

Şanlıurfa'da Kutanöz Leishmanyazis Şüpheli Hastalardan Alınan Klinik Örneklerin Tanısında Kinetoplast DNA'sına Özgül Primerlerin Kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Diğer Parazitolojik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Comparison of Polymerase Chain Reaction Using Kinetoplast DNA Specific Primers and Other Parasitological Methods in the Diagnosis of Clinical Samples of Suspected Patients with Cutaneous Leishmaniasis in Şanlıurfa

Fadile YILDIZ ZEYREK^{1,2}, Seray TÖZ², Fehmi YÜKSEL¹, Nevin TURGAY², Yusuf ÖZBEL²

¹ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

¹ Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Şanlıurfa, Turkey.

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, İzmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.08.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.10.2017

ÖZ

Visseral leishmanyazis (VL) ve kutanöz leishmanyazis (KL) Türkiye'de endemik olarak görülmektedir. *Leishmania tropica*'nın neden olduğu KL, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde olduğu gibi Türkiye'nin diğer bölgelerinde de halk sağlığı problemi olarak önem kazanmıştır. Tanı, genellikle lezyonun klinik görünümü ve/veya lezyonun aspirasyon yayma preparatlarının mikroskopik incelemesiyle konulmaktadır. Özellikle kronik lezyonlarda deri biyopsi örneği histolojik olarak incelendiğinde, parazit varlığının her zaman saptanamadığı durumlar olabilmektedir. Bunun yanı sıra, endemik bölgelerde KL enfeksiyonlarının farklı türlerle de oluşması nedeniyle tür tayininin yapıldığı tanı yöntemlerini kullanmak önem arz etmektedir. KL tanısı konurken aynı zamanda türün tanımlanması, klinisyenlere tedavinin planlanmasında yardımcı olduğu gibi hastalığın kontrolünde alınması gerekli önlemlerin belirlenmesinde de önem taşımaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), paraziti tür düzeyinde ayırabilen yüksek derecede özgün ve hassas bir tanı yöntemidir. Kinetoplast DNA'sı (kDNA), klinik örneklerde *Leishmania* parazitinin saptanmasında kullanılan

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Fadile Yıldız Zeyrek, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Osmanbey Kampüsü, Şanlıurfa-Türkiye.
Tel (Phone): +90 414 318 1572, **E-posta (E-mail):** fadilezeyrek@hotmail.com

hedef genetik bölgelerdendir. Farklı gen bölgelerinin hedeflendiği PCR yöntemi leishmaniyazis tanısında uzun süredir kullanılmakta olup kDNA'sının kullanıldığı PCR, parazit DNA'sının küçük daire bölgesinin tür- lere özgü değişken bölgelerini hedefleyen en duyarlı yöntemler arasında yer almaktadır. Kinetoplast DNA bölgesi, leishmaniyazis tanısında ideal hedeflerden birisi olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, KL tanısı için alınan klinik örneklerde, Uni21/Lmj4 primerleri kullanılarak kinetoplastik DNA'yı hedefleyen PCR yöntemini uygulamak ve elde edilen sonuçları yayma ve kültüre dayalı diğer parazitolojik yöntem- lerle karşılaştırmaktır. Çalışmada, Şanlıurfa Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezine başvuran KL şüpheli has- talardan alınan 62 örnek kullanılmıştır. Klinik örnekler kinetoplast DNA'yı hedefleyen PCR, parazit kültürü ve yayma preparatlarının mikroskopik incelenmesi yöntemleriyle çalışılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. PCR ile 35 klinik örnekte KL tanısı konulmuş ve bu yöntemin tüm yöntemler arasında en yüksek duyarlılığı (%100) gösterdiği tespit edilmiştir. PCR ile tüm mikroskopik ve/veya kültür pozitif örneklerde de olumlu sonuç alınmıştır. Ayrıca, PCR ile diğer yöntemlerle saptanmayan dört KL olgusu saptanmıştır. Mikros- kobik inceleme ile 25 hastada %71.4 duyarlılıkla, kültür yöntemi ile 19 hastada %54.3 duyarlılıkla tanı konulmuştur. Kültür ve mikroskopik inceleme yöntemleri birlikte uygulandığında duyarlılık %88.6 (31/35 olguda pozitiflik) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, özellikle Güneydoğu Anadolu gibi yüksek KL açısından endemik bölgelerde klasik yöntemlerin yanı sıra kDNA PCR'nin uygulanması hem tanıda duyar- lılığın yükseltilmesi hem de tür düzeyinde tanımlama yapmaya olanak vermesi, ayrıca buna bağlı olarak uygun tedavi rejimlerinin oluşturulması ve gerekli önlemlerin alınması açısından önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: *Leishmaniyazis; kutanöz; tanı; kinetoplast; PCR.*

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL) are seen endemically in Turkey and CL caused by *Leishmania tropica* is an important public health problem in southeastern as well as other regions of Turkey. The diagnosis has been usually made by clinical view of lesion and/or parasitologically using lesion aspiration smears. Histological examination does not, always reveal the parasite in the skin biopsy, particularly in chronic lesions. Besides this, due to CL infections caused by different species in endemic areas, diagnostic methods enabling species identification are in great need. Species identification, in the time of diagnosis, is an important procedure for helping the clinicians in the planning of treatment as well as control measures. Polymerase chain reaction (PCR) is a specific and sensitive diagnostic tool that can also identify the parasite at species level. Kinetoplast DNA (kDNA) is one of the genetic regions that can be used for the detection of *Leishmania* parasites in clinical specimens, kDNA PCR is reported as one of the most sensitive methods related to species-specific variable regions in mini-circle long time ago. It has been considered as one of the most ideal targets for the diagnosis of leishmaniasis. The aim of the study was to perform PCR targeting kDNA by using the primers of Uni21/Lmj4 in clinical samples and compare the results with other parasitological methods like smear and culture, for the diagnosis of CL. The kDNA PCR, parasite culture and microscopical evaluation of stained smears of 62 specimens from suspected CL cases who have referred to Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis and Treatment Center in Şanlıurfa, Turkey were included in the study. The kDNA PCR showed the highest sensitivity 100% of the samples (35/35) among all diagnostic assays, followed by the microscopy (25/35 positive, 71.4% sensitivity) and culture (19/35 positive, 54.3% sensitivity). The sensitivity of combination of culture and microscopy was 88.6% (31/35 positive). These results suggested that performing kDNA PCR in addition to conventional techniques is important for improving the true diagnosis of CL to the species level and also important for establishing treatment regimens and designing appropriate precautions in highly endemic area like the southeastern region of Turkey.

Keywords: *Leishmaniasis; cutaneous; diagnosis; kinetoplast; PCR.*

GİRİŞ

Leishmaniyazis, *Leishmania* cinsi içerisinde yer alan türlerin etken olduğu bir parazit hastalığıdır ve hastalığın visseral leishmaniyazis (VL), kutanöz leishmaniyazis (KL) ve muko-

kutanöz leşmanyazis (MKL) gibi farklı klinik şekilleri bulunmaktadır. Türkiye'de VL ve KL olmak üzere iki klinik şekil görülmekte ve 40'tan fazla ilimizden hastalık tanısı bildirilmektedir. Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerimizde, *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum*'un etken olduğu KL önemli bir halk sağlığı problemini oluşturmaktadır. Hastalık Anadolu'da yüzyıllardır bilinmekte ve Türkiye'de 1970'li yıllardan bu yana bildirimi zorunlu hastalıklar arasında yer almaktadır. Antroponotik KL Türkiye'de 1950'li yıllarda endemik olsa da, sivrisineklere karşı sıtma kontrol programı uygulaması sırasında, bu mücadelenin etkenin vektörü olan kum sineği popülasyonlarını da etkilemesi nedeniyle olguların sayısında kayda değer bir azalma görülmüştür. Bununla birlikte, 1980 yılından bu yana özellikle Şanlıurfa, Osmaniye ve Adana illerimizde KL'nin insidansında artış gözlenmiştir ve 1983 yılında 1741 KL olgusunun saptandığı bir epidemi yaşanmıştır¹. Sağlık Bakanlığının verilerine göre, 1990-2010 yılları arasında toplam 46.003 olgu bildirilmiştir. Bu olguların %96'sı Güneydoğu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde yer alan Şanlıurfa, Adana, Osmaniye, Hatay, Diyarbakır, İçel ve Kahramanmaraş illerimizden bildirilmiştir. Türkiye'de son yıllarda bildirilen KL olgu sayısında bir artış eğilimi gözlenmektedir^{2,3}.

KL'nin yüksek derecede endemik olduğu Şanlıurfa ilinde KL şüpheli hastalar Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezine başvurumaktadırlar. Bu merkezde hastalığın tanısı rutin olarak hastalardaki lezyonlardan elde edilen aspirasyon örneklerinden hazırlanan yayma preparatlarının Giemsa ile boyanması sonrasında mikroskopik inceleme sonucu konulmaktadır. Bu bölgede daha önceleri hastalıktan sorumlu etken olarak *L.tropica* görülürken son zamanlarda iki yerli ve bir Suriyeli hastada *L.major*'un etken olduğu bildirilmiştir⁴⁻⁶. Giemsa boyalı yayma preparatlarının mikroskopta incelenmesi, özellikle kronik lezyonlarda düşük duyarlılık göstermesine rağmen, en basit ve hızlı tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Diğer bir tanı yöntemi olan kültür yöntemi, hem klinik örneklerin uzun süreli inkübasyonunun gerekmesi hem de standardizasyonunun zor olması nedeniyle diğer yöntemlere göre daha düşük duyarlılığa sahiptir¹.

KL tanısı konurken tür tanısının yapılması, klinisyenlere tedavinin planlanmasında yol gösterici olmasının yanı sıra, hastalığın kontrolünde alınması gerekli önlemlerin belirlenmesinde de önem taşımaktadır⁷. Farklı gen bölgelerinin hedeflendiği PCR yöntemi leşmanyazis tanısında uzun zamandır kullanılmaktadır. Kinetoplast DNA (kDNA) PCR, parazit DNA'sı küçük daire bölgesinin türlere özgü değişken bölgelerini saptayan en duyarlı yöntemler arasında yer almaktadır⁸. kDNA bölgesi, leşmanyazis tanısında ideal hedeflerden birisi olarak kabul edilmektedir^{9,10}.

Anders ve arkadaşları¹¹, Uni21/Lmj4 primerlerinin kullanıldığı araştırmalarında kDNA'nın hedeflendiği PCR ile türlere özgü [*L.major* için 650 baz çifti (bp); *L.tropica* ve *L.donovani* grubu için 800 bp] farklı büyüklükte bant paternlerinin elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu yöntemle, yeni dünya *Leishmania* türleri eski dünya *Leishmania* türlerinden daha küçük bant paternleri göstererek kolaylıkla ayırt edilebilmektedir¹¹.

Bu çalışmada Şanlıurfa ilindeki KL şüpheli hastalardan elde edilen klinik örneklerde, kDNA'yı hedefleyen Uni21/Lmj4 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile mikroskopi ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu (Karar no: 07-9/2- Protokol adı: “Visseral ve kutanöz *Leishmaniasis* enfeksiyonlarının tanısı ile parazit tür ile tür içi farklılıklarının Türkiye’de endemik bölgelere göre belirlenmesi”) ile gerçekleştirildi ve hasta ve/veya ebeveynlerinden onam formu alındı.

Hastalar ve Örnekler

Şanlıurfa’da bulunan Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezine başvuran toplam 62 hastadan örnek alındı. KL şüpheli en az bir lezyonu olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş aralığı 1-55 yaş olarak belirlendi. Hastalara ait demografik veriler kaydedildi.

Örnek alınırken, lezyon ve çevresine deri antiseptisi uygulandı. Serum fizyolojik (0.1-0.2 mL) içeren insülin iğnesi (1 mL, 25-g) ile lezyonun türüne göre ülser veya nodülün sağlam deri ile birleştiği bölgeden bir kaç defa nazıkçe girilip çıkılarak örnek alındı. İşlem sırasında dokuya az miktarda serum fizyolojik enjekte edilip geri çekilerek doku sıvısı aspi-re edildi. Enjektör lezyondan çekilerek aspirasyon materyali önce NNN besiyerine inoküle edildi ve sonrasında 3-4 adet yayma preparatı hazırlandı. Yayma preparatları tamamen kuruduktan sonra, bir tanesi %100 metanol ile sabitlendi ve tekrar kurutulduktan sonra Giemsa ile boyanarak mikroskopta (x1000) incelendi. Diğer yayma preparatları DNA izolasyonu için -20°C’de saklandı. Lezyon kabuklu ise, tek kullanımlık bistüri ucu ile kabuk kaldırılarak %70’lik alkol içerisine alındı ve DNA izolasyonu yapılmıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Kültür yöntemi Modifiye NNN besiyeri (1 g NaCl, 2 g bakteriyolojik pepton, 5 g bakteriyolojik agar) hazırlanarak 120°C’de 20 dakika otoklavlandı. Besiyeri 55°C’ye soğuduğunda 30-60 ml insan kanı, 1.5 ml gentamisin eklendi. Besiyeri 2-4 ml steril tüplere dağıtılarak 45 derecelik eğimle soğutuldu ve ardından 4°C’de saklandı. Kullanım öncesi her tüpe 1 ml %20 fetal sıgır serumu içeren RPMI sıvı besiyeri eklenerek lezyona ait aspirasyon örneklerinden bir kaç damla ekim yapıldı. Tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirildi. Ekim yapılan kültür örnekleri 24°C’de üç hafta inkübe edildi ve her hafta üreme açısından örnek alınarak mikroskopta incelendi. Bu süre sonunda üreme olmayan örnekler negatif olarak değerlendirildi.

DNA İzolasyonu ve PCR Amplifikasyonu

TE tampon çözeltisinden 200 µl alınarak yayma preparat örnekleri yıkandı. Kabuklar mekanik olarak parçalandıktan sonra ependorf tüplere aktarıldı ve “Genomic DNA Purification Kit, K0512 (Fermentas, Almanya)” ticari kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA örnekleri 100 µl iki kez distile edilmiş su ile seyreltildi. DNA örnekleri kullanılabilece kadar -20°C’de saklandı.

Örneklerdeki *Leishmania* DNA’sının çoğaltılması için, kDNA’sının küçük daire sekansı hedeflenerek hazırlanan Uni21 (5’-GGG GTT GGT GTA AAA TAG GCC-3’) ve Lmj4 (5’-

CTA GTT TCC CGC CTC CGA G-3') primer çifti kullanıldı¹⁰. DNA amplifikasyonu; PCR tamponu, 2.0 mM MgCl₂, her bir nükleotitten 0.2 mM, her bir primerden 1 µm (50 pmol), 2.0 U Taq polimeraz (Fermentas, Almanya) ile 50 ng konsantrasyondaki genomik DNA'dan 1 µl içeren 50 µl hacimde gerçekleştirildi. Isı döngü cihazı (Perkin Elmer, Warrington, Birleşik Krallık)'nda PCR programı; 94°C'de 5 dakika denatürasyon sonrası, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 60°C'de 1 dakika primer birleşmesi ve 72°C'de 1.5 dakika uzama olacak şekilde toplam 35 döngü uygulandı. PCR ürünleri %1 agaroz jelde Tris-asetat-EDTA tampon çözeltisi içinde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV ışık altında görüntülendi. Pozitif kontrol olarak *Leishmania* promastigot kültüründen hazırlanan 10 ng DNA kullanıldı. Eski dünya *Leishmania* türleri için (*L.major* için 650 bp; *L.infantum*/*L.donovani* ve *L.tropica* için 800 bp; *L.aethiopica* için 850 bp) beklenen büyüklükteki bant paterni izlenmesi halinde test pozitif olarak kabul edildi¹¹.

İstatistiksel Analiz

Örnekler, kültür veya boyalı preparatın mikroskopik incelemesinde parazitin gösterilmesi ya da PCR'de leşmanya DNA'sının saptanması halinde doğrulanmış pozitif (D-Poz) sonuç olarak kabul edildi. Her üç yöntem de negatif ise, örnek doğrulanmış negatif (D-Neg) olarak kabul edildi. Bu değerler her bir tanı yönteminin değerlendirilmesinde konsensus standardı olarak kabul edildi. Çalışmada duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer (PPD), negatif prediktif değer (NPD) ve Cohen'in kappa katsayısı (κ) hesaplandı. Cohen'in kappa katsayısı ile iki test arasında şansa bağlı olmayan uyum ölçüldüğünde "0" tesadüfi uyum ve "1" ideal uyum olarak değerlendirildi. Kappa indeksinin genel olarak 0.70 olması yeterli bulundu. Veriler SPSS programı (versiyon 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile analiz edildi ve p değeri ≤ 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Şanlıurfa ilindeki 62 KL şüpheli hastanın örnekleri üç tanı yöntemiyle incelenmiştir. Toplamda saptanan 35 KL olgusunun, 15 (%42.9)'inin erkek, 20 (%57.1)'sinin kadın olduğu tespit edilmiştir. Olguların çoğu çocuk olup ortalama yaş 14.7 ± 13 olarak bulunmuştur. Olguların çoğunda (%66.1) lezyonların tanıdan 1-6 ay öncesinde başlama öyküsü olduğu tespit edilmiştir. Predominant klinik şekiller ülseratif ve nodüler lezyonlar olup papüler lezyonlar nadiren saptanmıştır. KL hastalarının klinik görünüm ve karakteristikleri Tablo I'de özetlenmiştir. Toplamda 21 hastada tek lezyon, yedi hastada iki lezyon ve altı hastada üç lezyon saptanırken sadece bir hastada sekiz lezyona rastlanmıştır. Lezyonlar öncelikle yüzde ve/veya üst ekstremitelerde yerleşmiştir. Kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar duyarlılık ve özgüllük açısından karşılaştırılmıştır (Tablo I).

Konsensus kriterine göre, çalışmaya alınan toplam 62 örnek içinde 35 (%56.5) örnek pozitif, 27 (%43.5) örnek negatif olarak kabul edilmiştir. Konsensus standartlarında tanımlandığı gibi, parazit kültürü ve mikroskopik inceleme yöntemlerinin her ikisi de KL tanısında yüksek derecede özgüllük (%100) göstermiş ve yöntemler birlikte değerlendirildiklerinde 35 örnekten 31 (%88.6)'inin doğru tanımlandığı saptanmıştır. Yöntemlerin tek başına du-

Tablo 1. Kutanöz Leşmanyazis (KL) Hastalarının Özellikleri

Özellikler	Değer
Erkek hastaların sayısı n (%)	15 (42.9)
Erkek/Kadın oranı	0.75
Yaş (yıl)	
Ortalama $\pm$ SD	14.7 $\pm$ 13
Minimum-Maksimum	1-44
Tedavi edilmemiş KL olgu sayısı (yeni olgu) (%)	16 (45.7)
Tedavi edilen KL olgu sayısı (%)	19 (54.2)
Lezyon sayısı	
Ortalama	1
Aralık	1-8 ^a
Ülseratif lezyonların sayısı n (%)	22 (62.9)
Nodüler lezyonların sayısı n (%)	8 (22.9)
Papüler lezyonların sayısı n (%)	5 (14.3)
Lezyonların çapı (mm)	
Ortalama	14.6
Minimum-Maksimum	5-50

^a Sadece bir hastada sekiz lezyon bulunmaktadır.

yarırlıkları daha düşük olup yayma için duyarlılık %71.4, kültür için duyarlılık %54.3 olarak tespit edilmiştir. Bazı kültürlerde bakteri veya mantarlara bağlı kontaminasyon gözlenmiştir. Yayma ve kültür yöntemlerinin özgüllük ve pozitif prediktif değerleri %100 olarak bulunmuştur. Cohen'in kappa katsayısı (κ) ile yayma ve kültür ile tanı arasındaki uyum düzeyi vasat (0.37, $p=0.005$) bulunurken, yayma veya kültürle doğrulanmış sonuçlar (D-Poz ve D-Neg) arasındaki uyum düzeyleri ise sırasıyla iyi (0.69, $p<0.0001$) ve ılımlı (0.50, $p<0.0001$) olarak değerlendirilmiştir.

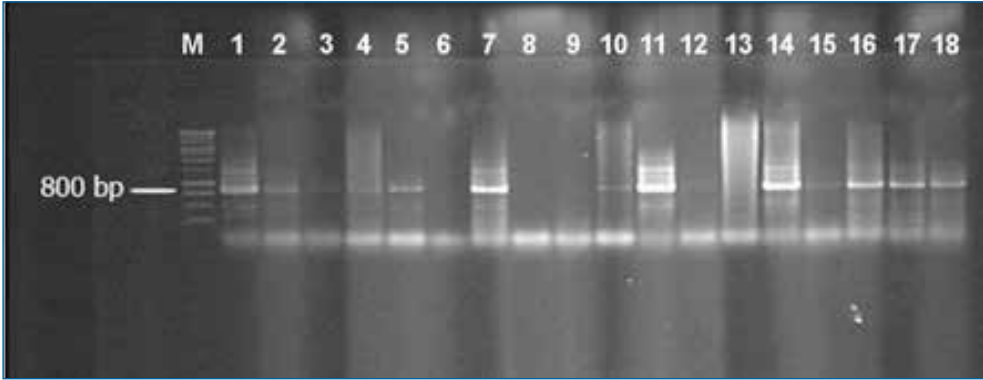
Kültür ve/veya mikroskopik inceleme ile pozitif bulunan 31 örneğin hepsi kDNA PCR ile doğrulanmıştır. Testler arasındaki uyum düzeyi $\kappa=0.84$ ($p<0.0001$) olup kültür ve/veya mikroskopiyle kDNA PCR sonuçlarının yüksek derecede uyumlu olduğu saptanmıştır.

Toplam 62 örnekten 35'i kDNA PCR (mikroskopi ve kültür pozitif olan 31 örnek ve mikroskopi veya kültür negatif olan dört örnek) ile 800 bp göstererek pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Çalışmada kDNA PCR yöntemi, uygulanan yöntemler içerisinde en duyarlı (%100) yöntem olarak gözlenmiştir. Doğrulanmış sonuçlar ile kDNA PCR sonuçları arasındaki uyum mükemmel $\kappa=1$ ($p<0.0001$) olarak bulunmuştur.

Tablo II. Kutanöz Leishmaniyazis Tanı Yöntemlerinin İstatistiksel Analizleri ^a

	Pozitif örnek sayısı (%)	Duyarlılık (%) (%95 CI)	Özgüllük (%) (%95 CI)	PPD (%) (%95 CI)	NPD (%) (%95 CI)	Uyum (%) (%95 CI)	K (kappa)
Mikroskopi	25 (40.3)	71.4 (53.9-89.0)	100 (81.2-1)	100 (80.9-1)	73.0 (55.7-90.3)	83.9 (68.7-99.0)	0.69
Kültür	19 (30.6)	54.3 (36.7-71.9)	100 (81.2-1)	100 (79.5-1)	62.8 (46.1-79.4)	72.2 (59.0-89.4)	0.50
kDNA PCR	35 (56.5)	100 (82.4-1)	100 (81.2-1)	100 (82.4-1)	100 (81.2-1)	100 (84.7-1)	1.00

^a Özgüllük ve duyarlılık değerleri her test için bütün test sonuçları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır (Parazit kültürü veya yaymanın mikroskopik incelenmesi veya PCR'nin pozitif olması pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir. Tüm testlerde negatif olan örnekler negatif olarak kabul edilmiştir). CI: Confidence Interval (güven aralığı), PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.



Şekil 1. kDNA PCR bant paterni (M: Moleküler ağırlık belirteci; 1-18: KL hasta örnekleri).

TARTIŞMA

Türkiye'de leishmaniyazisin VL ve KL olmak üzere iki şekli görülmektedir ve her ikisi de 1970'li yıllardan beri bildirimi zorunlu hastalıklardır. VL daha çok Ege, Akdeniz ve Orta Anadolu bölgelerinde olmak üzere sporadik olarak bildirilmektedir. Kendiliğinden iyileşebilen antroponotik KL ise Güney Doğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde endemik olarak görülmektedir. VL'nin etkeni *L.infantum*, KL'nin etkeni ise *L.tropica*'dır. Son yıllarda, Akdeniz bölgesinde *L.tropica*'nın yanı sıra *L.infantum*'un da KL'ye neden olabileceği ve KL'nin Ege bölgesinde de yayılım gösterdiği bildirilmiştir^{2,12-14}. Ayrıca, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde *L.major* ve/veya *L.donovani*'nin de KL etkeni olduğu gösterilmiştir^{6,15}.

KL'nin klasik tanısı lezyondan yapılan aspirasyon yayma preparatı veya biyopsi örneğinin mikroskopik incelemesinde parazitin görülmesi ve parazit kültürüne dayanmaktadır. Deri biyopsisinin histolojik incelemesinde özellikle kronik lezyonlarda, parazit her zaman tespit edilememektedir¹⁴. Bunun yanı sıra, endemik bölgelerde KL enfeksiyonlarının farklı türlerle oluşabilmesi nedeniyle tür tayininin yapılabildiği tanı yöntemleri önem arz etmektedir. Mikroskopi ve kültür yöntemleriyle tür tayini yapılamamasına karşın, PCR paraziti tür düzeyinde ayırabilen yüksek derecede özgül ve duyarlı bir tanı yöntemidir. kDNA'sı, klinik örneklerde *Leishmania* parazitinin saptanmasında tercih edilen DNA bölgelerinden birisidir. *Leishmania* cinsi içerisinde türlere göre 600 ile 800 bp arasında değişen boyutlardaki küçük daire gen bölgesinden her bir parazitte yaklaşık 10.000 kopya bulunmaktadır. Küçük daire, tüm *Leishmania* cinsi türlerinde ve bazı trypanosoma türlerinde bulunan ve moleküler tanı yöntemi geliştirmek için ideal hedeflerden birisi olan sabit bölge içermektedir¹⁶. Bu çalışmada, *L.major*, *L.tropica* ve *L.donovani* grubu gibi diğer *Leishmania* türlerinden ayırt edebilmek için kDNA primer dizileri (Uni21/Lmj4) kullanılmıştır¹¹. Çalışmamızda uygulanan kDNA PCR ile tüm mikroskopi ve/veya kültür pozitif örneklerde pozitif sonuç alınmıştır. Ayrıca, kDNA PCR testi ile diğer yöntemlerle saptanamayan dört KL olgusu saptanmıştır. İran'da gerçekleştirilen bir araştırmada, 155 KL şüpheli olgudan toplanan örneklerde boyalı yayma preparat ile mikroskopik inceleme, kültür ve ITS-PCR (primer seti; LeishR/LeishF) yöntemleri uygulanmış ve mikroskopi ve/veya kültür ile doğrulanmış örneklerde PCR yönteminin duyarlılığı %98.8 (86/87) olarak saptanmıştır. Tanı yöntemleri tek olarak değerlendirildiğinde mikroskopi ve kültürün duyarlılıkları sırasıyla %79.3 ve %86.2 olarak bulunmuştur. Mikroskopi ve kültür yöntemleri birlikte uygulandığında %100 duyarlılık gözlenmiştir¹⁷. Bizim çalışmamızda, PCR KL tanısında en duyarlı yöntem olarak saptanmıştır. Parazit kültürü ve yayma preparatlarının mikroskopik incelenmesi yöntemlerinin her ikisi de KL tanısında yüksek derecede özgül (%100) olup birlikte uygulandıklarında örneklerin 31/35 (%88.6)'ini doğru olarak saptamıştır. Bu sonuçlar bize PCR yönteminin uygulanmadığı merkezlerde tanıda etkinliği artırmak amacıyla kültür ve mikroskopi yöntemlerinin birlikte uygulanmasının gerekliliğini göstermektedir. Kültür yöntemi parazitin izolasyonunu sağlaması nedeniyle önemli olsa da, parazit tanısı için klinik örneğin deri yüzeyinden alınması nedeniyle olası bakteriyel ve fungal kontaminasyonlar yöntemin daha düşük duyarlılık göstermesine neden olmaktadır. Bununla birlikte, kültür yöntemi birçok rutin laboratuvarında zaman alıcı bir yöntem olarak değerlendirilip uygulanmamakta ve böylece olguların %28 (10/35)'inden fazlasına tanı konamamaktadır¹⁰.

Fas'ta gerçekleştirilen bir araştırmada, KL tanısı için ITS1 (primer seti; LITSR/L5.8S) ve iki farklı kDNA PCR (primer setleri; 13A/13B ve Lmj4/Uni21) yöntemi, mikroskopi ve kültür yöntemleriyle karşılaştırılmış ve Lmj4/Uni21 PCR PCR yöntemleri içerisinde en düşük duyarlılığı göstermiştir. Bu çalışmada duyarlılığın düşük olmasının, amplifikasyon ürününün daha büyük boyutta (650-800 bp) olmasına bağlı olabileceği ve aynı zamanda Lmj4 primerinin küçük dairenin değişken bölgesinde yer almasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür¹⁸. Diğer yandan, Hindistan'da yapılan bir araştırmada aynı primerlerin

[ITS1 (LITSR/L5.8S) ve kDNA (Lmj4/Uni21)] kullanıldığı PCR yöntemiyle, KL'nin tür düzeyinde tanısı karşılaştırılmış ve Lmj4/Uni21 PCR (%96.6)'nin ITS1 PCR (%82.75)'den daha yüksek duyarlılık gösterdiği bulunmuştur¹⁹. Bizim çalışmamızda Uni21/Lmj4 primer setinin kullanıldığı kDNA PCR, mikroskopi ve kültür yöntemleriyle karşılaştırıldığında %100 duyarlılık göstermiştir. Kinetoplast küçük daire değişken ve ITS1 bölgelerinin özellikle *L.tropica*'da tür ve tür içi düzeylerde heterojen olması nedeniyle, farklı endemik bölgelerde farklı PCR yöntemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılmasına gereksinim bulunmaktadır. Türkiye'de KL tanısında yüksek duyarlılık elde edilmesi ve türün tayin edilebilmesi için Güneydoğu Anadolu, Akdeniz ve Ege gibi farklı endemik bölgelerde farklı PCR yöntemlerinin karşılaştırılmasına gereksinim bulunmaktadır.

Suriye, Irak ve İran Türkiye'nin Güney ve Güneydoğu sınır komşularıdır ve *L.major* kaynaklı KL bu üç ülkede endemik olarak görülmektedir. Suriye'de KL olgularından elde edilen *L.major* parazitlerinin izoenzim analizi yapılmış ve bu etkenin Sahra çölünün yarı kurak bölgesi (Sub-Saharan Sahel) ile Yakın ve Orta Doğu arasındaki bölgede yaşayan insanları etkileyen zoonotik KL etkeni olduğu bilinen *L.major* MON-26 türü olduğu saptanmıştır²⁰⁻²². Şanlıurfa günümüzde *L.tropica*'nın endemik olduğu illerimizden biridir ve 2008 yılında yapılan bir araştırmaya göre seyahat öyküsü bulunmayan kişilerde PCR-RFLP yöntemiyle yapılan değerlendirme sonucunda Şanlıurfa'da yalnız *L.tropica*/*L.donovani* grubu ile uyumlu olabilecek 800 bp bant paterni bulunmuştur²³. Bununla birlikte, 2014 yılında Şanlıurfa ilinde *L.major*'un etken olduğu üç KL olgusu bildirilmiştir⁶. Bu bulgulara göre bölgede dominant tür hala *L.tropica* olsa da, Suriyeli göçmenlerin bölgeye gelmesiyle birlikte, epidemiyolojik durumun yakın gelecekte değişebileceğine işaret edilmektedir. Bu nedenle, zoonotik KL yayılımı açısından olası hayvan rezervuarlarının tanımlanabilmesi için ileri çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Adana ili ve çevresinde *L.major* ve *L.donovani*'nin otokutanöz KL olgularının etkeni olduğunun bildirilmesi nedeniyle rezervuar çalışmaları gibi vektör çalışmalarının da gerçekleştirilmesi önemlidir¹⁵.

Sonuç olarak, çalışmamızda KL tanı merkezlerinde hastaların tedavilerinin düzenlenmesi ve hastalığın görüldüğü bölgede uygun kontrol yöntemlerinin alınabilmesi için önemli olan *Leishmania* tür ayrımının yapılmasında PCR yöntemlerinin tercih edilmesi gerektiğinin önemi kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Culha G, Uzun S, Özcan K, Memisoglu HR, Chang KP. Comparison of conventional and polymerase chain reaction diagnostic techniques for leishmaniasis in the endemic region of Adana Turkey. Int J Dermatol 2006; 45(5): 569-72.
2. Gürel MS, Ulukanligil M, Özbilge H. Cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa, epidemiologic and clinical features of the last four years (1997-2000). Int J Dermatol 2002; 41(1): 32-7.
3. Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgün MK, Özbel Y. Cutaneous Leishmaniasis in Turkey. Türkiye Parazit Derg 2012; 36(2): 121-9.
4. Akkafa F, Dilmec F, Alpua Z. Identification of *Leishmania* parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region Şanlıurfa province in Turkey. Parasitol Res 2008; 103(3): 583-6.

5. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, et al. A real-Time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7(5): e2205.
6. Yıldız Zeyrek F, Gürses G, Uluca N, et al. Is the agent of cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa changing? First cases of *Leishmania major*. Türkiye Parazitol Derg 2014; 38(4): 270-4.
7. Control of the leishmaniasis: Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. World Health Organization; Geneva: 2010.
8. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006; 44(4): 1435-9.
9. Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia). J Clin Microbiol 2002; 40(2): 601-6.
10. Mohaghegh M, Fata A, Salehi G, et al. Molecular identification of *Leishmania* species using samples obtained from negative stained smears. Iran J Parasitol 2013; 8(2): 337-41.
11. Anders G, Eisenberger CL, Jonas F, Greenblatt CL. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA specific primers. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96(Suppl 1): S87-92.
12. Ok UZ, Balcioglu İC, Taylan Ozkan A, Özensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Trop 2002; 84(1): 43-8.
13. Uzun S, Durdu M, Culha G, Allahverdiyev AM, Memisoglu HR. Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. J Parasitol 2004; 90(4): 853-9.
14. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of minixon region. Diag Microbiol Infect Dis 2005; 53(3): 209-14.
15. Koltas IS, Eroglu F, Alabaz D, Uzun S. The emergence of *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in southern Turkey. Trans R Soc Trop Med Hyg 2014; 108(3): 154-8.
16. Abdolmajid F, Ghodrattollah SS, Hushang R, Mojtaba MB, Ali MM, Abdolghayoum M. Identification of *Leishmania* species by kinetoplast DNA-polymerase chain reaction for the first time in Khaf district, Khorasan-e-Razavi province, Iran. Trop Parasitol 2015; 5(1): 50-4.
17. Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbi M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis, a comparison with the parasitological methods. Parasitol Res 2008; 103(5): 1159-62.
18. Moultaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. Parasit Vectors 2014; 7: 420.
19. Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. Am J Trop Med Hyg 2007; 76(5): 896-901.
20. Khiami A, Dereure J, Pratlong F, Martini A, Rioux JA. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* MON-26 in the region of Damascus (Syria). Bull Soc Pathol Exot 1991; 84(4): 340-4.
21. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update, Cutaneous leishmaniasis in US military personnel-Southwest/Central Asia 2002-2004 MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004; 53(12): 264-5.
22. Talari SA, Talaei R, Shajari G, Vakili Z, Taghaviardakani A. Childhood cutaneous leishmaniasis, report of 117 cases from Iran. Korean J Parasitol 2006; 44(4): 355-60.
23. Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Şanlıurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. Clin Vaccine Immunol 2007; 14(11): 1409-15.