

Türkiye’de Kutanöz Leşmanyaziste Kemiricilerin Rolü Var mı?

Do the Rodents Have a Role in Transmission of Cutaneous Leishmaniasis in Turkey?

Ahmet ÖZBİLGİN¹, İbrahim ÇAVUŞ¹, Ahmet YILDIRIM¹, Cumhur GÜNDÜZ²

¹ Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Manisa, Turkey.

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

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

Geliş Tarihi (Received): 01.12.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.05.2018

ÖZ

Dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde ve özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın görülen leşmanyazis, vektörü olan kum sinekleri (*Phlebotomus* spp.) aracılığıyla insanlara bulaşan *Leishmania* türlerinin neden olduğu, zoonotik/antroponotik karakterli bir paraziter enfeksiyondur. *Leishmania* türlerinin doğadaki taşıyıcıları parazit ile enfekte çeşitli vahşi ve evcil karnivorlar, kemiriciler ile insanlar sayılabilir. Bu çalışma, ülkemizin doğal ortamında bulunan ve kutanöz leşmanyazis (KL) için rezervuar olabilecek *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* ve *Mus* cinsi kemiricilerin *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major* ve *Leishmania donovani*'yi taşıyıp yayabilme potansiyellerinin olup olmadığını deneysel olarak araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, Türkiye’de yaşayan kemiricilerden *Mus musculus* (Balb/C fare), *Mesocricetus auratus* (hamster), *Meriones unguiculatus* (gerbil) ve *Rattus norvegicus* (rat) türleri kullanılmıştır. Deney hayvanlarının ayak tabanlarına KL hastalarından alınmış yerli *L.tropica*, *L.infantum*, *L.major* ve *L.donovani* izolatlarının kültürde üretilmiş promastigotları intradermal yolla 10^8 promastigot/ml yoğunluğunda olacak şekilde enjekte edilmiştir. Enfekte edilen hayvanların ayak tabanlarındaki lezyonların büyüklüğü 12 hafta boyunca ölçülmüştür. Çalışmanın sonunda deney hayvanları sakrifiye edilmiş ve yapılan otopsilerinde ayak tabanı, karaciğer, dalak ve testislerinden “touch preparat” alınarak Giemsa ile boyanıp incelenmiş ve zenginleştirilmiş NNN besiyerlerine ekimleri yapılmıştır. Bütün deney hayvanlarının ayak tabanından hazırlanan yayma preparatlarda *Leishmania* amastigotları görülmüş ve yine ayak tabanından alınan materyallerin ekildiği besiyerlerinde promastigotlar saptanmıştır. Buna karşın, aynı işlemlerin uygulandığı karaciğer, dalak ve testis dokularında her grubun pozitif olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre deney gruplarındaki tüm hayvanlarda KL geliştiği fakat iç organ yayılımının her grupta gelişmediği görülmüştür. Buna göre; (a) *M.unguiculatus* ve *M.musculus*'da tüm *Leishmania* türlerinin KL'ye ve iç organ yayılımına neden olduğu, (b) *R.norvegicus* cinsi kemiricilerde yalnız *L.tropica*'nın KL'ye ve iç organ yayılımına, diğer *Leishmania* türlerinin ise yalnız KL'ye neden olduğu; (c) *M.auratus*'da ise yalnız *L.donovani*'nin KL'ye diğer türlerin ise hem KL'ye hem de iç organ yayılımına neden olduğu gözlenmiştir.

İletişim (Correspondence): Ahmet Yıldırım, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye. Tel (Phone): +90 507 881 8920, E-posta (E-mail): ahmetyildirim.par@yahoo.com

Bu çalışmada, ülkemizin doğal ortamında bulunan ve leşmanyazis için rezervuar olabilecek *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* ve *Mus* cinslerinin deneysel olarak *L.tropica*, *L.infantum*, *L.major* ve *L.donovani*’yi taşıyıp yayabilme potansiyelleri olduğu saptanmış ve yerli *Leishmania* suşlarının potansiyel taşıyıcı kemiricilerde oluşturduğu klinik tablolar konusunda önemli bilgiler toplanmıştır.

Anahtar sözcükler: *Leishmaniasis*; *zoonoz*; *rezervuar*; *kemirici*; *Türkiye*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic/anthroponotic vector borne parasitic infection which is caused by *Leishmania* species and transmitted by sand flies (*Phlebotomus* spp.) The reservoirs of *Leishmania* species in nature are various wild and domestic carnivores, rodents and human. The aim of this study was to investigate whether the rodents in genera *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* and *Mus* which inhabit in the natural habitat of our country could be natural reservoirs of *Leishmania tropica*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major* and *Leishmania donovani* for cutaneous Leishmaniasis (CL)., The rodents *Mus musculus* (Balb/C mouse), *Mesocricetus auratus* (hamster), *Meriones unguiculatus* (gerbil) and *Rattus norvegicus* (rat) which are part of the natural habitat in Turkey were used in the study. *L.tropica*, *L.infantum*, *L.major* and *L.donovani* promastigote isolates obtained from CL patients and cultured in enriched media were injected in the footpads of the animals intradermally using the density of 10^8 promastigote/ml. The scale of the lesions on the footpads of the animals were measured for 12 weeks. At the end of the experiment, the animals were sacrificed and “touch preparations” were prepared using footpad, liver, spleen and testicles of the sacrificed animals and were examined using Giemsa stained slides following culturing in enriched NNN medium. *Leishmania* amastigotes were seen in the slides prepared from the footpads of the all experimental animals and all cultures were positive for promastigotes prepared from the same clinical material. But not all the experiment groups were positive for the liver, spleen and testicle preparations. According to these results it was concluded that while all rodents in the experiment groups were positive for CL, only a part of the experiment groups were positive for internal organ involvement. Accordingly, (a) All *Leishmania* strains caused both CL and internal organ involvement in *M.unguiculatus* and *M.musculus*, (b) only *L.tropica* caused CL and internal organ involvement in *R.norvegicus*, while other *Leishmania* strains only caused CL in this group, (c) in *M.auratus* only *L.donovani* caused CL while other strains caused both CL and internal organ involvement. In our study, it was determined that the rodents *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* and *Mus* genera which are part of our country’s natural habitat could serve as natural reservoirs of *L.tropica*, *L.infantum*, *L.major* and *L.donovani*, thus having the potential for the spreading of Leishmaniasis in our country and important information were gathered concerning the clinical aspects of the infection caused by *Leishmania* species in their potential reservoir hosts.

Keywords: *Leishmaniasis*; *zoonosis*; *reservoir*; *rodent*; *Turkey*.

GİRİŞ

İnsanlarda 30 *Leishmania* türünün 21’i leşmanyazise neden olmaktadır. Bu farklı türler morfolojik olarak ayırt edilememekte ancak izoenzim analizleri, moleküler yöntemler ve monoklonal antikorlar kullanılarak ayırımları gerçekleştirilmektedir¹. *Leishmania* cinsine ait türlerin yaşam dönemlerinde memeli konakta görülen amastigot ve vektörde görülen promastigot olmak üzere iki farklı morfolojik form bulunmaktadır^{2,3}. *Leishmania* türlerinin vektörleri, Eski Dünya leşmanyazisinde *Phlebotomus* cinsi, Yeni Dünya leşmanyazisinde ise *Lutzomyia* cinsi kum sinekleridir. Enfeksiyonun doğadaki kaynakları parazit ile enfekte vahşi/evcil karnivorlar, küçük memeliler ve insanlardır. Kum sineklerinin enfekte rezervuar konak veya insandan emdiği kan ile alınan parazit, vektörün vücudunda morfolojik ve biyolojik olarak değişime uğramakta, vektörün tekrar kan emmek için bir omurgalıyı sokması durumunda parazit yeni bir konağa nakledilmektedir.

Antarktika dışında bütün kıtalarda yayılım gösteren ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından en önemli altı tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen leşmanyazis, dünyada 20 milyon insanın enfekte olduğu, yıllık ek olgu sayısı 400 bin olan ve yaklaşık 350 milyon insanı tehdit eden zoonotik/antroponotik karakterli bir paraziter enfeksiyondur. *Leishmania* türleri memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olup enfekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri tarafından kan emme sırasında bulaştırılmaktadır. *Leishmania* türleri, visseral leşmanyazis (VL), kutanöz leşmanyazis (KL) ve mukokutanöz leşmanyazis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik tablo oluşturmaktadır. *Leishmania donovani*'nin VL etkeni olduğu durumlarda tedavi sonrası deride ortaya çıkan ve post kala-azar deri leşmanyazisi olarak adlandırılan klinik şekli de son yıllarda dördüncü klinik tablo olarak kabul edilmiştir^{4,5}.

VL ve KL, Eski ve Yeni Dünya'da farklı *Leishmania* türleri tarafından oluşturulmaktadır. Eski Dünya leşmanyazisi genellikle endemik karakterlidir, bazen Hindistan ve Afrika ülkelerinde epidemilere de yol açmaktadır. Ülkemizde Ege ve Akdeniz Bölgelerinde daha sık olmak üzere *Leishmania infantum*'un etken olduğu VL; Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz Bölgelerinde ise *Leishmania tropica*'nın etken olduğu KL görülmektedir. Endemik bölgelerde yaşayan veya yakın zamanda endemik bölgeye seyahat eden ve bu klinik belirtilerle başvuran, özellikle küçük yaş grubu olgular mutlaka VL yönünden araştırılmalıdır. Kendiliğinden iyileşmesi genelde bir yıl sürdüğü için ülkemizde halk arasında "Yıl Çıbanı" adı da verilen KL ise daha çok, uzun sürede geçmeyen, özellikle yüz ve ellerde görülen ülser ile kendini göstermektedir⁶.

Suriye'de 2009 yılında 46.398 ve 2010 yılında 42.165 KL olgusu bildirilmiştir^{7,8}. İç savaşın devam ettiği ülkede son zamanlardaki yıllık olgu sayısının 250.000 olduğu tahmin edilmektedir. KL hastası Suriyeli mültecilerin bir kısmı ülkemize gelmekte ve bu kişiler kamplarda kalmakta bazıları ise değişik şehirlerimize yerleşmektedir. Bu kişilerin durumları SB Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü'nün ilgili birimleri tarafından takip edilmekte ve kayıt altına alınmaya çalışılmaktadır^{9,10}. Suriyeli mültecilerden önemli bir kısmının KL hastası olduğu bilinmektedir¹¹. Bu durum, KL'nin ülkemizdeki önemini arttırmakta ve Türkiye'de var olan halk sağlığı sorununun arttırmasından endişe edilmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizin doğal ortamında bulunan *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* ve *Mus* cinsi kemiricilerin *L.tropica*, *L.infantum*, *L.major* ve *L.donovani* türlerinin doğal rezervuarı olup olmadığını deneysel olarak araştırmak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Leishmania İzolatları

Bu çalışmada, ülkemizdeki KL hastalarından elde edilen yerli *L.tropica* (MHOM/TR/2012/CBCL-LT), *L.major* (MHOM/TR/2014/CBCL-LM), *L.infantum* (MHOM/TR/2012/CBCL-LI) ve *L.donovani* (MHOM/TR/2014/CBCL-LD) izolatları kullanılmıştır. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalında bulunan parazit bankasında sıvı azot tankında saklanan izolatlar, uygun koşullar altında zenginleştirildi ve

NNN besiyerinde üretildi. Zenginleştirilmiş NNN besiyerinde üremeye başlayan promastigotlar, içerisinde %10 fetal dana serumu olan RPMI 1640 besiyerine + aktarıldı ve 25°C sıcaklığa ayarlanmış etüv içerisinde 10 gün süresince bekletildi, bu süre sonunda logaritmik faza giren promastigotlar mikroskopta sayılarak 10^8 promastigot/ml yoğunluğunda olacak şekilde promastigot süspansiyonu hazırlandı.

Leishmania İzolatlarının Deney Hayvanlarına İnokülasyonu

Beş erkek *Mus musculus* (Balb/C fare), beş *Mesocricetus auratus* (hamster), beş *Meriones unguiculatus* (gerbil) ve beş *Rattus norvegicus* (rat)'dan oluşan 16 deney grubu ve dört kontrol grubundan oluşan 20 çalışma grubu oluşturuldu (Tablo I). Daha sonra deney grubundaki her bir deney hayvanının sağ ayak tabanına intradermal yolla 10^8 promastigot/ml yoğunluğundaki promastigot süspansiyonundan 100 µl olacak şekilde

Tablo I. Deney Hayvanı Çalışma Grupları ve Bu Gruplardaki Deney Hayvanı Sayısı

Deney Grubu	Parazit	Deney Hayvanı	
		Adı	Sayısı
1	<i>L.tropica</i>	<i>Mus musculus</i>	5
2		<i>Mesocricetus auratus</i>	5
3		<i>Meriones unguiculatus</i>	5
4		<i>Rattus norvegicus</i>	5
5	<i>L.major</i>	<i>Mus musculus</i>	5
6		<i>Mesocricetus auratus</i>	5
7		<i>Meriones unguiculatus</i>	5
8		<i>Rattus norvegicus</i>	5
9	<i>L.infantum</i>	<i>Mus musculus</i>	5
10		<i>Mesocricetus auratus</i>	5
11		<i>Meriones unguiculatus</i>	5
12		<i>Rattus norvegicus</i>	5
13	<i>L.donovani</i>	<i>Mus musculus</i>	5
14		<i>Mesocricetus auratus</i>	5
15		<i>Meriones unguiculatus</i>	5
16		<i>Rattus norvegicus</i>	5
Kontrol Grubu			
1	Serum fizyolojik	<i>Mus musculus</i>	5
2		<i>Mesocricetus auratus</i>	5
3		<i>Meriones unguiculatus</i>	5
4		<i>Rattus norvegicus</i>	5

Leishmania promastigotları enjekte edildi. Kontrol gruplarındaki deney hayvanlarının sağ ayak tabanlarına serum fizyolojik verildi ve bu ayak ölçüleri deney gruplarındaki deney hayvanlarının lezyon gelişen ayak ölçülerinin değerlendirilmesinde kontrol olarak kullanıldı.

Yapılan enjeksiyonlar sonrasında 12 hafta boyunca çalışmadaki tüm deney hayvanlarının ayak ölçümleri yapıldı. Çalışmanın sonunda deney hayvanlarına yapılan otopside ayak tabanı, karaciğer, dalak ve testisleri alınarak iki adet "touch" preparat yapıldı, bir tanesi metil alkolle tesbit sonrası Giemsa ile boyanarak mikroskop altında (x1000) *Leishmania* amastigotlarının varlığı açısından incelendi, diğer preparat ise moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı ve moleküler yöntemlerle parazit varlığı araştırıldı. Ayrıca alınan doku örneklerinin zenginleştirilmiş NNN besiyerine ekimleri yapılarak *Leishmania* promastigotlarının varlığı araştırıldı.

Moleküler Yöntemler

Yayma preparatlarından "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roch, Almanya)" ile DNA izolasyonu yapıldı. Örnekler testin uygulanması aşamasına kadar -20°C'de saklandı.

Çalışmada, ITS1 ve hsp70 gen bölgesine özgü primer ve probalar kullanılarak gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) testi uygulandı. *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi primer ve probalar kullanılarak çoğaltıldı¹². Rt-PCR analizi için hazırlanan toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımı; 20-50 ng genomik DNA, 1.5 µl H₂O (PCR grade water), 10 µM forward ve reverse primerlerden 1 µl, her bir 4 µM probe için 0.5 µl, 12.5 µl 2 X QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen, Almanya) içermektedir.

Rt-PCR cihazında (Rotor-Gene® Q) uygulanan protokol; 15 dakika 95°C'da başlangıç denatürasyonunu takiben 95°C'da 15 saniye denatürasyon, 50°C'da 30 saniye bağlanma, 72°C'de 20 saniye uzama döngülerinin 40 kez tekrarlanması sonrası ve 95°C'da 1 dakika son uzama döngüsü ile 40°C'da 1 dakika melting uygulaması şeklinde gerçekleştirildi. İleri tür ayrımı ise hsp70 gen bölgesine özgü primer ve probalar kullanılarak Rt-PCR testi ile sağlandı¹³. Hsp70 gen bölgesine özgü primer ve probalar için uygulanan PCR protokolü; 95°C'da 15 dakika başlangıç denatürasyonu takiben 35 döngü 94°C'da 40 saniye denatürasyon, 61°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama ve ardından 72°C 10 dakika son uzama döngüsü ile tamamlandı. Bu testlerin ardından *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum* ve *L. donovani* türlerinin ayrımı gerçekleştirildi.

BULGULAR

Deney gruplarındaki tüm deney hayvanlarının sağ ayak tabanlarında lezyon olduğu ve kontrol gruplarındaki deney hayvanlarının sağ ayak tabanlarının ise normal görünümünü korudukları görülmüştür (Resim 1-4). Ayrıca, deney gruplarındaki tüm deney hayvanlarının ayak tabanından hazırlanan yayma preparatlarda *Leishmania* amastigotları görülmüş ve hayvanların ayak tabanından alınan klinik materyallerin



Resim 1. *Mus musculus* ayakta KL lezyonu.



Resim 2. *Mesocricetus auratus* ayakta KL lezyonu.



Resim 3. *Meriones unguiculatus* ayakta KL lezyonu.



Resim 4. *Rattus norvegicus* ayakta KL lezyonu.

ekimlerinin yapıldığı besiyerlerinde promastigotlar saptanmıştır. Ancak, aynı işlemlerin uygulandığı karaciğer, dalak ve testis dokularında her deney grubunun pozitif olmadığı saptanmıştır. Kontrol gruplarında ise herhangi bir leişmanyazis bulgusuna rastlanmamıştır. Bu sonuçlara göre deney gruplarındaki tüm deney hayvanlarında KL geliştiği ancak iç organlara yayılımın her grupta gelişmediği görülmüştür.

Buna göre *M.unguiculatus* (gerbil) ve *M.musculus* (Balb/C fare)'da tüm *Leishmania* türlerinin KL oluşturduğu ve iç organlara yayıldığı tespit edilirken, *R.norvegicus* (rat) cinsi kemiricilerde *L.tropica*'nın KL oluşturmasının yanı sıra iç organlara yayılım gösterdiği, diğer türlerin ise yalnızca KL oluşturduğu saptanmıştır. *M.auratus* (hamster)'da ise *L.donovani*'nin yalnızca KL'e neden olduğu diğer türlerin ise hem KL oluşturduğu hem de iç organlara yayıldığı gözlemlenmiştir (Tablo II).

Tablo II. *Leishmania* Türlerinin Deney Hayvanlarında Oluşturduğu Leşmanyazis Klinik Formları

	<i>M.musculus</i>	<i>M.auratus</i>	<i>M.unguiculatus</i>	<i>R.norvegicus</i>
<i>L.tropica</i>	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı
<i>L.major</i>	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL
<i>L.infantum</i>	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL ve iç organ yayılımı	KL
<i>L.donovani</i>	KL ve iç organ yayılımı	KL	KL ve iç organ yayılımı	KL

Leishmania parazitinin ITS1 bölgesine özgü primer ve probler ile gerçek zamanlı PCR yöntemiyle hayvanlardan alınan klinik örneklerin kullanıldığı tanıya yönelik çalışmalarda *L.tropica*, *L.major* ve *L.infantum/L.donovani* türlerine uygun erime eğrileri saptanmıştır. *L.infantum* ve *L.donovani* türlerinin ayrımı hsp70 bölgesine özgü primer ve probler ile gerçek zamanlı PCR yönteminde uygun erime eğrisinin görülmesiyle yapılmıştır. Deney gruplarındaki tüm deney hayvanlarında gelişen KL enfeksiyonu ve bazı deney hayvanlarının iç organlarında parazit varlığı gerçek zamanlı PCR yöntemiyle doğrulanmıştır. Kontrol gruplarındaki tüm deney hayvanlarında *Leishmania* DNA'sı saptanmamıştır.

Leishmania türleri ile enfekte deney hayvanı gruplarının çalışma başlangıcındaki ve sonundaki ortalama milimetrik ayak tabanı ölçüm değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo III'te verilmiştir. Kontrol gruplarındaki tüm deney hayvanlarının çalışma başlangıcı ve sonunda tespit edilen ayak ölçümleri arasında herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Tablo III).

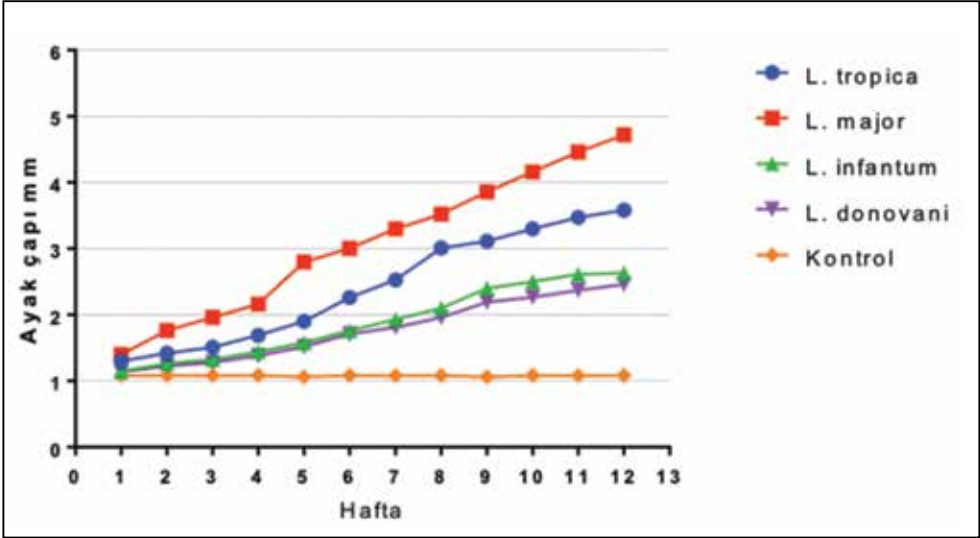
M.musculus (Balb/C fare), *M.auratus* (hamster), *M.unguiculatus* (gerbil) ve *R.norvegicus* (rat) türlerinde lezyon büyüklüğü bakımından en fazla patolojik etkiyi sırasıyla *L.major*, *L.tropica*, *L.infantum* ve *L.donovani* türlerinin gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1-4).

GraphPad Prism v. 6.0 (CA, ABD) istatistik programı kullanılarak yapılan Dunnett's çoklu karşılaştırma testine göre; *M.musculus* (Balb/C fare)'da ayak tabanındaki lezyon gelişimi, *L.tropica*, *L.major* ve *L.infantum* türleri ile enfekte edilen ayak ölçülerinin kontrol grubu ayak ölçüleriyle karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *L.donovani* ile enfekte edilen hayvanların ayak ölçüleriyle kontrol grubu ayak ölçülerinin karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ($p > 0.05$).

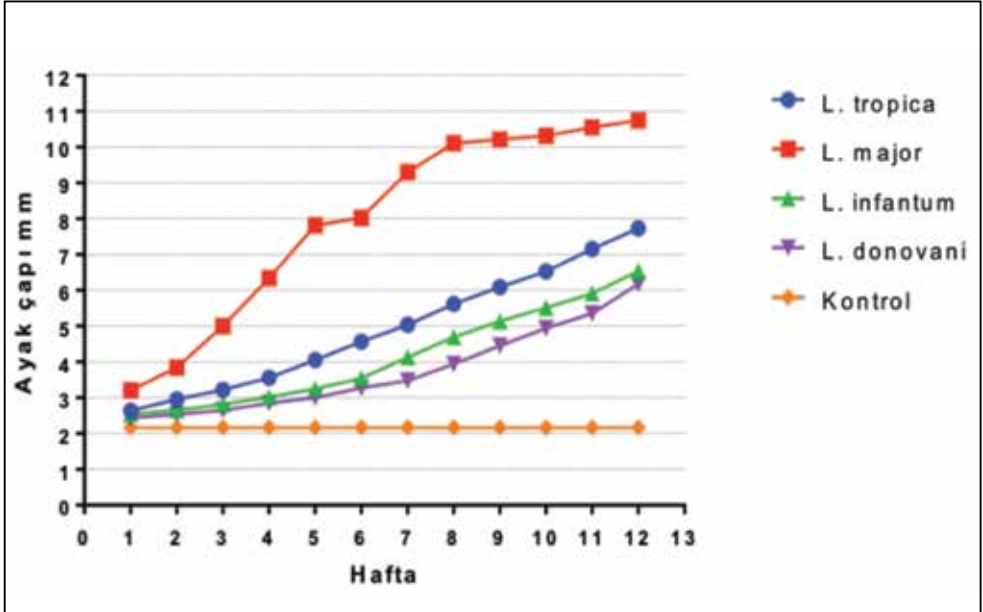
M.auratus (hamster) ayak tabanındaki lezyon gelişiminin, *L.tropica*, *L.major* ve *L.infantum* türleri ile enfekte edilen ayak ölçülerinin kontrol grubu ayak ölçüleriyle karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *L.donovani* ile enfekte

Tablo III. *Leishmania* Türleri ile Enfekte Deney Hayvanı Gruplarının Çalışma Başındaki ve Çalışma Sonundaki Ortalama Milimetrik Ayak Tabanı Ölçümleri

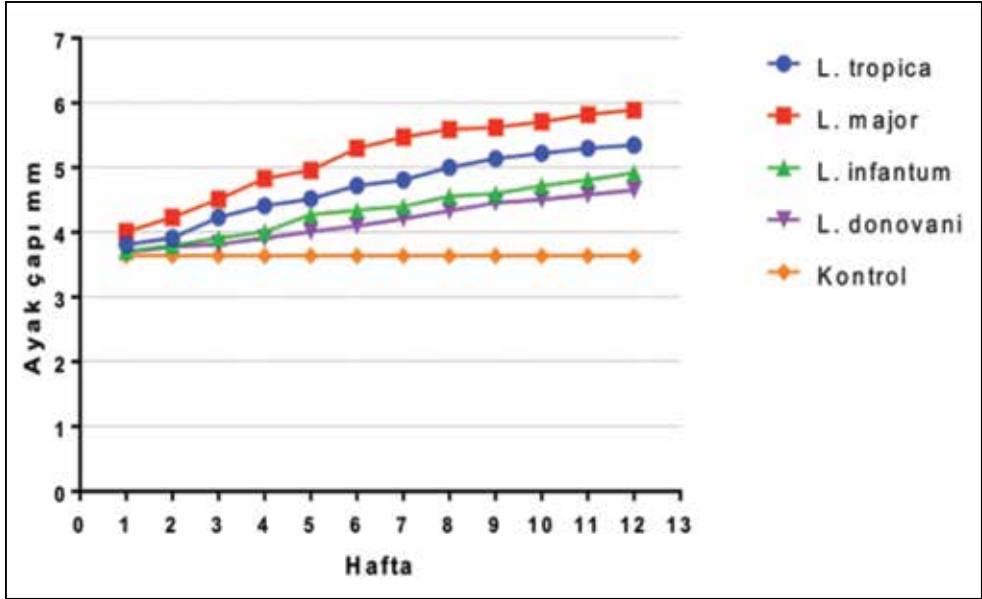
	<i>M.musculus</i>		<i>M.auratus</i>		<i>M.unguiculatus</i>		<i>R.norvegicus</i>	
	1. hafta	12. hafta	1. hafta	12. hafta	1. hafta	12. hafta	1. hafta	12. hafta
<i>L.tropica</i>	1.30	3.58	2.64	7.73	3.81	5.35	3.23	4.11
<i>L.major</i>	1.42	4.73	3.21	10.75	4.01	5.89	3.26	5.25
<i>L.infantum</i>	1.15	2.63	2.55	6.53	3.71	4.92	3.21	3.59
<i>L.donovani</i>	1.14	2.44	2.43	6.17	3.70	4.65	3.20	3.54
Kontrol	1.08	1.08	2.17	2.17	3.64	3.64	3.19	3.19



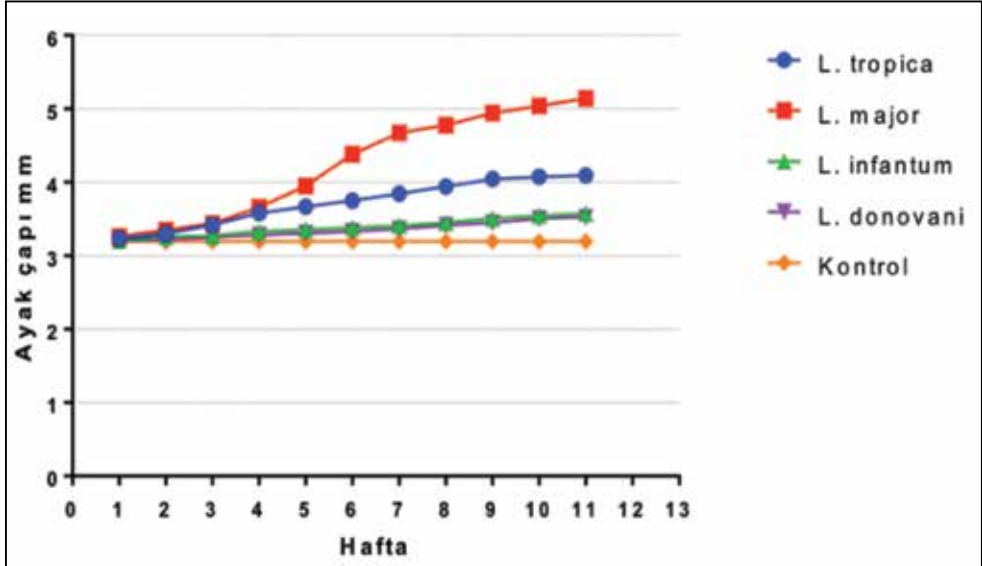
Şekil 1. *M.musculus* (Balb/C fare) ayak tabanında her bir *Leishmania* türü için haftalara göre lezyon gelişimi.



Şekil 2. *M.auratus* (hamster) ayak tabanında her bir *Leishmania* türü için haftalara göre lezyon gelişimi.



Şekil 3. *M. unguiculatus* (gerbil) ayak tabanında her bir *Leishmania* türü için haftalara göre lezyon gelişimi.



Şekil 4. *R. norvegicus* (rat) ayak tabanında her bir *Leishmania* türü için haftalara göre lezyon gelişimi.

edilen ayak ölçülerinin kontrol ayak ölçüleriyle karşılaştırılmasında ise anlamlılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

M.unguiculatus (gerbil) ayak tabanındaki lezyon gelişimi, *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* türleri ile enfekte edilen ayak ölçülerinin kontrol grubu ayak ölçüleriyle karşılaştırılması sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

R.norvegicus (rat) ayak tabanındaki lezyon gelişimi, *L.tropica* ve *L.major* türleri ile enfekte edilen ayak ölçülerinin kontrol grubu ayak ölçüleriyle karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). *L.infantum* ve *L.donovani* türleriyle enfekte edilen ayak ölçüleri kontrol grubu ayak ölçüleriyle karşılaştırıldığında ise herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır ($p > 0.05$).

TARTIŞMA

İran'ın güneyindeki endemik bölgede yapılan bir saha çalışmasında yirmi *Tatera indica*, sekiz *Meriones crassus* ve dört *Gerbillus* türü yakalanmış ve bu kemiricilerden dört *T.indica* ve iki *Gerbillus* türünün karaciğer ve dalaklarından hazırlanan preparatlarda ve bu örneklerden NNN besiyerine yapılan ekimler sonucunda parazite rastlandığı bildirilmiştir. PCR ile yapılan moleküler çalışmalarda saptanan parazitin *L.major* olduğu belirtilmiştir¹⁴.

İran'da KL'nin endemik olduğu bir bölgeden yakalanan 69 adet kemirgende PCR kullanılarak *Leishmania* türlerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir araştırmada, yakalanan 19 adet *Rhombomys opimus* türünün dördünde, 21 adet *Meriones libicus* türünün üçünde ve 29 adet *Meriones persicus* türünün ikisinde olmak üzere toplam dokuz kemiricide PCR yöntemi ile *L.major* ve bir *M.persicus*'ta *L.tropica* saptanmıştır¹⁵.

Orta İran'da KL'nin endemik olduğu bir alanda yakalanan kemirici türlerinden *Rhombomys opimus* türü kemirgenlerin %91.9'unun kulaklarından yapılan preparatlarda *Leishmania* amastigotları saptanmıştır. Daha sonra PCR yöntemi ile de bu verilerle uyumlu sonuçlar alınmış ve bu parazitin *L.major* olduğu bildirilmiştir. Leyşmanyazis'in görüldüğü bu bölgelerdeki potansiyel rezervuar konaklarının saptanarak bu hastalığı önleme programlarının söz konusu konakların da rolü göz önüne alınarak yeniden düzenlenmesi gerektiği belirtilmiştir¹⁶.

Moğolistan'da Gobi çölünde yapılmış olan çalışmalarda toplanan 39 *Rhombomys opimus* (büyük gerbil) örneğinin sekizinden *Leishmania* spp. izole edilmiştir¹⁷.

İspanya'nın güneyinde Granada ilinde yapılan bir çalışmada 37 yabani kemirici (yirmi dört *Apodemus sylvaticus*, dokuz *R.rattus*, dört *M.musculus*) doğadan kapanlar yardımıyla yakalanmıştır. Yapılan fiziksel muayenede, baş bölgesinde alopesi gözlenen bir dişi *A.sylvaticus* ve bir dişi *R.rattus* dışındaki kemiricilerde deri lezyonuna rastlanmamıştır. Moleküler incelemeler (PCR) sonucunda 10 kemiricide (beş *A.sylvaticus*, üç *R.rattus*, iki *M.musculus*) *L.infantum* saptanmıştır¹⁸.

İran’ın kuzeyinde Damghan ilinde yapılan bir çalışmada *Nesokia indica* (s= 95), *M.musculus* (s= 3) ve *Microtus socialis* (s= 2) kemirici türlerinden 100 kemirici doğadan canlı olarak yakalanmış ve parazitolojik ve moleküler (nested-PCR) yöntemler kullanılarak kemiricilerdeki leşmanyazis enfeksiyonunun varlığı araştırılmıştır. Kemiricilerin 71’inde parazitolojik inceleme sonucunda *Leishmania* amastigotları saptanmıştır. *N.indica* türüne ait 15 kemiricinin *L.major*, bir kemiricinin ise *L.infantum* ile enfekte olduğu moleküler yöntemlerle (nested-PCR) bulunmuştur¹⁹.

Yunanistan’ın kuzeyindeki çeşitli bölgelerden toplanan 97 kemirici (66 *M.musculus*, 19 *R.norvegicus* ve 12 *R.rattus*), sitoloji (dalak ve karaciğer simirleri), seroloji (ELISA) ve PCR (gerçek zamanlı ve jel bazlı) yöntemleri kullanılarak kemiricilerdeki *Leishmania* enfeksiyonunun prevalansı araştırılmıştır. Tüm sitoloji preparatları negatif bulunmuştur. Tüm kemiricilerin %54.5’inde (*R.norvegicus* türünde %70, *R.rattus* türünde %50 ve *M.musculus* türünde %50) spesifik IgG antikorları saptanmıştır. Tüm örneklerin %19.6’sı (*R.rattus* türü kemiricilerde %25, *M.musculus* türü kemiricilerde %24 oranında saptanmış olup, *R.norvegicus* türü kemiricilerde saptanmamıştır) en az bir moleküler yöntem ile pozitif bulunmuştur²⁰.

Suudi Arabistan’da yapılan bir çalışmada VL’li hastaların saptandığı bölgeden yakalanmış olan 22 *R.rattus*’tan bir tanesinin *L.infantum*, üç tanesinin *L.donovani* ile enfekte olduğu bulunmuştur²¹.

İsrail’in kuzeyinde KL odaklarında yapılan bir çalışmada toplanan 97 *Phlebotomus arabicus* türünden 5 (%5.2)’inin ve 162 *P.sergenti* türünden 2 (%1.2)’sinin *L.tropica* ile enfekte olduğu bulunmuştur. Yine bölgeden toplanan 29 adet *Procvavia capensis*’den üçünde ise PCR ile *L.tropica* bulunduğu bildirilmiştir²².

Şanlıurfa’da bir hastadan elde edilen *L.tropica* izolatu kullanılarak, *M.musculus* üzerinde deneysel enfeksiyon denemeleri yapılan bir çalışmada farelerin parazit ile enfekte olduğu bildirilmiştir²³.

Türkiye’deki bir KL hastasından elde edilen *L.major* izolatinın *M.unguiculatus* (gerbil) türlerinde hem KL hem de VL’ye neden olduğu bildirilmiştir²⁴.

Bizim çalışmamızda da deney gruplarındaki *Mus*, *Mesocricetus*, *Meriones* ve *Rattus* cinslerinden tüm deney hayvanlarının ayak tabanlarında lezyon oluştuğu ve *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* ile enfekte oldukları görülmüştür. Ayrıca ayak tabanından ve karaciğer, dalak ve testislerinden hazırlanan yayma preparatlarda *Leishmania* amastigotları görülmüş ve hayvanların bu dokularından alınan klinik materyallerinin ekimlerinin yapıldığı besiyerlerinde promastigotlar saptanmıştır. *Leishmania* parazitinin ITS1 ve hsp70 bölgelerine özgü primer ve proplar ile gerçek zamanlı PCR yardımıyla hayvanlardan alınan klinik materyaller kullanılarak tanıya yönelik çalışmalarda *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani*’ye uygun erime eğrileri saptanmıştır. Bu da bize deney gruplarındaki tüm deney hayvanı cinslerinin *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* ile enfekte olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı özellikle ülkemizin doğasında bulu-

nan *Meriones*, *Mesocricetus*, *Rattus* ve *Mus* cinslerinin potansiyel taşıyıcı kemiriciler olabileceğini düşündürmektedir.

Ülkemize olan mülteci akını sonucu son zamanlarda giderek artan leşmanyazis enfeksiyonlarının ve buna bağlı olarak dirençli leşmanyazis enfeksiyonlarının görülmesi bu hastalığın yayılmasında etken olan faktörlerin tespit edilmesi zorunluluğunu ortaya koymuştur. Türkiye’de *L.tropica*’nın vektörünün *Phlebotomus sergenti*, *L.major*’un vektörünün *Phlebotomus papatasi* ve *L.infantum*’un vektörünün *Phlebotomus tobbi* olduğu bildirilmiştir²⁵. Kemiricilerin doğada kazdıkları yuvalar, hem ısı ve nem açısından hem de besin kaynağı olarak kan içerdiği için kum sineklerinin yaşama ve beslenmesi açısından uygun ortamlar oluşturmaktadır. *Leishmania* parazitlerinin kemiriciler arasındaki döngüsü burada bulunan vektör kum sinekleri aracılığıyla olmaktadır. Bu durum, etkenin insana bulaşması açısından risk içermektedir. Bu çalışmada, ülkemiz doğasında bulunan potansiyel taşıyıcı kemirici cinslerinden *Mus*, *Mesocricetus*, *Meriones* ve *Rattus* cinslerinin *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* türleri ile laboratuvarında enfekte olabildiği ortaya konulmuştur. Ülkemizde doğada yaşayan kemiricilerde *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* türlerinin taşıyıcılığının saptanması kemiricilerle mücadele konusunda gereken kontrol önlemlerinin alınmasını gerektiren bir durumdur. Ülkemizde de bulunan potansiyel taşıyıcı kemirici cinslerinden *Mus*, *Mesocricetus*, *Meriones* ve *Rattus* cinslerinin *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* ve *L.donovani* türlerini taşıyıp taşımadığını araştırmak amacıyla geniş ölçekli epidemiyolojik projelerin planlanması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın bir bölümü Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün BAP 2015-108 nolu projesi ile desteklenmiştir. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası’na ve sıvı azot temininde yardımcı olan Air Liquide firmasına katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis, pp: 197-241. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (eds), *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 2007. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, No: 22, İzmir.
2. Scholtyseck E. Fine structure of parasitic protozoa, pp: 44-45. An atlas of micrographs, drawing and diagrams. 1979. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
3. Markell EK, John DT, Krotoski WA, pp: 123-88. In: Markell and Voge’s *Medical Protozoology*. 1999, 8th ed. WB Saunders Company. London, United Kingdom.
4. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB, pp:57-71. *Leishmania* and the Leishmanioses, In: *Parasitology and Vector Biology*. 2000, Academic Press, San Diego, USA.
5. Osman OF. The PCR and DAT for diagnosis and management, pp: 49-56. In: Ph.D. Thesis (Osman OF). 1998, Royal Tropical Institute, Amsterdam.
6. Unat EK, Yücel A, Altaş K , pp:570-79. In: Samastı, M. *Unat’ın Tıp Parazitolojisi*. 1991, Dördüncü baskı. İÜ Cerrah Tıp Fak Yayınları, İstanbul.
7. Alvar J, Vélez ID, Bern C, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; 7(5): e35671.

8. AlSamarai AM, AlObaidi HS. Cutaneous Leishmaniasis in Iraq. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(2): 123-9.
9. Tayeh A, Jalouk L, Cairncross S. Twenty years of cutaneous Leishmaniasis in Aleppo, Syria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997; 91(6): 657-9.
10. Syria Ministry of Health of Report, 2013, Damascus.
11. Salman IS, Vural A, Unver A, Sacar S. Cutaneous Leishmaniasis cases in Nizip, Turkey after the Syrian civil war. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48(1): 106-13.
12. 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.
13. Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, et al. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill* 2016; 21(49): 30418.
14. Mehrabani D, Motazedian MH, Oryan A, Asgari Q, Hatam GR, Karamian M. A search for the rodent hosts of *Leishmania major* in the Larestan region of southern Iran: demonstration of the parasite in *Tatera indica* and *Gerbillus* sp., by microscopy, culture and PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2007; 101(4): 315-22.
15. Parvizi P, Moradi G, Akbari G, et al. PCR detection and sequencing of parasite ITS-rDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Parasitol Res* 2008; 103: 1273-8.
16. Rassi Y, Abai MR, Javadian E, et al. Molecular data on vectors and reservoir hosts of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. *Bull Soc Pathol Exot* 2008; 101(5): 425-8.
17. Sambuu G, Sanjoba C, Asada M, et al. Zoonotic *Leishmania* infection among great gerbils in Mongolia. 4th Worldleish, 3-7 February 2009, India. p:83.
18. Navea-Pérez HM, Díaz-Sáez V, Corpas-López V, et al. *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? *Parasitol Res* 2015; 114(6): 2363-70.
19. Pourmohammadi B, Mohammadi-Azmi S, Kalantari M. Natural infection of *Nesokia indica* with *Leishmania major* and *Leishmania infantum* parasites in Damghan city, Northern Iran. *Acta Trop* 2017; 170: 134-9.
20. Tsakmakidis I, Angelopoulou K, Dovas CI, et al. *Leishmania* infection in rodents in Greece. *Trop Med Int Health* 2017; 22(12):1523-32.
21. Ibrahim EA, al-Zahrani MA, al-Tuwaigri AS, et al. *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 9. The black rat (*Rattus rattus*) a probable reservoir of visceral leishmaniasis in Gizan province, south-west Saudi Arabia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86(5): 513-4.
22. Jacobson RL, Eisenberger CL, Svobodona M, et al. Outbreak of cutaneous leishmaniasis in Northern Israel. *J Infect Dis* 2003; 188(7): 1065-73.
23. Girginkardeşler N, Balcioğlu IC, Yereli K, Özbilgin A, Özbel Y. Cutaneous leishmaniasis infection in Balb/c mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey. *J Parasitol* 2001; 87(5): 1177-8.
24. Bakırcı S, Bilgiç HB, Köse O, et al. Deney hayvanı olarak gerbiller (*Meriones unguiculatus*): *Leishmania major* için iyi bir rol model olabilir mi? *Türkiye Parazitoloj Derg* 2015; 39: 212-7.
25. Arserim SK, Çetin H, Töz S, Özbel Y. Kum sinekleri (Diptera: Psychodidae) Vektörlükleri ve Mücadelesi pp: 154, In: Özbel Y (ed), Vektör Artropodlar ve Mücadelesi, 2017, Türkiye Parazitoloji Derneği, İzmir.