T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

KAYSERİDE KUTANÖZ LEİSHMANİASİS ETKENLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

TCD-2016-6644

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü
Yrd.Doç.Dr. Ülfet ÇETİNKAYA
Erciyes Üniversitesi Halil Bayraktar SHMYO

Araştırmacıların Adı Soyadı
ARZUV CHARYYEVA
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi/Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı
Dr. SERKAN ŞAHİN
Kayseri Halk Sağlığı Müdürlüğü

Kasım 2017

KAYSERİ

TEŞEKKÜR
"Kayseride Kutanöz Leishmaniasis Etkenlerinin Moleküler Karakterizasyonu" isimli projemiz TCD-2016-6644 kodu ile Erciyes Üniversitesi bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	3
2. GENEL BİLGİLER	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	7
4. BULGULAR	9
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	11
6. KAYNAKLAR	14

Kayseri'de Kutanöz Leishmaniasis Etkenlerinin Moleküler Karakterizasyonu

Özet

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütüne göre en önemli tropikal hastalıklardan biridir. Visseral, kutanöz ve mukokutanöz leishmaniasis olmak üzere üç esas tipi vardır. Visseral leishmaniasis, hayati organları önemli ölçüde etkileyen, ciddi hastalık oluşturan ve sonuçta öldürücü olabilen formdur. Kutanöz leishmaniasis ise ülkemizde dahil, dünyada birçok ülkede görülen en yaygın klinik formdur. Kutanöz leishmaniasisde oluşan lezyonlar genellikle bir yıl sürüp iyileşse bile skatris dokusu bırakmaktadır. Bu hastalığın hem akut dönemindeki yaralar hem de sonraki skatrisinden dolayı hastada ömür boyu ciddi psikiyatrik sorunlar oluşmaktadır.

Bu çalışmada, Kayseri ilinde görülen kutanöz leishmaniasis olduğu tespit edilen hastalardan elde edilen örneklerin ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) gen bölgesinin moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvuran ve kutanöz leishmaniasis tanısı almış olan 30 hastanın tanı amaçlı alınan örneklerinden ITS1 gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. DNA örnekleri ITS1 gen bölgesine spesifik LITSR, LITSV ve L5.8S primerler kullanılarak Nested PCR işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen yaklaşık 300 bp büyüklüğündeki örnek jelden saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış olan ürünlere Sanger dizileme protokolü ile DNA dizi analizi yaptırılmıştır.

Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin BLAST search ile Genbank'a daha önce girilmiş sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda; Kayseri ilinde yaşayan yerli ve yabancı hastalardan elde edilen ve bu çalışmaya dahil edilen izolatlarda etkeninin *Leishmania tropica* olduğu tespit edilmiştir. DNA dizi analizleri sonucunda çalışmaya alınan hastalarda farklı nükleotid sıralamasına bağlı olarak 3 farklı varyant tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma sonucunda projenin başlangıç aşamasında belirtilen hedeflere ulaşılarak 30 izolatın ITS-1 gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu belirlenmiştir. Bu çalışma ile İç Anadolu bölgesinde yer alan Kayseri ilinde hastalıkla ilgili epidemiyolojik veriler ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde ettiğimiz verilerin Türkiye'de, kutanöz leishmaniasise sebep olan etkenin belirlenmesine, parazitin kontrolü, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kutanöz leishmaniasis, ITS1, Epidemiyoloji, Leishmania tropica, Moleküler Karakterizasyon

Molecular Characterization of Cutaneous Leishmaniasis Agents in Kayseri

Abstract

Leishmaniasis is one of the most important tropical diseases according to the World Health Organization. The disease has three basic types; visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Visceral leishmaniasis is a form that seriously affects vital organs, can cause serious illness and can eventually be lethal. Cutaneous leishmaniasis is the most common clinical form seen in many countries around the world, including Turkey. Usually, the skatris tissue remains after cutaneous leishmaniasis, even though the lesions heal without any treatment in a few years. Severe psychiatric problems occur in this patient due to both acute injury and subsequent scarring.

In this study, it was aimed the molecular characterization of the ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) gene in the samples collected from the patients with cutaneous leishmaniasis in Kayseri province. Molecular characterization of the ITS1 gene fragment has been performed from 30 cases diagnosed as cutaneous leishmaniasis who were referred to Erciyes University Medical Faculty Medical Parasitology Department. DNA samples were analyzed by Nested PCR using the ITS1 gene region-specific LITSR, LITSV and L5.8S primers, and the resulting samples of approximately 300 bp in size were purified from the gel. The DNA sequencing analysis of purified products was performed by the Sanger sequencing protocol.

As a result of BLAST search and comparison with the available data in GenBank, it was determined that the Leishmania tropica is the causative agent in the isolates obtained from indigenous and foreign patients living in Kayseri province. Furthermore, the 3 different variants were detected by DNA sequence analysis.

In conclusion, the molecular characterization of the ITS-1 gene region of the 30 isolates were determined as it was purposed at the initial stage of the project. With this study, it has been tried to reveal the epidemiological data related to the disease in Kayseri province in Central Anatolia region. It is thought that the data obtained in this study will provide useful information to determine the causative agent of cutaneous leishmaniasis, as well as for the parasite control, eradication, vaccination, and drug development studies in Turkey.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, ITS1, Epidemiology, *Leishmania tropica*, Molecular Characterization

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütüne göre en önemli tropikal hastalıklardan biri olup mortaliteye sebep olan ikinci hastalık morbiditede ise dördüncü sırayı almaktadır. Dünya genelinde 88 ülkede, yaklaşık 350 milyon insanı tehdit etmektedir. Günümüzde 12 milyon insanın enfekte olduğu, yıllık yeni olgu sayısının ise 1-2 milyon olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısı yaklaşık 60 bin olarak bildirilmiştir (1,2).

Ülkemizde 1990-2010 yılları arasında bildirilen 46.003 KL olgusunun %50'den fazlası Şanlıurfa'da, %35'inden fazlası ise Adana, Osmaniye ve Hatay illerinden kaynaklanmıştır. Bu illerde etkenin sırasıyla L.tropica ve L.infantum olduğu saptanmıştır. Dünyada yaygın olarak KL etkeni olan L.major'un ülkemizdeki varlığı gösterilememiştir (3).

Leishmaniasisin; visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere 3 esas tipi vardır. VL, hayati organları etkileyen, mortaliteden primer olarak sorumlu, en ciddi form iken; KL hem ülkemizde hem de dünyada görülen en yaygın klinik formdur. Her ne kadar mortaliteden sorumlu form VL ise de CL'de oluşan lezyonlar genellikle bir yıl sürüp iyileşse bile skatris dokusu bırakmaktadır. Bu hastalığın hem aktif dönemindeki yaralar hem de sonraki skatrisinden dolayı hastada ömür boyu ciddi psikiyatrik sorunlar oluşmaktadır. Çünkü lezyon vücudun görünür yerlerindedir ve ciddi kozmetik hasar oluşturmaktadır (4).

Suriye'de çıkan iç savaş sonrasında ise ülkemiz büyük bir göç almıştır. Bu göç sonrasında hastalığın görülme sıklığı artmıştır. Bu nedenle de proje konusu KL etkenleri olarak seçilmiştir. Daha önce KL ön tanısı ile müracaat etmiş hastalardan izole edilmiş Leishmania türleri çalışmaya dahil edilmiş ve diğer VL hastalarından izole edilmiş ve kültürü devam ettirilen Leishmania izolatları çalışma dışında tutulmuştur. Projenin başlangıç aşamasında belirtilen hedeflere ulaşılarak 30 izolatın ITS-1 gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yaptırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Morfolojisi

Difazik hayat evresine sahip olan *Leishmania* türleri, insan ve diğer memelilerde amastigot, vektör olan tatarcık sineklerinde ise promastigot formunda bulunmaktadır.

Amastigot: Yuvarlak veya oval şekilli, 2.5-6.8 µm büyüklüğündedirler. Hareketsiz formdur. Lökositler, monositler veya endotel hücreleri içerisinde veya bu hücrelerin parçalanması ile hücre dışarısında tek tek veya gruplar halinde bulunabilirler. Sitoplazmada uca yakın büyük bir nükleus ve kinetoplast bulunmaktadır. Kinetoplastta da nükleustakinden farklı bir DNA bulunmaktadır. Bütün *Leishmania* türlerinde sitoplazmada tek bir mitokondrium vardır. Sitoplazmada bulunan golgi aygıtı ve lizozomlar çeşitli enzim aktivitelerinden ve parazitin beslenmesinden sorumludurlar. Amastigotlar da serbest kamçı bulunmamaktadır (5,6).

Promastigot: 15-20 µm boyunda, 1.5-5 µm genişlikte mekik şeklindedir. *Phlebotomus*'ların bağırsaklarında ve besi yerinde bulunan formudur. Ön uçundan çıkan serbest bir kamçısı vardır. Sitoplazmada ortada büyük bir nükleus ve ön uca yakın kinetoplast bulunmaktadır (5,6).

Yaşam Döngüsü

Leishmania türleri vektörü olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia*cinsi tatarcıklar, leishmaniasisli bir omurgalı konaktan kan emerken makrofajlar içinde bulunan parazitin amastigot şeklini almaktadır. Emilen kan, orta midede bir membran ile sarılmakta ve sineğin sindirim enzimleri ile bu membran içine salgılanmaktadır. *Leishmania*'ların bir kısmı makrofajların lizis olması esnasında sindirilirken kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek enfektif olmayan promastigot şekline dönüşüp bölünerek çoğalmaya başlamaktadır**.**

Enfektif promastigotları barındıran vektör tatarcık, kan emmek için bir omurgalı konağı soktuğu zaman belli bir miktardaki promastigotları da inoküle etmektedir. Deriden vücuda giren promastigotlar ilk saatlerdeki serumdaki kompleman tarafından opsonize edilmekte ve uygun hücreler tarafından fagosite edilmektedir. Fagosite edilen promastigotlar kamçısını kaybederek amastigot şekline dönüşmektedirler. Enfeksiyonun bundan sonraki seyrini *Leishmania*'nın türü belirlemektedir. Enfeksiyon deride sınırlı kalabilmekte (*L.tropica*) veya iç organlara göç edebilmektedir (*L.infantum*). Enfekte makrofajlar kan yoluyla deriden öncelikle dalak, karaciğer ve kemik iliği olmak üzere diğer dokulara doğru hareket etmekte ve bu organlarda çeşitli patolojilere neden olmaktadırlar (5-7).

Epidemiyoloji

Kutanöz leishmaniasis epidemiyolojisinde sosyoekonomik, politik ve çevresel faktörler belirleyici rol oynamaktadır. Kentler arası ulaşımın yaygınlaşması, göçlerin artışı, kaynak olguların tedavi edilmemesi, vektörle düzenli mücadele yürütülememesi ve sağlıksız kentleşme gibi faktörler enfeksiyon insidansının artışında etkilidir. Lezyonların ağrısız olması, bir yıl içinde kendiliğinden iyileşebilmesi ve sistemik komplikasyonlara neden olmaması da, hastalığın toplum tarafından kabul edilmesine neden olmaktadır (5-7).

Klinik ve Patogenez

Kutanöz leishmaniasis (KL) inkübasyon dönemi birkaç hafta ile birkaç ay arasında değişebilmektedir. Lezyon sivilce şeklinde başlar ve 1-2 ay bu şekilde devam edebilir. Lezyon yaklaşık 6 ay içinde giderek genişleyen ve 1-2 cm çapa ulaşır ve ortası ülserleşir. Bu ülser üzerine sıkıca yapışmış bir kabukla kaplanır. Küçük kuru kabuklu tek bir lezyondan, geniş, derin ve skar bırakarak iyileşen birden fazla lezyona kadar değişen ülserler meydana gelebilmektedir. Lezyon özelikleri etken *Leishmania* türüne göre değişmektedir. *L.tropica* ‘’kuru’’ kabuklu,yavaş ilerleyen ve tedavi edilmeyen olgularda bir yıl kalan lezyonlara neden olurken, *L.major* ve *L.braziliensis* ‘’ıslak’’ zeminli, geniş ve birkaç ayda iyileşebilen lezyonlara neden olmaktadır. Diffüz Kutanöz leishmaniasis (DKL) ise ülserleşmeyen bir papül olarak başlayan lezyonun etrafında satellit lezyonları meydana gelmekte ve bu lezyonlar hastanın tüm yaşamı boyunca kalabilmektedir. *L.tropica* sebep olduğu lezyonlar, İran ve Orta Asya’da yaygın olarak görülmektedir. Genellikle yüzde görünmektedir (8,9)

Tanı

KL’de tanı epidemiyolojik veri, klinik özellikler ve laboratuvar testlerine dayanmaktadır. KL için endemik bölgede yaşamak veya nonendemik bölgeden endemik bölgeye seyahat öyküsü önemli epidemiyolojik tanı kriterleridir. Klinik, parazit (*Leishmania* türü vb) ve konak (immun sistem vb) ile ilgili çeşitli faktörlere bağlı olarak oldukça farklılık gösterebilmektedir. KL tanısının doğrulanması için lezyondan alının örnekte parazit (mikroskobi, NNN - Novy, McNeal, Nicolle - besi yerin-de kültür), *Leishmania* DNA’sı (moleküler yöntemler) saptanması gereklidir. Etkensel tanıda ya lezyondan alınan örnekler hazırlanan preparatların Giemsa ile boyanır ve mikroskobun (X100) büyütmesinde incelenir ya da alınan materyaller en N.N.N. besiyerine ekilir. 23-25°C‘lik etüvde 21-30 gün inkübe edilir. Giemsa ile boyanan preparatlarda parazite ait amastigotların görülmesi,besiyerlerinde ise promastigotların

üremesiyle kesin tanı konur.Kültür ile tanının duyarlığı, kültür ortamına inoklülasyon sırasında aseptik koşullara dikkat edilmesi ve daha sonraki günlerde kültürlerin dikkatlice incelenmesiyle arttırabilmektedir. Ancak tanının hemen mümkün olmaması kültür yönteminin dezavantajıdır. Eğer yeterince dikkat edilmezse kontaminasyon riski bulunduğu unutulmamalıdır. Moleküler yöntemler ise duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan yöntemlerdir (7,10).

Tedavi

KL, Eski Dünya'da hastaların % 90'dan fazlasında spontane olarak iyileşebilmektedir. KL lokal tedavisinde kriyoterapi uygulanmakta ve %77 den %100'e kadar başarı elde edilebilmektedir. Diğer taraftan lokal infrared lambalarla da olumlu sonuçlar alınmıştır. Ayrıca paromomisin-metilbenzetonium ve paromomisin-pentavalan antimon kombinasyonları da kullanılarak yaklaşık %75 oranında tedavi başarısı elde edilebilmiştir (11).

Korunma

Leishmaniasisin vektör kaynaklı ve zoonotik bir hastalık olması nedeniyle, hasta, rezervuar ve vektörü kapsayan korunma yöntemleri uygulanmaktadır. İnsektisitler ve tatarcıkların konaklara ulaşmasını engelleyecek tedbirler vektörlere yönelik yöntemlerdir. Rezervuar olabilecek köpeklerin serolojik testlerinin yapılması ve pozitif çıkanların ya tedavilerinin yapılması ya da ortamdan uzaklaştırılması diğer bir korunma yoludur. Hastalarla ilgili olarak da, doğru ve zamanında tanı ve tedavi önem taşımaktadır. Ayrıca henüz efektif bir aşı olmamakla birlikte aşı çalışmaları da devam etmektedir (7,12).

GEREÇ VE YÖNTEM

Örneklerin toplanması, Kültürü ve DNA İzolasyonu

Çalışmada Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'na başvurmuş ve kutanöz leishmaniasis tanısı almış olan 30 hastanın tanı amaçlı alınan örnekleri değerlendirilmiştir. Kültürü devam ettirilen parazitlerin %10 fetal bovin serum, %1 L-glutamin ve %1 penicilline/streptomicine içeren besiyerin de çoğalmaları sağlanmış ve parazit sayısı yeterli seviyeye ulaşınca GeneAll Exgene Cell SV Mini Kit (GeneAll, Kore) kullanılarak üretici firma önerisine göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

Nested PCR

Çalışmada birinci PCR reaksiyonu için LITSR (forward: 5'- CTG GAT CAT TTT CCG ATG -3') ve LITSV (revers: 5'-ACA CTC AGG TCT GTA AAC-3'); ikinci PCR reaksiyonu için LITSR ve L5.8S (revers: 5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') primer çiftleri kullanılmıştır (13). Birinci reksiyon için 25 µl ikinci reaksiyon için ise 50 µl'lik karışımlar hazırlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. PCR reaksiyonu için kullanılan bilesen ve miktarları

Bilesen	**1.reaksiyon (µl)**	**2.reaksiyon (µl)**
10X Tampon	2,5	5
25mM $MgCl_2$	2	4
2,5 mM dNTP mix	0,5	1
20 pmol/ µl F Primer	0,5	1
20 pmol/ µl R Primer	0,5	1
DNA	5	5
Distile su	14	33
Toplam	25	50

Birinci ve ikinci amplifikasyonlar için aynı PCR şartlar uygulanmıştır(Tablo 2).

Tablo 2. Amplifikasyon için gerekli PCR şartları

95°C-15 dk	1 döngü
95°C-30 sn 53°C-30 sn 72°C-60 sn	35 döngü
72°C-5 dk	1 döngü

İkinci reaksiyon ürününün tamamı %1,5'luk agaroz jele yüklenmiş ve yaklaşık 300 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri jelden kesilerek GeneAll Expin^{TM} CleanUp SV (GeneAll, Kore) kullanılarak üretici firma önerisine göre pürifiye edilmiştir.

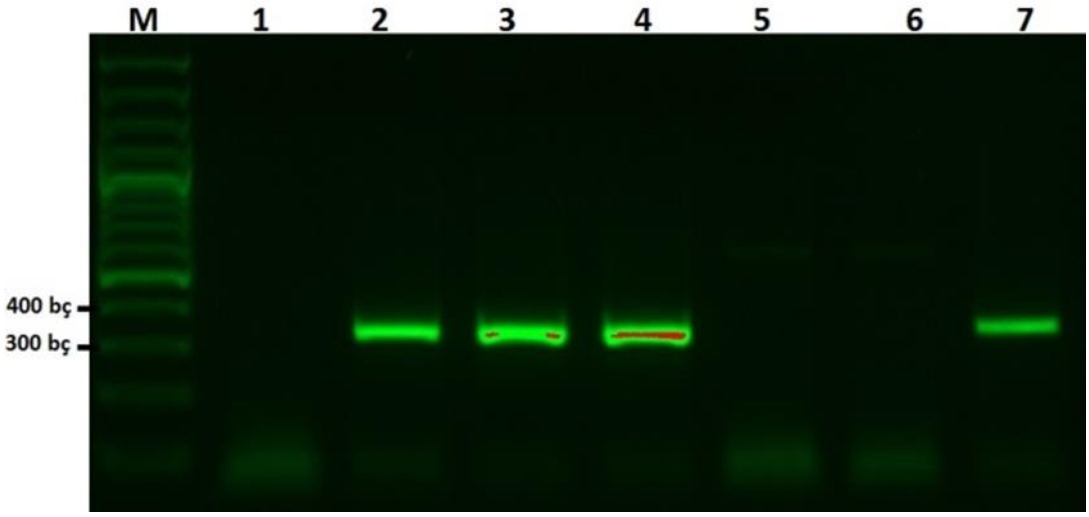
DNA Sekansı ve Filogenetik Analiz

Pürifiye edilen PCR ürünlerine Sanger Dizileme Protokolu kullanılarak DNA dizi analizi yaptırılmıştır.

Elde edilen izolatlar GENBANK'a kayıt edilmiştir ve mevcut olan diğer izolatlarla BLAST analizi yapılmıştır. DNA dizi analiz sonuçları GENBANK'tan elde edilen diğer izolatlar ile MEGA version 7 programında Neighbour-Joining algorithm kullanılarak karşılaştırılmıştır.

BULGULAR

Nested PCR işlemi sonucunda 30 izolattan yaklaşık 300 bç büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1: Nested PCR işlemi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Line 1: Negatif kontrol, Line 2,3,4 ve 7: Pozitif örnekler, Line 5,6: Negatif örnekler.

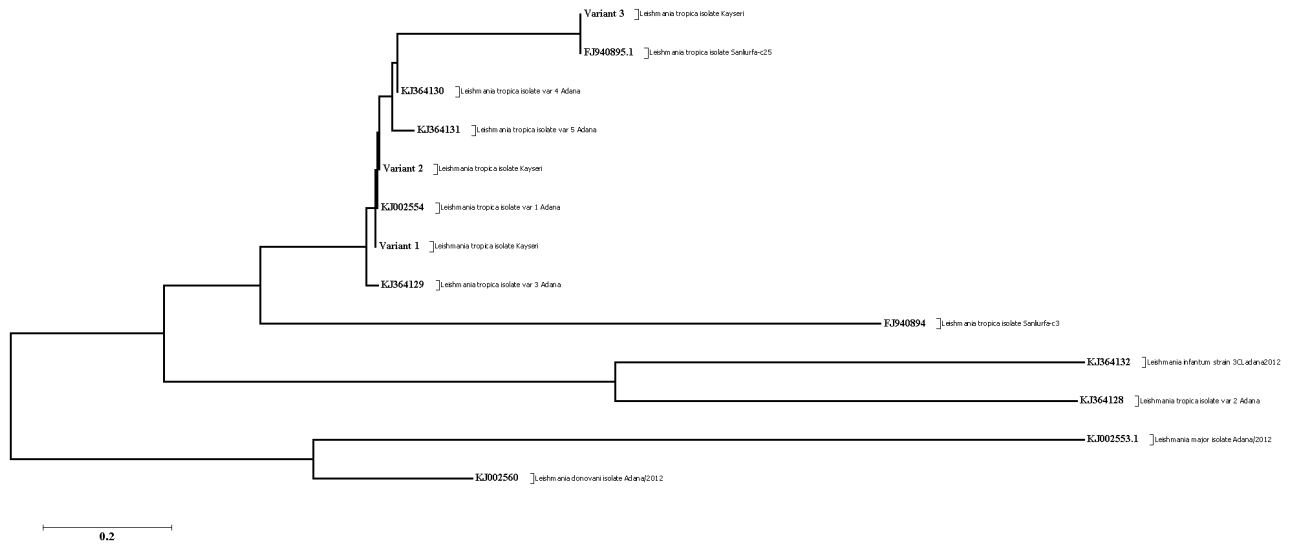
Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen verilerin BLAST search ile Genbank'a daha önce girilmiş sonuçlarla karşılaştırılması sonucunda; Kayseri ilinde yaşayan yerli ve yabancı hastalardan elde edilen ve bu çalışmaya dahil edilen izolatların tamamında etkeninin *Leishmania tropica* olduğu tespit edilmiştir.

DNA dizi analizleri sonucunda çalışmaya alınan hastalarda farklı nükleotit sıralamasına bağlı olarak 3 farklı varyant tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki dizi varyasyonları, esas olarak ITS1 bölgesinin nükleotid dizisindeki nükleotidlerin eklenmesi ya da silinmesinden kaynaklanmıştır. Kutanöz leishmaniasis hastalarından elde edilen *Leishmania tropica* izolatlarının %63,3 varyant 1(19/30), %26,7 Varyant 2 (8/30), %10 varyant 3 (3/30) olduğu görülmüştür (Tablo 1-3). Varyant 1 ve 2 olarak sınıflandırılan örneklerin %99 uyumlu olduğu ve sadece bir nükleotidde farklılık olduğu tespit edilmiştir. Varyant 3'ün ise varyant 1 ve 2 ile %95 benzer olduğu görülmüştür (Şekil 2).

Tablo 1: Varyant 1 olarak gruplandırılan 19 örneğe ait DNA dizi analizi sonucu
GATCATTTTCCGATGATTACACCCAAAAAAAACATATACAAAACTCGGGGAGGCCTATATATTATACATTAT ATAGGCCTTTCCCACACATACACAGCAAACTTTTATACTCGAAGTTTGCAGTAAACAAAAGGCCGATCGACC TTATAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAATATACGGCGTTTCGGTTTTGTTG GCGGGGGGTGCGTGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTG

Tablo 2: Varyant 2 olarak gruplandırılan 18 örneğe ait DNA dizi analizi sonucu
GATCATTTTCCGATGATTACACCCAAAAAAAACATATACAAAACTCGGGGAGGCCTATATATTATACATTA TATAGGCCTTTCCCACACATACACAGCAAACTTTTATACTCGAAGTTTGCAGTAAACAAAAGGCCGATCGAC CTTATAACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAATATACGGCGTTTCGGTTTTGTTG GCGGGGGGTGCGTGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTG

Tablo 3: Varyant 3 olarak gruplandırılan 3 örneğe ait DNA dizi analizi sonucu
GATCATTTTCCGATGATTACACCCCCCCAAAAAAAACATATACAAAACTCGGGGAGGCCTATTATATACATTA TAGGCCTTTCCCACATACACAGCAAACTTTTATACTCGAAGTTTGCAGTAAACAAAAGGCCGATCGACGTTAT AACGCACCGCCTATACACAAAAGCAAAAATGTCCGTTTATACAAATATACGGCGTTTCGGTTTTGTTGGCGG GGGGTGCGTGTGTGGATAACGGCTCACATAACGTGTCGCGATGGATGACTG



Şekil 2: Çalışmadan elde edilen izolatların ITS-1 dizileri ile GENBANK'tan elde edilen diğer izolatların Neighbour-Joining filogenetik ilişkisi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Leishmaniasise neden olan türlerin belirlenmesi, parazitle ilgili epidemiyolojik verilerin elde edilmesi, parazitin kontrolü, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları için oldukça büyük önem arz etmektedir (14). Kutanöz leishmaniasisin bir bölgede sıklığının artmasında birçok faktör etkili olmakla birlikte özellikle bölge halkının sosyoekonomik durumu ve o bölgenin endemik bölgelerden göç alması büyük önem taşımaktadır (5-7). 2012 sonrası Türkiye hastalığın endemik olduğu Suriye'den büyük oranda göç almıştır. Bu çalışmada Kayseri de yaşayan ve KL tanısı almış olan hastalardan elde edilen izolatların ITS1 gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılarak nükleotid dizilimleri hem bu çalışmaya dahil edilen hem de Türkiye'den bildirilen diğer izolatlarla karşılaştırılarak benzerlik ve farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır.

Çalışmamızda 28'i Suriye kökenli, ikisi yerli vaka olmak üzere toplam 30 hastadan alınan örneklerin ITS1 gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Türler arasındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde kullanılan birçok yöntem olmasına rağmen DNA sekanslama hem hastalığa sebep olan leishmania türünün doğrudan belirlenmesi hem de türler arasındaki varyasyonların ortaya konması için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (15) . Bu nedenle çalışmamızda da ITS1-DNA sekanslama yöntemi kullanılmıştır. ITS1 gen bölgesi de oldukça yüksek duyarlılığa sahip olduğu bilinen (16,17) Nested-PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

Gadisa ve arkadaşları(18) Habasiştan'da KL şüpheli hastalardan aldıkları örneklerde baskın türün *L. aethiopica*, Mahnaz ve arkadaşları (19) İran'da *L.major*, Mehdy ve arkadaşları (13) Yemen'de *L. tropica* olarak bildirmiştir. Nemati ve arkadaşları (20) KL şüpheli 24'ü İran ve üçü Afgan olan toplam 27 hastanın 15'inde etkenin *L. majör*, 12'sinde ise *L. tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Iran'da yapılan başka bir çalışmada Hajjaran ve arkadaşları (21) 112 KL şüpheli hastanın 75'inde etkenin *L. majör*, 37'sinde ise *L. tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Beldi ve arkadaşlarının (15) Cezayir'de yaptıkları çalışmada KL şüpheli 75 hastanın 49'unda etkenin *L.infantum*, 24'ünde *L.majör*, 2'sinde *L.tropica* olduğunu bildirilmişlerdir.

Türkiye'de ITS1-RFLP ve/veya ITS1 DNA sekanslama ile yapılan birçok araştırmada KL vakalarının çoğundan *L. infantum*, *L. tropica* ve *L. majör* olmak üzere üç türün sorumlu olduğu bildirilmektedir. Serin ve arkadaşlarının (22) 2005 yılında Adana da yaptıkları bir çalışmada KL tanısı almış toplam 10 hastanın 3'ünde etkenin, hastalarda VL geçmişi olmamasına rağmen *L.infantum*, 7'sinde *L.tropica* olduğu VL tanısı almış olan 5 hatada ise

etkenin *L.infantum* olduğunu bildirmişleridir. Akkafa ve arkadaşlarının (23) 2008 yılında Şanlıurfa'da yaptıkları bir çalışmada KL tanısı almış 51 hastanın 49'unda etkenin *L.tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Toz ve arkadaşları (24) 2009 yılında yaptıkları çalışmada Türkiye'nin 7 bölgesinde toplam 109 hastadan elde edilen izolatların ITS1 PCR ve RFLP yöntemi ile tiplendirmesini yapmışlardır. VL tanısı almış insan ve köpeklerden toplanan örneklerde etkenin *L.infantum* referans suşu ile benzerlik gösterdiğini, insan CL izolatlarının ise iki türle benzerlik gösterdiğini (*L.tropica* ve *L.infantum*) ve Türkiye'de CL'den sorumlu olanın bu iki tür olduğunu bildirmişlerdir. İnsan CL sorumlu olan etkenin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinden sadece *L.tropica*, aynı şekilde, Ege, İç Anadolu ve Marmara bölgelerinde *L.infantum*'dan kaynaklanan VL'nin aynı bölgelerde bulunmasına rağmen sadece *L.tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Şaşırtıcı bir şekilde Doğu Karadeniz bölgesindeki Hatay ilinden toplanan 40 CL hastasında etkenin *L.infantum* olduğunu rapor etmişlerdir. Eroğlu ve arkadaşlarının (25) 2011 yılında Çukurova bölgesinden topladıkları 64 KL örneği üzerinde yaptıkları çalışmada PCR-RFPL ile hastaların %31,5'inde etkenin *L.infantum* olduğu bildirilmiştir. Toz ve arkadaşları (26) 2013 yılında 315 (İnsan ve köpek kutanöz ve viseral leishmaniasis) klinik örnek üzerinde real time PCR ile yaptıkları çalışmada insan ve köpek VL örneklerinin %80,43'inde etkenin *L.infantum*, %6,52'sinde *L.tropica* olduğunu; KL örneklerinin %52,46'sında etkenin *L.infantum*, %26,90'nında ise *L.tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Koltaş ve arkadaşlarının (27) 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada real time PCR ile pozitif belirledikleri 107 simir örneğinin %42'sinde etkenin (45/107) *L. tropica*, %36.5'inde (39/107) *L. infantum* ve %21.5'inin (23/107) *L. majör* olduğu bildirilmiştir. 63 VL örneğinin ise %60.3'ünde (38/63) *L. infantum*, %30.2 (19/63) *L. donovani* ve %9.5 (6/63) *L. tropica* olduğu bildirilmiştir. Eroğlu ve arkadaşları (28) 2015 yılında yaptıkları çalışmada ise ITS1-PCR ile pozitif belirledikleri 148 simir örneğinin %48,6'sinde etkenin (72/148) *L. tropica*, %35,8'inde (53/148) *L. infantum* ve %15,6'sında (23/148) *L. majör* olduğu bildirilmiştir. Ekşi ve arkadaşları (29) Gaziantep'te yaptıkları çalışmada KL pozitif 100 hasta örneğini incelemişler ve örneklerin tamamında etkenin *L.tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Ertabaklar ve arkadaşları (30) Aydın'da KL pozitif 30 hasta örneği üzerinde yaptıkları çalışmada, örneklerin tamamında etkenin *L.tropica* olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda analizi yapılan 30 izolatta etkenin *L.tropica* olduğu tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalardan sadece 2 tanesinin yerli vaka olması bu çalışmanın en büyük kısıtlılıklarından biridir.

Kutanöz leishmaniasis etkenini belirlemek kadar tür içerisindeki genetik farklılıkları da belirlemekte parazitin kontrolü, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları açısından oldukça önemlidir (31). Son dönemlerde de bu konu ile ilgili çalışmalar artmıştır. Eroğlu ve arkadaşları (28) *L.tropica* izolatlarında 6 farklı, Toz ve arkadaşları (26) iki farklı varyant tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda toplam üç farklı varyant tespit edilmiştir. Dizi varyasyonları, esas olarak ITS1 bölgesindeki bazı nükleotidlerin insersiyon ve delesyonundan kaynaklandığı görülmüştür. İzolatların %63,3'ünde nükleotid dizisinin benzer olduğu ve bu izolatların Eroğlu ve arkadaşları tarafından bildirilen varyant 1 ile %100 benzer olduğu görülmüştür. Çalışmadaki iki yerli vaka da bu grupta yer almaktadır. Olguların %26,7'sini içeren ikinci grup ise birinci grup ve Eroğlu ve arkadaşları tarafından bildirilen varyant 1 ile %99 benzerlik gösterdiği görülmüştür. Olguların %10'unu içeren üçüncü grubun ise Toz ve arkadaşları tarafından bildirilen izolatlarla %99 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma sonucunda projenin başlangıç aşamasında belirtilen hedeflere ulaşılarak 30 izolatın ITS-1 gen bölgesinin moleküler karakterizasyonu belirlenmiştir. Bu çalışma ile İç Anadolu bölgesinde yer alan Kayseri ilinde hastalıkla ilgili epidemiyolojik veriler ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde ettiğimiz verilerin Türkiye'de, kutanöz leishmaniasise sebep olan etkenin belirlenmesine, parazitin kontrolü, eradikasyon, aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization., UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programmefor Researchand Training in Tropical Diseases. Global reportforresearch on infectious diseases of poverty 2012. Geneva: World Health Organization; 2012.

2. World HealthOrganization. Leishmaniasis: backroundinformation [16.10.2013]. http://www.who.int/leishmaniasis/ disease_epidemiology/en/index.html.

3. Gürel MS, Yeşilova Y, Olgen MK, Ozbel Y. Cutaneous leishmaniasis in Turkey. Turkiye Parazitoloji Derg. 2012; 36(2) : 121-9.

4. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999;354(9185):1191-9.

5. Unat EK. Tıp Parazitolojisi. Ist. Univ. Cerr. Tıp Fak. Yayın, 1991: no:162, 564-565.

6. Kuman HA, N. Altıntaş. Protozoon Hastalıklar. Ege Universitesi Basımevi. Izmir, 1996:79-100 s.

7. Bates PA and Ashford RW. Old World leishmaniasis. In: Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH, Despommier DD (eds). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections; Parasitology. 10 nd edn. ASM pres, Washington, D.C. 2005;283-312.

8. McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. QJM. 2014;107(1):7-14.

9. Singh A, Ramesh V. Histopathological features in leprosy, post-kala-azar dermal leishmaniasis, and cutaneous leishmaniasis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2013;79(3):360-6.

10. Vasoo S, Pritt BS. Molecular diagnostics and parasitic disease. Clin Lab Med. 2013;33(3):461-503.

11. Grogl M, Hickman M, Ellis W, Hudson T, Lazo JS, Sharlow ER, Johnson J, Berman J, Sciotti RJ. Drug discovery algorithm for cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(2):216-21.

12. Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):e2278.

13. Mahdy MA, Al-Mekhlafi HM, Al-Mekhlafi AM, Lim YA, Bin Shuaib NO, Azazy AA, Mahmud R. Molecular characterization of Leishmania species isolated from cutaneous leishmaniasis in Yemen. PLoS One. 2010; 5(9). e12879.

14. Schönian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, Presber W. Genetic heterogeneity in the species Leishmania tropica revealed by different PCR-based methods. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001;95(2):217-24.

15. Beldi N, Mansouri R, Bettaieb J, Yaacoub A, Souguir Omrani H, Saadi Ben Aoun Y, Saadni F, Guizani I, Guerbouj S. Molecular Characterization of Leishmania Parasites in Giemsa-Stained Slides from Cases of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, Eastern Algeria. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017;17(6):416-424.

16. Feiz Haddad MH, Ghasemi E, Maraghi S, Tavala M. Identification of Leishmania Species Isolated from Human Cutaneous Leishmaniasis in Mehran, Western Iran Using Nested PCR. Iran J Parasitol. 2016;11(1):65-72.

17. Koarashi Y, Cáceres AG, Saca FM, Flores EE, Trujillo AC, Alvares JL, Yoshimatsu K, Arikawa J, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. Identification of causative Leishmania species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniasis in Peru using PCR-RFLP. Acta Trop. 2016;158:83-7.

18. Gadisa A, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, Aseva A, Gedamu L. Leishmania (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR–RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. Experimental parasitology.2007; 115: 339-343.

19. Mahnaz T, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio I, Sch¨onian G, Farajnia S, Alimohammadian M.H. Leishmania major: Genetic heterogeneity of Iranian isolates by singlestrand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Tropica. 2006;(98):52-58.

20. Nemati S, Fazaeli A, Hajjaran H, Khamesipour A, Anbaran MF, Bozorgomid A, Zarei F. Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of the Iranian Leishmania Parasites Based on HSP70 Gene PCR-RFLP and Sequence Analysis. Korean J Parasitol. 2017; 55(4):367-374.

21. Hajjaran H1, Mohebali M, Mamishi S, Vasigheh F, Oshaghi MA, Naddaf SR, Teimouri A, Edrissian GH, Zarei Z. Molecular identification and polymorphism determination of

cutaneous and visceral leishmaniasis agents isolated from human and animal hosts in Iran. Biomed Res Int. 2013;2013:789326.

22. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, Allahverdiyev A, Uzun S, Vural Z, Kayar B, Tezcan S, Yetkin M, Aslan G, Emekdas G, Koksal F. Rapid diagnosis and genotyping of Leishmania isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of miniexon region. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005;53(3):209-14.

23. 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, Sanliurfa province, in Turkey. Parasitol Res. 2008; 103(3):583-6.

24. Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, Ziya Alkan M, Jaffe CL. Leishmaniasis in Turkey: molecular characterization of Leishmania from human and canine clinical samples. Trop Med Int Health. 2009; 14(11):1401-6.

25. Eroglu F, Koltas IS, Genc A. Identification of causative species in cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. J Bacteriol Parasitol. 2011; 2: 3.

26. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, Gunduz C, Ozbel Y. 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.

27. 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.

28. Eroglu F, Koltas IS, Alabaz D, Uzun S, Karakas M. Clinical manifestations and genetic variation of Leishmania infantum and Leishmania tropica in Southern Turkey. Exp Parasitol. 2015;154:67-74.

29. Ekşi F, Özgöztaşı O, Karslıgil T, Sağlam M. Genotyping Leishmania promastigotes isolated from patients with cutaneous leishmaniasis in south-eastern Turkey. J Int Med Res. 2017;45(1):114-122.

30. Ertabaklar H, Ertuğ S, Çalışkan SÖ, Bozdoğan B. [Determination of Leishmania species by PCR-RFLP in the smear samples taken from the lesions of cutaneous leishmaniasis cases]. Mikrobiyol Bul. 2016;50(2):300-6.

31. Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Živičnjak T, Smirlis D, Pratlong F, Dedet JP, Özbel Y, Toz SÖ, Presber W, Schönian G, Soteriadou K. Genetic diversity and structure in Leishmania infantum populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. Parasit Vectors. 2013; 6: 342.