

ÜLKEMİZİN KUZAYBATISINDAKİ İL VE İLÇELERDE YAŞAYAN ÇOCUKLARDA ANTI-*LEISHMANIA* SEROPREVALANSININ FARKLI SEROLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF ANTI-*LEISHMANIA* SEROPREVALENCE BY DIFFERENT SEROLOGIC ASSAYS IN CHILDREN INHABITING IN THE NORTHWESTERN PART OF TURKEY

**Nihal DOĞAN¹, Özcan BÖR², Ener Çağrı DİNLEYİCİ²
Seray ÖZENSOY TÖZ³, Yusuf ÖZBEL³**

ÖZET: Akdeniz Bölgesi'nde *Leishmania infantum*'a bağlı olarak gelişen insan visseral leishmaniasis'i (VL), ciddi bir halk sağlığı problemi olarak önemini korumaktadır. Enfeksiyonun çoğu olguda asemptomatik seyretmesi, olguların tanımlanmasını ve yayılımının sınırlandırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu çalışmada, ülkemizin kuzeybatı bölgesindeki bazı il ve ilçelerde yaşayan sağlıklı çocuklarda anti-*Leishmania* seroprevalansının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Eskişehir, Bilecik, Kütahya ve Afyon illeri ile bu illerin bazı ilçelerinde yaşayan 1-17 yaş arasındaki (ortalama: 8.1 yıl) sağlıklı 572 çocuk (260 kız, 312 erkek) dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul eden ailelerin bilgilendirilmesi ve onayı ile tüm çocuklardan alınan serum örneklerinde *Leishmania* antikorları; ticari ELISA (*Leishmania* Ab Panel, Cypress Diagnostics, Belçika), "in-house" ELISA (tüm organizma antijeni-"whole"- ve rK39 antijeni ile) ve "in-house" indirek floresan antikor testi (IFAT) ile araştırılmıştır. Ticari ELISA ile pozitiflik saptanan serumlar rK39 "dipstick" testi ile tekrar değerlendirilmiştir. Çalışma grubundaki çocukların %5.2'sinde (n=30) ticari ELISA testi ile, %3.8'inde (n=22) IFAT ile, %4.7'sinde (n=27) "in-house whole" ELISA ile ve %3.6'sında (n=21) "in-house rK39" ELISA ile seropozitiflik saptanmıştır. Ticari ELISA ile pozitif bulunan 30 örneğin 19'u (%63.3) "dipstick" testi ile pozitif sonuç vermiş, aradaki farklılığın ticari ELISA testinde çok sayıda *Leishmania* türüne ait antijenlerin kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Tüm serolojik yöntemlerle seropozitifliğin saptandığı olgu sayısı 15 (%2.6), en az üç yöntemle seropozitifliğin saptandığı olgu sayısı ise 24 (%4.2) olarak belirlenmiştir. Ticari ELISA testi ile seropozitif 30 olgunun %76.7'sinin Afyon-İscehisar (n=16) ve Bilecik-Söğüt (n=7) ilçelerinde yaşadığı belirlenmiş, %93.3'ünün (28/30) ise kırsal bölgede yaşadığı görülmüştür. Seropozitiflik saptanan çocukların hiçbirisinde bir yıllık izlem süresinde VL'e ait semptom ve klinik bulgular gözlenmemiştir. Bulgularımız çalışmanın yapıldığı bölgede sağlıklı çocuklarda saptanan seropozitifliğin (en az bir test ile %5.2, en az üç test ile %4.2) göz ardı edilemeyecek bir oranda olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bu çalışmanın bulgularıyla birlikte aynı bölgelerde

*Bu çalışma Osmangazi Üniversitesi Araştırma Fonu (No: 2000/4) tarafından desteklenmiştir.

¹ Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir. (ndogan@ogu.edu.tr)

² Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Eskişehir.

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışmada köpeklerde saptanan VL seropozitifliğinin yüksek olması ve vektör *Phlebotomus* türlerinin saptanmış olması nedeniyle parazitin yayılımının önlenmesinde gerekli koruyucu önlemlerin alınması için bölgedeki hekimlerin ve kamuoyunun bilgilendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Visceral leishmaniasis, Leishmania antikorları, serolojik tanı, seropozitiflik, Türkiye.*

ABSTRACT: Human visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* in Mediterranean region is still an important public health problem in those countries including Turkey. The asymptomatic presentation of the infection in most of the cases leads to difficulties in the diagnosis and prevention of the spread of infection. The aim of this study was to investigate the seroprevalence of anti-*Leishmania* antibodies in children inhabiting in the northwestern part of Turkey. A total of 572 healthy children (260 girls, 312 boys) aged between 1-17 years old (mean age: 8.1 years) inhabiting in Eskişehir, Bilecik, Kutahya and Afyon provinces and their counties were included to the study with the informed consent obtained from their families. All serum samples were screened by a commercial ELISA (*Leishmania* Ab Panel, Cypress Diagnostics, Belgium), two in-house ELISA (with whole antigens and rK39 antigen) tests and an in-house indirect fluorescent antibody test (IFAT). The sera yielding a positive result by commercial ELISA, have been re-evaluated with rK39 dipstick test. Of 572 children, 5.2% (n=30) were found positive with commercial ELISA, 3.8% (n=22) with IFAT, 4.7% (n=27) with in-house whole ELISA, and 3.6% (n=21) with in-house rK39 ELISA. Of 30 commercial ELISA positive sera, 19 (63.3%) gave positive result also by dipstick test. This difference was attributed to the use of multiple antigens belonging to different *Leishmania* species in commercial ELISA test. The number of children who were seropositive with all of the tests were 15 (2.6%) and with at least three of the tests were 24 (4.2%). Most (76.7%) of the 30 seropositive children with commercial ELISA were found to be inhabiting in Işcehisar town of Afyon province (n=16) and Sogut town of Bilecik province (n=7) where canine VL was also endemic. Our results also indicated that 93.3% (28/30) of seropositive children were living in the rural parts of the study region. Thirty seropositive children were followed-up for one year, but none of them have exhibited clinical findings of VL. As a result, the rate of anti-*Leishmania* seropositivity (5.2% with at least one test, and 4.2% with at least three tests) in healthy children in the study area should not be ignored, and prevention strategies should be undertaken since our previous study have also showed that the rate of VL in dogs was high and the vector *Phlebotomus* species were determined in these areas of Turkey.

Key words: *Visceral leishmaniasis, Leishmania antibody, serological diagnosis, seropositivity, Turkey.*

GİRİŞ

Leishmaniasis, deride kendiliğinden iyileşen bir yaradan (kutanöz form), tedavi edilmediğinde ölüme yol açan sistemik hastalığa (visceral form) kadar uzanabilen geniş bir spektrumda seyredabilmektedir. Hastalığın endemik olduğu tropikal ve subtropikal bölgelerde yılda 12 milyondan fazla olgu bildirilmektedir¹⁻³. *Leishmania* türleri tarafından oluşturulan visceral leishmaniasis (VL) ve kutanöz leishmaniasis (KL) Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde ve Ortadoğu ülkelerinde ciddi bir sağlık problemi olarak önemini

korumaktadır^{4,5}. *Leishmania infantum*'un neden olduğu VL, zoonotik bir hastalıktır ve ana rezervuarı köpek olup, insanlara geçiş *Phlebotominae* grubundaki kum sinekleri tarafından olmaktadır. Leishmaniasis, kırsal alanlarda kentsel alanlara göre daha fazla görülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Türkiye'de VL saptanan hastalardan ve köpeklerden izole edilen *Leishmania* suşlarının, *L. infantum* zimodem MON1 olduğu belirtilmiştir^{4,6,7}. VL genellikle küçük çocuklarda görülen bir hastalık olup, immün sistemi sağlam erişkinlerde daha nadir olarak rastlanmakta, ancak HIV ile enfekte olan hastalarda HIV/*Leishmania* ko-enfeksiyonları ortaya çıkabilmektedir^{2,8}. *L. infantum*'a bağlı asemptomatik VL enfeksiyonları da bildirilmekte ve enfeksiyon etkeni ile karşılaşan veya enfekte olup asemptomatik seyreden birey sayısının semptomatik VL olgularından çok daha fazla olduğu düşünülmektedir⁹⁻¹¹.

Leishmaniasis'in endemik olduğu bölgelerde temel kontrol mekanizması, hastalığın o bölgedeki epidemiyolojisinin belirlenmesi ile oluşturulmaktadır. Bu amaçla daha önce kliniğimize VL şüphesi ile başvuran yedi, KL şüphesi ile başvuran bir hastanın tanılarının kesinleşmesi nedeniyle bölgemizde hastalığın epidemiyolojisinin araştırılması planlanmış ve gerçekleştirilen ilk çalışmada, bölgemizdeki köpeklerde VL sıklığı, hastalığın vektörü olan *Phlebotomus* türlerinin dağılımı ve koruyucu önlemler belirlenmiştir¹². Sunulan bu çalışmanın amacı ise bölgemizdeki çocukluk yaş grubunda VL seropozitifliğinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma alanı ve örnekleme: Çalışmaya Eskişehir (Merkez), Bilecik (Merkez ve Küre, Söğüt, Kayabalı ilçeleri), Kütahya (Merkez ve Seydişehir ilçesi) ve Afyon (Merkez, İscehisar ve Sülümenli ilçeleri) bölgelerinde yaşayan 1-17 yaş arasındaki (ortalama: 8.1 yıl) sağlıklı 572 çocuk (260 kız, 312 erkek) dahil edildi. Daha önceden sporadik olguların saptandığı yörelerin bağlı olduğu Sağlık Müdürlükleri aracılığıyla, sağlık ocaklarından ve muhtarlıklardan yardım talep edilerek 1-17 yaş arası çocuk ve ailelere ulaşıldı. İlgili idari birimler ve aileler bilgilendirilerek çalışmaya katılmayı kabul eden tüm ailelerden yazılı onam formu alındı. Çocukların fizik muayenesi pediatristler tarafından yapıldı ve demografik bilgileri not edildi. Toplanan kan örnekleri, serumları ayrıldıktan sonra çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

Serumlarda *Leishmania* antikorlarının araştırılmasında indirek floresan antikor testi (IFAT), üç farklı ELISA kiti ve "dipstick" testi kullanıldı.

IFAT: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda daha önceden VL'li bir hastadan NNN besiyerinde izole edilen ve %10 fetal dana serumu içeren RPMI-1640 besiyerinde çoğaltılan *Leishmania infantum* (MHOM/TR/95/EP14) promastigotları, santrifüj edilerek 8 kez fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı. Konsantrasyonu 2×10^6 olacak şekilde sulandırıldıktan sonra IFAT lamlarının her çukuruna 10 µl gelecek şekilde damlatıldı ve kurutulduktan sonra pelur kağıtlara sarılarak kullanılincaya kadar -20°C de saklandı. Çalışmaya

alınan serum örnekleri 1/40-1/1280 sulandırım aralığında çalışıldı ve konjugat olarak floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretli anti-insan IgG (A9042, SIGMA®) solüsyonu 1/100 sulandırımında kullanıldı. Bu yöntem önceki çalışmalarda tanımlandığı şekilde uygulandı ve $\geq 1/128$ titreler pozitif olarak kabul edildi¹³.

Ticari ELISA: Tüm serum örnekleri, çeşitli *Leishmania* türlerine (*L.donovani*, *L.major*, *L.mexicana* ve *L.braziliensis*) özgül antijenler kullanılarak hazırlanmış yarı-kantitatif ticari ELISA testi ile (*Leishmania* Ab Panel, Cypress Diagnostics, Belçika) anti-leishmanial antikor varlığı açısından kit prosedürüne göre araştırıldı.

“In-house” ELISA: Bu yöntem tüm mikroorganizma antijenleri (whole) ve rK39 antijeni kullanılarak laboratuvarımızda hazırlanan kitlerle uygulandı.

rK39-ELISA için, ELISA plakları (Linbro) 1 µg/µl distile su içinde -20°C’de saklanan rekombinant K39 (rK39) antijeni ile çukur başına 20 ng gelecek şekilde bikarbonat tamponu (pH: 9.4) ile +4°C’de bir gece bekletilmek suretiyle kaplandı ve -20°C’de saklandı. Test uygulanacağı zaman plaklar 150 µl kazein tamponu (pH: 7.4) ile muamele edildi ve oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra tampon döküldü. Serum örnekleri 1/100 oranında PBS+%0.05 Tween 20 (PBS-T) ile sulandırıldı ve çukurlara eklenerek 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 3 kez PBS-T ile yıkandı ve 1/1000 sulandırımındaki anti-insan IgG konjugatı (Sigma) eklendi. Bir saat 37°C’de inkübasyondan sonra tekrar yıkama işlemi uygulandı ve çukurlara substrat solüsyonu (3-ethylbenz-thiozoline-6-sulfonic acid-ABTS tablet, 100 ml 0.003M sitrat fosfat buffer pH:5 ve 20 µl H₂O₂) ilave edildi. Reaksiyon 30 dakika sonra durduruldu ve plaklar 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda değerlendirildi. Negatif kontrollerin ortalaması +2-3 SD şüpheli, >3 SD pozitif olarak kabul edildi^{6,7,12}.

“Whole” ELISA yönteminde IFAT testinde açıklandığı şekilde RPMI besiyerinde üretilen *Leishmania* promastigotları (MHOM/TR/95/EP14-MON1) kullanıldı. Promastigotlar sodyum dodesilsülfonat (SDS) ile parçalanarak eriyik antijen hazırlandı (300.000/ml). Hazırlanan antijen, bilinen pozitif ve negatif serumlarla değişik sulandırımelerde çalışıldı (checker-board) ve en uygun antijen sulandırımının 1/200 olduğu saptandı. Daha sonra 100 mM bikarbonat tamponla (pH: 9.4) sulandırıldı ve 96 çukurlu mikropatlara (Linbro) 100’er µL ilave edildi. Oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra yöntem daha önce tarif edilen protokole göre uygulandı^{6,7}.

“Dipstick” Testi: Ticari ELISA ile pozitifliğin saptandığı serumlar “dipstick” testi ile tekrar değerlendirildi. Serum ya da plazmada *Leishmania*’ya karşı antikorların saptanmasında hızlı ve kalitatif bir immünokromatografik test olan “dipstick” testi (Intersep *Leishmania* Test®, Berkshire, UK) tarif edildiği şekilde uygulandı¹⁴.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 572 çocuğun 30’unda (%5.2) ticari ELISA ile, 27’sinde (%4.7) “in-house whole” ELISA ile, 22’sinde IFAT ile (%3.8) ve 21’inde (%3.6) “in-house rK39” ELISA ile *Leishmania* seropozitifliği saptanmıştır. Ticari ELISA ile seropozitif bulunan serumların “dipstick” testi ile tekrar değerlendirilmesi sonucunda, bunlardan 19’unun pozitif sonuç verdiği izlenmiştir (Tablo I).

Tablo I. Seropozitiflik Saptanan Çocukların Demografik Özellikleri ve Seropozitifliğin Testlere Göre Dağılımı

Olgu No.	Yaş (yıl)	Cins	Bölge	Ticari ELISA	“In-house” ELISA		IFAT	“Dipstick” testi
					“Whole”	rK39		
1	9	E	Kütahya/Seydişehir	+	+	+	+	+
2	10	E	Kütahya/Seydişehir	+	+	+	+	-
3	6	E	Afyon/İscehisar	+	-	-	-	-
4	1,5	K	Afyon/İscehisar	+	+	-	-	-
5	8	K	Afyon/İscehisar	+	+	-	-	-
6	6	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	+
7	1,5	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	+
8	6	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	-
9	6	K	Afyon/İscehisar	+	-	-	-	-
10	9	K	Afyon/İscehisar	+	-	-	-	+
11	11	E	Kütahya	+	+	+	+	+
12	9	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	-
13	8	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	-	+
14	6	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	-
15	9	E	Bilecik/Söğüt	+	+	+	+	+
16	13	E	Bilecik/Söğüt	+	+	+	+	+
17	6	K	Bilecik/Söğüt	+	+	+	+	+
18	7	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	+
19	7	E	Afyon/İscehisar	+	+	-	+	-
20	9	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	+
21	10	E	Bilecik/Küre	+	+	+	+	+
22	10	E	Afyon/İscehisar	+	+	+	+	+
23	3	E	Bilecik/Küre	+	+	-	+	+
24	9	E	Eskişehir	+	+	+	+	+
25	4	E	Bilecik/Söğüt	+	+	+	+	+
26	2.5	E	Bilecik/Söğüt	+	+	+	+	+
27	13	K	Bilecik/Söğüt	+	+	+	-	-
28	12	E	Bilecik/Söğüt	+	+	-	-	-
29	10	E	Afyon/Sülümenli	+	+	+	+	+
30	10	K	Afyon/İscehisar	+	+	-	+	+

Tüm yöntemlerle seropozitifliğin saptandığı olgu sayısı 15 (%2.6), en az üç yöntemle seropozitifliğin saptandığı olgu sayısı ise 24 (%4.2) olarak belirlenmiştir. En az bir yöntemle seropozitifliğin saptandığı 30 olgunun çoğunu (%76.7) Afyon-İscehisar (n=16) ve Bilecik-Söğüt (n=7) bölgelerinde yaşayan çocuklar oluşturmuştur. Bu 30 olgunun 28'inin (%93.3) kırsal bölgede, birinin Eskişehir ve birinin de Kütahya şehir merkezinde yaşadığı görülmüştür. Ticari ELISA ile pozitifliğin saptandığı 30 çocuğun bir yıllık izlemlerinde VL'e ait klinik bulgular gözlenmemiştir.

TARTIŞMA

Leishmaniasis, dünyanın yaklaşık 88 ülkesinde endemik olarak görülmekte olup 250 milyon kişinin risk altında olduğu belirtilmektedir⁸. Akdeniz bölgesinde insan visseral leishmaniasis (VL)'ine *L.infantum* sebep olmakta ve sıklıkla beş yaş altı çocukları etkilemektedir¹⁵. Ülkemizde hem Akdeniz tipi VL, hem de kütanöz leishmaniasis görülebilmekte ve Ege, Akdeniz ve İç Anadolu'nun batı bölgelerinde VL olgularına sporadik olarak rastlanmaktadır^{4,6,23}. 1993-1995 yılları arasında Manisa'da 12 kemik iliği aspirasyonu örneğinde *Leishmania* amastigotları saptanmış, başka bir çalışmada da 1990-1995 yılları arasında aynı il ve çevresinde 21 VL olgusu rapor edilmiştir^{4,24}. 1997-2000 yılları arasında Türkiye'de bildirilen 161 olgunun 78'i (%48.5) Akdeniz, 30'u (%18.6) Ege ve 30'u (%18.6) da İç Anadolu Bölgesi'nden rapor edilmiş olup, bu olguların büyük bir bölümünü 12 yaş ve altı çocuklar oluşturmaktadır^{4,6,24-30}.

Bilindiği gibi VL'in rutin tanısı, kemik iliği ve lenf nodu aspirasyon örneklerinde direk mikroskopik inceleme ile amastigotların görülmesi ve/veya bu örneklerin NNN besiyerine ekilmesi sonucu promastigotların üretilmesi ile konmaktadır. Ancak bu yöntemler geniş kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar için uygun olmadığından, daha az invaziv olan hızlı ve güvenilir serolojik yöntemler tercih edilmektedir^{1-3,16-19}. Tanıda en sık kullanılan serolojik testler, direk aglütinasyon testi (DAT), IFAT ve ELISA yöntemleridir¹⁹. Rekombinant K39 antijeninin kullanıldığı rK39 "dipstick" testi ise, hızlı bir immünokromatografik test olup enfeksiyonun ilk dönemlerinde total anti-*Leishmania* antikorlarının kalitatif olarak saptanmasına dayanır. *L.donovani* kompleksi içinde korunmuş bir bölge tarafından kodlanan ve tekrarlayan aminoasitlerden oluşan kinezin ailesinin üyesi olan K39 antijeni, *Leishmania chagasi* (*infantum*) tarafından eksprese edilmektedir²⁰. rK39 "dipstick" testinin duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %98'e ulaştığını gösteren çalışmalar mevcuttur^{1,3,12,17,19}. Bu yöntemin yüksek özgüllük ve duyarlılığının yanı sıra ucuz ve kolay uygulanabilir olması, özellikle sağlık hizmetlerinin yetersiz olduğu bölgelerde tarama testi olarak kullanılmasına olanak vermektedir²². Yine rK39 antijeninin kullanıldığı ELISA yönteminin de özgüllük ve duyarlılığı %96-100 arasında değişmektedir^{6,21}.

Sunulan çalışmada, ülkemizin kuzeybatı bölgesinde yer alan dört il ve ilçelerinde yaşayan sağlıklı çocuklarda *Leishmania* antikor seroprevalansı farklı serolojik yöntemlerle araştırılmış ve çocukların %5.2'sinde (30/572) en az bir yöntemle, %4.2'sinde (24/572) ise en az üç yöntemle seropozitif sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda uygulanan "dipstick" ve rK39 ELISA testleri ile sağlıklı çocuklarda seropozitiflik oranı sırasıyla %3.3 (n=19) ve %3.6 (n=21) olarak saptanmıştır. Kullanılan antijenlerin laboratuvarımızda hazırlandığı "in-house whole" ELISA ve IFAT yöntemlerinde ise seropozitiflik oranları sırasıyla %4.7 (n=27) ve %3.8 (n=22) olarak belirlenmiştir. Ticari ELISA kiti ile elde ettiğimiz seropozitiflik oranının daha yüksek olması (%5.2; n=30) da, bu kitte birçok *Leishmania* türüne ait antijenlerin kullanılmasından kaynaklanmış olabilir. Dolayısıyla, farklı testlerle saptadığımız farklı seropozitiflik oranlarının, yöntemlerde kullanılan antijenlerin farklılığına, standardizasyon farklılığına ve bunlara bağlı olarak da özgüllük ve duyarlılıklar arasındaki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Ticari ELISA testi ile seropozitifliğin saptandığı 30 çocuk bir yıl süreyle izlenmesine karşın hiçbirisinde VL'e özgü klinik bulgular saptanmamış, enfeksiyonun kendiliğinden iyileştiği düşünüerek herhangi bir tedavi uygulanmasına da gerek görülmemiştir. VL, çocukluk çağında asemptomatik ya da subklinik enfeksiyon şeklinde görülebilmektedir. Hastalığın bu sessiz seyrinde hastaların yaşları ve immün durumları belirleyici olmakta, parazite ait faktörlerle de patojenite şekillenmektedir. Leishmaniasis'deki farklı klinik tablolar, parazitin türü, invazyon yeteneği, patojenitesi ve konağın immün cevabını yönlendiren genetik özellikleri tarafından belirlenmektedir^{3,5,11,13}. Seropozitif olguların hiçbirinde VL'e ait klinik bulguların olmaması, VL olgularında hastalık seyri ile immün sistem arasındaki ilişkisinin anlaşılması için daha geniş çalışmalara gereksinim olduğu düşündürmektedir.

Ülkemizdeki VL olgularının büyük bölümü kırsal bölgelerde yaşayan ve sosyoekonomik düzeyi düşük kesimlerde görülmektedir. Akdeniz ülkelerinde köpeklerin ana rezervuar olarak enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir⁴. Çalışmamızda seropozitif çocukların %93'ünün kırsal kesimde yaşadığı belirlenmiştir. Bitki örtüsü ve iklim durumu, evlerin önemli bir kısmının tahta veya kerpiçten yapılmış olması, evlerin altında veya yakınında büyükbaş ve/veya küçükbaş hayvan barınaklarının bulunması vektör *Phlebotomus*'lar için uygun ekolojik koşulların sağlanmasına zemin oluşturmaktadır. Ailelerin büyük bölümü tarım ile uğraştığından, sıklıkla köpek beslemekte ve bu köpekler de genelde evin dışında yaşamaktadır. Daha önce yaptığımız bir çalışmada, bölgemizde vektör *Phlebotomus* türlerinin varlığı gösterilmiş ve köpeklerde VL (CanVL) seropozitifliği Afyon'da %27.5, Bilecik'te %9.1, Eskişehir'de ise %7.8 olarak saptanmıştır¹². Bu çalışmamızda ise, aynı bölgelerdeki sağlıklı çocuklarda anti-*Leishmania* seropozitifliği araştırılmış ve en az üç yöntemle saptanan seropozitiflik oranı (%4.2), köpeklerde saptanan oranlardan daha düşük olmakla birlikte özellikle Afyon-İscehisar ve Bilecik-Söğüt ilçelerinde saptadığımız CanVL sonuçları ile paralellik göstermiştir. Ayrıca daha önce VL hastalarının bulunduğu bölgelerdeki epidemiyolojik çalışmalarda seropozitifliğe rastlanmış olması da, hastalığın yayılımının anlaşılmasına önemli katkı sağlamaktadır^{6,7,23-25,27-30}.

Sonuç olarak, bölgemizdeki çocuklar arasında saptanan seropozitifliğin göz ardı edilemeyecek oranda olduğu, bu bölgelerdeki sağlık kuruluşlarında çalışan hekimlerin VL olasılığı yönünden bilgilendirilmesinin uygun olduğu ve rezervuar ve vektörlere yönelik koruyucu halk sağlığı önlemlerinin alınmasıyla bölgemizdeki yayılımın sınırlandırılabilmesinin mümkün olduğu düşüncesine varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın yürütülmesindeki yardımlarından dolayı Eskişehir, Kütahya, Afyon ve Bilecik Sağlık Müdürlüklerine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Davies CR, Kaye P, Craft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. BMJ 2003; 326: 377-82.
2. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191-9.
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2004; 27: 305-18.

4. Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, et al. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol* 1995; 89 (Suppl 1): 89-93.
5. Gramiccia M, Bettini S, Yaşarol S. Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from human cases of cutaneous leishmaniasis in Urfa, south-east Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 568.
6. Özensoy S, Özbel Y, Turgay N, et al. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 363-9.
7. Özbel Y, Oskam L, Özensoy S, et al. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop* 2000; 74: 1-6.
8. World Health Organization. *Leishmania* and HIV in gridlock. WHO/CTD/Leish/98.9 add. 1, UNAIDS/98.23. 1998, World Health Organization, Geneva.
9. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1986; 154: 1003-11.
10. Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *J Infect Dis* 1992; 166: 1129-32.
11. Davies CR, Mazloumi Gavgani AS. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. *Parasitology* 1999; 119: 247-57.
12. Doğan N, Özbel Y, Özensoy Toz S, Çağrı Dinleyici E, Bor O. Sero-epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in northwestern Turkey: prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *J Trop Pediatr* 2006; 52: 212-7.
13. Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis, pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991; 77: 557-61.
14. Iqbal J, Hira PR, Saroj G, et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 475-9.
15. Gradoni L, Bryceson A, Desjeux P. Treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 191-7.
16. Zijlstra EE, Ali MS, el-Hassan AM, et al. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 505-7.
17. Chappuis F, Rijal S, Singh R, et al. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 277-85.
18. Zijlstra EE, Osman OF, Hofland HW, et al. The direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan: comparison of aqueous and freeze-dried antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91: 671-3.
19. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-8.
20. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 775-9.
21. Maalej IA, Chenik M, Louzir H, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 312-20.
22. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998; 351: 563-5.
23. Daldal N, Uner A, Yasarol S, Karacasu F, Yurdagül C. The prevalence of *Phlebotomus* spp. in the Aegean and Mediterranean Regions. *Acta Parasitologica Turcica* 1989; 13: 71-84.

24. Ok UZ, Balcıoğlu IC, Taylan Özkan A, Özensoy S, Özbek Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84: 43-8.
25. Aydoğdu I, Dinçer SL. Non-epidemiological Kala-azar cases in Turkey. *Acta Paediatr* 1995; 84: 1034.
26. Erduran E, Bahadır A, Gedik Y. Kala-azar associated with coombs-positive autoimmune hemolytic anemia in the patients coming from the endemic area of this disease and successful treatment of these patients with liposomal amphotericin B. *Pediatr Hematol Oncol* 2005; 22: 349-55.
27. Büyükcavcı M, Karacan M, Tan H, Akdağ R. Visceral childhood leishmaniasis in Kağızman, eastern Turkey: a new endemic area. *Ann Trop Paediatr* 2005; 25: 41-3.
28. Totan M, Dağdemir A, Muslu A, Albayrak D. Visceral childhood leishmaniasis in Turkey. *Acta Paediatr* 2002; 91: 62-4.
29. Mocan H, Gedik Y, Ökten A, Erduran E, Gacar N. Kala-azar in Trabzon (eastern Black Sea) region of Turkey. *Indian J Pediatr* 1993; 60: 819-22.
30. Hiçsönmez G, Özsoylu S. Kala-azar in childhood: a survey of clinical and laboratory findings and prognosis in 44 childhood cases. *Clin Pediatr (Phila)* 1972; 11: 465-7.