyon sıklıkla görülmekte ve bu da normalde ağrısız olan lezyonlarda ağrıya sebep olmaktadır²⁵.

Kutanöz Leyişmanyoz enfekte tatarcığın sokmasını takiben subklinik kalabilir veya 1-12 haftalık inkübasyon döneminden sonra, büyüyen bir papül ve sonrasında lezyona dönüşmesi ile enfeksiyon gelişebilir. Lezyon sivilce şeklinde başlar ve bir-iki ay bu şekilde devam edebilir, yaklaşık 6 ay içinde giderek genişleyen ve 1-2 cm çapa ulaşan lezyon zamanla ortasından ülserleşir ve bu ülser üzerine sıkıca yapışmış bir kabukla kaplanır. Bu kabuk kaldırılırsa ülser bakan yüzeyinde kirli-beyaz renkte dikensi çıkıntılar gözlenir. Buna Hulusi Behçet çivi belirtisi denir. Lezyon bir yıl içerisinde yerinde elek görünümünde, deride iz bırakarak kendiliğinden iyileşmektedir²⁴.

2.4.1.3. Kutanöz Leyişmanyoz'un Laboratuvar Tanısı

Kutanöz Leyişmanyoz klinik tanısı ile uyumlu her olgu, parazitolojik olarak doğrulanmalıdır. Parazitolojik olarak doğrulanma en çok direkt mikroskopik bakı veya kültür yöntemleri ile yapılır^{26,27}.

Kutanöz Leyişmanyoz'un serolojik yöntemler ile tanısında çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için tanıda serolojik yöntemler tercih edilmemektedir^{28,29}.

PCR, Real-Time PCR gibi moleküler yöntemler ile *Leishmania* parazitlerine tür ve alt tür seviyesinde tanı konulabilmektedir. Kutanöz Leyişmanyoz'un tanısında moleküler yöntemlerin kullanılmasını amaçlayan çalışmalar sonucunda PCR ve Real-Time PCR yöntemlerinin tanıda % 100 özgüllük ve % 92-98 aralığında değişen duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Kliniğe başvuran hastalarda ve saha çalışmalarında yapılan DNA izolasyonundaki yeni tekniklerin sağladığı avantajlar sonucunda günümüzde PCR ile tanı altın standart olarak kabul edilebilir konuma gelmiştir^{30,31,32}.

2.4.1.4. Kutanöz Leyişmanyoz İmmunolojisi

Kutanöz Leyişmanyoz olgularında lezyon iyileştikten sonra türe özgü, kalıcı bir bağışıklık gelişir. Lezyona erken döneminde uygulanan tedavi bağışıklık oluşmasını olumsuz yönde etkileyebilir³³.

Tip 1 hücrel immun yanıt Leyişmanyoz bağışıklığı ve patolojisi için kritiktir. Tip 1 hücrel immun yanıt, insanda *Leishmania*'nın çoğalması ve yayılımının kontrolü için gereklidir. Karşıt olarak interlökin (IL)-10 ve transforming growth factor (TGF)- β *Leishmania*'nın çoğalmasını kolaylaştırmaktadır. Tip 1 hücrel immun yanıt Leyişmanyoz kontrolünde kritik olsa da bu yanıtın uygun şekilde düzenlenmesinde olabilecek bir eksiklik Kutanöz Leyişmanyoz'un konaktaki immünopatolojisini belirlemektedir. Kutanöz Leyişmanyoz'da şiddetli bir tip 1 hücrel immun yanıt şiddetli iltihabi yanıt ile sonlanmaktadır³⁴.

Kutanöz Leyişmanyoz'da CD8+ T hücreleri, şiddetli tip 1 hücrel immun yanıtın kontrolünde Leyişmanyoz'un farklı klinik şekillerinde değişik stratejiler uygulanması bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir³⁴.

2.4.1.5. Kutanöz Leyişmanyoz'un Tedavisi

Tedavide seçilmesi gereken birincil ilaç beş değerlikli antimon bileşikleridir. Eğer lezyonlarda herhangi bir sekonder enfeksiyon yoksa hemen, eğer sekonder bir enfeksiyon varsa öncelikle uygun antibiyotik/antimikotik tedavisi ile sekonder enfeksiyon tedavi edildikten sonra lezyon tedavi edilmelidir³⁵.

2.4.1.5.1. Sistemik Tedavi

10-20 mg/kg/gün beş değerlikli antimon (Sb^V) 12-15 gün süreyle parenteral olarak uygulanır. Pentostam (sodyum stiboglukonat) ticari preparatının 1 ml'sinde 100 mg'a eşdeğer Sb^V bulunurken, Glucantime (meglumine antimonate) ticari preparatının 1 ml'sinde 85 ml'a eşdeğer Sb^V bulunmaktadır. Glucantime Intramuscular (IM) derin

enjeksiyon şeklinde, Pentostam IM derin enjeksiyon şeklinde, Pentostam IM veya Intravenöz (IV) uygulanabilir. IV uygulama beş dakika içerisinde yavaş infüzyon şeklinde olmalıdır. Birinci kür tedaviden sonra 1 ay ara verilir ve lezyon bu süre sonunda tekrar değerlendirilir; gerekirse ikinci kür tedavi uygulanabilir³⁶.

2.4.1.5.2. İntralezyonel Tedavi

Antimonun lokal olarak enjeksiyonu erken dönemdeki, iltihapsız lezyonlar için oldukça faydalıdır. İlaç lezyonun içine intradermal olarak, lezyon tamamen beyazlaşana kadar enjekte edilir. Subkutan dokuya veya damar içerisine kaçırmadan uygulanmalıdır. Lezyonun tamamını beyazlatana kadar ilaç uygulanır. Büyük lezyonlarda, lezyonun tamamını beyazlatabilmek için birden fazla noktadan enjeksiyon yapılması gerekebilir. Lezyon ülser ise, ilacın dışarı kaçmasını önlemek için enjeksiyon ülser kenarına, ülser paralel olarak uygulanır^{37,38}.

Haftada 1 veya 2 kez olmak üzere toplam 5 doz enjeksiyon genellikle yeterlidir. Bu tedavinin tamamlanmasından 1 ay sonra yapılan kontrollerde lezyonda tam iyileşme sağlanamamış ise ikinci kür tedavi uygulanabilir^{38,39}.

2.4.2. Visseral Leyişmanyoz

Visseral Leyişmanyoz'un etkeni ilk kez 1900 yılında, Hindistan'dan ülkesi İngiltere'ye dönen ve yedi yıl sonra ölen bir hastanın dalağında görülmüştür. Aynı yıl yine Hindistan'da birbirinden habersiz olarak Leishman ve Donovan, tropikal kaşeksiden ölen bir hastanın dalağında parazitleri görüp *Piroplasma donovani* diye isimlendirmişler fakat daha sonra *L. donovani* terimini kullanmışlardır. Bu parazitozun etkeni olarak yıllarca tek tür, *L. donovani*, sorumlu tutulmuştur ancak son yirmi yılda en az üç *Leishmania* türü belirlenmiştir. Bunun içinde artık *L. donovani* kompleksinden bahsedilmektedir. Bu kompleksi oluşturan türler coğrafik dağılımları ve biyokimyasal özellikleri yönünden farklı oldukları gibi, oluşturdıkları parazitozun kliniği bakımından da farklılık göstermektedir^{1,2}.

2.4.2.1. Visseral Leyişmanyoz Epidemiyolojisi

Visseral Leyişmanyoz temelde bir zoonozdur. Çünkü bu parazitozun etkeninin rezervuarı köpek ve köpekgillerdir. Bu konaklardan bulaşma olmaktadır. Kentsel bölgelerde zoonoz özellik kaybolup, insandan insana tatarcık ile bulaşma ön plana çıkabilir. Ayrıca Visseral Leyişmanyoz'lu anne plasenta aracılığı ile paraziti bebeğine bulaştırabilmektedir⁴⁰.

Visseral Leyişmanyoz Afrika, Asya, Güney Avrupa ve Güney Amerika olmak üzere 88 ülkede görülmektedir. Her yıl görülen 500 bin yeni olgunun yaklaşık %90'ı Bengladeş, Hindistan, Sudan, Nepal ve Brezilya olmak üzere 5 ülkede saptanmaktadır. Dünyadaki olguların yaklaşık %50'si Hindistan'da görülmektedir⁴¹.

2.4.2.2. Visseral Leyişmanyoz'un Klinik Tanısı

Visseral Leyişmanyoz'lu olgularda parazitoz temelde üç faz halinde seyreder: ivegen, ivegenimsi ve süregen. İvegen Visseral Leyişmanyoz'lu olgularda burun, diş eti ve bağırsak kanamaları görülmektedir. Böyle olgularda hızla anemi, granülositopeni ve pansitopeni gelişir. Kusma, sürgün ve dizanteri görülür. Ödem ve asit gelişimine bağlı olarak hasta 2-3 ayda yaşamını yitirir. En sık görülen tip olan ivegenimsi yani subakut Visseral Leyişmanyoz'da başlangıç birinci tipten daha hafiftir. Ateş başlangıçta iki kez inip çıkarken sonradan dalgalı ateşe dönüşür. Dalak büyür ve sertleşir. Özellikle çocuklarda karaciğer ve lenf bezleri büyür. Sürgün, hatta dizanteri görülür ve hasta ileri derecede zayıflar, kansızlık yoğunlaşır ama dil temiz kalır, iştah iyidir. Hastanın sedim hızı yüksek, serum albumin seviyesi düşük, gamaglobulin seviyesi yüksektir. Hastada granülositopeni ve monositozlu lökopeni görülür^{42,43,44}.

Visseral Leyişmanyoz iki yıl kadar sürebilir, hastalar özellikle çocuklar sekonder enfeksiyonlar nedeniyle yaşamını yitirirler. Süregen Visseral Leyişmanyoz subakut seyreden tipe benzer fakat seyri ondan daha hafiftir. Bazen ivegenimsi tip de süregenleşebilir. Zayıflama, kansızlık, dalak ve karaciğer büyümesi bu dönemin

karakteristiğidir. Visseral Leyişmanyoz'da ıvegen şekil nadirdir ve parazitozun endemik olduğu bölgeye gidenlerde sporadik olgular halinde görülür⁴³.

2.4.2.3. Visseral Leyişmanyoz'un Laboratuvar Tanısı

Visseral Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında dalak veya karaciğer ponksiyon sıvısı, kemik iliğı materyali veya kan örnekleri kullanılır. En iyi sonuç dalaktan alınan örnekle elde edilir ama dalak çok gergin ve duyarlı olduğundan dolayı ponksiyon yapılması önerilmez. Sternumdan alınan kemik iliğı örneğinin de dalak örneğı kadar iyi sonuç verdiğı belirlenmiştir. Araştırmalara göre dalak örneğı % 95'den fazla, karaciğer ve kemik iliğı % 85 civarında, Afrika'daki olguların lenf düğümleri % 65 ve kanın buffy coat tabakası % 70 oranında pozitif sonuç vermektedir⁴⁴.

Visseral Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında direkt inceleme ve kültür yapma sık kullanılan yöntemlerdir. Direkt incelemede örnekten yayma veya değdirme preparat hazırlanır, Giemsa boyası ile boyanır ve mikroskopta incelenir. Kültür için örnekler, steril koşullarda ana maddesi tavşan kanlı tuzlu agar olan Novy-MacNeal-Nicoll (NNN) besiyerine ekilir. Ekimden sonra tüpler 22-25⁰C'de inkübe edilir. Ekim için kullanılan örnekte parazit var ise en erken 2-3 gün sonra kültürlerde promastigotlar görülebilir. Fakat kesin sonuç almak için kültürleri 4 hafta kadar bekletmek hatta kör pasaj yapmak gerekir. NNN besiyerinden başka Schneider'in *Drosophila* besiyeri ve RPMI 1640 gibi besiyerleri de kullanılır^{45,46}.

Visseral Leyişmanyoz'un serolojik tanısı için IFA (dolaylı floresan antikor) testi, IHA (dolaylı hemaglutinasyon antikor) testi, ELISA, DAT (doğrudan aglutinasyon testi), FAST (hızlı aglutinasyon tarama testi) ve western blot (WB) gibi yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen söz konusu bu yöntemlerin duyarlılıkları Visseral Leyişmanyoz tanısında düşüktür⁴⁶.

Son yıllarda geliştirilen ve Visseral Leyişmanyoz etkenine özgü rekombinant antijene karşı antikor varlığını gösteren rK39 hızlı tanı testi yaygın olarak kullanılmaktadır. rK39 hızlı tanı testi insan serumunda *L. infantum*'a karşı oluşan antikorların kalitatif tanımlanması için geliştirilmiş bir immunokromatografik testtir⁴⁷.

Visseral Leyişmanyoz tanısında DNA'ya dayalı genotipik moleküler teknikler diğeri tanı yöntemlerine kıyasla daha güvenilir ve özgüdür. Visseral Leyişmanyoz

etkeni olan *Leishmania* türlerini tiplendirmek için kullanılan metotlar PCR, multiplex PCR, rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD), single-strand konformasyon polimorfizmi, restriksiyon fragment length polimorfizmi (RFLP) ve DNA dizi analizidir^{48,49}.

2.4.2.4. Visseral Leyişmanyoz İmmunolojisi

Bağışıklık sisteminin *Leishmania* infeksiyonlarına karşı cevabı karmaşıktır. Birtakım özel koşullara bağlı olarak hızla iyileşebilir veya daha da kötüleşebilir. Bunlar kısmen memeli konakların genetik farklılıklarına, kısmen parazitin tür ve suşlarının genetik farklılıklarına, kısmen de ısırın sinek sayısı, yeri ve büyüklüğü gibi faktörlere bağlıdır⁵⁰.

Visseral Leyişmanyoz'daki koruyucu bağışıklık da hücresel bağışıklık ile ilgilidir. Bununla beraber T lenfositleri yabancı antijenleri sadece MHC II yüzey molekülüne sahip olan makrofajlar, Langerhans hücreleri ve keratinositler gibi antijen sunan hücreler tarafından sunulduğu zaman tanıyabilmektedir. Sistem çalıştığı zaman ve antijen sunan hücre T hücre ile etkileştiğinde T hücre sitokin üretmekte ve bu da makrofajlar tarafından *Leishmania*'nın öldürülmesini desteklemektedir⁵¹.

Visseral Leyişmanyoz'un immünolojisi ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda tüm hastalarda IgG1 artışı saptanırken antimon tedavisine dirençli olgularda belirgin olarak IgG2 ve IgG3 artışı olduğu, IgM, IgA ve IgE seviyelerinde değişiklik olmadığı saptanmıştır. Yapılan son çalışmalar IgG'nin koruyucu etkisinin bulunmadığı ve ilerlemesine neden olan faktörlerden birisi olduğunu göstermiştir^{50,51}.

2.4.2.5. Visseral Leyişmanyoz'un Tedavisi

Visseral Leyişmanyoz tedavisinde 5 değerli antimonlu bileşikleri kullanılmaktadır. 100 mg antimon (Sb)/ml içeren Na stibogluconate ve 85 mg Sb/ml içeren meglubin antimonat eşit etki ve toksisiteye sahiptir. İlaç IM olarak veya küçük bir iğne kullanılarak damardan veya yavaşça verilir. 50-100 ml, % 5'lik dekstroz içinde 20 dakikadan uzun sürede infüzyon şeklinde de verilebilir. Tedaviye 21 gün devam edilir. Tedavinin sonuna doğru halsizlik, iştahsızlık, bulantı, kusma ve kas ağrıları

görülebılır. Toksik etkiler gelişince bir gün dinlenmeden sonra her dozu 2 mg/Sb/kg azaltılarak tedaviye devam edilir. Karaciğer ve pankreas enzim seviyeleri yükselebilir, diğer yandan hemoglobin seviyesi düşebilir. Fakat tedavi durdurulduğunda tüm değerlerin normale döndüğü bildirilmiştir^{52,53}.

2.5. Leyişmanyoz'un Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Günümüzde moleküler yöntemler Leyişmanyoz tanısında özgülüğü ve duyarlılığı yüksek olduğu için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca moleküler yöntemler konaktaki *Leishmania* sayısını belirlemek, *Leishmania*'ları tür düzeyinde tanımlamak, *Leishmania*'nın virulansını ya da ilaca direncini belirleyen genleri belirlemek amacı ile kullanılmaktadır⁵⁴.

Moleküler yöntemler ile tanı, kantitasyon ve canlılık çalışmaları için hassasiyetin en yüksek seviyede olması gerektiği için kopya sayısı yüksek olan rRNA genleri, kinetoplast DNA, mini-exon genleri gibi hedefler ile çalışılmaktadır. Tür ayırımında hedef bölgenin hassasiyet sağlaması kadar taksonomik düzeyde değişken olması gerekliliği de önem taşımaktadır. Bu nedenle gp63, internal transcribed spacer (ITS) bölgeleri, hsp70 ve sistein proteinaz genleri gibi kopya sayısı çok ve polimorfik bölgeler hedeflenmektedir^{55,56,57}.

Leyişmanyoz'un tanısı için dokudan izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı birçok PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler vektör ve rezervuarların epidemiyolojik araştırmalarında da başarıyla kullanılmaktadır. PCR hedefi olarak çok kopyalı dizilerin seçilmesiyle en yüksek duyarlılığa ulaşılmaktadır. PCR'ın özgülüğü *Leishmania*'nın genomundaki korunan ya da değişken bölgelerin seçilmesiyle özel ihtiyaçlara göre adapte edilerek parazit cins kompleksi, tür ya da bireysel izolat seviyesinde tanımlanabilir. PCR-RFLP yöntemi Leyişmayoz tanısında en çok uygulanan yöntemlerden biridir. Bu yöntem klasik PCR yönteminin ardından ürünlerin restriksiyon enzimleri ile kesilip elektroforez uygulandıktan sonra etidyum bromür ile boyanarak görüntülenmesidir⁵⁴.

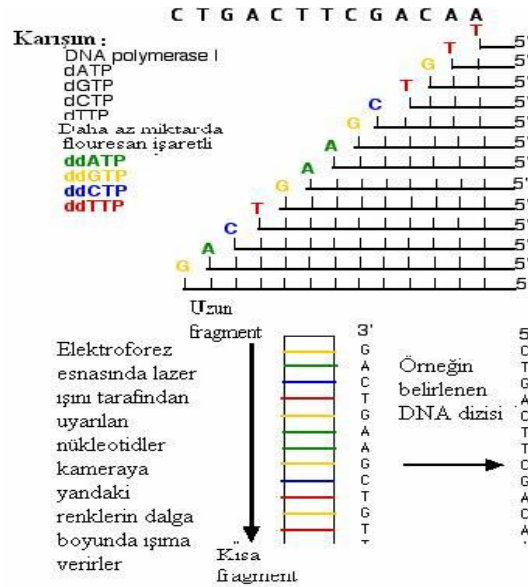
Real-Time PCR yönteminde SYBR-green boyası ile boyanarak ya da TaqMan, FRET gibi florogenik problemlerle parazitler hibridize edilerek aynı anda analiz edilmektedir^{58,59}.

Reverse line blot hibridizasyon yöntemleri (RLB) birçok patojenin hızlı tanısı ve genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. RLB ile <0,1 pg parazit DNA'sı saptanabilmektedir⁶⁰.

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) yöntemi ile *Leishmania*'nın DNA'ları çoğaltılmakta ve ürünler görüntülenebilmektedir. Çoğaltma aşaması için sadece su banyosu gereklidir ve görüntüleme çoğalan ürün varlığında yeşile dönüşen ve yokluğunda portakal renginde kalan SYBR-Green I boyası ile yapılabilmektedir⁶¹.

2.6. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotit baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. (Şekil 4) Analiz bir nükleik asit dizisinin diğer nükleik asit hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır⁶².



Şekil 4. DNA dizi analizi ile tanımlama işlemi

Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir. İlk dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlanmıştır. 1965 yılında Robert HOLLEY tarafından 74

nükleotitlik bir tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. 1977 yılında Allan Maxam-Water Gilbert ve Frederick Sanger tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982 yılında Akiyoshi WADA DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır. 1986 yılında California Teknoloji Enstitüsünden (Caltech) Leroy Hood ve Llyod Smith tarafından DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur. 1990 yılında Edward Uberbacher tarafından bir gen bulma programı olan Grail kullanılmaya başlanmıştır. 1992 yılında Craig Venter, Claire Fraser ve Hamilton Smith tarafından Haemophilus influenza'ya ait ilk DNA dizisi yayınlamıştır. 1996 yılında ulusal bir konsorsiyum tarafından bir ekmek mayası olan *S. Cerevisiae*'nin DNA dizisi yayınlanmıştır. 1998 yılında Sanger Center ve Washington Üniversitesi bilim adamları tarafından *Caenorhabditis elegans*'in DNA dizisi açıklanmıştır. 1999 yılında İngiltere, Japonya ve ABD'den bilim adamları tarafından insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır. 2000 yılında Celera ve işbirliği içinde olduğu üniversiteler tarafından *Drosophila melanogaster*'in DNA dizisi açıklanmıştır. 2000 yılı Haziran ayı içinde İnsan Genom Projesi katılımcıları ve Celera'nın insan gen haritası taslağını tamamladığı açıklanmıştır. *Arabidopsis thaliana* 2000 yılında DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003 yılında Whitehead Enstitüsünde görevli David PAGE ve arkadaşları Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır⁶².

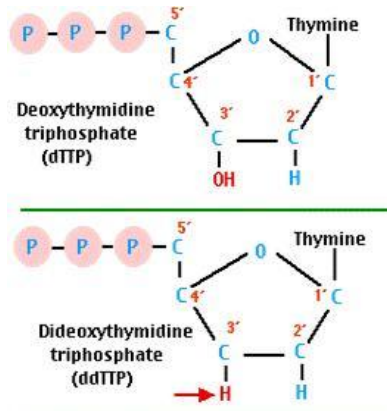
DNA dizi analizinde günümüzde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

1. Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi
2. Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi

Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yönteminin prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit'in, DNA'da bulunan bazları özgül olarak değiştirilmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır. Bu yöntemde, nükleotit dizisi saptanacak olan DNA önce 5' ucundan ²³P ile ya da floresan bir boya ile işaretlenir. DNA'nın yalnızca bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. İkinci adımda ise DNA molekülleri dört tüpe ayrılarak A, C, G ya da T nükleotitlerini değiştirmek ve kırmak için gerekli tepkimeler gerçekleştirilir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotitlerden kırılmış DNA parçaları elde edilir. Sonuçta kırılmanın olduğu

pozisyona göre hepsi 5'- pozisyonlarından işaretli ancak boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilmiş olur. Elde edilen boyları gittikçe kısalan DNA dizileri, jel elektroforezi ile birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi uygulanarak bantlar görüntülenir⁶².

Sanger-Coulson zincir sonlanma yöntemi; dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğundan Maxam-Gilbert yöntemine göre tercih edilir. Bu yöntem için tek iplikçi kalıp DNA'ya, dNTP'lere, ddNTP, DNA polimeraz ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanabilmesine dayanır. **(Şekil 5)** Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir. Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısıfı en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur¹⁰.



Şekil 5. DNA dizi analizinde kullanılan nükleotitlerden dATP ve ddATP molekülü

2.6.1. Otomatik DNA Dizi Analizi

İnsan genom projesi gibi büyük projeler çok sayıda DNA dizi analizi yapılmasını gerektirmektedir. Artan analiz sayısı, uzun zaman ve yüksek iş gücü gerektirir. Bu gelişmeler sonucunda otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamıştır. Otomatik analizinde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programaları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir^{10,62}.

Günümüzde DNA dizi analizi için kullanılan cihazlar genelde kontrol sistemi ve elektroforez ünitesinden oluşmaktadır. Kontrol sistemi tipik bir masa üstü bilgisayar sistemidir. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. Elektroforez ünitesi hazırlanan örneğin yüklendiği ve elektroforezin gerçekleştiği kısımdır. Örnek yükleme ünitesi, dedektör ünitesi ve jel blok ünitesi olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri Ve Zührevi Hastalıklar Ana Bilim Dalı'na Kutanöz Leyişmanyoz şüphesi ile başvuran hastalardan alınan 207 smear örneği ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı'na Visseral Leyişmanyoz ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan 135 kemik iliği örneği kullanıldı.

3.1.1. Smear Örneklerinin Alınması

Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli lezyon %70'lik alkol ile temizlendi. Steril 0,5'lik bistüri ile lezyonun sağlam deriye yakın olan kenarından 1-2 cm derinlikte kazıntı örnekleri alındı. Kazıntı örnekleri alkol ile temizlenmiş lam üzerine ince bir şerit şeklinde yayıldı. (Şekil 6)



Şekil 6. Smear Örneğinin Alınması

3.1.2. Kemik İliği Örneklerinin Alınması

Kemik iliği örneği alınacak Visseral Leyişmanyoz şüpheli hastaya önce lokal anestezi uygulandı. Lokal anestezi etkisini göstermeye başladığında iğne kalça kemiğindeki deri altından kemik zarından ve kemik dış bölümünden geçirildikten sonra hafif bir döndürme hareketiyle kemik iliğine sokuldu. İğnenin içindeki klavuz iğne çekildi kemiğin içinde kalan iğnenin ucuna 10-20 mL kapasitesinde bir şırınga yerleştirilerek 0,2-0,5 mL kadar sıvı çekildi. (Şekil 7)



Şekil 7. Kemik İliği Örneğinin Alınması

3.2. MİKROSKOBİK İNCELEME YÖNTEMİ

3.2.1. Smear Örneğinin Giemza Boyası ile Boyanması

1. Hastadan alınan kazıntı örnekleri lam üzerine yayıldı ve kurutuldu.
2. Lam üzerindeki kazıntı örneği etil alkol ile tespit edildi.
3. Lamın üzerindeki kazıntı örneği % 2'lik Giemza boyası ile boyandı.
4. Giemza boyalı preparat 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. Preparatın üzerindeki Giemza boyası çeşme suyu ile yıkandı ve preparat kurutuldu.

3.2.2. Kemik İliği Örneğinin Giemza Boyası ile Boyanması

1. Bir damla kemik iliği lamın bir köşesine damlatıldı.
2. Sağ elin baş ve işaret parmakları arasına alınan başka bir lam, kemik iliğinin ön kısmına işaret parmağına bakan 45⁰'lik bir açı yapacak şekilde temas ettirildi.
3. Kemik iliği iki köşesine yayılması için kısa bir süre beklendi ve açı korunarak sol tarafa doğru sürüklendi. Lamın peşinden sürüklenen kemik iliği içindeki hücreler bozulmadan ince bir tabaka halinde yayıldı ve preparatlar oda sıcaklığında kurutuldu.
4. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar %70'lik etil alkol ile tespit edildi.
5. Preparatlar % 2'lik Giemza boyası ile boyandı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Yüzeyi Giemza boyası ile kaplı preparatlar çeşme suyu ile yıkandı ve kurutuldu.

3.2.3. Smear ve Kemik İliği Örneklerinin Mikroskopik İncelenmesi

Giemza ile boyanan smear ve kemik iliği preparatlarının üzerine bir damla immersiyon yağı damlatıldı. Preparatlar mikroskopta 100'lük objektifte incelendi ve amastigot görülen preparatlar pozitif (+), amastigot görülmeyen preparatlar negatif (-) kabul edildi.

3.3. DNA İZOLASYONU

Giemza boyalı smear örnekleri temiz bir ependorfun içine bistürü yardımı ile kazınarak aktarıldı. Kazıntı örneklerindeki Giemza boyasının çözünmesi için ependorflara 200 µl parçalayıcı tampon (150 mM NaCl, %1 SDS, 20 mM TrisHCl pH:7,5) ilave edildi ve ependorf tüpleri 70⁰C'lik su banyosunda 30 dakika kaynatıldı. Kemik iliği örneklerinden ise 200 µl alındı, ependorfa aktarıldı ve üzerlerine 200 µl parçalayıcı tampon (150 mM NaCl, %1 SDS, 20 mM TrisHCl pH:7,5) ilave edildi.

Parçalayıcı tamponlar ile parçalanmış kemik iliği ve kazıntı örneklerindeki *Leishmania* parazitlerinin DNA'larını izole etmek için Agencourt DNA izolasyon kiti (BeckmanCoulter, Massachusetts, USA) kullanıldı. DNA izolasyon kitinin kullanım şekli aşağıdaki belirtilmektedir:

1. 400 µL parçalayıcı tampon solusyonu ve 10 µL proteinaz K eklendi.
2. 37°C'lik etüvde 20 dakika inkübe edildi.
3. Örnekler etüvden çıkartıldıktan sonra homojen hale gelmesi için vortekslendi.
4. Homojen hale gelen karışıma 300 µL bağlayıcı tampon solusyonu eklendi ve karışım oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
5. Manyetik boncuk plağına örnekler yerleştirildi ve burada 15 dakika bekletildi.
6. DNA örnekleri manyetik boncuk ve manyetik plağın etkileşmesi ile ependorfun bir kenarında toplandı ve atık sıvı pipet yardımı ile atık kabına boşaltıldı.
7. Ependorflar plaktan çıkartıldı ve her birine 800 µL yıkama solusyonu-1 eklendi ve karışımın homojen hale gelmesi için ependoflar vortekslendi.
8. Ependorflar manyetik boncuklar ve manyetik plağın birleşmesi için tekrar manyetik plağa yerleştirildi ve 10 dakika bekletildi.
9. DNA örnekleri ependorfun manyetik plağa yakın olan kısmında toplandı ve atık sıvı pipet yardımı ile atık kabına boşaltıldı.
10. Ependorflar manyetik plaktan çıkartıldı ve her birine tekrar 800 µL yıkama solusyonu-1 ilave edildi ve karışım vortekslendi.
11. Ependorflar tekrar manyetik alana yerleştirildi ve 10 dakika bekletildi.
12. DNA örneklerine zarar verilmeden atık sıvı pipet yardımı ile atık kabına aktarıldı.
13. Ependoflar manyetik plaktan çıkartıldı ve her birine 500 µL yıkama solusyonu-2 ilave edildi ve karışım vortekslendi.
14. Ependoflar tekrar manyetik plağa yerleştirildi ve 10 dakika bekletildi.
15. DNA örneklerine zarar verilmeden atık sıvı pipet yardımı ile atık kabına aktarıldı.
16. Ependorflar plaktan çıkartıldı ve her birine tekrar 500 µL yıkama solusyonu-2 ilave edildi ve karışım vortekslendi.
17. Ependorfun kenarına biriken DNA örneklerine zarar vermeden pipet yardımı ile atık sıvı atık kabına boşaltıldı.

18. Ependorflar manyetik plaktan çıkartıldı ve her birine 50 µL steril saf su ilave edildi ve vortekslendi.

19. Ependorflar tekrar manyetik plağa yerleştirildi, 10 dakika bekletildi.

20. Steril saf su içerisinde çözünen DNA örnekleri pipet yardımı ile yeni steril ependorflara aktarıldı.

Smear ve kemik iliği örneklerinden elde edilen DNA örnekleri Nanodrop cihazında okutularak DNA konsatrasyonları hesaplandı.

3.4. PCR YÖNTEMİ

3.4.1. Hedef Alınan Gen Bölgesi ve Primerler

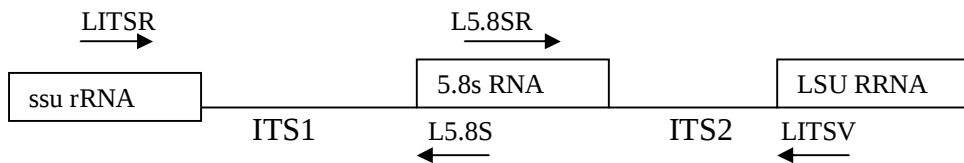
Çalışmada *Leishmania* türlerinin tanımlanması için *Leishmania*'nın Internal Transcribed Spacers 1 (ITS 1) gen bölgesi hedef alındı ve LITSR-L5.8S primerleri kullanıldı⁶³. (Çizelge 1)

Çizelge 1: PCR Yönteminde Kullanılan Primerlerin Nükleotid Dizileri

Gen Bölgesi	Primer İsmi	Nükleotid Dizilimi	PCR Ürünün Uzunluğu
ITS 1	LITSR	5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3'	300-350 bp
	L5.8S	5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3'	

ITS 1 gen bölgesi Eski ve Yeni Dünya *Leishmania* türleri arasında çok yüksek derecede inter ve intra çeşitlilik göstermektedir. Bu yüzden bu gen bölgesi uygun restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde *Leishmania* türleri tanımlanmaktadır. ITS 1 gen bölgesi *Leishmania*'nın ssu rRNA gen bölgesi ile 5.8s rRNA gen bölgeleri arasında yer almaktadır ve her *Leishmania* türünde yaklaşık 40-200 kopya sayısı vardır. (Çizelge 2)

Çizelge 2: *Leishmania* ITS1 Gen Bölgesi Şemazitesi



3.4.2.PCR Reaksiyonun Karışımı

RFLP ve DNA dizi analizinde kullanılmak üzere toplam hacmi 50,5 µL olan PCR karışımı hazırlandı. PCR karışımında kullanılan kimyasalların oranları **çizelge 3**'de gösterilmektedir.

Çizelge 3: PCR Karışımında Kullanılan Protokol

Kimyasalın Adı	Kullanılan Miktar
KCl Tamponu (10X)	5 µL
dNTP karışımı(12,5 mM)	1 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
Forward primer (10 mM)	1 µL
Reverse primer (10 mM)	1 µL
DNA örneği (0.5–1 µg/mL)	5 µL
Taq polimeraz (5 U/µL)	0,5 µL
Steril distile su	33 µL
Toplam Hacim	50,5 µL

3.4.3. Termal Cyclus Programı

Bu çalışmada kullanılan LITSR-L5.8S primerleri için kullandığımız termal cyclus programındaki süre, sıcaklık ve döngü sayısı **çizelge 4** 'de gösterilmektedir.

Çizelge 4: PCR Yöntemi için Kullanılan Termal Cyclus Programı

94°C	5 dakika	Ön Denatürasyon	→1 döngü
94°C	1 dakika	Denatürasyon	→35 döngü
54°C	1 dakika	Primer bağlanması	
72°C	1 dakika	Zincir uzaması	
72°C	10 dakika	Son döngüde zincir uzaması	→1 döngü

3.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi ve Örneklerin Yürütülmesi

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

3.5. RESTRİKSİYON FRAGMENT UZUNLUK POLİMORFİZİMİ

Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türlerinin tanımlanması için restriksiyon fragment uzunluk polimorfizimi (RFLP) yöntemi kullanıldı. Ultraviyole (UV) ışığı altında DNA bandlarının görüldüğü LITSR-L5.8S primerleri ile amplifiye edilmiş PCR ürünleri, tür tayini yapmak amacıyla *Haemophilus aegyptius* (Hae III) restriksiyon enzimi ile kesildi. Hae III restriksiyon enziminin moleküler ağırlığı 37126 olup, DNA molekülünü 5^I...GG/CC...3^I nükleotit diziliminden kesmektedir.

Amplifiye olmuş her PCR ürününden 10 µL alınıp PCR tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 1 µL Hae III (5U/ µL) enzimi ilave edildi. Bu karışım 37⁰C'de 1 gece inkübe edildikten sonra %4'lük agaroz jelinde marker ile beraber yürütüldü. Agaroz jel etidyum bromür boyası ile boyandıktan sonra band uzunlukları değerlendirildi.

3.6. PCR ÜRÜNLERİNİN PURİFİKASYONU

PCR ürünleri DNA dizi analizi uygulamasından önce SentroPure (Sentromer, Sentromer DNA Teknolojileri Ltd.Şti, İstanbul) PCR ürünü saflaştırma kiti ile saflaştırıldı. PCR saflaştırma kitinin kullanma şekli aşağıdaki gibidir:

1. 40 µL PCR ürünü 1,5 mL'lik steril ependorf tüplerinin içine aktarıldı.
2. İçerisinde PCR ürünü bulunan ependorf tüplerinin üzerine 160 µL SG solüsyonu eklendi ve karışım homojen hale gelene kadar vortekslendi.
3. Karışım SentroSpin kolonuna aktarıldı, 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
4. SentroSpin kolonuna 500 µL SW solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
5. SentroSpin kolonuna tekrar 500 µL SW solüsyonu eklendi. 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
6. Arıtma işleminden sonra SentroSpin kolonu 13000 rpm'de 1 dk boş olarak santrifüj edilerek kalan etil alkol uzaklaştırıldı ve toplama tüpü atıldı.
7. SentroSpin kolonu 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve SentroSpin kolonuna 40 µL SE solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 3 dk bekletildi ve 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edilerek saf DNA elde edildi.
8. Saflaştırılan PCR ürünlerinin konsantrasyonları nanodrop cihazında okutuldu ve saf PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi.

3.7. DNA DİZİ ANALİZİ

3.7.1. Dideoksi Terminasyon Reaksiyonu

Reaksiyon ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI Prism Big Dye™) kullanılarak yapıldı. Bu kit içerisinde AmpliTaq DNA polimeraz içeren bir PCR kitidir. Kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan elde edilir. Bu enzimin 5'-3' nükleaz aktivitesi ile fosfataz aktivitesi inhibe edilmiştir.

ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP'lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Çizelge 5. DNA dizi analizi reaksiyon kitinde ddNTP'lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler

ddNTP	Florasın Boya	Renk
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	dTAMRA	Siyah

DNA dizi analizi için toplam hacim 20 µL olmak üzere aşağıdaki protokole göre reaksiyon karışımı hazırlandı.

Ready Reaction Premiks	4.0 µL
BigDye Sequencing Buffer	2.0 µL
Primer (10 pmol)*	2.0 µL
Pürifiye PCR ürünü	2.0 µL
dH ₂ O	10.0 µL
Toplam hacim	20.0 µL

*LITSR ve L5.8S primerleri kullanıldı.

Terminasyon reaksiyonu termal cycler kullanılarak yapılır. PCR programı;

95°C'de	30 sn	} 30 siklus olarak ayarlandı.
50°C'de	10 sn	
60°C'de	4 dk	

3.7.2. Terminasyon Reaksiyon Ürününün Purifikasyonu

Reaksiyonu bitmiş olan PCR ürününün purifikasyonu aşağıdaki protokoldeki gibi yapıldı.

1. 20 µL'lik DNA dizi analizi reaksiyon ürününe 5 µL (125 mM EDTA), 60 µL (%100 etil alkol) ilave edildi.
2. 15 dakika plate oda sıcaklığında oda sıcaklığında vortekslendi.
3. Platedeki PCR ürünleri 2000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi.
4. Platedeki süpernatant kısım atık kabına boşaltıldı.
5. Platedki kuyucukların üzerine 20 µL %70'lik etil alkol ilave edildi ve vortekslendi.
6. Platedeki PCR ürünleri 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
7. Platedeki etil alkol atık kabına boşaltıldı ve boş plate 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8. Her bir örneğin üzerine 20 µL yükleme solusyonu (sample loading solution) eklendi.

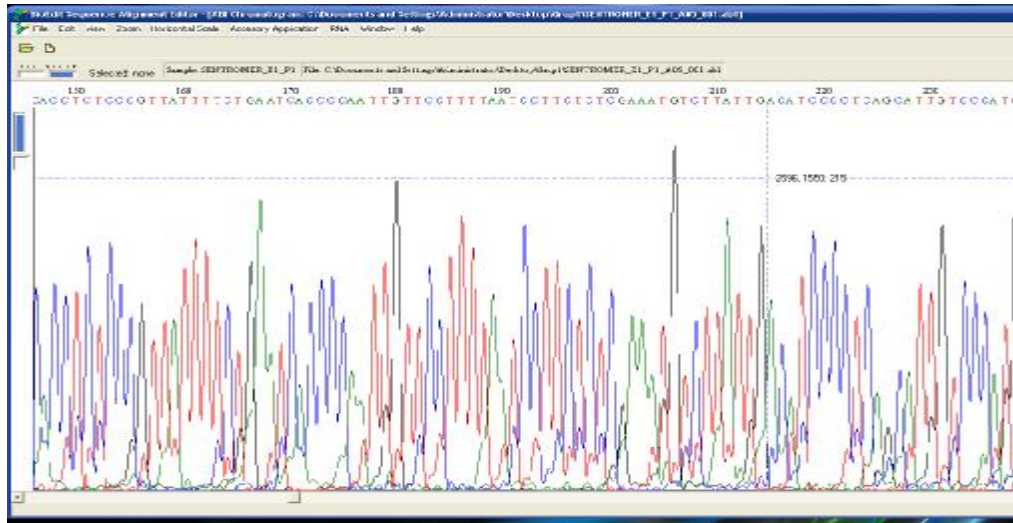
3.7.3. DNA Dizi Analizi Cihazının Çalışma Programı

Örnekler hazırlandıktan sonra ABI 3100 DNA (Applied Biosystems, Nort America) dizi analizi cihazında bulunan örnek tepsisine yerleştirildi ve cihaza başlama komutu verildi. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır:

1. Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 50°C'ye çıkarır.
2. Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest ucu örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.
3. Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsisi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.
4. Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru

harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.

5. Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
6. Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.
7. Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V'ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yayıldıkları florasan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder. (Şekil 8)

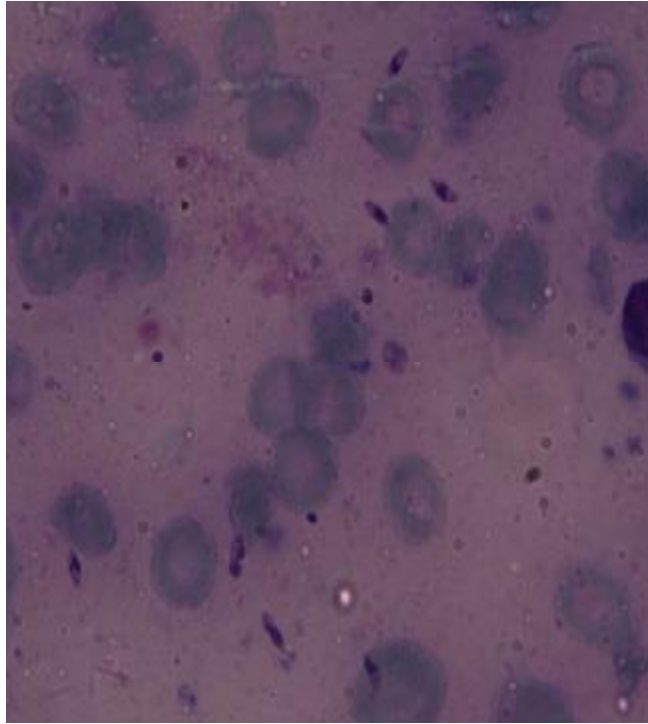


Şekil 8. DNA Dizi Analizi Cihazında Elde Edilen Analiz Görüntüsü

4. BULGULAR

4.1. Mikroskopik İnceleme Yönteminin Sonucu

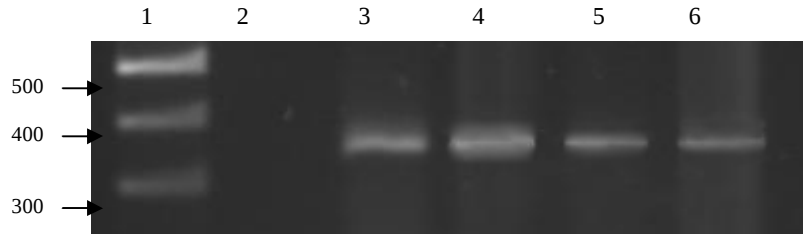
Mikroskopik inceleme yönteminde Giemza boyalı preparatlarda *Leishmania* amastigotları görülen örnekler pozitif, amastigot görülmeyen örnekler ise negatif kabul edildi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıklar Anabilim Dalı'na Kutanöz Leyişmanyoz şüphesi ile başvuran hastalardan alınan 207 smear örneğinin 127 tanesinin mikroskopik inceleme sonucu pozitif, 80 tanesinin mikroskopik inceleme sonucu negatif bulundu. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı'na Visseral Leyişmanyoz ön tanısı ile başvuran hastalardan alınan 135 kemik iliği örneğinin 12 tanesinin mikroskopik inceleme sonucu pozitif, 123 tanesinin mikroskopik inceleme sonucu negatif bulundu. (Şekil 9)



Şekil 9: Leishmania amastigot şekilleri (X100 Obj)

4.2.PCR Yönteminin Sonucu

PCR yönteminde LITSR-L5.8S primerleri ile yaklaşık olarak 300-350 bp'de band veren örnekler pozitif kabul edildi. (**Şekil 10**) Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli 207 hastadan alınan smear örneğinin 148 tanesi PCR'da pozitif, 59 tanesi negatif bulundu. Visseral Leyişmanyoz şüpheli 135 hastadan alınan kemik iliği örneğinin 32 tanesi PCR yöntemi ile pozitif, 103 tanesi negatif bulundu.



Şekil 10. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerin agaroz jel görüntüsü. (1.100 bp'lik marker (Promega), 2.Negatif Kontrol, 3.Pozitif Kontrol, 4-6. Hastalardan izole edilen örnekler)

Çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyozun laboratuvar tanısında kullanılan mikroskopik inceleme ve PCR yönteminin sonuçları karşılaştırıldı.

Çizelge 6. Kutanöz Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması

	Mikroskobi Pozitif (+)	Mikroskobi Negatif (-)	Toplam
PCR Pozitif (+)	127	21	148
PCR Negatif (-)	0	59	59
Toplam	127	80	207

$$\text{PCR yönteminin duyarlılığı: } 127 / (127+0) \times 100 = \%100$$

$$\text{PCR yönteminin özgüllüğü: } 80 / (21+59) \times 100 = \%74$$

Kutanöz Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında kullanılan PCR yöntemi ile mikroskopik inceleme yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında, PCR yönteminin mikroskopik inceleme yöntemine göre %100 duyarlılık ve %74 özgüllük gösterdiği tespit edildi. (**Çizelge 6**)

Çizelge 7. Visseral Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme ve PCR yöntemlerinin karşılaştırılması

	Mikroskobi Pozitif (+)	Mikroskobi Negatif (-)	Toplam
PCR Pozitif (+)	12	20	32
PCR Negatif (-)	0	103	103
Toplam	12	123	135

PCR yönteminin duyarlılığı: $12 / (12+0) \times 100 = \%100$

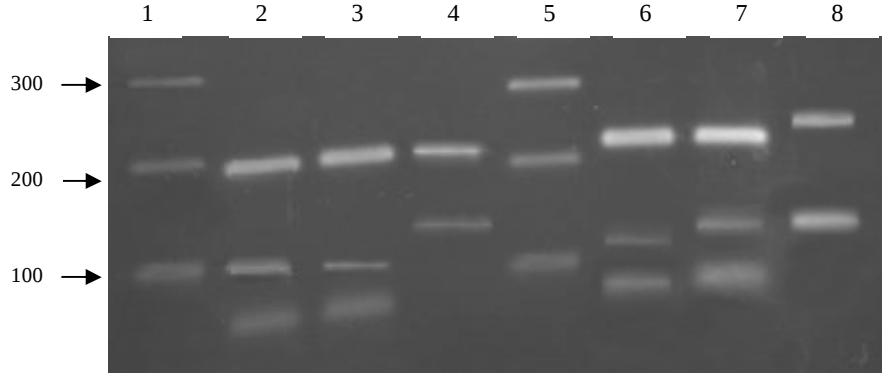
PCR yönteminin özgüllüğü: $103 / (20+103) = \%84$

Visseral Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında kullanılan PCR yöntemi ile mikroskopik inceleme yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında, PCR yönteminin mikroskopik inceleme yöntemine göre %100 duyarlılık ve %84 özgüllük gösterdiği saptandı. (**Çizelge 7**)

4.3.RFLP Yönteminin Sonucu

Çalışmada PCR yöntemi ile pozitif bulunan 148 Kutanöz Leyişmanyoz'lu ve 32 Visseral Leyişmanyoz'lu olgunun etken türlerini tespit etmek için RFLP yöntemi çalışıldı.

Kutanöz Leyişmanyoz tanısı konulan 148 PCR ürünün 72 tanesinin *L. tropica* (% 49), 53 tanesinin *L. infantum* (%36), 23 tanesinin *L. major* (%15) olduğu tespit edildi. PCR yöntemi ile Visseral Leyişmanyoz tanısı konulan 32 PCR ürünün 18 tanesinin *L. infantum* (%56), 10 tanesinin *L. donovani* (%31) ve 4 tanesinin *L. tropica* (%13) olduğu belirlendi. (**Şekil 11**)



Şekil 11. PCR yöntemi ile pozitif bulunan örneklerin RFLP sonucundan elde edilen agaroz jel görüntüsü. (1.100 bp'lik marker (Bio Basic), 2.*L. infantum*, 3. *L. tropica*, 4. *L. major*, 5. 100 bp'lik marker (Bio Basic), 6. *L. infantum*, 7. *L. donovani*, 8.*L. tropica*)

4.4.DNA Dizi Analizi Yönteminin Sonucu

Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. tropica*, *L. infantum* ve *L. major* türlerinin DNA dizi analizi sonucu **çizelge 8'**de gösterilmektedir. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum* ve *L. major* türlerinin haplotip yapıya, *L. tropica* türlerinin ise (*L. tropica* KL-1, *L. tropica* KL-2) heterotip yapıya sahip olduğu tespit edildi.

Çizelge 8. Kutanöz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. tropica*, *L. infantum* ve *L. major* türlerinin nükleotit dizileri

<i>L. tropica</i> (KL-1 izolasyonu)
1 ccccaaaaaa aacatataca aaactcgggg ggcctattat atacattaca ggcctttccc 61 acacacagca aacttttata ctcgaagttt gcagtaaaca aaaggccgat cgacgttata 121 acgcaccgcc tatacacaaa acaaaaatgt ccgttttatac aaatatacgg cgtttcgggtt 181 ttgttgccgg ggggtgcgtg tgtggataac ggctcacata acgtgtcgcg gacgtcgttt 241 tacaaatata cggcgtttcg gttttgttg cgggggggtgc gtgtgtggat aacggctcac
<i>L. tropica</i> (KL-2 izolasyonu)
1 tacaccccc aaaaaaaca tatacaaaac tcggggaggc ctattatata cattataggc 61 ctttcccaca tacacagcaa acttttatac tcgaagtttg cagtaaaca aaggccgatc 121 gacgttataa cgcaccgcct atacacaaaa gcaaaaatgt ccgttttatac aaatatacgg 181 cgtttcgggtt ttgttgccgg ggggtgcgtg tgtggataac ggctcacata acgtgtacgg 241 atggaagact tggcttccta tttctttgaa aaacgcaata aagtgcgtga ggtgggaata
<i>L. infantum</i>
1 cagcaaagtt ttgtactcaa aatttgcagt aaaaaaagg ccgatcgacg ttataacgca 61 ccgcctatac aaaagcaaaa atgtccgttt atacaaaaaa tatacggcgt ttcggttttt 121 ggcgggggtg gtgcgtgtgt ggataacggc tcacataacg tgtcgcgatg gatgacttgg 181 cttcctattt cgttgaagaa cgcagtaaag tgcataagt gtatcaaatg agtcccttcc 241 ataacgtgtc gcgatggatg acttggcttc ctatttcgtt gaagaacgca gtaaagtgcg 301 ataagtggta
<i>L. major</i>
1 ctggatcatt ttccgatgat tacaccccaa aaaacatata caactcgggg aggcttattc 61 tatatatata tagtataggc ttttcccaca tacacagcaa acttttatac tcgaaatttg 121 cagtaaaaaa ggccgatcga cgttgtagaa cgcaccgcct atacacaaaa gcaaaaatgt 181 ccgtttatac aaaaaaatag acggcgtttc ggtttttggc gggagggaga gagagggggg 241 tgcgtgcgcg tggataacgg ctcacataac gtgtcgcgat ggatgacttg gcttcctatt 301 tcgttgaaga acgcagtaaa gtgcgataag tggatatca

Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *Leishmania* türlerinin nükleotit dizileri **çizelge 9**’da gösterilmektedir. Çukurova Bölgesinde Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum*, *L. donovani* ve *L. tropica* türlerinin haplotip yapıda olduğu tespit edildi.

Çizelge 9. Visseral Leyişmanyozlu olgulardan izole edilen *L. infantum*, *L. donovani* ve *L. tropica* türlerinin nükleotit dizileri

<i>L. infantum</i> (VL izolasyonu)
1 ctggatcatt ttccgatgat tacacccaaa aaacatatac aactcgggga gacctatgta 61 tatatatgta ggcctttccc acatacacag caaagttttg tactcaaaat ttgcagtaaa 121 aaaaaggccg atcgacgtta taacgcaccg cctatacaaa agcaaaaatg tccgtttata 181 caaaaaatat acggcgtttc ggtttttggc ggggtgggtg cgtgtgtgga taacggctca 241 cataacgtgt cgcatggat gacttggtt cctatttcgt tgaagaacgc agtaaagtgc 301 gataactgct
<i>L. donovani</i> (VL izolasyonu)
1 ctggatcatt ttccgatgat tacaccaaaa aaaacatata caactcgggg agacctatgt 61 atatatatat gtaggccttt cccacataca cagcaaagtt ttgtactcaa aatttgcagt 121 aaaaaaggc cgatcgacgt tataacgcac cgcctataca aaagcaaaaa tgtccgttta 181 tacaaaaaat atacggcggt tcggtttttg gcgggggtggg tgcgtgtgtg gataacggct 241 cacataacgt gtcgcatgg atgacttggc ttcctatttc gttgaagaac gcagtaaagt 301 gcgataagt
<i>L. tropica</i> (VL izolasyonu)
1 aaatcgggga ggcctatata tattatacat tatataggcc tttcccacac atacacagca 61 aacttttgta ctcgaagttt gcagtaaaca aaaggccgat cgacgttata acgcaccgcc 121 tatacacaaa agcaaaaatg tccgtttata caaatatacg gcgtttcggg tttgttgggc 181 ggggtgctgt gtgtgtggat aacggctcac ataacgtgtc gcgatggatg acttggttc 241 ctatttcgtt gaaagaacgc agtaaagtgc gaaaagtggg atcaaaatgc cgctggcctt

Kutanöz Leyişmanyoz'lu ve Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *Leishmania* türlerinin nükleotit dizileri BİOEDİT programında analiz edildi ve nükleotit dizileri BLAST programı kullanılarak Gen Bankasına (blast.ncbi.nlm.nih.gov) kayıtlı olan diğer *Leishmania* türleri ile karşılaştırıldı.

Çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. tropica* (KL-1 ve KL-2)'nın diğer *L. tropica* türleri ile %74-99 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği saptandı. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum*'un diğer *L. infantum* türleri ile %96-97 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. major*'un diğer *L. major* türleri ile karşılaştırıldığında %75-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği saptandı. Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum* türlerinin BLAST sonucunda benzerlik gösterdikleri *L. infantum*'ların Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edildiği tespit edildi.

Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *Leishmania* türlerinin nükleotit dizileri GenBankasında kayıtlı olan *Leishmania* türlerinin nükleotit dizileri ile karşılaştırıldı. Çalışmada Visseral Leyişmanyoz'lu olgulardan izole edilen *L. infantum*'un diğer *L. infantum* türleri ile %98 oranında benzerlik gösterdiği, *L. donovani*'nin diğer *L. donovani* türleri ile %100 oranında, *L. tropica*'nın ise %74-95 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği saptandı. **(Çizelge 12,13)**

Ayrıca çalışmada elde edilen *L. infantum* türlerinin nükleotit dizilerinin *L. donovani* türleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Çizelge 10. Kutanoz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. tropica* türlerinin Gen Bankasına kayıtlı diğer *L. tropica* türleri ile karşılaştırılması (GB No: Gen Bank Kayıt No, B: Benzerlik Oranı)

<i>L. tropica</i> (KL-1 izolasyonu)				<i>L. tropica</i> (KL-2 izolasyonu)			
GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%
EU482829.1	99	FN677345.1	98	FJ948464.1	95	FJ948456.1	93
FJ948464.1	98	EN677343.1	98	FJ948463.1	95	FJ948450.1	93
FJ948463.1	98	FN677341.1	98	FJ948462.1	95	FJ948449.1	93
FJ948462.1	98	FJ948456.1	98	FJ948461.1	95	FJ948448.1	93
FJ948460.1	98	FJ948450.1	98	FJ948459.1	95	FJ948447.1	93
JN541338.1	98	FJ948449.1	98	JN541338.1	94	GU561643.1	90
HM101131.1	98	FJ948448.1	98	GQ913688.1	95	FJ940895.1	78
GQ913688.1	98	FJ948447.1	98	FJ948458.1	93	AJ000302.1	91
FJ948461.1	98	GU561644.1	98	FJ460459.1	94	FJ948452.1	93
FJ948459.1	98	EU727197.1	91	FJ948465.1	93	AJ000301.1	91
FJ948458.1	98	AJ000302.1	96	FJ948457.1	93	HM101131.1	80
FJ948465.1	98	FJ948452.1	98	EU727198.1	89	GU561644.1	90
FJ948457.1	98	AJ000301.1	96	EU326226.1	95	EU871037.1	89
FJ940895.1	96	EU871037.1	94	FJ460458.1	95	AJ300485.1	91
FJ940894.1	99	EU727198.1	90	FJ460457.1	95	EU604811.1	89
EU326226.1	98	JN860723.1	90	EU727197.1	90	FJ940894.1	76
EF095751.1	95	AJ300485.1	96	JN860722.1	93	EF095751.1	74
FJ460459.1	98	EU604811.1	94	HM060590.1	93	JN860725.1	83
FJ460458.1	98	EU683618.1	96	HM060589.1	93	EU683618.1	90
FJ460457.1	98	GU591395.1	96	HM060588.1	93	EU683617.1	76
FN677356.1	97	GU591394.1	95	EF653267.1	93	EU482829.1	76
JN860722.1	98	GU591393.1	95	FN677356.1	93	JN104588.1	87
HM060590.1	98	GU591392.1	95	JN860723.1	86	JN005821.1	84
HM060589.1	98	GU591391.1	95	FJ948451.1	95		
HM060588.1	98	GU591390.1	95	HM004586.1	93		
FJ948451.1	98	JN005821.1	97	FJ948455.1	93		
EF653267.1	98	GU591396.1	95	FJ948454.1	93		
HM004586.1	98	EU683617.1	93	FJ948453.1	93		
GU561643.1	98	JN005822.1	96	FN677345.1	93		
FJ948455.1	98	JN860725.1	88	FN677343.1	93		
FJ948453.1	98	JN104588.1	91	FN677341.1	93		

Çizelge 11. Kutanöz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum* ve *L. major* türlerinin Gen Bankasına kayıtlı diğer *L. infantum* ve *L. major* türleri ile karşılaştırılması (GB No: Gen Bank Kayıt No, B: Benzerlik Oranı)

<i>L. infantum</i> (KL izolasyonu)				<i>L. major</i> (KL izolasyonu)			
GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%
FJ940892.1	96	AJ000293.1	96	FR796423.1	100	EF413078.1	85
FM209177.1	96	AJ000291.1	96	FJ460456.1	100	JN541335.1	83
FM209179.1	97	AJ000289.1	96	FJ753394.1	100	JN860735.1	83
HQ830354.1	96	AJ000288.1	96	FJ753393.1	100	JN005827.1	84
HQ830353.1	96	FN182207.1	95	FJ753392.1	100	HM117696.1	82
FN398343.2	96	FN687759.1	95	FJ753391.1	100	JN541337.1	82
HQ535858.1	96	FM209178.1	95	FJ326229.1	100	JN541332.1	82
FN677362.1	96	GQ444144.1	95	AY550178.1	100	JN541327.1	82
FN677361.1	96	FM164417.1	95	AF339752.1	100	JN005825.1	83
FN677360.1	96	FM164416.1	95	FN677357.1	100	JN860731.1	81
FN677359.1	96	EU326227.1	95	AY573187.1	100	JN860721.1	84
FN677358.1	96	AJ249616.1	95	AY573188.1	100	JN860732.1	78
GU045592.1	96	AJ249615.1	95	JF831924.1	100	JN860750.1	85
GU045591.1	96	AJ249613.1	95	FN677342.1	100	JN860742.1	84
FM164420.1	96	AJ249612.1	95	AJ000310.1	100	JN541333.1	77
AM901453.1	96	FM164419.1	95	FJ753395.1	100	JN860740.1	77
AM901451.1	96	FM164418.1	95	AJ300482.1	96	JN860746.1	79
EU604810.1	96	HQ830358.1	96	DQ295825.1	96	JN860741.1	79
AJ634369.1	96	FN398344.2	96	DQ295824.1	96	JN005823.1	86
AJ634368.1	96	FR799614.1	96	DQ300195.1	96	AJ000309.1	100
AJ634367.1	96	FN677364.1	96	AY283793.1	97	AJ000307.1	100
AJ634366.1	96	FN677363.1	96	AY260965.1	97	JN860739.1	77
AJ634365.1	96	GU045590.1	96	AJ300481.1	96	JN860739.1	75
AJ634364.1	96	GU045589.1	96	EF413075.1	96	JN860730.1	83
AJ634363.1	96	FJ753386.1	96	EF653269.1	96	FJ555209.1	100
AJ634362.1	96	AM901450.1	96	AJ272383.1	96	JN860734.1	73
AJ634361.1	96	AM901449.1	96	GQ402544.1	95	EF413079.1	96
AJ634355.1	96	AM901448.1	96	GQ402543.1	95	AJ272382.1	96
AJ634354.1	96	AM901447.1	96	GQ466350.1	87	AJ272381.1	96
AJ634353.1	96	AJ634378.1	96	GQ466353.1	87	AJ272380.1	96
AJ634352.1	96	AJ634377.1	96	JN860745.1	87	AJ272379.1	96
AJ634351.1	96	AJ634376.1	96	EF413077.1	89	AJ272378.1	96
AJ634350.1	96	AJ634375.1	96	JN860754.1	87	HM130607.1	95
AJ634349.1	96	AJ634374.1	96	GQ466351.1	86	HQ830351.1	95
AJ634348.1	96	AJ634373.1	96	GQ466352.1	86	JN860714.1	79
AJ634347.1	96	AJ634372.1	96	JN860720.1	88	HQ830350.1	96
AJ634346.1	96	AJ634371.1	96	JN005828.1	86	EF413076.1	96
AJ634345.1	96	AJ634370.1	96	JN005830.1	86	JN860736.1	69
AJ634344.1	96	AJ634360.1	96	JN005824.1	86	EU395712.1	91
AJ634343.1	96	AJ634359.1	96	JN005829.1	85	JN860737.1	75
AJ634342.1	96	AJ634358.1	96	JN860718.1	88		
AJ634341.1	96	AJ634357.1	96	JN860757.1	85		
AJ634340.1	96	AJ634356.1	96	JN860713.1	85		
AJ634339.1	96	AJ000297.1	96	JN005826.1	85		
AJ276260.1	96	AJ000296.1	96	JN541336.1	84		
AJ276259.1	96	AJ000294.1	96	JN541334.1	84		
AJ276258.1	96	AJ000292.1	96	JN541331.1	84		
AJ000306.1	96			JN541330.1	84		
AJ000305.1	96			JN541329.1	84		
AJ000304.1	96			JN541328.1	84		
AJ000303.1	96			JN541326.1	84		
AJ000295.1	96			EU482830.1	86		

Çizelge 12: Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum* ve *L. donovani* türlerinin GenBankasına kayıtlı diğer *L. infantum* ve *L. donovani* türleri ile karşılaştırılması (GB No: Gen Bank Kayıt No, B: Benzerlik Oranı)

<i>L. infantum</i> (VL izolasyonu)				<i>L. donovani</i> (VL izolasyonu)			
GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%	GB No	B%
FN398343.2	98	AJ249615.1	98	FN398344.2	100	AJ634365.1	100
HQ535858.1	98	FN398344.2	98	FR799614.1	100	AJ634364.1	100
FM209179.1	98	FR799614.1	98	FN677364.1	100	AJ634363.1	100
FM209178.1	98	FN677364.1	98	FN677364.1	100	AJ634362.1	100
FM209177.1	98	FN677363.1	98	FN677363.1	100	AJ634361.1	100
GU045592.1	98	GU045590.1	98	GU045590.1	100	AJ276258.1	100
GU045591.1	98	GU045589.1	98	GU045589.1	100	AJ249612.1	100
GQ444144.1	98	GQ367489.1	98	GQ367489.1	100	AJ000293.1	100
FM164420.1	98	FJ753386.1	98	FJ753386.1	100	AJ000291.1	100
FM164419.1	98	AM901448.1	98	AM901448.1	100	AM901452.1	100
FM164418.1	98	AM901447.1	98	AM901447.1	100	AJ276260.1	100
FM164417.1	98	EU753232.1	98	EU753232.1	100	FN182208.1	100
FM164416.1	98	EU753231.1	98	EU753231.1	100	FN182210.1	100
AM901451.1	98	EU753230.1	98	EU753230.1	100	AJ249613.1	100
EU326227.1	98	EU753229.1	98	EU753229.1	100	AM901450.1	100
AJ634355.1	98	EU753228.1	98	EU753228.1	100	AJ634360.1	100
AJ634354.1	98	EU753227.1	98	EU753227.1	100	AJ634359.1	100
AJ634353.1	98	EU753226.1	98	EU753226.1	100	AJ634358.1	100
AJ634352.1	98	EU753225.1	98	EU753225.1	100	AJ634357.1	100
AJ634350.1	98	EU326228.1	98	EU326228.1	100	AJ634356.1	100
AJ634349.1	98	AJ634378.1	98	AJ634378.1	100	HQ830354.1	96
AJ634348.1	98	AJ634377.1	98	AJ634377.1	100	AJ249614.1	100
AJ634347.1	98	AJ634376.1	98	AJ634376.1	100	FN398343.2	100
AJ634346.1	98	AJ634375.1	98	AJ634375.1	100	HQ535858.1	100
AJ634345.1	98	AJ634374.1	98	AJ634374.1	100	FM209179.1	100
AJ634344.1	98	AJ000297.1	98	AJ000297.1	100	FM209178.1	100
AJ634343.1	98	AJ000296.1	98	AJ000296.1	100	FM209177.1	100
AJ634342.1	98	AJ000292.1	98	AJ000292.1	100	GU045592.1	100
AJ634341.1	98	AJ000290.1	98	AJ000290.1	100	GU045591.1	100
AJ634340.1	98	FN182207.1	98	AJ634373.1	100	GQ444144.1	100
AJ634339.1	98	FN687759.1	98	AJ634372.1	100	FM164420.1	100
AJ000306.1	98	FN677362.1	98	AJ634371.1	100	FM164419.1	100
AJ000305.1	98	FN677361.1	98	AJ634370.1	100	FM164418.1	100
AJ000304.1	98	FN677360.1	98	AJ276259.1	100	FM164417.1	100
AJ000303.1	98	FN677359.1	98	AJ249615.1	100	FM164416.1	100
AJ000295.1	98	FN677358.1	98	AJ249620.1	100	AM901451.1	100
AJ000289.1	98	AM901453.1	98	FN182206.1	100	EU326227.1	100
AJ000288.1	98	AJ634368.1	98	AJ249616.1	100	AJ634355.1	100
AJ249613.1	98	AJ634369.1	98	FN182209.1	100	AJ634354.1	100
AM901450.1	98	AJ634367.1	98	FN182207.1	100	AJ634353.1	100
AJ634360.1	98	AJ634365.1	98	FN687759.1	100	AJ634352.1	100
AJ634359.1	98	AJ634364.1	98	FN677362.1	100	AJ634351.1	100
AJ634358.1	98	AJ634363.1	98	FN677361.1	100	AJ634350.1	100
AJ634357.1	98	AJ634362.1	98	FN677360.1	100	AJ634349.1	100
AJ634356.1	98	AJ634361.1	98	FN677359.1	100	AJ634348.1	100
AJ276260.1	98	AJ276258.1	98	FN677358.1	100	AJ634347.1	100
GQ367488.1	98	AJ276259.1	98	AM901453.1	100	AJ634436.1	100
GQ367487.1	98			AM901449.1	100	AJ634345.1	100
GQ367486.1	98			AM634369.1	100	AJ634344.1	100
AJ000294.1	98			AJ634368.1	100	AJ634366.1	100
AJ249616.1	98			AJ634367.1	100		

Çizelge 13. Visseral Leiyşmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. tropica* türlerinin GenBankasına kayıtlı diğer *L.tropica* türleri ile karşılaştırılması (GB No: Gen Bank Kayıt No, B: Benzerlik Oranı)

<i>L. tropica</i> (VL izolasyonu)			
GB No	B%	GB No	B%
JN104588.1	95	FJ948457.1	95
AJ300485.1	95	FJ460458.1	94
FJ948456.1	95	FJ460457.1	93
FJ948455.1	95	EU727197.1	95
FJ948454.1	95	JN860723.1	89
FJ948453.1	95	EU727198.1	90
FJ948450.1	95	EU683618.1	87
FJ948449.1	95	JN860725.1	89
FJ948448.1	95	EU683617.1	87
FJ948447.1	95	EF653267.1	96
EU604811.1	95	JN860722.1	92
AJ000301.1	95	GU591395.1	75
HM004586.1	94	GU591394.1	75
FN677345.1	95	GU591393.1	75
FN677343.1	95	GU591392.1	75
FN677341.1	95	GU591391.1	75
FJ948452.1	95	FJ595949.1	74
FJ948451.1	95	FN677346.1	95
EU871037.1	95	GQ920676.1	95
AJ000302.1	95	GQ920673.1	95
GU561643.1	88	HM060590.1	89
EU326226.1	94	HM060589.1	89
GU561644.1	88	HM060588.1	89
FN677356.1	95	GU591396.1	75
JN541338.1	95	GU591390.1	75
FJ948464.1	95	FJ595950.1	74
FJ948463.1	95		
FJ948462.1	95		
FJ948461.1	95		
FJ948460.1	95		
FJ948458.1	95		
GQ913688.1	94		
FJ948465.1	95		
FJ948459.1	95		

5. TARTIŞMA

Dünya sağlık örgütüne göre Leyişmanyoz 88 ülkede endemiktir. Dünyada yılda 500 bin Visseral Leyişmanyoz, 1.5-2 milyon Kutanöz Leyişmanyoz olgusu vardır ve her iki parazitoz yönünden yaklaşık 200 milyon kişi risk altındadır^{61,63}. Leyişmanyoz 1950’li yıllardan beri ülkemizde ve son yirmi yıl içerisinde özellikle Çukurova Bölgesinde yaygın olarak görülen önemli bir hastalıktır. Ülkemizde Leyişmanyoz ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda, hastalığın etkeni olan *Leishmania* türleri hem insandan hem köpeklerden izole edilmiş ve hastalığın doğadaki rezervuarlığını köpeklerin yaptığı epidemiyolojik çalışmalar ile kanıtlanmıştır⁶⁴.

Bu çalışmada Mart 2010 - Mart 2012 tarihleri arasında Çukurova Bölgesinde yaşayan Kutanöz Leyişmanyoz şüpheli olgulardan smear, Visseral Leyişmanyoz şüpheli olgulardan kemik iliği örnekleri alınmıştır. Klinik örnekler mikroskopik inceleme ve PCR yöntemleri ile incelendiğinde Kutanöz Leyişmanyoz (%71,5) ve Visseral Leyişmanyoz (%24)’un literatürde yer aldığı gibi Çukurova Bölgesinde yaygın olduğu görülmüştür.

Klinik olarak Kutanöz Leyişmanyoz akne, kan çıbanı, ekzama, lupus eritomatozus, lupus vulgaris, tuberculosis verrucosus, çeşitli frengi belirtileri, leptomlu lepra, yumuşak yara, psoriasis ve deri urları gibi birçok deri hastalığıyla, Visseral Leyişmanyoz ise sıtma, tifo, tüberküloz gibi hastalıklar ile karışabilmektedir. Bu yüzden Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyoz olgularının tanısında klinik bulgular yeterli olmayıp, laboratuvar tanısına ihtiyaç duyulmaktadır^{65,66}. Her iki parazitozun laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme, kültür, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Visseral Leyişmanyoz olgularının laboratuvar tanısında rekombinant antijen (rK39) hızlı tanı testi duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak Özerdem ve ark⁴⁸.’larının Çukurova Bölgesinde bulunan Visseral Leyişmanyoz olgularının laboratuvar tanısında kullanılan PCR yöntemi ile rK39 hızlı tanı testini karşılaştırmışlardır⁴⁸. Çalışmanın sonucunda PCR yönteminin duyarlılığının rK39 hızlı tanı testine göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. rK39 hızlı tanı testi insan serumunda *L. donovani*’ye karşı oluşan antikorların kalitatif tanımlanması için geliştirilmiş bir immunokromatografik testtir. Bu çalışmada da Visseral Leyişmanyoz olgularına etken olan *Leishmania* türleri araştırılmış

ve bu bölgede *L. donovani* ile birlikte *L. infantum* ve *L. tropica* türleri tespit edilmiştir. rK39 hızlı tanı testi sadece *L. donovani* kompleksini tanımlayan bir test olduğu için Çukurova Bölgesindeki Visseral Leyişmanyoz olgularında bu testin duyarlılığının düşük olması normaldir.

Günümüze kadar birçok araştırmacı Leyişmanyoz'un tanısında kullanılan laboratuvar tanı yöntemlerini karşılaştırmış ve çalışmaların sonucunda moleküler yöntemlerin duyarlılığının yüksek olduğu rapor edilmiştir⁶⁷. Bu çalışmada da Leyişmanyoz'un laboratuvar tanısında mikroskopik inceleme yöntemi ile PCR yönteminin duyarlılıkları karşılaştırıldığında PCR yönteminin mikroskopik inceleme yöntemine göre daha duyarlı (%100) olduğu görüldü.

Leyişmanyoz etkeni *Leishmania* türleri klinik, biyolojik ve epidemiyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Tür tayininde izoenzim yöntemi, PCR-RFLP gibi DNA'ya dayalı moleküler yöntemler kullanılmaktadır⁶⁸. Son yıllarda Leyişmanyoz'un endemik olduğu Afrika, İran, Brezilya, İsrail, Türkiye gibi ülkelerde moleküler yöntemler ile Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türlerini genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır⁶⁹. Palestin, Jericho bölgesinde Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olarak *L. tropica*'nın baskın olduğu, İran'da Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olarak *L. major* ve *L. tropica*'nın baskın olduğu, Sudan'da Visseral Leyişmanyoz etkeni olarak *L. donovani*'nin baskın olduğu, Özbekistan'da ise Visseral Leyişmanyoz etkeni olarak *L. infantum*'un baskın olduğu rapor edilmektedir^{70,71}.

Türkiye'de Çukurova, Güneydoğu Anadolu ve Ege Bölgelerinde de *Leishmania* genotiplendirme çalışmaları yapılmıştır ve bu çalışmalarda Türkiye'de Kutanöz Leyişmanyoz olgularında etken türün *L. tropica* olduğu, ülkede *L. major* türünün bulunmadığı bildirilmiştir^{72,68}. Ancak bu tez çalışmasında Kutanöz Leyişmanyoz'lu olgulardan *L. major* (%15) izole edilmiştir. Ayrıca tez çalışmasının sonucunda Çukurova Bölgesinde Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olarak *L. tropica*'nın (%49) baskın olduğu, Visseral Leyişmanyoz etkeni olarak *L. infantum*'un (%56) baskın olduğu ortaya çıkmıştır.

Leishmania genotiplendirme çalışmalarında Visseral Leyişmanyoz hikâyesi bulunmayan Kutanöz Leyişmanyoz olgularında *L. infantum*, Kutanöz Leyişmanyoz hikâyesi olmayan Visseral Leyişmanyoz olgularında ise *L. tropica* izole edildiği rapor edilmektedir^{65,68,69}. Bu tez çalışmasında da Kutanöz Leyişmanyoz hikâyesi olmayan

Visseral Leyişmanyoz olgularında *L. tropica* (%13), Visseral Leyişmanyoz hikâyesi olmayan Kutanöz Leyişmanyoz olgularında ise *L. infantum* türleri tespit edildi. Bu durum *L. tropica* ve *L. infantum* türlerinin her iki Leyişmanyoz formuna neden olabileceği ihtimalini ve bunun sonucunda da Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyoz olgularının tedavi protokollerinin değişmesi gerektiğini ortaya çıkartmıştır.

Leyişmanyoz etkeni olan *Leishmania* türlerinin nükleotit dizilerini ortaya çıkartmak, türler arasında polimorfizimi tespit etmek amacıyla birçok moleküler çalışma yapılmıştır. Schönion ve ark⁷³. *Leishmania* genotiplendirme çalışmalarında *L. tropica* türünde 14 farklı nükleotit dizilimi olduğunu bildirmişlerdir. Sudan’da izole edilen *L. tropica* türünün nükleotit dizilimi incelendiğinde bölgede izole edilen *L. tropica*’ların haplotip özellik gösterdiği tespit edilmiştir⁷⁴. Bu çalışmada da Kutanöz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. major* ve *L. infantum* türlerinin haplotip yapıya, *L. tropica* türlerinin ise heterotip yapıya sahip oldukları tespit edildi.

El-Tai ve ark⁷⁵. çalışmalarında ise *L. donovani* türünün 11 farklı polimorfizim gösterdiği ve bu nedenden dolayı *Leishmania* sınıflandırmasında *L. donovani*’nin *L. donovani* kompleksi olarak tanımlanmasının daha doğru olacağını bildirmişlerdir. Bu çalışmada Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum* (%56), *L. donovani* (%31) ve *L. tropica* (%13) türlerinin hepsinin aynı nükleotit dizilimi gösterdiği, hepsinin haplotip yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz ve Visseral Leyişmanyoz olgularından izole edilen *L. infantum* türlerinin nükleotit dizileri ile *L. donovani* türlerinin nükleotit dizileri arasında yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu durum *L. infantum* ve *L. donovani*’nin tür ayrımının zor olduğunu ve El-Tai ve ark⁷⁵’nin *L. donovani* türleri için *L. donovani* kompleksi ifadesinin kullanılabilirliğini doğrulamaktadır.

Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. tropica* türünün nükleotit dizileri GenBankasına kayıtlı Kutanöz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. tropica* türleri ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Bu durum Çukurova Bölgesinde *L. tropica*’nın Visseral Leyişmanyoz’a neden olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada Kutanöz Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum*’un türleri Visseral Leyişmanyoz’lu olgulardan izole edilen *L. infantum*’un nükleotit dizileri

ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu durum Çukurova Bölgesinde *L. infantum*'un Kutanöz Leyişmanyoz'a neden olabileceği sonucunu ortaya çıkartmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Leyişmanyoz tanısında mikroskopik inceleme yöntemi ucuz ve hızlı bir yöntem olmasına rağmen, PCR yönteminin tanıda duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması, deneyimli mikropistlere ihtiyaç duyulmaması gibi sebeplerden dolayı Leyişmanyoz tanısında mikroskopik inceleme yöntemi ile birlikte PCR yönteminin kullanılmasının yararlı olacağı sonucu çalışmamızda elde edilmiştir.

Klasik bilgilerde yer alan Kutanöz Leyişmanyoz etkeni *L. tropica* ve *L. major* bilgilerine ek olarak *L. infantum*'un da Kutanöz Leyişmanyoz etkeni olabileceği bu yüzden Kutanöz Leyişmanyoz'lu olguların Visseral Leyişmanyoz açısından da değerlendirilmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Ayrıca çalışmamızın sonucunda Kutanöz Leyişmanyoz hikâyesi olmayan Visseral Leyişmanyoz olgularında *L. tropica* türleri izole edilmiştir. Ancak çalışmamızda izole edilen *L. tropica* olgu sayısının düşük olduğu ve bu konu ile ilgili çalışmaların daha fazla örnekle tekrarlanması gerektiği düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Özcel MA.** Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları, Meta Basım, İzmir, **2007**; 197-275.
2. **Saygı G.** Paraziter Hastalıklar ve Parazitler, Dizgi Baskı Es-Form Ltd., İzmir, **2009**; 88-105.
3. **Saygı G.** Temel Tıbbi Parazitoloji, Esnaf Ofset Matbaacılık, **1998**; 47-55.
4. **Amro A, Schönian G, Al-Sharabati MB, Azmi K, Nasereddin A, Abdeen Z, Schnur LF, Baneth G, Jaffe CL, Kuhls K.** Population genetics of *Leishmania infantum* in Israel and the Palestinian Authority through microsatellite analysis. *Microbes Infect*, **2009**; 11(4): 484-492.
5. **Katakura K.** Molecular epidemiology of leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Curr Opin Infect Dis*, **2009**; 22 (2): 126-130.
6. **Yatawara L, Le TH, Wickramasinghe S, Agatsuma T.** Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. *Gene*, **2008**; 424(1-2): 80-86.
7. **Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M.** Differentiation of old and new world *Leishmania* Species at Complex and Species Levels by PCR. *Scand J Infect Dis*, **2002**; 34(10): 756-758.
8. **Davami MH, Motazedian MH, Kalantari M, Asgari O, Badzohre A, Mohammadpour I.** First microscopical and molecular-based characterization of *Leishmania major* within naturally infected *Phlebotomus salehi* (Diptera; Psychodidae) in Fars province, southern Iran. *Ann Trop Med Parasitol*, **2011**; 105(7): 485-491.
9. **Elnaiem DE, Hassan HK, Osman OK, Maingon RD, Killick-Kendrick R, Ward RD.** A possible role for *Phlebotomus* (*Anophlebotomus*) *rodhaini* (Parrot 1930) in transmission of *Leishmania donovani*. *Parasit Vectors*, **2011**; 4(1): 238.
10. **Özcel MA, Tanyüksel M, Eren H.** Moleküler Parazitoloji. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, **2009**; 407-424.
11. **Hajjarian H, Vassgheh F, Mohebbali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S.** Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **2011**; 25:20-24.
12. **Myler PJ.** Genome structure and content in *Leishmania*: After the genome. Myler PJ&Fasel N (Eds) Caister Academic Pres, **2008**.
13. **Smith DF, Peacock CS, Cruz AK.** Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*, **2007**; 37(11): 1173-1186.
14. **Dahlin-Laborde RR, Scolaro EJ, Romine NM, Ramer-Tait AE, Lei SM, Beetham JK.** Characterization of DNA sequences that confer complement resistance in *Leishmania chagasi*. *Ann N Y Acad Sci*, **2008**; 1149: 347-351.
15. **Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC.** Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis*, **2004**; 189(6): 1035-1043.

16. **Odiwuor SO, Saad AA, Doncker S, Maes I, Laurent T, El-Safi S, Mbuchi M, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G.** Universal PCR assays for the differential detection of all old world *Leishmania* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2010**; 30(2): 209-218.
17. **Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F.** A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2008**; 60(2): 151-154.
18. **Passero LF, Carvalho AK, Bordon ML, Bonfim-Melo A, Toyama MH, Corbett CE, Laurenti MD.** *Leishmania* (Viannia) *shawi* purified antigens confer protection against murine cutaneous leishmaniasis. *Inflamm Res*, **2011**.
19. **Bianchini G, Bocedi A, Ascenzi P, Gavuzzo E, Mazza F, Aschi M.** Molecular dynamics simulation of *Leishmania* major surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins*, **2006**; 64(2): 385-390.
20. **Stauch A, Sarkar RR, Picado A, Ostyn B, Sundar S, Rijal S, Boelaert M, Dujardin JC, Duerr HP.** Visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent: modelling epidemiology and control. *Plos Negl Trop Dis*, **2011**; 5(11): 1405.
21. **Villinski JT, Klena JD, Abbassy M, Hoel DF, Puplampu N, Mehta S, Boakye D, Racznik G.** Evidence for a new species of *Leishmania* associated with a focal disease outbreak in Ghana. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2008**; 60(3): 323-327.
22. **David CV, Craft N.** Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, **2009**; 22(6): 491-502.
23. **Laurent T, Van der Auwera G, Hide M, Mertens P, Quispe-Tintaya W, Deborggraeve S, De Doncker S, Leclipteux T, Banuls AL, Büscher P, Dujardin JC.** Identification of old world *Leishmania* spp. by specific polymerase chain reaction amplification of cysteine proteinase B genes and rapid dipstick detection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2009**; 63(2): 173-181.
24. **Altıntaş K.** Tıbbi Klinik Parazitoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, **2004**; 67-69.
25. **Machado PR, Carvalho AM, Machado GU, Dantas ML, Arruda S.** Development of cutaneous leishmaniasis after leishmania skin test. **2011**.
26. **Boggild AK, Miranda-Verastegui C, Espinosa D, Arevalo J, Adaui V, Tulliano G, Llanos-Cuentas A, Low DE.** Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol*, **2007**; 45(11): 3680-3684.
27. **Rodrigues Ide A, da Silva BA, dos Santos AL, Vermelho AB, Alviano CS, Rosa Mdo S.** A new experimental culture medium for cultivation of *Leishmania amazonensis*: its efficacy for the continuous in vitro growth and differentiation of infective promastigote forms. *Parasitol Res*, **2010**; 106(5): 1249-1252.
28. **Zeyrek FY, Korkmaz M, Özbel Y.** Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol*, **2007**; 14(11): 1409-1415.
29. **Toz SO, Chang KP, Özbel Y, Alkan MZ.** Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J Parasitol*, **2004**; 90(6): 1484-1486.

30. **Simon S, Veron V, Carme B.** Leishmania spp. identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2010**; 66(2): 175-180.
31. **Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A.** PCR detection and sequencing of parasite ITS-RDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res*, **2008**; 103(6): 1273-1278.
32. **Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J.** Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol*, **2007**; 147(3-4): 315-319.
33. **Özcel MA, Akisü Ç, Korkmaz M.** Tıbbi Parazitolojide Tedavi, Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir, **2005**; 87-98.
34. **Boecken G, Sunderkötter C, Bogdan C, Weitzel T, Fischer M, Müller A, Löbermann M, Anders G, von Stebut E, Schunk M, Burchard G, Grobusch M, Bialek R, Harms-Zwingerberger G, Fleischer B, Pietras M, Faulde M, Erken K.** Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Germany. *J Dtsch Dermatol Ges*, **2011**; 8(1): 51.
35. **Nateghi Rostami M, Keshavarz H, Edalat R, Sarrafnejad A, Sarrafnejad A, Shahrestani T, Mahboudi F, Khamesipour A.** CD8⁺ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis*, **2010**; 4(10): 845 .
36. **Masmoudi A, Maalej N, Boudaya S, Turki H, Zahaf A.** Adverse effects of intralesional Glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Med Mal Infect*, **2006**; 36(4): 266-268.
37. **Asilian A, Iraj F, Hedaiti HR, Saidat AH, Enshaieh S.** Carbondioxide laser for the treatment of lupoid cutaneous leishmaniasis (LCL): a case series of 24 patients. *Dermatol Online J*, **2006**; 12(2): 3.
38. **White JML, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega Lopez F.** Cutaneous leishmaniasis: three children with Leishmania major successfully treated with intraconazole. *Pediat Dermatol*, **2006**; 23(1): 78-80.
39. **Minodier P, Parola P.** Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis*, **2007**; 5(3): 150-158.
40. **Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalik MS, Tafuri WL.** Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with Leishmania infantum. *Acta Vet Scand*, **2011**; 53(1): 67.
41. **Haralambous C, Antoniou M, Pratloug F, Dedet JP, Soteriadou K.** Development of a molecular assay specific for the Leishmania donovani complex that discriminates L. donovani/Leishmania infantum zymodemes a useful tool for typing MON-1. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2008**; 60(1): 33-42.
42. **Özerdem D, Koltas IS.** Kala-Azarlı Hastalarda Etken Türlerin PCR-RFLP Yöntemi ile Tanımlanması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana:2008.

43. **Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuypere S, Hide M, Banuls AL, De Doncker S, Rijal S, Canavate C, Campino L, Dujardin JC.** Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis*, **2005**; 192(4): 685-692.
44. **Hide M, Banus AL.** Species-specific PCR assay for *L.infantum/L.donovani* discrimination. *Acta Trop*, **2006**;100(3): 241-245.
45. **Korkmaz M, Ok ÜZ.** Parazitolojide Laboratuar. Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 23, Meta Basım, Bornova, İzmir. **2011**; 307-320.
46. **Hide M, Singh R, Kumar B, Banuls AL, Sundar S.** A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop*, **2007**; 102(3): 197-200.
47. **Tasew G, Kebede A, Wolday D, Gadisa E, Britton S, Eidsmo L, Akuffo H.** Low-cost liquid medium for in vitro cultivation of *Leishmania* parasites in low-income countries. *Glob Health Action*, **2009**.
48. **Ozderdem D, Eroglu F, Genc A, Demirkazık M, Koltas IS.** Comparison of microscopic examination, rK39, and PCR for visceral leishmaniasis diagnosis in Turkey. *Parasitol Res*, **2009**; 106(1): 197-200.
49. **Giorgobiani E, Chitadze N, Chanturya G, Grdzeldze M, Jochim RC, Machablishvili A, Tushisvili T, Zedginidze Y, Manjgaladze M, Lashvili N, Makharadze MP, Zakaraya T, Kikaleishvili K, Markhvashvili I, Badashvili G, Daraselia T, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D.** Epidemiologic aspects of an emerging focus of visceral leishmaniasis in Tbilisi, Georgia. *Plos Negl Trop Dis*, **2011**; 5(12): 1415.
50. **Özcel MA, İnci A, Turgay N, Ergun K.** Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji. Meta Basım, **2007**; 155-167.
51. **Saghouni F, Khammari I, Kaabia N, Bouguila J, Ben Abdeljelil J, Fathallah A, Amri F, Ben Said M.** Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia. *Pathol Biol (Paris)*, **2011**.
52. **Roy A, Chowdhury S, Sengupta S, Mandal M, Jaisankar P, D'Annessa I, Desideri A, Majumder HK.** Development of derivatives of 3, 3'-diindolylmethane as potent *Leishmania donovani* Bi-subunit topoisomerase IB poisons. *Plos One*, **2011**; 6(12): 28493.
53. **Zhao S, Zhang D, Li L, MaoQ.** Acute renal injury as a result of liposomal amphotericin B treatment in sodium stibogluconate unresponsive visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, **2011**; 85(6): 1035-1037.
54. **Azmi K, Nasereddin A, Ereqat S, Schnur L, Schonian G, Abdeen Z.** Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a gold standard in diagnosing old world cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2011**; 71(2): 151-155.

55. **Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W.** Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta Tropica*, 2006; 99: 55-61.
56. **da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graca GC, Porrozzi R, Cupolillo E.** Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*, 2010; 10(1): 77-83.
57. **Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A.** PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res*, 2008; 103(6): 1273-1278.
58. **Tupperwar N, Vineeth V, Rath S, Vaidya T.** Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the quantification of *Leishmania* species and the monitoring of systemic distribution of the pathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008; 61(1): 23-30.
59. **de Monbrison F, Mihoubi I, Picot S.** Real-time PCR assay for the identification of cutaneous *Leishmania* parasite species in Constantine region of Algeria. *Acta Trop*, 2007; 102(2): 79-83.
60. **Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe CL.** Molecular diagnosis of old world cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(9): 2848-2855.
61. **Reithinger R, Dujardin JC.** Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol*, 2007; 45(1): 21-25.
62. **Nunnally BK.** Introduction to DNA Sequencing: Sanger and Beyond. **Nunnally BK.** Analytical Techniques in DNA Sequencing. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, 2005: 1-12.
63. **Santiago MC, Susan MS, Shao-feng Y, Mark F, Kenneth S, Peter JM.** Genomic organization and functional characterization of the *Leishmania* major Friedlin ribosomal RNA gene locus. *Molecular&Biochemical Parasitology*, 2001; 116: 147-157.
64. **Zeyrek FY, Korkmaz M, Özbel Y.** Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007; 14(11): 1409-1415.
65. **Elamin EM, Guizani I, Guerbouj S, Gramicca M, El Hassan AM, Di Muccio T, Taha MA, Mukhtar MM.** Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 102: 54-57.
66. **Pandey K, Yanagi T, Dev Pandey B, Mallik AK, Sherchand JB, Kanbara H.** Characterization of *Leishmania* isolates from Nepalese patients with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 2007; 100: 1361-1369.
67. **Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GLL, Machado-Pinto J, Da Costa CA, Mayrink W, Genaro O, Romanha AJ.** Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2006; 54: 37-43.

68. **Alborzi A, Rasouli M, Shamsizadeh A.** Leishmania tropica-isolated patient with visceral leishmaniasis in southern Iran. *Am J Trop Med Hyg*, **2006**; 74(2): 306-307.
69. **Toz SO, Abdelmafeed N, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, Alkan MZ, Jaffe CL.** Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. *Tropical Medicine and International Health*, **2009**; 14(2): 1401-1406.
70. **Kifaya A, Abdelmajeed N, Suheir E, Schönián G, Abdeen Z.** Identification of old world Leishmania species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay. *Tropical Medicine and International Health*, **2010**; 15(8): 872-880.
71. **Kovalenko DA, Razakov SA, Ponirovsky EN, Warburg A, Nasyrova RM, Ponomareva VI, Fatullaeva AA, Abdelmajeed N, Eyal K, Mohammad ZA, Schnur LF, Jaffe CL, Schönián G, Baneth G.** Canine leishmaniosis and its relationship to human visceral leishmaniasis in eastern Uzbekistan. *Parasites&Vectors*, **2011**; 4: 58.
72. **Akkaya F, Dilmeç F, Alpua Z.** Identification of Leishmania parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. *Parasitol Res*, **2008**; 103: 583-586.
73. **Schönián G, Schnur L, El-Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Kohler W, Presber W.** Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2001**; 35: 1-8.
74. **Parvizi P, Moradi G, Akbari G, Farahmand M, Ready PD, Piazak N, Assmar M, Amirkhani A.** PCR detection and sequencing of parasite ITS-RDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res*, **2008**; 103: 1273-1278.
75. **El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönián G.** Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **2000**; 94: 575-579.

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana’da doğdu. İlkokulu Bekir Hanife Akata İlkokulu’nda, ortaokulu Cebesoy İlköğretim Okulu’nda, Liseyi Danişment Gazi Anadolu Lisesi’nde okudu. Üniversite lisans eğitimini 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde tamamladı. 2008 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Parazitoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansını, 2012 yılında Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı Parazitoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimini tamamladı.