

Kutanöz Layşmanyazise Neden Olan Olan *Leishmania* Türlerinin Sybr Green Bazlı ITS-1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Tiplendirilmesi

Typing of *Leishmania* Species Causing Cutaneous Leishmaniasis by Sybr Green Based ITS-1 Real Time Polymerase Chain Reaction Method

Gülcan GÜRSES¹(ID), Nebiye YENTÜR DONİ²(ID), Fadile YILDIZ ZEYREK²(ID), Akın YiĞİN³(ID)

¹ Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Şanlıurfa.

¹ Harran University Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Program Şanlıurfa, Turkey.

² Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

² Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Şanlıurfa, Turkey.

³ Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

³ Harran University Faculty of Veterinary, Department of Zootechnics, Şanlıurfa, Turkey.

Makale Atfı: Gürses G, Yentür Doni N, Yıldız Zeyrek F, Yiğın A. Kutanöz layşmanyazise neden olan olan *Leishmania* türlerinin Sybr Green bazlı ITS-1 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul 2022;56(2):326-338.

ÖZ

Kutanöz layşmanyazis (KL) Türkiye’de en sık Şanlıurfa’da görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. İlimizde olduğu gibi, enfeksiyonun farklı *Leishmania* türleriyle oluştuğu bölgelerde tür tayini yapılması önemlidir. Çalışmamızda Şanlıurfa’dan alınan *Leishmania* şüpheli 136 örneğin, Sybr Green bazlı ITS-1 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) yöntemi kullanılarak tiplendirilmesi ve daha sonra ITS-1 PCR RFLP ve direkt mikroskopik yöntemleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Layşmanyazis şüpheli hasta lezyonlarından yara sıvısı örnekleri lam üzerine alınıp, tespit edilerek Giemsa boyasıyla boyanmıştır. Preparatlar mikroskopta incelenip amastigot pozitifliği yönünden değerlendirilmiştir. Giemsa boyalı preparatlardan, QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra örnekler, LITSR ve L5.8S primerleri kullanılarak Sybr Green bazlı ITS-1 Rt-PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmada PCR sonuçlarına göre, erime eğrisi analizi yapılmış ve erime eğrileri referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Daha sonra, yüz otuz altı örneğe ITS1 bölgesi amplifikasyonu için LITSR ve L5.8S primerleri kullanılarak PCR uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri Hae III restriksiyon enzimiyle kesilerek “restriction fragment length polymorphism (RFLP)” yapılmıştır. Ürünler metaphor agaroz jelde yürütüldükten sonra jeller 15 dakika etidyum bromür ile boyanıp, ultraviyole (UV) transilüminatörde görüntülenmiştir. Çalışmamızda Sybr Green bazlı ITS-1 Rt-PCR, ITS-1 PCR- RFLP ve direkt mikroskopi yöntemlerinin sonuçları kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. En yüksek pozitiflik oranı %97 (136/132) olarak ITS-1 Rt-PCR ile belirlenmiştir. ITS-1 PCR- RFLP %95.5 (136/130) ve direkt mikroskopi ile %94.1 (136/128) oranında pozitiflik saptanmıştır. Sybr Green bazlı ITS-1 Rt-PCR yöntemiyle çalışılıp pozitif bulunan 132 örneğin, erime eğrisi analiziyle 121’i *Leishmania tropica*, 11’i *Leishmania major* olarak tiplendirilmiştir. ITS-1 PCR RFLP ile

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Gülcan Gürses Gülcan Gürses, Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir Kampüsü 63050 Haliliye/Şanlıurfa, Türkiye.
Tel (Phone): +90 414 318 30 00-2348, E-posta (E-mail): ggurses@hotmail.com

çalışılan 130 örneğin 119 (%91.5)'unun *L.tropica*, 11 (%8.5)'inin ise *L.major* olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız ITS-1 Rt-PCR yöntemi en fazla pozitiflik saptayan yöntem olmuştur. Bu yöntemle *Leishmania* örnekleri *L.tropica* ve *L.major* olarak tiplendirilmiştir. PCR sonrası kesim, boyama gibi ekstra işlemler gerektirmemesi ve kısa sürede sonuç vermesi bakımından bu yöntemin *Leishmania* parazitinin varlığını tespit etmesi ve *Leishmania* türlerinin hızlı tanımlanmasında faydalı olabileceği ancak *L.tropica* ve *L.major* dışındaki türlerin saptanmasında etkinliğinin görülebilmesi için yeni çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Layşmanyazis; kutanöz; genotip; PCR.*

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an important public health problem, most frequently seen in Şanlıurfa in Turkey. It is important to determine the species in regions where infection occurs with different *Leishmania* species, as in our province. In this study, it was aimed to genotype 136 samples with suspected *Leishmania* from Şanlıurfa using the Sybr Green-based ITS-1 real time polymerase chain reaction (Rt-PCR) method and then to compare them with ITS-1 PCR RFLP and direct microscopy methods. Wound fluid samples from patient lesions suspected of leishmaniasis were mounted on a slide, fixed, and stained with Giemsa dye. The preparations were examined under the microscope and evaluated for the presence of amastigote. After the extraction of DNA from Giemsa stained preparations by using the QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany), the samples were studied with the Sybr Green based ITS-1 Rt-PCR method using LITSR and L5.8S primers. As a result of the PCR study, melting curve analysis was determined and the melting curves were compared with the reference strains. Then, PCR was performed in 136 samples for ITS1 region amplification using primers LITSR and L5.8S. PCR products were digested with Hae III restriction enzyme and RFLP process was performed. The products were run on metaphor agarose gel than the gels were stained with ethidium bromide for 15 min and visualized in a UV transilluminator. In our study, the results of Sybr Green-based ITS-1 Rt-PCR, ITS-1 PCR-RFLP and direct microscopy methods were compared. The highest positivity rate was determined as 97% (136/132) in ITS-1 Rt-PCR method. With ITS-1 PCR-RFLP method 95.5% (136/130) positivity and with direct microscopy 94.1% (136/128) positivity were obtained, respectively. Of 132 samples, which were studied with the Sybr Green-based ITS-1 Rt-PCR method and found as positive, 121 were genotyped as *L.tropica* and 11 were genotyped as *L.major* by melting curve analysis. It was determined that, of 130 samples studied with ITS-1 PCR RFLP method 119 (91.5%) were detected as *L.tropica* and 11 (8.5%) were detected as *L.major*. The ITS-1 Rt-PCR method we used in our study was the method that detected the most positivity rate. With this method, *Leishmania* specimens were typed as *L.tropica* and *L.major*. It is thought that this method may be useful for the detection of the presence of *Leishmania* parasite and in the rapid identification of *Leishmania* species, as it does not require extra processes such as cutting and staining after PCR and results in a short time, but new studies are needed to observe its effectiveness in detecting other species other than *L.tropica* and *L.major*.

Keywords: *Leishmaniasis; cutaneous; genotype; PCR.*

GİRİŞ

Leishmania dünya çapında görülen, enfekte flebotomların vektörlüğünü yaptığı bir parazit hastalığıdır. Parazitin 20'den fazla türü bulunmaktadır. Hastalığın; en yaygın görülen, yara izi ve doku bozukluklarına yol açan kutanöz layşmanyazis (KL), iç organları tutan, kala azar olarak da bilinen viseral layşmanyazis (VL) ve müköz dokuları da tutan mukokutanöz layşmanyazis olmak üzere üç ana formu bulunmaktadır. Sonraki yıllarda diffüz (yaygın) deri layşmanyazisi (DKL) ve kala-azar sonrası deri layşmanyazisi (PKDL) de bu gruplara eklenmiştir. Viseral layşmanyazis (VL) olgularının çoğu Brezilya, Doğu Afrika ve Hindistan'da görülür. Dünya çapında her yıl tahminen 50 000 ila 90 000 arası yeni VL olgusu meydana gelmektedir. Mukokutanöz layşmanyazis olgularının %90'ı Peru, Bre-

zilya ve Bolivya'da görülmektedir. 2019'da yeni KL olgularının %87'sinden fazlası, Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Irak, Libya, Pakistan, Suriye ve Tunus olarak kaydedilmiştir. Her yıl dünya çapında 600 000 ila 1 milyon arasında yeni KL olgusunun meydana geldiği tahmin edilmektedir¹.

Türkiye'de KL olgularının büyük çoğunluğu Şanlıurfa, Adana, Gaziantep, Hatay, Osmaniye, Kahramanmaraş ve Mersin'de görülmektedir. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamında kurulan barajlar ve sulama kanalları, bölgedeki iklimi, tarım alanlarını, popülasyon yoğunluğunu, layşmanyazis KL etkenlerini artıracak şekilde değiştirmiştir. 1980 sonrası Şanlıurfa ve 1985 sonrası Çukurova bölgesinde KL olgularının sayısı artmıştır. Suriye'deki savaştan kaçarak gelen mültecilerden sonra da Güneydoğu illerimizdeki olgu sayılarında artış görülmüştür. Hastalığın artışında düzensiz göçlerin yanı sıra, hastaların erken tanı ve tedavisinde yaşanan zorluklar da önemlidir²⁻⁶.

Bölgemizde KL etkeni daha önceleri *Leishmania tropica* olarak bildirilirken^{7,8} son yıllarda yapılan çalışmalarda *L.tropica*'nın yanı sıra *Leishmania major* ve *Leishmania infantum*'un da kutanöz layşmanyazise sebep olduğu bildirilmiştir^{5,6}.

Özellikle enfeksiyonun farklı *Leishmania* türleri tarafından oluşturulduğu bölgelerde *Leishmania*'nın tür tanımlamasının yapılabilmesi için PCR- RFLP ya da DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler kullanılması gerekmektedir. Rutinde tanı için kullanılan direkt mikroskopi ve kültür gibi yöntemlerle bu mümkün olmamaktadır^{9,10}.

Bu çalışmada, farklı *Leishmania* türleriyle oluşan layşmanyazis olgularının bulunduğu bölgemizde, Sybr Green temelli Rt-PCR yöntemi kullanılarak *Leishmania* enfeksiyonlarında tanı ve tür ayrımının yapılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.04.2016 ve Karar No: 2016/03).

Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, 2016-2018 yılları arasında *Leishmania* şüpheli hastalardan alınan lezyon sıvısı örnekleri kullanıldı.

Direkt Mikroskopi

Lezyonun kenarı iki parmak arasında sıkılıp sağlam deri ile lezyonun birleştiği noktaya lanset yardımı ile girişimde bulunuldu. Girişim sonrası ilk ortaya çıkan kan silinip sonrasında kansız seröz materyal lam üzerine nazikçe yayıldı. Lamalar havada kurutulduktan sonra metanol ile fikse edilip Giemsa ile boyandı. Giemsa boyalı preparatlar mikroskopta 100x objektifle incelenerek *Leishmania* amastigotların varlığı araştırıldı.

DNA Ekstraksiyonu

Giemsa boyalı preparatlardan, QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. DNA örnekleri çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

PCR RFLP Yöntemi

Leishmania şüpheli örneklerden elde edilen DNA'lara LIT SR (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3') ve L5.8S (5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') primerleri kullanılarak PCR işlemi uygulandı ve *Leishmania* ITS1 bölgesi DNA amplifikasyonu sağlandı.

PCR karışımı; 2 µl DNA, 2.5 µl her bir primer, 0.2 µl Taq DNA polimeraz, 4 µl dNTP karışımı, 5 µl 10x PCR tampon çözeltisi şeklinde hazırlandı ve distile su ile 50 µl'ye tamamlandı. PCR amplifikasyonu için T-100 Thermal Cycler (Biorad, Amerika) cihazı kullanıldı ve amplifikasyon 94°C'de iki dakika ön denatürasyon sonrası 95°C'de 20 saniye denatürasyon, 53°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika polimerizasyon olacak şekilde 33 döngü ve ardından 72°C'de altı dakika son uzama olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen PCR ürünü Hae III restriksiyon enzimiyle (10x tampon, 1.5 µl ddH₂O 2.5 µl, Hae III 0.8 µl, 10 µl PCR ürünü olacak şekilde) 37°C'de bir saat 20 dakika kesim için inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kesim ürünü, 3 µl yükleme boyası, 15 µl kesim ürünüyle karıştırılıp metaphor agaroz jele yüklendi. Örnekler 0.5X TBE tampon çözeltisi ile 100 voltta 70 dakika yürütüldü. Yürütme sonunda jeller, 15 dakika etidyum bromür (0.5µg/ml) ile boyandı ve UV transilüminatörde görüntülendi¹¹. Sonuçlar her test sırasında pozitif kontrol suşları (*L.tropica*, *L.major*, *L.infantum/donovani*) kullanılarak değerlendirildi.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

Rt-PCR çalışmasında ITS1 gen bölgesi amplifikasyonu için LIT SR (5'- CTG GAT CAT TTT CCG ATG- 3') ve L5.8S (5'- TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT- 3') primerleri kullanıldı. DNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve hedef bölgeleri işaretlemek amacıyla Faststart Essential Sybr Green karışımı (Roche, ABD) ticari kiti kullanıldı. Kıtte yer alan prorokole göre PCR karışımı, Sybr Green karışımı 10 µl, (LIT SR) forward primer 500 nM 1µl, (L5,8S) reverse primer 500 nM 1 µl, DNA 5 µl, H2O 3 µl, toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

Hazırlanan *Leishmania* Rt-PCR karışımları, DNA lar ile Light Cycler 96 sistemine ait 96 kuyucuklu mikropaklar üzerinde bir araya getirildikten sonra Rt-PCR işlemine alındı. Isı protokolü olarak; denatürasyon aşamasında 95°C'de 10 dakika, amplifikasyon aşamasında 95°C'de 20 saniye, 50°C'de 20 saniye, 72°C'de 20 saniye (saniyedeki ısı değişimi 1.6°C/sn, 40 döngü), erime eğrisi aşamasında, 95°C'de 30 saniye, 65°'de bir dakika, 97°C'ye kadar her 0.2°C artışta 5 okuma, son olarak soğutma aşamasında 40°C'de bir dakika olarak çalışıldı. Sonuçlar Light Cycler 96 cihazı quantification analiz programı ve TM calling analizi kullanılarak belirlendi.

BULGULAR

Çalışmaya Şark Çıbanı Tanı ve Tedavi Merkezine gelen hastalardan alınan 136 örnek dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların yaş aralığının 1-80 arasında ve yaş ortalamasının 23.62 ± 1.54 olduğu görülmüştür. Hastaların %53.7 (n= 73 hasta)'sinin erkek, %46.3 (n= 63 hasta)'ünün kadın olduğu saptanmıştır.

Hastalardaki lezyon yerleri incelendiğinde lezyonun en sık üst ekstremitelerde ve yüzde olduğu saptanmıştır. Lezyonların %36.8'inin el ve kolda, %34.6'sının yüzde, %7'sinin gövdede, %5.1'inin ayak ve bacaklarda %16.5'inin vücudun diğer muhtelif bölgelerinde olduğu belirlenmiştir. Hastaların lezyon tipine bakıldığında, %54.5'inin ülsere, %40.1'inin nodüler, %4.5'inin papüler ve %0.7'sinin rezidiv tarzda olduğu görülmüştür.

Lezyon süresi, ay olarak minimum 1, maksimum 36 ay arasında, ortalama 4.7 ± 0.42 olarak hesaplanmıştır. Lezyonların %96.2'sinin akut (1-24 ay), %3.8'inin kronik (25 ay ve üzeri) olduğu belirlenmiştir. Lezyon boyutu milimetrik olarak 3-40 mm aralığında, ortalaması 12.23 ± 0.59 mm bulunmuştur.

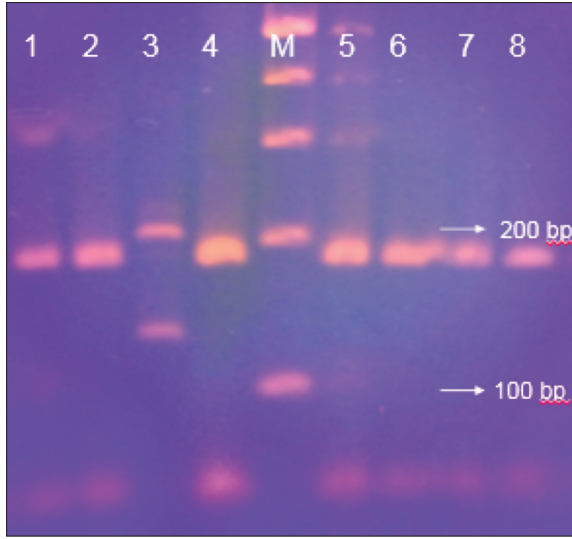
Hastaların lezyon sayılarının 1 ile 10 arasında değiştiği, ortalama lezyon sayısının 2.19 ± 0.16 olduğu görülmüştür. Hastaların %53'ü bir lezyon, %15.2'si iki lezyon, %15.9'u üç lezyon ve %15.9'u dört ve daha fazlası lezyona sahip olduğu saptanmıştır.

KL şüpheli hastalardan alınan 136 lam örneği Giemsa boyası ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir. Yüz otuz altı preparatın 128 (%94.1)'inde *Leishmania* amastigotları gözlenip pozitif olarak değerlendirilmiştir. Preparatların sekizinde ise *Leishmania* amastigotları gözlenmemiş ve negatif kabul edilmiştir.

Çalışmaya alınan 136 örnek, PCR işlemleri için DNA ekstraksiyonuna alınmıştır. DNA ekstraksiyonu yapılan örnekler ITS1 bölgesi amplifikasyonu için LITSR ve L5.8S primerleri kullanılarak PCR işlemi uygulanmıştır. PCR sonrası örneklerin kontrolü için PCR ürünleri %1.5 agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir. Görüntüleme sonunda 300-350 baz çifti (bp) arası büyüklükte bant görüntülenen 130 (%95.5) örneğin ITS1 PCR sonucu pozitif kabul edilmiştir.

Leishmania tür analizi için, ITS1 PCR ürünleri Hae III restriksiyon enzimiyle kesildikten sonra, DNA fragmanlarının görüntülenmesi için %2'lik metaphor agaroz jelde yürütülmüştür. Daha sonra jeller, 15 dakika etidyum bromür (0.5 µg/ml) ile boyanıp ve UV transillüminatörde görüntülenmiştir. Görüntüleme sonuçlarında kullanılan standartlarla uyumlu olarak, yaklaşık 185 bp ve 57 bp olarak iki bant gözlenen örnekler *L.tropica* olarak tanımlanmıştır. Yaklaşık 210 bp ve 160 bp olmak üzere iki bant oluşturan örnekler ise *L.major* olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1). Çalışılan 130 örneğin 119 (%91.5)'unun *L.tropica*, 11 (%8.5)'inin ise *L.major* olduğu belirlenmiştir.

Leishmania şüpheli hastalardan alınan 136 örnek daha sonra Sybr Green bazlı Rt-PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışma sonucunda erime eğrisi analizi yapılmış ve erime eğrileri, daha önce sekans analizleri yapıp gen bankasında yayımlanmış olan MHOM/TR/2017/HRURFA010 ve MHOM/TR/2017/HRURFA160 referans suşlarıyla (Genbank: MH 34725, Genbank: MH347950) karşılaştırılmıştır. Çalışılan 136 örnekten 132 (%97)'si pozitif bulunmuştur. Erime eğrisi analizi ile 121 örnek *L.tropica*, 11 örnek *L.major* olarak belirlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 1. *Leishmania* ITS-1 PCR ürünlerinin *Hae* III restriksiyon enzimiyle kesim profilleri (%2 metaphor agaroz jel). 1-2: *L.tropica*, 3: *L.major*, 4-8: *L.tropica*, M: Moleküler ağırlık belirteci (100 bp).

Tablo 1. Kullanılan Yöntemlere Göre Elde Edilen Sonuçlar (n= 136)

	Pozitif örnek sayısı	<i>L.tropica</i>	<i>L.major</i>
Mikroskopi	136/128 (%94.1)	-	-
ITS1 PCR-RFLP	136/130 (%95.5)	119	11
ITS1 Rt- PCR	136/132 (%97)	121	11

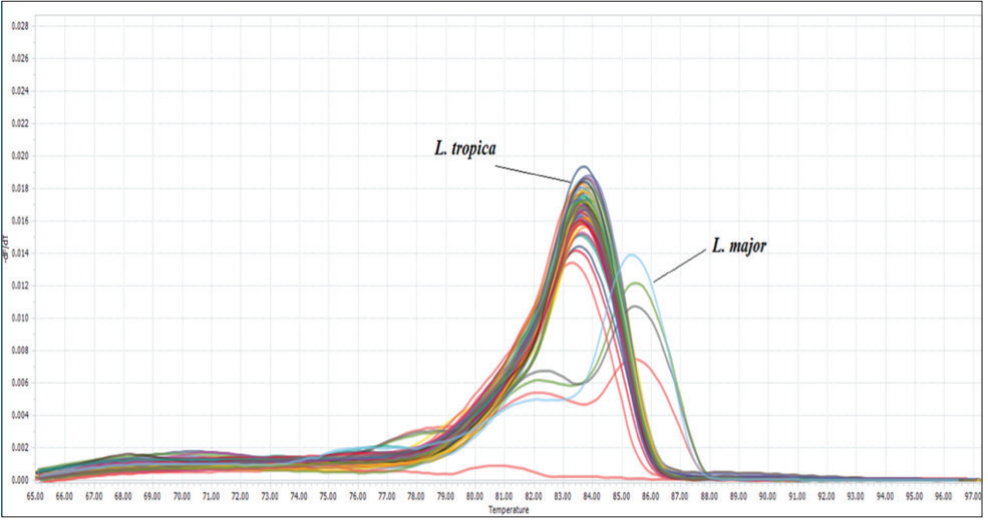
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu; RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

Erime eğrisi analizinde (T_m) *L.tropica* örnekleri için ortalama $83.65 \pm 0.14^\circ\text{C}$ 'de iken *L.major* örnekleri için ortalama $85.52 \pm 0.23^\circ\text{C}$ 'de erime eğrilerinin oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 2).

Rt-PCR ile pozitif saptanan örnekler için sekans işlemi uygulanmıştır. Genbankta bulunan *L.tropica* referans suşlarıyla pozitif *Leishmania* izolatları arasında % 99-100 oranında benzerlik görülmüştür (Genbank: KC686338.1). *L.major* örnekleriyle de referans suşlar arasındaki benzerlik %99-100 olarak bulunmuştur (Genbank: KX619443.1).

TARTIŞMA

Kutanöz layşmanyazis, Türkiye'de önemli bir halk sağlığı problemi olarak yerini korumaktadır. Özellikle birden fazla türün enfeksiyona neden olduğu bölgelerde, parazitlere karşı kontrol programları oluşturulmasında, hastalığın prognozu ve tedaviye yaklaşıma karar vermede, *Leishmania*'nın tür tanımlamasının yapılması önemlidir^{10,12}.



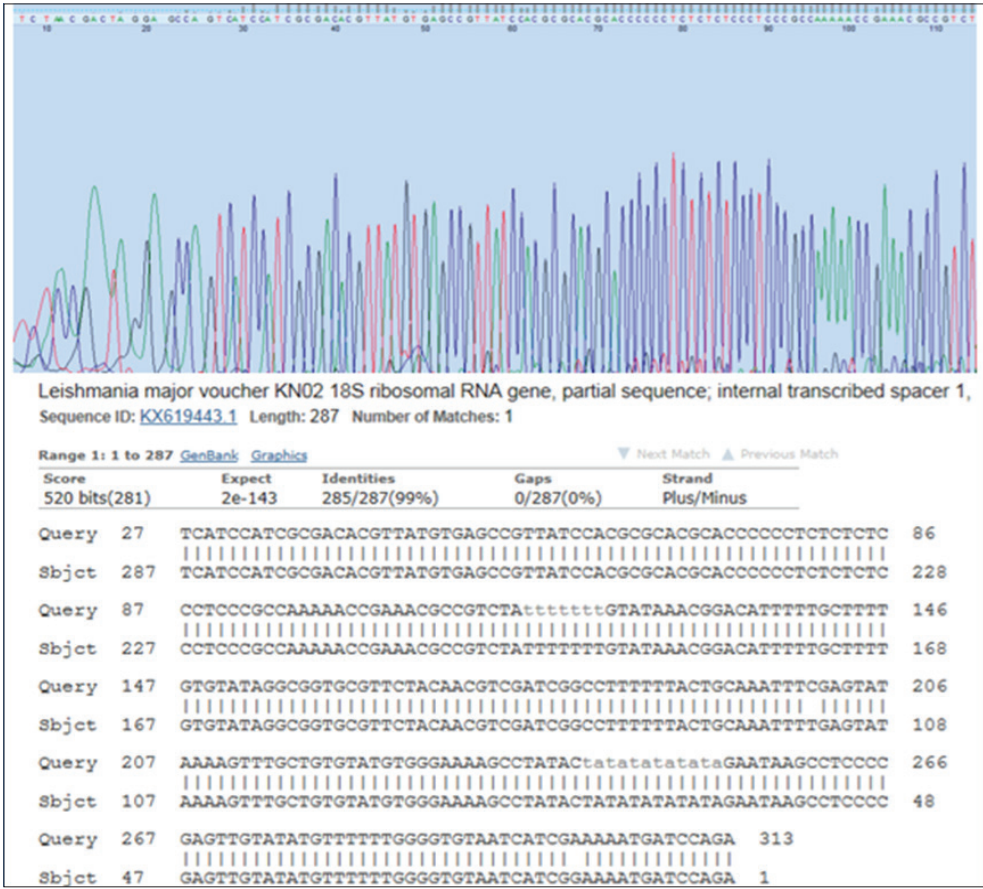
Şekil 2. *Leishmania tropica* ve *Leishmania major*'un erime eğrisi analizi. Erime sıcaklıkları (T_m), *L.tropica* için $83.65 \pm 0.14^\circ\text{C}$, *L.major* için $85.52 \pm 0.23^\circ\text{C}$.

Leishmania parazitlerinin tanısında kültür ve direkt mikroskopi geleneksel yöntemlerdir. Direkt mikroskopinin uzmanlık gerektirmesi, parazit sayısı çok az olduğunda saptanamayabilmesi, kültürde üreme için ise haftalara gerek duyulması bu yöntemlerin dezavantajlarıdır^{13,14}.

PCR yöntemi, kültür ya da direkt mikroskopıyla parazitlerin belirlenmesi gibi yöntemlere alternatif olarak geliştirilmiştir. PCR'nin orta çıkışından beri *Leishmania*'nın tür ve ırk ayrımıyla ilgili birçok moleküler çalışma yapılmıştır. Amplifikasyondan sonraki yöntemler olarak RFLP, multigen familyalarının DNA sekans analizi, PCR "fingerprint" teknikleri, multilokus sekans tiplendirmesi (MLST) ve multilokus mikrosatelit tiplendirmesi (MLMT) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu moleküler belirteçlerin her biri kendi özgül ayırım gücüne, bazı avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Tanısal PCR için, "internal transcribed spacer (ITS)" PCR, "kinetoplast DNA (kDNA)", "miniexon (spliced leader RNA)" geni, gp63 PCR RFLP, "heat shock protein 70 (HSP70)", "glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)" gibi hedefler geliştirilmiştir^{13,15-17}.

ITS bölgesi, 18 S ve 5.8S rRNA arasındaki "internal transcribed spacer 1 (ITS1)" ve de 5.8S ile 28S rRNA genleri arasındaki "internal transcribed spacer 2 (ITS2)" olarak, kodlanmayan iki değişken bölgeden oluşmaktadır. *Leishmania* tür tanımlamasında en sık kullanılan belirteçler olarak bildirilmişlerdir¹⁸⁻²⁰.

Bu çalışmada kutanöz layşmanyazise neden olan *Leishmania* parazitleri hem ITS1 PCR RFLP yöntemi hem de ITS1 bölgesi Sybr green bazlı Rt-PCR yöntemi ile tiplendirilmiştir. ITS1 PCR-RFLP 18S ve 5.8S rRNA genleri arasındaki yaklaşık 300-350 bp bölgeyi çoğaltmayı hedefleyen bir yöntemdir. Çeşitli yayınlarda, parazit kültürü, kan ve doku örneklerinde ITS1 PCR-RFLP çalışılmış ve klinik olarak şüpheli örneklerde yüksek duyarlılık ve



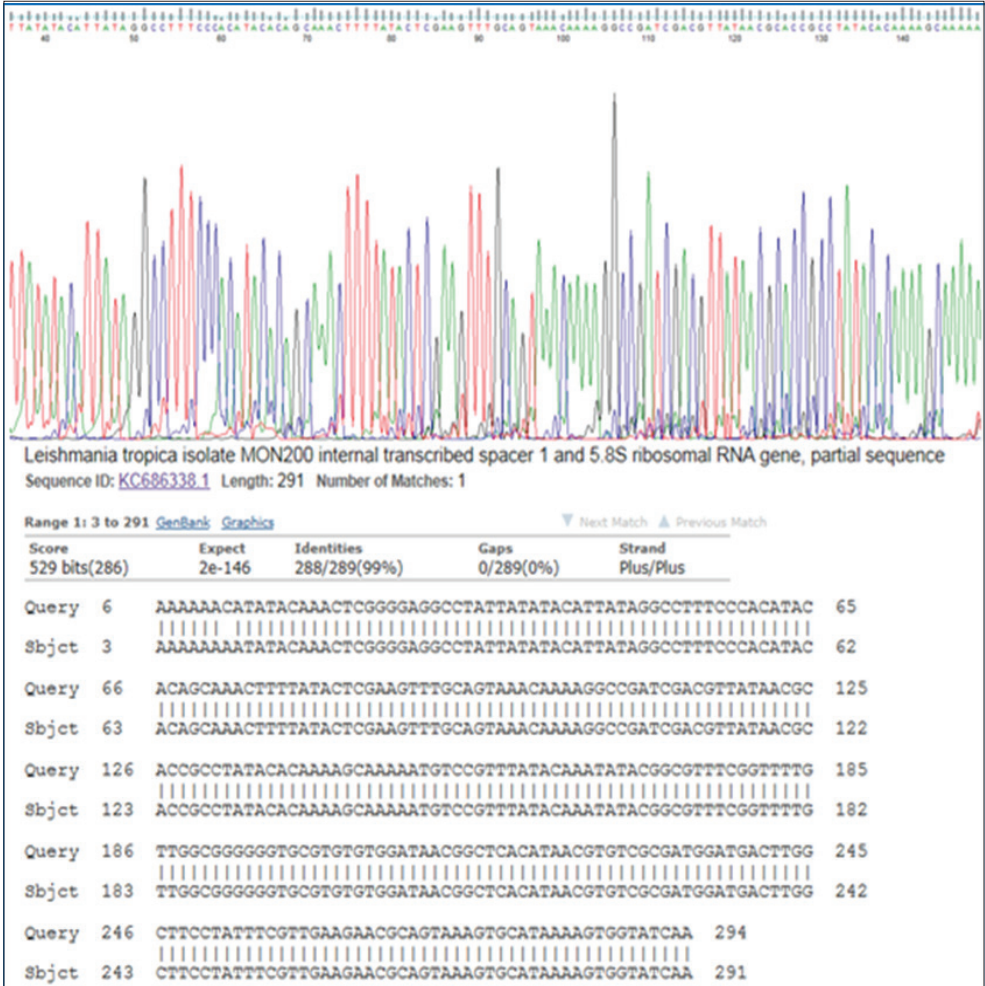
Şekil 3. NCBI Blast programında referans *Leishmania major* sekans dizisiyle çalışmada elde edilen bir *L. major* DNA dizisinin karşılaştırılması.

özgüllük gösterdiği, özellikle parazit sayısının düşük olduğu ve direkt mikroskopiyle belirlenemeyen hastalarda yüksek duyarlılığa sahip olduğu belirtilmiştir^{5,6,9,10,21,22}.

Çalışmamıza dahil edilen 136 örnekten 130'u [*L. major* (n= 11), *L. tropica* (n= 119)] ITS1 PCR-RFLP yöntemiyle pozitif olarak tespit edilmiştir.

ITS1 Rt-PCR yöntemi, hızlı sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek olması, PCR sonrası işlemlere gerek duyulmaması gibi nedenlerle, *Leishmania*'nın varlığını tespiti ve tür tanımlamasının yapılması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır^{8,17,23,24}.

Rt-PCR, amplifikasyon sırasında üretilen floresan sinyalinin analizine dayanmaktadır. Floresan sinyali, araya giren Sybr Green, Eva Green, vb. floresan boyalar veya floresan probalar kullanılarak üretilebilir. Özgül amplikonların varlığını belirlemek için erime eğrisi analizi kullanılabilir. HRM analizi sekans farklılıkları temelinde amplikonların ayırımında



Şekil 4. NCBI Blast programında referans *Leishmania tropica* sekans dizisiyle çalışmada elde edilen bir *L.tropica* DNA dizisinin karşılaştırılması.

kullanılabilir ve çift zincirli DNA'nın denatürasyonunda erime sıcaklığının artmasıyla oluşan floresan sinyal değişikliklerinin saptanması esasına dayanır^{17,23-25}.

Çalışmamızda Sybr Green temelli gerçek zamanlı ITS 1 PCR, ITS 1 PCR- RFLP ve direkt mikroskopi yöntemleri kullanılarak tiplendirme yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. En yüksek pozitiflik oranı %97 (136/132) oranıyla gerçek zamanlı ITS 1 PCR ile belirlenmiştir. ITS 1 PCR- RFLP yöntemiyle %95.5 (136/130) ve direkt mikroskopiyle %94.1 (136/128) oranında pozitif sonuç saptanmıştır. Duyarlılığın farklı olmasının, boyama yöntemine, mikroskoptaki örnekte parazit sayısının miktarına, çalışanın deneyimine bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Asfaram ve arkadaşları çalışmalarında²⁴ 105 örnekte ITS 1 bölgesi için, ITS-219F ve ITS-219R primerlerini kullanarak HRM PCR yöntemi uygulamıştır. Aynı çalışmada konvansiyonel PCR ve mikroskopik incelemede yapılarak sonuçların karşılaştırması yapılmıştır. HRM PCR ile 94 (*L.major* 34, *L.tropica* 60), konvansiyonel PCR ile 90 (*L.major* 34, *L.tropica* 56), mikroskopi ile 60 örnekte pozitiflik saptanmıştır.

Mohammadiha ve arkadaşları çalışmalarında²⁶ Rt-PCR, kDNA PCR ve ITS PCR RFLP yöntemlerini uygulamışlar ve en yüksek duyarlılığa Taqman problu Rt-PCR yönteminin sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Khademvatan ve arkadaşları çalışmalarında²⁷ Giemsa boyalı preparatlarda kDNA Rt-PCR yöntemini kullanmışlar ve erime eğrisi analizi ile *Leishmania* parazitlerinin tiplendirmişlerdir. *Leishmania* tanısı ve tiplendirmesi için uygun bir yöntem olduğunu ancak parazit sayısı az ve eski preparatlarda yetersiz kalabileceğini belirtmişlerdir.

Özbiğın ve arkadaşları çalışmalarında²⁸, elde ettikleri *Leishmania* örneklerini tiplendirmek için ITS1 ve hsp70 gen bölgesine ait primer ve probler kullanarak Rt-PCR uygulamışlardır. ITS 1 PCR erime eğrisi analiziyle örnekler *L.tropica*, *L.major* ve *L.donovani*/infantum olarak tiplendirilmiş daha sonra *L.donovani* ve *L.infantum* türlerinin ayrımı için hsp70 bölgesine özgü PCR yapılarak tanımlanmıştır.

Nicolas ve arkadaşları²⁹ kDNA minicircle bölgesi için LightCycler FastStart DNA Master Sybr Green kullanarak Rt-PCR uygulamışlar ve erime eğrisi analiziyle *Leishmania* parazitlerini tiplendirmişlerdir. Light Cycler Rt-PCR testinin yüksek duyarlılık ve özgüllükte olması nedeniyle klinik tanı, epidemiyolojik çalışmalar ve tür ayrımının yapılmasında çok yardımcı olacağını belirtmişlerdir.

Özensoy ve arkadaşları⁸, ITS 1 bölgesi için LITSR ve L5.8 S primerleri ve hibridizasyon problemleri kullanarak Rt-PCR yöntemi kullanarak erime eğrisi analizi ile parazit tiplendirmesi yapmışlardır. Sonuçlar daha sonra MLEE yöntemi ile karşılaştırılmış ve örneklerin *L.infantum* ve *L.tropica* olarak tiplendirildiği bildirilmiştir. Sonuçların MLEE yöntemiyle yüksek oranda uyumlu olduğu fakat *L.donovani* kompleksini kendi içinde ayırmada ITS1 PCR'ın yetersiz kalabileceğini belirtmişlerdir.

Eroğlu ve arkadaşları³⁰ *Leishmania* şüpheli örneklerin tanısında mikroskopi, kültür, PCR ve Rt-PCR yöntemlerini kullanıp karşılaştırma yapmışlar ve en yüksek pozitifliğin sırasıyla Rt-PCR, PCR, mikroskopi ve kültür yöntemi olarak saptandığını belirtmişlerdir. Rt-PCR çalışmasında ITS1 bölgesine uygun primer ve probler kullanılmış, erime eğrisi analizi ile örnekler *L.tropica*, *L.major*, *L.infantum* olarak tiplendirilmiştir.

Leishmania hastalarının tanısı, prognozunu doğrulanması, tedaviye yönelik karar verme, tedavi izlemi ve hastalık kontrol programlarının uygulanması açısından *Leishmania* tür identifikasyonu yapabilmek önemlidir. Layşmanyazisin yayılımı, küresel ısınma, uluslararası göçler, hastaların tanı ve tedavisindeki zorluklar ve çevresel koşullara bağlı olarak artabilir. Endemik bölgelerde etken *Leishmania* türlerinde değişiklikler olabilir. Son yıllarda

bölgemizde birden fazla tür ile enfeksiyon meydana gelmeye başladığından özellikle bu tür alanlarda tiplendirmenin yapılması çok önemlidir^{5,6}.

Çalışmamızda kullandığımız ITS1 Rt-PCR yöntemi en fazla pozitiflik saptayan yöntem olmuştur. Bunu sırasıyla ITS PCR RFLP ve direkt mikroskopi yöntemleri izlemiştir. ITS1 Rt-PCR yönteminin, hızlı sonuç vermesi, duyarlılığının yüksek olması, PCR sonrası RFLP, boyama, yürütme gibi ekstra işlemlere gerek duyulmaması gibi nedenlerle *Leishmania* parazit varlığının tespiti, *Leishmania* türlerinin hızlı identifikasyonu ve tedavi stratejilerine katkı sağlamada faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda *Leishmania* örnekleri *L.tropica* ve *L.major* olarak tiplendirilmiş, referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Kullandığımız yöntemin *L.tropica* ve *L.major*'un hızlı saptanmasında etkili olduğu ancak diğer *Leishmania* türlerinin analizi için, yeni çalışmalar yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 01.04.2016 ve Karar No: 2016/03).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Leishmaniasis fact sheet. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Accessed date: 15 Ağustos 2021).
2. Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y. Türkiye'de kutanöz leishmaniasisin durumu. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2012; 36: 121-9.
3. Gürel MS. Leishmaniasis kutis epidemiyolojisi. 8. Dermatolojide Gelişmeler Sempozyumu Kitabı. 2009, Diyarbakır.
4. Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis, pp: 197-241. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (eds). Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, İzmir, 2007.
5. Gürses G, Özasan M, Yıldız Zeyrek F, Kılıç İH, Yentür Doni N, Karagöz ID, et al. Molecular identification of *Leishmania* spp. isolates causes cutaneous leishmaniasis (CL) in Şanlıurfa Province, Turkey, where CL is highly endemic. *Folia Microbiol* 2018; 63(3): 353-9. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0556-1>
6. Yentür Doni N, Gürses G, Dikme R, Aksoy M, Yıldız Zeyrek F, Şimsek Z, et al. Cutaneous leishmaniasis due to three *Leishmania* species among Syrian refugees in Sanliurfa, Southeastern Turkey. *Acta Parasitologica* 2020; 65: 936-48. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00227-w>
7. Yıldız Zeyrek F, Korkmaz M, Özbel Y. Serodiagnosis of Anthroponotic cutaneous Leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(11): 1409-15. <https://doi.org/10.1128/CVI.00133-07>
8. Özensoy Toz S, Çulha G, Yıldız Zeyrek F, Ertabaklar H, Alkan MZ, Tetik Vardarlı A, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
9. Toz SO, Nasereddin A, Özbel Y, Ertabaklar H, Çulha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of *Leishmania* from human and canine clinical samples. *Trop Med Int Health* 2009; 14(11): 1401-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02384.x>

10. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47(1): 349-58. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)
11. Schönian G, Kuhls K. Manual molecular procedures, pp: 27-32. *Leishmaniasis Epidemiology Network South America*. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Brazil, 2009.
12. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by pcr amplification of the minixon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3147-53. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3147-3153.2003>
13. Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in Clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014; 2014: 607287. <https://doi.org/10.1155/2014/607287>
14. Foulet F, Botterel F, Buffet P, Morizot G, Rivollet D, Deniau M, et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a Real-Time PCR assay and sequencing of the cytochrome b Gene. *J Clin Microbiol* 2007; 45(7): 2110-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.02555-06>
15. Akhoundi M, Downing T, Votyčka J, Kuhls K, Luke J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine* 2017; 57: 1-29. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>
16. Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends in Parasitology* 2008; 24(3): 135-42. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.12.006>
17. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2018; 11:273. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
18. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SÖ, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4 (1): e581. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000581>
19. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Felinto de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol* 2003; 41(7): 3126-32. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126-3132.2003>
20. Schönian G, Schnur L, El Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska Kohler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 217-24. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90173-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90173-7)
21. Kazemi-Rad E, Mohebbi M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of *Leishmania* species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian J Publ Health* 2008; 37(1): 54-60.
22. Amro A, Gashout A, Al-Dwibe H, Alam MZ, Annajar B, Hamarsheh O, et al. First molecular epidemiological study of cutaneous leishmaniasis in Libya. *Plos Negl Trop Dis* 2012; 6(6): 1700. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001700>
23. Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, et al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *American J Trop Med Hyg* 2005; 73(6): 999-1004. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.999>
24. Asfaram S, Fakhari M, Mirani N, Derakhshani-Niya M, Valadan R, Hezarjaribi HZ, et al. HRM-PCR is an accurate and sensitive technique for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis as compared with conventional PCR. *Acta Parasitol* 2020; 65(2): 310-16. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00154-5>
25. Bousslimi N, Ben-Ayed S, Ben-Abda I, Aoun K, Bouratbine A. Natural infection of North African Gundi (*Ctenodactylus gundi*) by *Leishmania tropica* in the focus of cutaneous leishmaniasis, Southeast Tunisia. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86(6): 962-5. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0572>

26. Mohammadiha A, Mohebbali M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, et al. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in human and dog blood samples. *Exp Parasitol* 2013; 133(1): 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.017>
27. Khademvatan S, Neisi N, Maraghi S, Saki J. Diagnosis and identification of *Leishmania* spp. from Giemsa-stained slides, by real-time PCR and melting curve analysis in south-west of Iran. *Ann Trop Med Parasitol* 2011; 105(8): 559-65. <https://doi.org/10.1179/2047773211Y.0000000014>
28. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Gündüz C. Türkiye’de Kutanöz Leşmanyaziste kemiricilerin rolü var mı?. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(3): 259-72. <https://doi.org/10.5578/mb.66828>
29. Nicolas L, Milon G, Prina E. Rapid differentiation of old world *Leishmania* species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of Microbiological Methods* 2002; 51: 295-9. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00099-4)
30. Eroğlu F, Uzun S, Koltaş İS. Comparison of clinical samples and methods in chronic cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91(5): 895-900. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0582>