

HIV/AIDS HASTALARINDA *LEISHMANIA INFANTUM* SEROPOZİTİFLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF *LEISHMANIA INFANTUM* SEROPOSITIVITY IN HIV/AIDS PATIENTS

**Ayşegül TAYLAN ÖZKAN¹, Tülay YALÇINKAYA¹, Selçuk KILIÇ¹
Cahit BABÜR¹, Henk DFH SCHALLIG²**

ÖZET: Son yıllarda birçok ülkede ve özellikle de Güney Avrupa ülkelerinde HIV ve *Leishmania* koenfeksiyonlarına rastlanma sıklığında artış olduğu bildirilmektedir. Ülkemizin bazı bölgelerinde sporadik olarak görülen visseral leishmaniasis (VL), doğal olarak tatarcık ısırığı ile bulaşmakla birlikte HIV/AIDS'li hastalarda bulaş, damar içi uyuşturucu bağımlılarında enjektörlerin paylaşılması ve/veya kan transfüzyonu ile de gerçekleşebilmektedir. Bu çalışmada, HIV/AIDS'li hastalarda VL etkeni olan *Leishmania infantum*'a özgül antikor varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2004-2006 yılları arasında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, HIV Referans Laboratuvarı'nda HIV/AIDS tanısı doğrulanmış 79 hastaya (61 erkek, 18 kadın; yaş ortalaması: 30±2 yıl) ait serum örneği dahil edilmiştir. Tüm örneklerde *L.infantum* antikorları, hızlı aglütinasyon tarama testi (FAST), direk aglütinasyon testi (DAT), indirek floresan antikor testi (IFAT) ve rK39 hızlı tanı testi (dipstick assay) ile araştırılmıştır. Örneklerin sadece birisinde (%1.2) tüm serolojik yöntemlerle pozitiflik saptanmış (FAST ile >1/100, DAT ile 1/3200, IFAT ile 1/256, rK39 testinde *L.infantum*'a özgül bantlar), diğer örneklerin tamamı tüm yöntemlerle negatif olarak bulunmuştur. Seropozitif örneğin Akdeniz kıyı ilinde yaşayan 49 yaşında heteroseksüel bir erkeğe ait olduğu, HIV enfeksiyonunu cinsel temas yoluyla kazandığı, intravenöz ilaç kullanım öyküsünün bulunmadığı ancak kan transfüzyonu yapıldığı belirlenmiştir. Hastanın seropozitiflik saptanan serumunun kan transfüzyonundan 2-3 hafta sonra alındığı tespit edilmiş ve *L.infantum* bulaşının tatarcık ısırığı ile olabileceği gibi transfüzyon ile de olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, HIV/AIDS'li hastalarda *L.infantum* seropozitifliğinin düşük bulunmasına rağmen HIV/*Leishmania* koenfeksiyonlarının akılda tutulmasının yararlı olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Visseral leishmaniasis, Leishmania infantum, HIV/AIDS, koenfeksiyon, seroprevalans.*

ABSTRACT: In recent years an increase in the rate of detection of HIV and *Leishmania* co-infections has been reported from many countries especially countries in Southern Europe. Visceral leishmaniasis (VL) is sporadically detected in some parts of Turkey. Although the natural transmission is via sandfly bites, VL may be transmitted by needle sharing of intravenous drug addicts or by blood transfusion in HIV/AIDS patients. The aim of this study was to investigate the presence of specific antibodies

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Ankara. (aysegul.taylanozkan@rshm.gov.tr)

²KIT Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands.

against *Leishmania infantum*, which is the causative agent of VL, in the sera of HIV/AIDS patients. A total of 79 HIV/AIDS patients (61 male, 18 female; mean age: 30 ± 2 years) with confirmed diagnosis by HIV Reference Laboratory of Refik Saydam Hygiene Center between the years of 2004-2006, were included in the study. *L. infantum* antibodies were searched by fast agglutination screening test (FAST), direct agglutination test (DAT), indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and rK39 dipstick assay. Only one serum sample (1.2%) was found to be seropositive by all of the serological tests ($>1/100$ by FAST, $1/3200$ by DAT, $1/256$ by IFAT, and specific bands for *L. infantum* by rK39 dipstick test), while the remaining samples were negative with all of the methods. The seropositive serum was from a 49 years-old heterosexual male, living on the Mediterranean coast and has had acquired the HIV infection by sexual contact. He has no history of intravenous drug use but he had experienced blood transfusion. Since the seropositive serum sample was collected 2-3 weeks after the transfusion, the transmission of *L. infantum* was thought to be during blood transfusion, however it could also be acquired via a previous sandfly bite. In conclusion although the rate of *L. infantum* seropositivity was low in HIV/AIDS patients in our study, the possibility of HIV/*Leishmania* co-infections should be considered.

Key words: Visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, HIV/AIDS, co-infection, seroprevalence.

GİRİŞ

Akdeniz Bölgesi'nde visceral leishmaniasis'in (VL) etkeni olan *Leishmania infantum*, *Phlebotomus* cinsine ait tatarcık sinekleriyle bulaşır ve ana rezervuarı köpeklerdir. Hastalığa ülkemizde sporadik olarak Ege, Akdeniz, Karadeniz ve İç Anadolu Bölgeleri'nde rastlanmaktadır¹⁻⁴. 1997-2000 yılları arasında Sağlık Bakanlığı'na 161 yeni olgu bildirilmiştir¹. Olguların sayısı 2001'de 17'ye gerilerken 2004'de 30'a yükselmiştir. VL'e bağlı olarak her yıl 0-2 olgunun hayatını kaybettiği bildirilmektedir⁵. Dünyanın en önemli sağlık sorunlarından birisi olan HIV/AIDS için ise, Sağlık Bakanlığı tarafından ülkemizde bildirilen olgu sayısı 2097 olmakla birlikte (Ekim 1985-Temmuz 2005), bildirimdeki eksiklikler nedeniyle gerçek rakamın daha da yüksek olabileceği düşünülmektedir⁵.

İmmün sistemi baskılanmış olan HIV/AIDS hastalarında, VL hayatı tehdit eden bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. VL'in doğal yolla bulaşı tatarcık ısırığı ile olurken, HIV ile enfekte uyuşturucu bağımlılarında enjektörlerin paylaşılması ve/veya AIDS'li hastalara yapılan kan transfüzyonları önemli bulaş riski taşımaktadır. Dünyada en az 35 ülkede HIV ve *Leishmania* koenfeksiyonlarına rastlandığı bildirilmiş ve bunların büyük bir çoğunluğunun Güney-Batı Avrupa'da olduğu ifade edilmiştir⁶⁻⁹.

Bu çalışmada, ülkemizin çeşitli bölgelerinden doğrulama için merkezimize gönderilen HIV/AIDS'li hasta serumlarında *Leishmania infantum* seropozitifliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2004-2006 yılları arasında HIV/AIDS enfeksiyonu ön tanısıyla Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı'na (RSHMB) gönderilen ve anti-HIV pozitifliği INNO-LIA HIV Confirmation (Innogenetics, Belgium) ve/veya HIV

Blot 2.2 (Genelabs, Singapore) testleri ile doğrulanmış 79 hastaya (61 erkek, 18 kadın; yaş ortalaması: 30 ± 2 yıl) ait serum örneği dahil edildi. Serumlar çalışılincaya kadar RSHMB HIV referans laboratuvarında -80°C 'de saklandı.

Hasta serumlarında *L.infantum* antikorlarının varlığı; IFAT (indirect immunofluorescent antibody test), FAST (fast agglutination screening test), DAT (direct agglutination test) ve rK39 hızlı tanı testi (rk39 dipstick assay, InBios International, USA) ile araştırıldı. IFAT testi için, %10 FCS (fetal dana serumu) içeren RPMI-1640 içerisinde kültürü yapılmış yerel *L.infantum* MON-1 stokları kullanıldı; $\geq 1/128$ titreler pozitif olarak kabul edildi^{2,4}. FAST ve DAT antijenleri Koninklijk Instituut voor de Tropen (KIT; Royal Tropical Institute, Biomedical Research, Amsterdam, Hollanda)'den sağlandı. FAST (tarama titres 1/100) ve DAT yöntemleri daha önce tanımlandığı şekilde uygulandı ve DAT için $\geq 1/400$ titreler pozitif olarak değerlendirildi^{10,11}. rK39 hızlı tanı testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, HIV/AIDS tanısı doğrulanmış 79 hastaya ait serum örneklerinden yalnızca birisinde (%1.2) *L.infantum*'a karşı antikor pozitifliği tespit edilmiş, diğer örneklerin tamamının tüm serolojik tanı yöntemleriyle negatif olduğu belirlenmiştir. Antikor varlığı saptanan hastanın örneği, FAST ile $> 1/100$, DAT ile $1/3200$, IFAT ile $1/256$ titrelerde pozitif sonuç vermiş ve rK39 hızlı tanı testinde *L.infantum*'a özgül bantlar oluşturmuştur. Bu hastaya ait kayıtların incelenmesi sonunda, hastanın 49 yaşında heteroseksüel bir erkek olduğu, Akdeniz kıyısındaki bir ilde yaşadığı, HIV enfeksiyonunu cinsel temas yoluyla kazandığı ve intravenöz ilaç kullanımı öyküsü bulunmadığı tespit edilmiştir. Hastada ayrıca *Candida* enfeksiyonu mevcuttur ve AIDS nedeniyle yaşamını kaybetmiştir. Hastaya ölümünden üç ay önce eritrosit ve lökositlerindeki düşüklük nedeniyle kan transfüzyonu yapıldığı belirlenmiş ancak *Leishmania* bulaşının transfüzyondan önce mi yoksa geçmişte mi olduğuna dair herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Hastanın, araştırmamızda çalışılan serumu transfüzyondan 2-3 hafta sonra alınmıştır.

TARTIŞMA

Türkiye'de genellikle 6 ay ile 14 yaş arasındaki çocuklarda görülen Akdeniz tipi visseral leishmaniasis (VL) oldukça ağır ve bazen de ölümcül seyreden bir hastalıktır³. Belirleyebildiğimiz kadarıyla ülkemizde şimdiye kadar HIV ile enfekte kişilerde VL saptandığına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Mevcut veriler ışığında bu araştırmamız, HIV/AIDS'li bir hastada *L.infantum* seropozitifliğinin varlığını gösteren ilk çalışmadır.

Değişik ülkelerden yapılan çalışmalarda son yıllarda leishmaniasis morbiditesinde artış olduğu ve bu durumun hastalığa eşlik eden HIV enfeksiyonu ile bağlantılı olabileceği belirtilmektedir^{6-9,12-14,16,17}. Özellikle Güney Avrupa'da HIV/*Leishmania* koenfeksiyonu artan sıklıkla rapor edilmektedir. 1998'den beri

İspanya, Fransa, İtalya ve Portekiz’de 1911 yeni olgu saptanmıştır⁷. Her ne kadar Akdeniz tipi VL çoğunlukla çocuklarda görülmekteyse de, koenfekte olan hastaların %85’inden fazlası 20-40 yaşlarındaki genç erişkin erkeklerdir^{12,13}.

Birçok ülkede HIV bulaşı genellikle damar içi uyuşturucu kullanımı ve homoseksüel/heteroseksüel cinsel temas ile gerçekleşmektedir¹⁴. Ülkemizdeki resmi verilere göre HIV/AIDS hastalarının %70’i erkek, %52’si heteroseksüeldir⁵. Leishmaniasis bulaşı açısından ise, enjektörlerin paylaşılması nedeniyle intravenöz ilaç kullananlar ve kan transfüzyonu yapılanlar da risk altındadır^{7,12,13,15}. Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, 834 koenfekte hastadan 13’ü leishmaniasis’i kan transfüzyonu yoluyla almıştır¹². Çalışmamızda seropozitifliğin saptandığı hastaya kan transfüzyonu yapılmış olması ve serum örneğinin transfüzyondan 2-3 hafta sonra alındığı düşünülürse, *Leishmania* bulaşının bu yolla da gerçekleşmiş olabileceği varsayılabilir.

HIV/AIDS hastalarında asemptomatik ya da geçirilmiş leishmaniasis reaktivasyonu sıklıkla karşılaşılmakta ve bu durum her iki hastalığın da seyrini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu tip hastalarda VL’in hızlı tanısı zorlaşmakta ve antiparaziter tedavinin etkinliği de azalmaktadır. Diğer yandan leishmaniasis varlığı da asemptomatik HIV enfeksiyonundan AIDS’e doğru ilerleyişi hızlandırmaktadır^{7,12,13,16}. Bilindiği gibi AIDS hastaları tüberküloz, toxoplasmosis, kandidiyasis gibi fırsatçı hastalıklara son derece duyarlıdırlar. HIV ve VL ile koenfekte olan 576 hastanın 136’sında tüberküloz, 118’inde de özaftal kandidiyasis saptandığı bildirilmiştir¹². Çalışmamızda seropozitif olan hastanın verileri retrospektif olarak incelendiğinde *Candida* spp. ile enfekte olduğu saptanmıştır.

Leishmaniasis tanısında altın standart, dalak ya da kemik iliği aspirasyonundan elde edilen materyalin Giemsa ile boyanması ve direk mikroskopide amastigotların görülmesidir. Moleküler teknikler daha güvenilir olsa da maliyetleri yüksektir^{18,19}. ELISA, IFAT, DAT ve FAST gibi yöntemlerle serolojik tanının uygulanması nispeten daha kolaydır. Özellikle DAT ve FAST büyük ekipmanlara gereksinim duymadıkları için son derece avantajlıdır¹⁸. Buna karşın bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde antikor yapımının bozulması nedeniyle bu testlerin hiç birisi tek başına güvenilir olarak kabul edilmemekte, çalışmamızda da uygulandığı gibi iki ya da daha fazla serolojik testin birlikte uygulanması tavsiye edilmektedir⁷⁻¹³.

Sonuç olarak, ülkemizde VL’in endemik olduğu bölgelerde ateş, hepatosplenomegali ve anemisi olan HIV/AIDS hastalarında leishmaniasis koenfeksiyonu olasılığı akılda tutulmalı, diğer yandan özellikle tedaviye yanıt alınamayan, relaps veya fırsatçı patojen enfeksiyonlar geliştiren VL’li erişkin hastalar da HIV yönünden kontrol edilmelidir.

TEŞEKKÜR

Tüm katkıları için Doç. Dr. Kosta Y. Mumcuoğlu’na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Ok UZ, Balcıoğlu C, Taylan Özkan A, Özensoy S, Özbek Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84: 43-8.
2. Ertabaklar H, Özensoy Toz S, Taylan Özkan A, Rastgeldi S, Balcıoğlu C. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province. *Acta Trop* 2005; 93: 239-45.
3. Tanır G, Taylan Özkan A, Dağlar E. Pediatric visceral leishmaniasis in Turkey. *Pediatr Int* 2006; 48: 66-9.
4. Özensoy S, Özbek Y, Turgay N. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 363-9.
5. Ministry of Health of Turkey. Annual Report of Primary Health Care Directorate, 2005. pp: 117-121. <http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/temel2005/index.doc>
6. Desjeux P. Global control of *Leishmania* HIV co-infection. *Clin Dermatol* 1999; 17: 317-25.
7. Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 1: 3-5.
8. Sinha PK, Pandey K, Bhattacharya SK. Diagnosis and management of *Leishmania*/HIV co-infection. *Indian J Med Res* 2005; 121: 407-14.
9. Anema A, Ritmeijer K. Treating HIV/AIDS and leishmaniasis coinfection in Ethiopia. *CMAJ* 2005; 172: 1434-5.
10. Meredith SE, Kroon NCM, Sondorp E, et al. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze dried antigen for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1742-5.
11. Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L. A fast agglutination test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 400-1.
12. Desjeux P, Meert JP, Piot B, et al. *Leishmania*/HIV co-infection, South Western Europe 1990-98. WHO/LEISH/2000.42. World Health Organization, Geneva.
13. Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV) – infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine* 2001; 80: 54-73.
14. Grassly NCC, Garnet GP. The future of the HIV pandemic. *Bull World Health Org* 2005; 83: 378-82.
15. Molina R, Gradoni L, Alvar J. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 1: 29-45.
16. Lopez-Velez R, Perez-Molina JA, Guerrero A, et al. Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 436-43.
17. Malla N, Sengupta C, Dubey ML, Sud A, Ansari NA, Salotra P. Antigenaemia and antibody response to *Leishmania donovani* stage-specific antigens and rk39 antigen in human immunodeficiency virus-infected patients. *Br J Biomed Sci* 2003; 60: 210-6.
18. Schallig HD, Schoone GJ, Kroon CC, Hailu A, Chappuis F, Veeken H. Development and application of simple diagnostic tools for visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190: 69-71.
19. Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 641-651.