

Leishmaniasis şüpheli örneklerin kültür ve PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Evaluation of culture and PCR results of leishmaniasis suspected samples

Selma USLUCA¹

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada leishmaniasis şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen kan, kemik iliği ve/veya doku biyopsisi ve yara aspiratı örneklerinin Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekimi ve moleküler yöntemlerle inceleme sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde yerli olguların görülme sıklığı düşük olmasına rağmen son yıllarda artan göçmen sayısı nedeniyle leishmaniasis tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yeniden önem kazanmıştır. Visseral leishmaniasis tanısında özellikle kemik iliği ve buffy coat örnekleri; kütanöz leishmaniasis tanısında ise yara aspiratı veya doku biyopsi örneklerinden yararlanılmaktadır. Kemik iliği ve doku biyopsi örneklerinin alınması hasta açısından oldukça zahmetli olmakta, ayrıca doğru şekilde alınmadığında yanlış tanıya yol açabilmektedir. Bu nedenle mümkün olduğunca birden fazla yöntemin bir arada kullanılması ile tanı koyma şansının artırılması önerilmektedir.

Yöntem: Ocak 2015 ile Temmuz 2018 tarihleri arasında leishmaniasis şüphesiyle Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı'na gönderilen 271 adet kan, kemik iliği, doku ve/veya yara aspiratı örneğinin NNN besiyerine ekimi yapılmış ve ticari kit kullanılarak (Genesig, Primer Design, UK) real-

ABSTRACT

Objective: In this study, we aimed to evaluate the results of blood, bone marrow and / or tissue biopsy and wound aspirate samples sent to our laboratory with suspicion of leishmaniasis on Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium and the results of molecular examination. Although incidence of indigenous cases in our country is low, due to increasing number of migrants in recent years, leishmaniasis has regained importance in our country as in the whole world. Especially bone marrow and buffy coat samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis and wound aspirate or tissue biopsy specimens for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis are used. Obtaining bone marrow and tissue biopsy specimens is very painful for the patient and may lead to misdiagnosis if not obtained correctly. Therefore, it is recommended to increase the chance of diagnosis by using more than one method together.

Methods: Two hundred seventy one blood, bone marrow, tissue and / or wound aspirate specimens between January 2015 and July 2018 were sent to the National Parasitology Reference Laboratory of the General Directorate of Public Health on suspicion of leishmaniasis and cultured in NNN medium were then processed by using a commercial kit (Genesig, Primer

¹Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı, Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı, Ankara



İletişim / Corresponding Author : Selma USLUCA

Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Adnan Saygun Cad. No: 55. Ankara - Türkiye
Tel : +90 505 253 71 23 E-posta / E-mail : selmausluca@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 31.03.2019
Kabul Tarihi / Accepted : 26.07.2019

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2019.76258

Usluca S. Leishmaniasis şüpheli örneklerin kültür ve PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.
Turk Hij Den Biyol Derg, 2019; 76(3): 313-320

time PCR yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışılan örneklerin 45 (%16,60)'i herhangi bir yöntemle pozitif olarak değerlendirilirken, 226 (%83,40)'sı negatif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin 174 (%64,20)'ü sadece PCR ile değerlendirilmiş, bunların 22 (%12,64)'si pozitif, 152 (%87,36)'si negatif olarak belirlenmiştir. Örneklerin 52 (%19,20)'si sadece kültür yöntemi ile değerlendirilmiş, bunların 7 (%13,46)'si pozitif, 45 (%86,54)'i negatif olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemle değerlendirilen 45 (%16,60) örneğin 29 (%64,45)'u hem PCR, hem kültür ile negatif, 10 (%22,22)'u hem PCR, hem kültür ile pozitif, 6 (%13,33)'sı PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak belirlenmiştir. PCR ile negatif, kültür ile pozitif saptanan örnek yoktur. Çalışılan iki yöntem arasında orta derecede uyum belirlenmiştir ($\kappa= 0,545$).

Sonuç: Tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin farklı olması nedeniyle, özellikle düşük parazitemi durumunda parazitin üretilmesini sağlayan kültür ve DNA'sının çoğalmasını sağlayan PCR yöntemlerinin bir arada kullanılmasının hastalığın tanı şansını artıracak kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, kültür, NNN besiyeri, real-time PCR

Design, UK) for real-time PCR method.

Results: While 45 (16.60%) of the samples were evaluated as positive by any method, 226 (83.40%) were evaluated as negative. Of the 174 (64.20%) samples evaluated by PCR alone, 22 (12.64%) were positive and 152 (87.36%) were negative. Of the 52 (19.20%) samples evaluated by culture method only, 7 (13.46%) were positive and 45 (86.54%) were negative. And finally, of the 45 (16.60%) samples evaluated by both methods, 29 (64.45%) were negative by both PCR and culture, 10 (22.22%) were positive by PCR and culture, 6 (13.33%) were positive by PCR and negative by culture. There were no samples detected negative by PCR and positive by culture. There were no samples detected negative by PCR and positive by culture. A moderate concordance was found between the two methods studied ($\kappa= 0.545$).

Conclusion: Since the sensitivity and specificity of the two diagnostic methods are different, it is concluded that the use of a combination of culture and PCR methods that allow the growth of the parasite by culture, especially in the case of low parasitemia and amplification of DNA by PCR, will increase the chance of diagnosis of the disease.

Key Words: Leishmaniasis, culture, NNN medium, real-time PCR

GİRİŞ

Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği en önemli altı hastalıktan biri olarak değerlendirilen bir tropikal hastalıktır. Visseral, kütanöz ve mukokütanöz başta olmak üzere birçok farklı klinik formu mevcuttur. Özellikle leishmaniasisin endemik olduğu ülkeler aynı zamanda HIV'in de endemik olduğu bölgeler olduğu için iki enfeksiyonun birlikteliği yüksek oranda görülebilmektedir. Hastalık immün sistemi baskılanmış kişilerde hem farklı kliniklerin ortaya çıkmasına, hem de komplikasyonlara yol açabilmektedir (1). Ülkemizde yerli olguların

görülme sıklığı düşük olmasına rağmen, son yıllarda yaşanan nüfus hareketleri nedeniyle, vektörlerin yaşamasına uygun iklim koşulları mevcut olduğu için özellikle kütanöz leishmaniasis olgularının sayısının arttığı görülmektedir. Bunun dışında sporadik visseral leishmaniasis olguları da bildirilmektedir (2-4).

Ülkemizde görülen kütanöz leishmaniasis etkenleri *Leishmania tropica* ve *Leishmania major*, visseral leishmaniasis etkenleri ise *Leishmania donovani* ve *Leishmania infantum*'dur (5,6). Leishmaniasis tanısında direkt mikroskopi ve kültür

yöntemleri altın standart olarak kabul edilmektedir (7). Her iki yöntem de incelenen örnekte parazitin fazla miktarda ve morfolojik olarak sağlam olması durumunda yararlıdır. Bu durum, özellikle deri lezyonlarında parazit seviyelerinin çok düşük olduğu kütanöz leishmaniasisin kronik döneminde sorun teşkil edebilmektedir (8-11). Klinik örneklerin Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) veya Schneider'ın Drosophila Medium'u gibi besiyerlerine ekimi yapılmaktadır (12-14). Uygun besiyerinde amastigotlar, hareketli promastigotlara dönüşmektedir ve in vitro olarak çoğalmaktadır. Kültürler, besiyerine ekimden sonra dört haftaya kadar, haftada bir kontrol edilmektedir. Üreme genellikle iki hafta içinde gerçekleşmekte, ancak düşük parazitemi oranına sahip örnekler için bu süre daha uzun olabilmektedir (14). Örneklerin ekimi sırasında %30'u kontamine olabilmektedir (11). Geleneksel yöntemler (direkt mikroskopi ve kültür) zaman almakta, mikroskopi tecrübesi olan laboratuvar personeline ihtiyaç duymakta ve duyarlılığı %50-70 arasında değişmektedir (12,15). Buna karşın moleküler yöntemlerin hem duyarlılığı, hem de özgüllüğü daha yüksektir (8,15). Ayrıca geleneksel yöntemlerle parazitin tür ayrımı da yapılamamaktadır (12,16). Leishmaniasis tanısında parazitin tanımlanması ve sınıflandırılmasında izoenzim analizi altın standart yöntemdir. Bu yöntem için de kültür gereklidir ve 15 ayrı enzimatik reaksiyon uygulanması gerekmektedir. Tüm bu işlemler zahmetli ve zaman alıcıdır. Birçok laboratuvar da rutin olarak uygulanabilecek bir yöntem olmaması nedeniyle hastalığın tanısında farklı yöntemler araştırılmaktadır. Bu konuda son yıllarda her türlü klinik materyalden tanı konulmasına imkân veren, kültür yöntemine ihtiyaç duymayan ve parazitin tür ayrımını da mümkün kılan moleküler yöntemler önem kazanmıştır (17).

Bu çalışmada leishmaniasis şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen kan, kemik iliği ve/veya doku biyopsisi ve yara aspiratı örneklerinin NNN besiyerine ekilmesi ve moleküler yöntemlerle inceleme sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 2015 ile Temmuz 2018 tarihleri arasında leishmaniasis şüphesiyle Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Parazitoloji Referans Laboratuvarı'na gönderilen kan, kemik iliği, doku ve/veya yara aspiratı olmak üzere toplam 271 örneğin NNN besiyerine ekimi yapılmış ve Leishmania spp. DNA'sının real-time PCR yöntemi ile saptanması için ticari kit (Genesig, Primer Design, UK) kullanılmıştır. NNN besiyeri literatürde belirtildiği şekilde hazırlandıktan sonra bek alevi başında aseptik koşullarda, steril vida kapaklı tüplere 4'er ml dağıtılmıştır. Besiyeri katı hale geldikten sonra, uzun süreli kullanılabilmesi için -20°C'de saklanmıştır (18).

Klinik örneklerden DNA ekstraksiyonu ticari kit (QIAamp DNA Blood Mini kit, Qiagen, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. PCR amplifikasyonu ticari real-time PCR kiti (Genesig, Primer Design, UK) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar elde edilen amplifikasyon eğrisi ile değerlendirilmiştir. Çalışılan iki yöntem arasındaki uyumun değerlendirilmesi amacıyla Kappa testi uygulanmıştır.

Parazitin kültür ve moleküler yöntemlerle saptanmasında kemik iliği örnekleri kan örneklerinden daha yararlı iken, kan örnekleri daha çok serolojik yöntemlerde tercih edilmektedir. Bu nedenle her iki yöntemle birlikte incelenen örneklerin sonuçları karşılaştırılmış, farklı (uyumsuz) sonuçlar elde edilen örneklerde, bu farklılığın nedeninin yöntem farklılığından mı, örnek çeşidinin farklılığından mı (kan, kemik iliği, doku, yara aspiratı) kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya leishmaniasis şüphesiyle laboratuvarımıza gönderilen 145 (%53,50)'i kan, 81 (%29,90)'i kemik iliği, 45 (%16,60)'i doku ve/veya yara aspiratı olmak üzere toplam 271 adet örnek

dâhil edilmiştir. Bu örneklerin 45 (%16,60)'i herhangi bir yöntemle pozitif olarak değerlendirilirken, 226 (%83,40)'sı negatif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin 174 (%64,20)'ü sadece PCR ile değerlendirilmiş, bunların 22 (%12,64)'si pozitif, 152 (%87,36)'si negatif olarak belirlenmiştir. Örneklerin 52i (%19,20)'si sadece kültür yöntemi ile değerlendirilmiş, bunların 7 (%13,46)'si pozitif, 45 (%86,54)'i negatif olarak belirlenmiştir. Klinik örneklerin değerlendirme sonuçları Tablo 1'de belirtilmiştir.

Toplam incelenen örnek sayısı 271 olmasına rağmen, sadece 45 örnek her iki yöntemle birlikte değerlendirilebilmiştir. Bu 45 örneğin seçiminde hastanelerden yapılan test istemleri göz önüne

alınmıştır. Her iki yöntemle değerlendirilen 45 örneğin (%16,60) 29 (%64,45)'u hem PCR, hem kültür ile negatif, 10 (%22,22)'u hem PCR, hem kültür ile pozitif, 6 (%13,33)'sı PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak belirlenmiştir. Çalışılan iki yöntem arasında orta derecede uyum belirlenmiştir ($k=0,545$).

PCR yöntemiyle pozitif, kültür yöntemiyle negatif olarak belirlenen örnek çeşitleri değerlendirildiğinde; iki yara aspiratı örneğinin, bir deri kazıntısı örneğinin ve bir kemik iliği örneğinin hem PCR, hem kültür yöntemi ile çalışıldığı belirlenirken, bir hastaya ait kemik iliği örneğinin kültür yöntemi ile kan örneğinin ise PCR yöntemi ile çalışıldığı belirlenmiştir. Bu örneklerde PCR ile pozitif sonuç elde edilmesine rağmen kültür yöntemiyle negatif sonuç elde edildiği

Tablo 1. Klinik örneklerin değerlendirme sonuçları (n=271)

	PCR	Kültür	PCR ve Kültür
Pozitif	22 (%12,64)	7 (%13,46)	10 (%22,22)
Negatif	152 (%87,36)	45 (%86,54)	29 (%64,45)
Toplam	174 (%100)	52 (%100)	45* (%100)

* 6 örnek PCR yöntemiyle pozitif, kültür yöntemiyle negatif olarak değerlendirilmiştir. Tabloda sütun yüzdeliği alınmıştır.

Tablo 2. PCR ve kültür yöntemleri ile uyumsuz sonuç elde edilen örnek çeşitleri (n=6)

	PCR	Kültür	PCR ve Kültür	Toplam
Yara aspiratı	0	0	2	2
Deri kazıntısı	0	0	1	1
Kemik iliği	0	1*	1	2
Kan	1*	0	0	1
Toplam	1	1	4	6

* Aynı hastaya ait örnek çeşidi

görülmüştür (Tablo 2).

TARTIŞMA

Visseral leishmaniasis tanısında özellikle kemik iliği ve buffy coat örnekleri, kütanöz leishmaniasis tanısında ise yara aspiratı veya doku biyopsi örneklerinden yararlanılmaktadır. Kemik iliği ve biyopsi örneklerinin alınması hasta açısından oldukça zahmetli olmakta, ayrıca doğru şekilde alınmadığında yanlış tanıya yol açabilmektedir. Bu nedenle mümkün olduğunca birden fazla yöntemin bir arada kullanımı ile tanı koyma şansının artırılması önerilmektedir (4).

Leishmaniasis ile ilgili kültür ve PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan bazılarında kültür yöntemiyle pozitiflik oranının daha yüksek olduğu görülürken (9), bazılarında PCR ile daha yüksek pozitiflik oranları belirlendiği bildirilmiştir (8,11,15-17, 19, 20). Her iki yöntemin eşit pozitiflik oranına sahip olduğunu bildiren çalışmalara da rastlanmıştır (21). Ertabaklar ve ark.'nın çalışmasında deri kazıntısı örneklerinin %62'sinin NNN ile, %60'ının PCR ile pozitif olarak belirlendiği bildirilmiş, tanıda kültür ve PCR yöntemlerinin birlikte uygulanmasının duyarlılık ve özgüllüğü artıracağı sonucuna varılmıştır (9). Profeta Luz ve ark.'nın çalışmasında biyopsi örneklerinin %69,7'si NNN besiyerinde pozitif olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin %79'u PCR yöntemiyle çalışılmış, bunların da %80'i pozitif olarak belirlenmiştir. Kültür ve PCR yöntemlerinin birlikte uygulandığı hastaların %98,3'ü pozitif olarak belirlenmiş, bu çalışmada da iki yöntemin birlikte uygulanmasının duyarlılık ve özgüllüğü artıracağı vurgusu yapılmıştır (19). Rahi ve ark.'nın çalışmasında deri kazıntısı örneklerinin %29,7'sinin NNN kültürü ile, %68,75'inin PCR ile pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Bu sonucun nedeninin, kültür yöntemiyle tanı konulabilmesi için nispeten fazla sayıda ve sağlam yapıdaki parazitin varlığına ihtiyaç duyulması, ancak moleküler yöntemlerin daha az miktarda ve canlı olmayan paraziti saptayabilme kapasitesine sahip

olması olarak değerlendirilmiştir (8). Yaptığımız çalışmada kültür ve PCR ile değerlendirilen örneklerin 45 (%16,60)'i herhangi bir yöntemle pozitif, 226 (%83,40)'sı ise negatif olarak belirlenmiştir. Örneklerin 174 (%64,20)'ü sadece PCR ile değerlendirilmiş, bunların 22 (%12,64)'si pozitif, 152 (%87,36)'si negatif bulunmuştur. Örneklerin 52 (%19,20)'si sadece kültür yöntemi ile değerlendirilmiş, bunların 7 (%13,46)'si pozitif, 45 (%86,54)'i negatif olarak belirlenmiştir. Her iki yöntemle incelenen örneklerin 29 (%64,45)'u hem PCR, hem kültür ile negatif, 10 (%22,22)'u hem PCR, hem kültür ile pozitif, 6 (%13,33)'sı ise PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak belirlenmiş, PCR ile daha yüksek pozitiflik oranları saptanmıştır (Tablo 1).

Abda ve ark.'nın çalışmasında deri kazıntısı örneklerinin %66,67'si NNN ile pozitif bulunmuştur. Örneklerin %96,3'ü PCR-RFLP ile, %81,5'in real-time PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. PCR-RFLP ile bir örneğin negatif olmasının, testin hemen çalışılmaması nedeniyle DNA'nın bozulmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüş, DNA örnekleri hemen çalışılmayacaksa uygun koşullarda saklanması gerektiği ifade edilmiştir. Real-time PCR yöntemi kolay uygulanmasına rağmen zaman zaman erime eğrisi analizinin değerlendirilmesinde güçlükler yaşanabildiği Leishmania suşları arasındaki kDNA polimorfizminin erime sıcaklığının değişmesine neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tekrarlanabilirliği en üst düzeye çıkarmak için kDNA real-time PCR'in standardizasyonunun gerektiği belirtilmiştir (17). Bizim çalışmamızda uyguladığımız real-time PCR'in sonucu amplifikasyon eğrisi ile değerlendirilmekte, erime eğrisi analizi yapılmamaktadır. Ayrıca ticari bir kit kullanıldığı için testin standardizasyon sorunu yaşanmamıştır. Örneklerden DNA elde edildikten sonra bekletmeden PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiş, DNA örnekleri testin tekrarlanması gerektiği durumlarda kullanılmak üzere -200C'de saklanmıştır. Bu şartlarda saklandığı için DNA'nın parçalanması sorunu ile karşılaşılmamış, bu nedenle PCR ile daha yüksek pozitiflik oranları elde edildiği düşünülmüştür.

Lemrani ve ark.'nın çalışmasında biyopsi örneklerinin %69,2'si kültür yöntemi ile, %84,6'sı PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. Elde edilen iki yalancı negatif sonucun PCR inhibisyonuna bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca kütanöz leishmaniasis şüphesi olan ancak doğrulanamayan 13 biyopsi örneği daha her iki yöntemle değerlendirilmiş, bunların %46,15'i PCR ile pozitif olarak saptanırken, NNN ile negatif olarak değerlendirilmiştir. Özellikle konvansiyonel tekniklerin hastalığı tespit edemediği durumlarda, kütanöz leishmaniasis tanısında alternatif bir yöntem olarak PCR'ın değerli olduğu vurgulanmıştır (11). Bizim çalışmamızda real-time PCR ile yalancı negatif sonuç elde edilmemiş, altı örnek kültür yöntemiyle negatif, PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. Kültür yöntemiyle parazitlerin çoğaltılabilmesi için canlılıklarını sürdürebilmeleri gerekmektedir. Ancak PCR ile parazitin DNA'sı saptandığı için, canlı parazit varlığına ihtiyaç duyulmamaktadır. Ayrıca parazitemi oranı düşük olan örneklerde kültürde her zaman üreme olamamakta, bu durum yalancı negatif sonuçlara neden olabilmektedir (9).

Imran Al-Mosa ve ark.'nın çalışmasında yara aspiratı örneklerinin %57,8'i NNN ile %94,7'si PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. PCR'ın konvansiyonel yöntemlere kıyasla tanı hızını ve duyarlılığını artırdığı, ayrıca tür ayırımına da imkân verdiği bildirilmiştir (15). Pourmohammadi ve ark.'nın çalışmasında deri kazıntısı örneklerinin %50,7'si NNN ile %93,6'sı PCR ile pozitif bulunmuştur. PCR'ın paraziti saptamada daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Kültür sonucunun ise daha önceki çalışmalardan düşük olarak belirlenmesinin, besiyerinde kullanılan malzemelerin türü ve fungal veya bakteriyel kontaminasyonlar gibi bazı teknik problemlerden etkilenmesi nedeniyle olabileceği düşünülmüştür (16). Thomaz-Soccol ve ark.'nın çalışmasında deri kazıntısı örneklerinin %46,67'si NNN besiyeri ile %100'ü PCR ile pozitif olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada da parazitin kültürde izole edilmesinin zaman alıcı olduğu ve iyi bir antisepsi sağlanmazsa özellikle mantar kontaminasyonunun oluşabileceği vurgulanmıştır (20). Klinik örneklerin

besiyerine ekilmesi sırasında karşılaşılan en önemli sorunlardan birisi besiyerinde bakteri ve/veya mantar kontaminasyonuna bağlı olarak parazitin üremesinin baskılanması ve besiyerindeki üremenin değerlendirilememesidir. Ancak çalışmamızda kültür ekimi sırasında aseptik koşullara azami dikkat gösterilmesi nedeniyle çalışılan örneklerin hiçbirinde bakteri ve/veya mantar kontaminasyonuna rastlanmamıştır.

Qader ve ark.'nın çalışmasında yara aspiratı örneklerinin %22,22'sinin mikroskopi ile pozitif olarak belirlenmesine karşın, sadece %33,33'ünün NNN besiyeri ve PCR ile pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir. Özellikle kütanöz leishmaniasis olgularının klinik olarak farklı deri hastalıklarına benzemesi nedeniyle yanlış tanı alabileceği, bu nedenle PCR gibi parazitin tür ayırımına da olanak veren özgül tanı yöntemlerinin kullanılması gerektiği, ayrıca özellikle birden fazla *Leishmania* türünün birlikte bulunduğu bölgelerde tedavi protokollerinin sadece klinik olarak değil, hastalığa neden olan türlerin teşhisine de önem verilerek yapılması gerektiği belirtilmiştir (21). Birçok paraziter hastalıkta olduğu gibi leishmaniasiste de hastaya sadece tanı koymanın yeterli olmadığı, tedaviyi yönlendirmek için tür düzeyinde tanımlamanın da giderek daha fazla önem kazandığı görülmektedir. Bu nedenle moleküler yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

Çalışılan örnek çeşidinin test sonuçlarına etkisinin araştırıldığı çalışmalara göz atıldığında, kemik iliği örneklerinde PCR pozitifliğinin kan örneklerinden daha düşük oranda saptandığı görülmektedir. Georgiadou ve ark.'nın çalışmasında visseral leishmaniasis hastalarına ait örneklerle retrospektif bir analiz yapılmış, periferik kan, kemik iliği veya her iki örnekte sırasıyla hastaların %91, %72 ve %100'ünde PCR'ın duyarlı olduğu gösterilmiştir. PCR'ın uzun süreli ilaç etkinliğini izlemek ve nüksleri tanımlamak için faydalı olduğu belirtilmiştir (14). Fraga ve ark.'nın çalışmasında örnek türüne göre PCR'ın duyarlılığı değerlendirildiğinde periferik kan

örneklerinin %95,6'sında, kemik iliği örneklerinin ise %91,1'inde parazit DNA'sının saptanabildiği belirlenmiştir. Kemik iliği örneklerinin PCR ve kültür sonuçları karşılaştırıldığında %26,7'sinin kültür ile, %91,1'inin PCR ile pozitif olduğu bildirilmiştir. Visseral leishmaniasis tanısında invaziv olmayan bir yöntem kullanılması açısından PCR'ın uygun olduğuna karar verilmiştir (7). Çalışmamızda PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak uyumsuz sonuç alınan örnekler değerlendirildiğinde her iki yöntemin aynı örnek çeşidiyle çalışıldığı örneklerin yanı sıra, farklı örnek çeşidiyle çalışılan örneklerin de olduğu dikkati çekmiştir. İki yara aspiratı örneği PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak değerlendirilirken, bir deri kazıntısı örneği PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 2). Kütanöz leishmaniasis olgularında özellikle hastalığın kronikleşen dönemlerinde lezyonda parazit sayısının ve canlılığının giderek azaldığı bilinmektedir. İncelenen örnekte çok az miktarda parazit olması durumunda kültürde üreme çok geç olmakta veya hiç üreme olmamaktadır. PCR ise çok düşük parazitemi oranlarında bile paraziti saptayabilmektedir. Ayrıca kültür ile canlı parazit varlığında tanı konulabilmesine karşılık, PCR parazite ait DNA'yı saptayabilmekte ve canlı parazite gerek duyulmamaktadır (9). Elde ettiğimiz sonuçların örnek çeşidinden değil, bu nedenlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda bir kemik iliği örneği PCR ile pozitif, kültür ile negatif olarak belirlenmiştir. Bir hastaya ait tam kan örneği PCR ile pozitif, aynı hastanın kemik iliği örneği kültür ile negatif olarak belirlenmiştir. Bu durumun örnekte çok az miktarda parazit varlığında kültürde üremenin olmaması, ancak PCR'ın çok az sayıdaki paraziti saptayabilmesi nedeniyle ortaya çıkabileceği ve yine örnek çeşidi kaynaklı olmadığı düşünülmüştür .

Uzun yıllardır visseral leishmaniasiste kanda

parazitlerin olmadığı ya da çok az miktarda olduğu düşünülmekte, bu nedenle buffy coat örnekleriyle elde edilen sonuçlara şüpheyle yaklaşılmaktaydı. Son yıllarda kemik iliği aspiratlarında daha önce uygulanmış olan moleküler yöntemler periferik kan örneklerinde *Leishmania* DNA'sının saptanması için adapte edilmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (7). Çalışmamızda örnek çeşidinin elde edilen sonuçlara etkisi değerlendirildiğinde, PCR ile çalışılan 14 tam kan örneğinin pozitif sonuç vermesi nedeniyle bu örnek çeşidinin ekstraksiyon ve amplifikasyonunda sorun yaşanmadığı, kemik iliği örnekleri kadar güvenilir sonuç verebildiği düşünülmüştür. Bu sonuç hasta için zahmetli bir yöntem olan kemik iliği örneği yerine tam kan örneği ile tanı koymanın mümkün olabileceğini göstermektedir. Ancak örnek sayısının az olması nedeniyle bu konuda kesin bir yargıya varmanın güç olduğu göz ardı edilmemelidir.

Hızlı ve doğru tanı ile hastaya zamanında ve etkin ilaç tedavisinin uygulanması hem hastanın prognozuna olumlu yönde etki edecek, hem de hastalığın toplumda yayılmasını engelleyecektir. Bu nedenle her laboratuvar kendi personel kapasitesi, maddi ve fiziki koşullarını göz önünde bulundurarak, tanıda kullanılan yöntemlerin ve incelenecek olan klinik materyalin cinsi, hastanın parazit yükü gibi faktörlere bağlı olarak birden fazla yöntemi bir arada kullanarak tanı kapasitesini artırmaya çalışmalıdır. Gözden geçirilen yayınlar ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tanı yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin farklı olması nedeniyle, özellikle düşük parazitemi oranına sahip olgularda parazitin üretilmesini sağlayan kültür veya parazit DNA'sının çoğaltılmasını sağlayan PCR yöntemlerinin bir arada kullanılmasının, bu yöntemlerin tek başlarına kullanıldıklarında elde edilecek sonuçlardan daha güvenilir olacağı ve hastalığın tanı şansını artıracacağı kanaatine varılmıştır.

REFERENCES

1. Singh S, New developments in diagnosis of leishmaniasis, *Indian J Med Res* 2006; 123:311-30.
2. Öztoprak N, Aydemir H, Pişkin N, Seremet Keskin A, Araslı M, Gökmen A, Çelebi G, Külekçi Uğur A, Taylan Özkan A, Zonguldak'ta Erişkin Viseral Leşmanyaz Olgusu, *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 671-7.
3. Sayili A, Taylan Ozkan A, Schallig HDFH, Case Report: Pediatric Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in Northern Cyprus, *Am J Trop Med Hyg* 2016; 95(6): 1386-8.
4. Dinçer D, Arca E, Koç E, Topal Y, Taylan Özkan A, Çelebi B, Ülkemizin Endemik Olmayan Bir İlinde (Ankara) Saptanan *Leishmania infantum*'a Bağlı Bir Kütanöz Leşmanyaz Olgusu, *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(3): 499-506.
5. Malatyalı E, Özçelik S, Gürsoy N, Kekik (Thymus vulgaris), kimyon (Cuminum cyminum) ve mersin (*Myrtus communis*) bitkilerinden elde edilen yağların invitro antileishmanial etkileri, *Türk Hij Den Biyol Derg* 2009; 66 (1): 7-13.
6. Çulha G, Doğramacı ÇA, Gülkan B, Savaş N, Kutanöz leishmaniasis ve Hatay İlindeki durumu, *Türk Hij Den Biyol Derg* 2014; 71(4): 171-8.
7. Fraga TL, Brustoloni YM, Lima RB, Cavalheiros Dorval ME, Teruya Oshiro E, Oliveira J, Lyrio de Oliveira AL, Pirmez C, Polymerase Chain Reaction of Peripheral Blood as a Tool for the Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Children, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2010;105(3):310-3.
8. Rahi AA, Nsaif S, Hassoni JJ, Ali MA, Hamza HA, Comparison of Diagnostic Methods in Cutaneous Leishmaniasis in Iraq, *Am J BioSci* 2013;1(1):1-5.
9. Ertabaklar H, Çalışkan SÖ, Boduç E, Ertuğ S, Kutanöz Leşmanyaz Tanısında Direkt Mikroskopi, Kültür ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Mikrobiyol Bul* 2015;49(1):77-84.
10. Nsaif AL-Hucheimi S, Sultan BA, Al-Dhalimi MA, Abdullah Mahmood T, Tracking of Ceotaneous Leishmaniasis by Parasitological, Molecular and Biochemical Analysis, *Kufa J Nursing Sci* 2015;5(1):1-10.
11. Ilemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M, PCR Detection of *Leishmania* in Skin Biopsies, *J Infect Developing Countries* 2009; 3(2):115-22.
12. Zakai HA, Cutaneous Leishmaniasis (CL) in Saudi Arabia: Current Status, *J Adv Lab Res Biol* 2014;5(2):29-34
13. El Hassan AM, Cutaneous Leishmaniasis in Al-Ahsa Oasis in Saudi Arabia and in Sudan: A Comparative Study, *Saudi J Med Med Sci* 2013;1(2):64-71
14. Georgiadou SP, Makaritsis KP, Dalekos GN, Leishmaniasis Revisited: Current Aspects on Epidemiology, Diagnosis and Treatment, *J Translat Intern Med* 2015;3(2):43-50
15. Imran AL-Mosa MA, The best method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis and Identification of the Causative *Leishmania* Species in Al-Najaf Governorate by Using PCR Assay, *Int J Adv Res* 2015;3(5):226-33
16. Pourmohammadi B, Motazedian MH, Hatam GR, Kalantari M, Habibi P, Sarkari B, Comparison of Three Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis, *Iranian J Parasitol* 2010;5(4):1-8
17. Abda IB, de Monbrison F, Bouslimi N, Aoun K, Bouratbine A, Picot S, Advantages and Limits of Real-time PCR Assay and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism for the Identification of Cutaneous *Leishmania* Species in Tunisia, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105(1):17-22
18. Daldal N, Taylan Özkan A, Etkene Yönelik Tanı Yöntemleri, Korkmaz M, Ok ÜZ (eds) In: Parazitolojide Laboratuvar Yöntem, Yorum, Akreditasyon, Meta Basım, İzmir, 2011:87-117
19. Profeta Luz ZM, da Silva AR, de Oliveira Silva F, Caligorne RB, Oliveira E, Rabello A, Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2009;104(1):62-6
20. Thomaz-Soccol A, Mocellin M, Mulinari F, de Castro EA, de Queiroz-Telles F, de Souza Alcântara F, Bavaresco MT, Hennig L, Andraus A, Luz E, Thomaz-Soccol V, Clinical Aspects and Relevance of Molecular Diagnosis in Late Mucocutaneous Leishmaniasis Patients in Paraná, Brazil, *Braz Arch Biol Technol* 2011, 54(3): 487-94
21. Qader AM, Abood MK, Bakir TY, Identification of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples Obtained from Cutaneous Leishmaniasis Patients Using PCR Technique in Iraq, *Iraqi J Sci* 2009;50(1):32-6