

Leishmaniasisde Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Sitokrom B Gen Bölgesinden Tür Ayırımı Yapabilen Primer ve Probların Tasarlanması: Pilot Çalışma

Designing of the Primers and Probes for Real Time Polymerase Chain Reaction of Cytochrome B Gene Region in Leishmaniasis: A Pilot Study

Ahmet Özbilgin*[ⓧ], Bakiye Göker Bağca**[ⓧ], Mehmet Harman***[ⓧ], İbrahim Çavuş*[ⓧ], Tuğba Kaya****[ⓧ]
Ahmet Yıldırım*[ⓧ], Cumhuriyet Gündüz**[ⓧ]

*Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

***Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye

****Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye

Öz

Amaç: Bu çalışmada, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile parazitin sitokrom b gen bölgesi kullanılarak leishmaniasis etkeninin (*Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum*) tür tayininin belirlenmesi için primer ve problemlerin dizayn edilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'nda kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanmış olan *Leishmania* suşları uygun koşullarda canlandırılarak besiyerlerine aktarılmış ve ticari kit ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen DNA'lara *Leishmania*'nın yeni tasarladığımız sitokrom b gen bölgesi primer ve prob adayları ve kontrol için daha önce kullandığımız internal transcribed spacer-1 gen bölgesine özgü tasarlanan primer ve problemler kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu erime analizleri uygulanmıştır.

Bulgular: Yeni tasarlanan sitokrom b gen bölgesi primer ve problemler ile *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania aethiopia* ve *Leishmania infantum/donovani* hibrit türlerinin genotiplendiği saptanmıştır.

Sonuç: Yeni Dünya leishmaniasis etkenleri olan *Leishmania braziliensis* ve *Leishmania amazonensis* dışında, Eski Dünya leishmaniasis etkeni olan *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania aethiopia* ve *Leishmania infantum/donovani* hibritinin yeni tasarlanan sitokrom b gen bölgesi primer ve problemler kullanılarak başarılı bir şekilde genotiplendirildiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Sitokrom B, GZ-PZR, *Leishmania*

ABSTRACT

Objective: In this study, it was aimed to design primers and probes to identify *Leishmania* species (*Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*) through Real Time Polymerase Chain Reaction using the cytochrome b gene region.

Method: The *Leishmania* strains, which have been cryopreserved and stored in liquid nitrogen in the Parasite Bank of Manisa Celal Bayar University, were transferred to culture media after being revived under the appropriate conditions and their DNA isolations were conducted using a commercial kit. Real Time Polymerase Chain Reaction melting analyses were conducted for the extracted DNA by utilizing both the candidate primers and probes of cytochrome b gene region, newly designed for *Leishmania*, and the primers and probes, designed for internal transcribed spacer-1 gene region we had previously used for control.

Results: *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania aethiopia* and *Leishmania infantum/donovani* hybrid species were managed to be genotyped successfully using the primers and probes of the newly designed cytochrome b gene region.

Conclusion: It has been observed that Old World *Leishmania* species (*Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, *Leishmania aethiopia* and *Leishmania infantum/donovani* hybrid), rather than New World *Leishmania* species (*Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis*), were successfully genotyped by the primers and probes of the newly designed cytochrome b gene region.

Keywords: Cytochrome B, RT-PCR, *Leishmania*

Alındığı tarih / Received:
11.11.2019 / 11.November.2019

Kabul tarihi / Accepted:
16.12.2019 / 16.December.2019

Yayın tarihi / Publication date:
31.06.2020 / 31.June.2020

ORCID Kayıtları

A. Özbilgin 0000-0003-3613-8741
B. Göker Bağca 0000-0002-5714-7455
M. Harman 0000-0002-8845-1433
İ. Çavuş 0000-0002-3860-0146
T. Kaya 0000-0001-7612-5414
A. Yıldırım 0000-0003-4411-8185
C. Gündüz 0000-0002-6593-3237

✉ ahmetyildirim.par@yahoo.com

Atf: Özbilgin A, Göker Bağca B, Harman M, Çavuş İ, Kaya T, Yıldırım A, Gündüz C. *Leishmaniasis*'de gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için sitokrom B gen bölgesinden tür ayırımı yapabilen primer ve problemlerin tasarlanması: Pilot çalışma, Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(2):86-94.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

Leishmaniasis, dünya genelinde yayılım gösteren ve kum sineği vektörü ile omurgalı konağa bulaştırılan zoonotik/antroponotik özellik gösteren protozoon parazitler olan *Leishmania* türlerinin neden olduğu enfeksiyon hastalığıdır. *Leishmania* türleri aralarında morfolojik açıdan fark olmamasına karşın, tedaviye gerek duyulmaksızın iyileşebilen ve ölümcül olmayan deri enfeksiyonundan, iç organlara yerleşen ve çok sayıda insanın ölümü ile sonuçlanan epidemilere yol açabilen sistemik enfeksiyona kadar oldukça farklı hastalık tablolarına neden olmaktadır⁽¹⁾.

Dünya Sağlık Örgütü'nün en önemli 6 tropikal hastalıktan biri olarak kabul ettiği *Leishmaniasis* bağli olarak, dünya genelinde 20 milyon insanın hastalığa yakalanmış olduğu, her yıl 400 bin yeni olgunun ortaya çıktığı ve yaklaşık olarak 350 milyon insanın ise risk altında olduğu bildirilmektedir. Memelilerin zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania* türleri, enfekte kum sineği türlerinin (*Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar/yakarcalar) kan emmesi esnasında omurgalı konağa bulaştırılmaktadırlar. Morfolojik açıdan aralarında fark olmayan *Leishmania* türleri klinik açıdan değerlendirildiğinde kutanöz leishmaniasis (KL), visseral leishmaniasis (VL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olarak üçe ayrılmaktadır. Son yıllarda dördüncü klinik form olarak değerlendirilen post kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) ise *L. donovani*'nin etkeni olduğu VL'de sağaltım sürecinin sonunda deride gözlenen klinik tablo olarak kabul edilmektedir⁽²⁾.

Visseral leishmaniasis ve KL yeni ve eski dünyada ayrı *Leishmania* türleri tarafından oluşturulmaktadır. Eski Dünya *Leishmaniasis*'i daha çok endemik özellik göstermekle birlikte, Hindistan ve Afrika ülkelerinde zaman zaman epidemilere de neden olabilmektedir. Ülkemizde, Ege ve Akdeniz bölgelerinde daha yoğun olarak görülen VL'in etkeni *L. infantum*; Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde daha yoğun olarak görülen KL'in etkeni ise *L. tropica* olarak karşımıza çıkmaktadır. Endemik bölgelerde yaşamını sür-

düren ya da endemik bölge seyahat öyküsü bulunan ve hastalığa özgü klinik belirtilerle başvuran, özellikle de küçük yaş grubundaki çocuk olgular kesinlikle VL açısından değerlendirilmelidir. Kendiliğinden tedavi gerektirmeksizin iyileşmesi genel olarak bir yıl sürmesinden dolayı ülkemizde "Yıl Çıbanı" olarak halk arasında adlandırılan KL ise sıklıkla, uzun sürede geçmeyen, çoğunlukla ellerde ve yüzde gözlenen ülser ile karşımıza çıkmaktadır⁽³⁾.

Epidemiyolojik durumun oldukça çeşitli olmasından dolayı hâlihazırda tüm leishmaniasis olgularında kullanıma uygun tek bir tanı, tek bir tedavi ve kontrol yöntemi mevcut değildir. Özgüllük ve duyarlılığı yüksek olan, invaziv olmayan ve uygulaması basit testlerin bulunmaması, sahada tanıyı güçleştirmektedir. Hâlihazırda kullanılan kemik iliği veya dalak örneği ile çalışılan parazitolojik testler, invaziv yöntemler olarak değerlendirildiğinden dolayı her hasta için uygun görülmemektedir. Çapraz reaksiyon görülmesinden dolayı, serolojik testlerin özgüllük ve duyarlılığı düşüktür. Son zamanlarda geliştirilen nükleik asit tabanlı yöntemler ise oldukça avantajlı olmasına karşın gerek duyulan ekipmanlar karmaşık ve fazla olarak görülmektedir. *Leishmania* türlerinin moleküler tanısı için birçok çalışma yapılmaktadır. Tür tanımı analizlerinde *Leishmania* genomuna ait, ribozomal DNA⁽⁴⁾, kinetoplast DNA'sı⁽⁵⁾, *katepsin L-benzeri sistein proteaz B* gen bölgesi⁽⁶⁾ ve sitokrom b (*cyt b*) gen bölgesi⁽⁷⁾ kullanılan bölgelerinden bazılarıdır.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR) yöntemi ile parazitin *cyt b* gen bölgesi kullanılarak tasarlanan primer ve probaların Eski Dünya *Leishmaniasis* etkeni olan *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. aethiopica* ve *L. infantum/donovani* türlerinin başarılı bir şekilde genotipleştirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'nda kademeli dondurma yöntemi ile kriyoprezervasyonu yapılarak sıvı azot tankında saklanmış olan *L. tropica*

(MHOM/AZ/1974/SAF-K27), *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), *L. infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1), *L. donovani* (MHOM/IN/1980/DD8), *L. aethiopica* (MHOM/ET/1972/L100), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) ve *L. infantum/donovani* hibrit suşu (MHOM/TR/2014/CBU25) referans grubu izolatları olarak kullanılmıştır. Bunların yanı sıra Türkiye’de kutanöz ve visseral Leishmaniasisli hastalardan elde edilmiş ve dondurularak sıvı nitrojende saklanmış 22 adet hasta izolatu çalışma grubu izolatları olarak kullanılmıştır.

Sıvı azottan çıkarılan tüm izolatlar 37°C’lik su banyosunda kısa süre içerisinde çözündürülmüş ve NNN besiyerine ve RPMI 1640+%15 FCS içeren sıvı besiyerine ekimleri yapılmıştır. Üreyenler RPMI 1640+%15 FCS içeren besiyerine ekilerek üreme yoğunlukları 10⁷ promastigot/ml’ye ulaştığında Roche High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®) kullanılarak kitin içerisinde belirtilen yönergeler doğrultusunda DNA izolasyonları yapılmıştır. Detaylı çalışma bilgisi aşağıda verilmiştir.

NNN besiyeri: Katı faz: Bir balon içerisine eklenen NaCl (1 g), agar (5 g), pepton (2 g) ve distile su (200 mL), 20 dakika süreyle 121°C sıcaklıkta otoklavlanmıştır. Aseptik ortam şartlarında, steril balon içerisine 30 mL tavşan kanı konulmuştur. Ardından, gentamisin solüsyonundan 2.3 mL (%1) eklenmiştir ve homojen olarak karışması sağlanmıştır. Agar içeren süspansiyon yaklaşık 50°C sıcaklığa kadar soğutulmuştur, üzerine steril tavşan kanı eklenerek homojenize edilmiştir ve zaman kaybetmeden steril tüpler içerisine 3-4 mL olarak dağıtılmıştır. Besiyerinin katılaşması için eğimli bir zemine konulan tüpler, oda sıcaklığında bekletilmiştir ve sonrasında kullanılmaya dek +4°C’de korunmuştur.

Sıvı faz: Kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarılan besiyerinin dip kısmında az bir miktarda kondansasyon sıvısı adı verilen bir sıvı toplanır. Bu sıvı üzerine, RPMI-1640 besiyerinden (%15 FCS) 1 mL eklenmiştir ve besiyeri ekim için hazırlanmıştır.

DNA izolasyonu: Besiyerinde üreme yoğunlukları 10⁷ promastigot/mL olduğunda promastigotlar üç kez PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra, filtrelili pipet uçları kullanılarak ependorf tüp içerisine promastigot süspansiyonundan 200 µL eklenmiştir. Üzerine 40 µL proteinase K ve 200 µL “Binding Buffer” solüsyonlarından eklenmiştir ve homojen olarak karışması sağlanmıştır. 70°C sıcaklıktaki ısıtıcı blok içerisinde 10 dakika süreyle bekletilmesi sonrasında, ependorf tüp ısıtıcı bloktan çıkarılmıştır, içerisine isopropanol alkol solüsyonundan 100 µL eklenmiştir ve karışması sağlanmıştır. Ependorf içerisindeki süspansiyon, “Collection” tüp içine konulan filtrelili tüp içerisine eklenmiştir ve 8000 g devirde 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, “Collection” tüp atılmıştır ve yenisiyle değiştirilmiştir. “Removal Buffer” solüsyonundan filtrelili tüp içerisine 500 µL eklenmiştir ve 8.000 g devirde 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, “Collection” tüp atılmıştır ve yenisiyle değiştirilmiştir. “Wash Buffer” solüsyonundan filtrelili tüp içerisine 500 µL eklenmiştir ve 8.000 g devirde 1 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, “Collection” tüp atılmıştır ve yenisiyle değiştirilmiştir. Bu işlem bir kez daha yinelenmiştir. Tekrar yıkama yaptıktan sonra filtrelili tüp boş olarak 15 saniye kullanılan santrifüjün en üst sınırında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra filtrelili tüp boş bir ependorf tüpü içerisine yerleştirilmiştir. Filtrelili tüp içerisine 70°C sıcaklıktaki “Elution Buffer” solüsyonundan 100 µL eklenmiştir. Ardından, 8.000 g devirde 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında filtrelili tüp atılmıştır ve DNA örneği ependorf tüp içinde izole edilmiştir. PZR çalışılana dek, uygulanan bu protokol sonucunda elde edilen DNA örnekleri -20°C’de korunmuştur.

Genotiplendirme: Elde edilen DNA’lar kontrol amacı ile daha önce kullandığımız Leishmania’nın ITS-1 bölgesine özgü primer ve problemleri kullanılarak GZ-PZR çalışılmıştır⁽⁸⁾. Daha sonra aynı DNA örnekleri yeni tasarladığımız *cyt b* gen bölgesi primer ve problemleri kullanılarak GZ-PZR çalışılmıştır.

Yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* gen bölgesine özgü primer ve problar;

Forward: GCAACYGTCCCAGTTATWGG
 Revers: AAKGTATCAACTATWACTCAWGAYTCTTCAT
 Probe 1: free-TTCGGATGGGTTTTGTGATAGAT-Fluo
 Probe 2: LC640-TGCATTTTATTGYGARGCTTTATG

Yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* gen bölgesine özgü primer ve problar ile GZ-PZR analizi için hazırlanan toplam 10 µL'lik reaksiyon karışımına (Tablo 1) GZ-PZR protokolü (Tablo 2) uygulanarak erime eğrileri analizi her bir örnek için elde edilmiştir. Örneklerin erime eğrileri ile referans suşların erime eğrilerine göre incelenen suşların genotiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Yerel Etik Kurulu'nun 03/08/2016 tarih ve 20.478.486-292 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* bölgesine özgü primer ve problar ile hazırlanan PZR mix.

İçerik	Molar	Hacim
Forward Primer	5 µM	1 µL
Reverse Primer	5 µM	1 µL
Probe 1	2 µM	1 µL
Probe 2	2 µM	1 µL
Enzim (Fast Start)	-	1 µL
Mg ²⁺	-	0.8 µL
H ₂ O	-	2.2 µL
DNA	-	2 µL
Toplam		10 µL

Tablo 2. Yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* bölgesine özgü primer ve problar ile hazırlanan PZR protokolü.

Program	Döngü sayısı	Analiz Modu	Hedef sıcaklık (°C)	Süre	Okuma modu	Sıcaklık artış hızı (°C/sn)	Okuma (°C başına)
Denatürasyon	1	-	95°C	10 dk	-	4.4	-
			95°C	10 sn	-	4.4	-
Döngü	45	Kantifikasyon	60°C	10 sn	-	2.2	-
			72°C	15 sn	Tek	4.4	-
Erime	1	Erime eğrisi	95°C	2 dk	-	4.4	-
			45°C	2 dk	-	2.2	-
Soğutma	1	-	65°C	0 sn	Sürekli	0.11	5
			40°C	10 sn	-	2.2	-

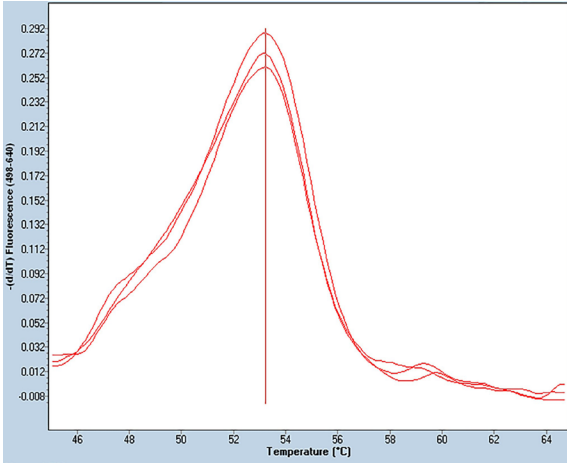
BULGULAR

Elde edilen DNA'ların kontrol amacı ile daha önce kullandığımız *Leishmania*'nın ITS1 bölgesine özgü primer ve probları kullanılarak yapılan GZ-PZR analizi sonucunda elde edilen erime eğrileri değerlendirilmiştir. Bu ön çalışmada, *Leishmania braziliensis* ve *Leishmania amazonensis* referans suşu anlamlı bir sonuç vermemiştir. Diğer türlerde ve hasta suşları ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen erime eğrileri değerlendirildiğinde genotipleme başarı bir şekilde yapıldığı görülmüştür.

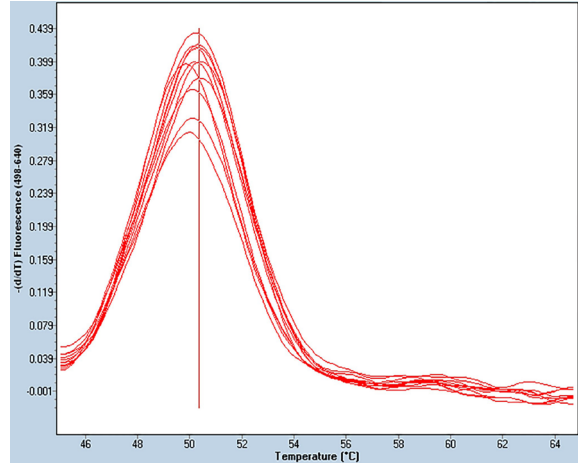
Yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* gen bölgesine özgü primer ve problar kullanılarak yapılan GZ-PZR analizi sonucunda elde edilen eğriler değerlendirildiğinde *L. tropica* referans suşu ile 2 hasta izolatu (Şekil 1), *L. major* referans suşu ile 10 hasta izolatu (Şekil 2), *L. infantum* referans suşu ile 3 hasta izolatu (Şekil 3), *L. donovani* referans suşu ile 5 hasta izolatu (Şekil 4), *L. aethiopica* referans suşu ile 1 hasta izolatu (Şekil 5), ve *L. infantum/donovani* hibrit referans suşu ve 1 hasta izolatu (Şekil 6) erime eğrileri değerlendirildiğinde yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* gen bölgesine özgü primer ve probların eski dünya *Leishmania* türlerini genotiplemediği görülmüştür.

TARTIŞMA

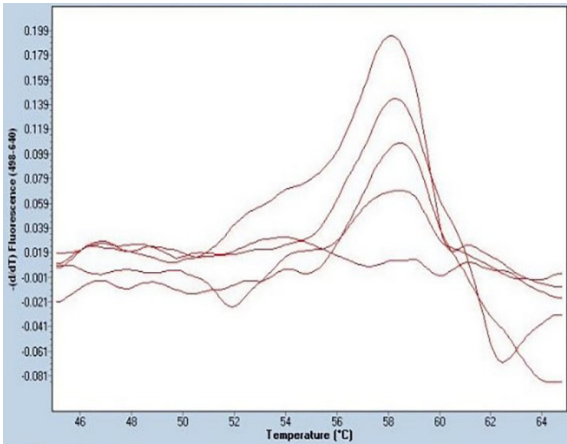
Epidemiyolojik durumun oldukça çeşitli olmasından dolayı halihazırda tüm leishmaniasis olgularında kullanıma uygun tek bir tanı, tek bir tedavi ve kontrol yöntemi mevcut değildir. Özgüllük ve duyarlılığı yük-



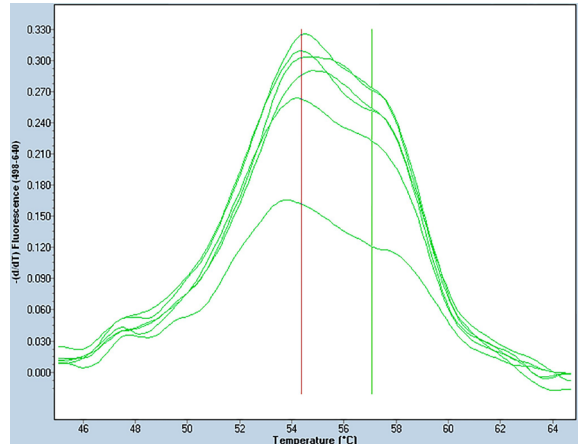
Şekil 1. *Leishmania tropica* referans suşu ile hasta izolatlarının erime eğrileri.



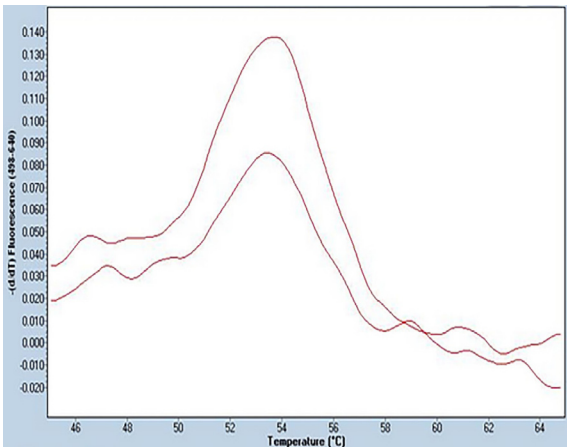
Şekil 2. *Leishmania major* referans suşu ile hasta izolatlarının erime eğrileri.



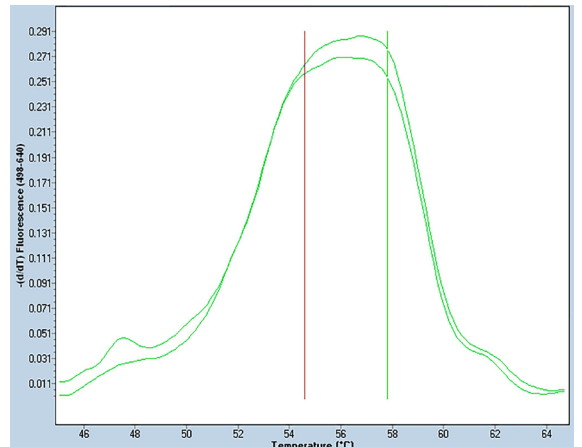
Şekil 3. *Leishmania infantum* referans suşu ile hasta izolatlarının erime eğrileri.



Şekil 4. *Leishmania donovani* referans suşu ile hasta izolatlarının erime eğrileri.



Şekil 5. *Leishmania aethiopica* suşu ve hasta izolatının erime eğrisi.



Şekil 6. *Leishmania infantum/donovani* hibrit suşu ve hasta izolatının erime eğrisi.

sek olan, invaziv olmayan ve uygulaması basit testlerin bulunmaması, sahada tanıyı güçleştirmektedir. Hâlihazırda kullanılan kemik iliği veya dalak örneği ile çalışılan parazitolojik testler, invaziv yöntemler olarak değerlendirildiğinden dolayı her hasta için uygun görülmemektedir. Çapraz reaksiyon görülmesinden dolayı, serolojik testlerin özgüllük ve duyarlılığı düşüktür. Son zamanlarda geliştirilen nükleik asit tabanlı yöntemler ise oldukça avantajlı olmasına karşın gerek duyulan ekipmanlar karmaşık ve fazla olarak görülmektedir^(9,10).

Leishmaniasis tanı protokolünde, bilinen moleküler metodlar da uygulanmaktadır. Tüm genom analizi 2005 yılında tamamlanmış olan *L. major* Friedlin suşunun analiz sonuçları araştırmacıların kullanımına sunulmuştur. PZR yöntemi, az miktarda klinik materyal ile çalışmaya olanak tanınması, etkenin hızlıca belirlenebilmesi ve uygulanan tedavi protokolünün başarısının takip edilebilmesi gibi avantajlara sahiptir. PZR'nun kullanıma girmesi ile birlikte, moleküler testlerin VL ve KL enfeksiyonları için tanı ve araştırmalardaki yeri ve önemi artmıştır. *Leishmaniasis* tanısı için farklı klinik mateyallerden yapılan total DNA izolasyonu ile PZR yöntemi uygulanmaktadır. Kan örnekleri kullanıldığında; santrifüj işlemi sonrasında dipteki pelletten tampon solüsyonu içerisinde süspansiyon hazırlanmaktadır. Lenf bezi aspiratları ve deri örneği kullanıldığında da tampon solüsyon içerisinde homojenize edilmektedir. Her bir örnek için kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılmaktadır. Daha önce üretilen belirli sayıdaki parazitlerden DNA izole edilmesi ve GZ-PZR ile standart eğriler oluşturulmasından dolayı, örneklerdeki parazit miktarı ile ilgili oranlamada bulunulabilmektedir^(10,11).

Mikroskopik inceleme ile karşılaştırıldığında KL'de, PZR ile oldukça hassas sonuçlar elde edilmektedir. VL'de ise mikroskopik inceleme sonucu negatif olduğunda dâhi serolojik testler bağışıklığı sağlam bireylerde %100'e yakın duyarlılığa sahip olmakla birlikte, doğrulayıcı test olarak PZR oldukça önemlidir. Spesifik antikor yanıtının az olmasından dolayı bağışıklığı basılanmış bireylerde (AIDS/HIV+, transplant hastası

vb.) PZR, mikroskopi sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde tanıda önem kazanmaktadır^(10,12,13).

Farklı gen bölgeleriyle PZR ve PZR-RFLP yöntemleriyle aynı zamanda tür tanımlanması da yapılabilmekte ve bir bölgede hastaların hangi *Leishmania* türü ile enfekte olduklarına rutin olarak yanıt verme olanağı sağlanmaktadır. *Kinetoplastidae* ailesinde bulunan, visseral ve kutanöz leishmaniasise neden olan *Leishmania* parazitlerinin nükleer DNA'ları yanısıra kinetoplastik DNA'ları (kDNA) da bulunmaktadır. Parazitin kDNA'sında büyük daire (maxicircle) ve küçük daire (minicircle) bölgeleri bulunmaktadır. "Minicircle" bölümünün 10.000 kopyadan oluşması tanıdaki hassasiyeti artırmaktadır. "Minicircle" sabit bölgesi tanıda çok hassas olmasına karşın türler arası ve tür içi genotipik farklılıkları gösterememektedir. Değişken bölgesi ise "RNA editing" bölgesi olup, in vitro besiyerlerinde sürdürülen suşlarda zaman içinde değişiklik gösterebilmektedir, hastadan alınan klinik örneklerde ise tür içi genotipik farklılıkların gösterilmesinde kullanılabilir. Nükleer DNA'da 27. kromozomda bulunan small subunit ve large subunit ribosomal RNA (*ssu* ve *lsu* rRNA) genleri arasında kalan 0.9-1.2 kb kodlamayan bölgenin (internal transcribed spacer, ITS) *Leishmania* türleri ayırabilecek düzeyde değişken olduğu bildirilmiştir^(10,14-16).

Kliniğe başvuran hastalarda ve saha çalışmalarındaki örneklerin toplanması, laboratuvara taşınması ve DNA izolasyonundaki yeni tekniklerin sağladığı önemli avantajlar sonucunda PZR ile tanı altın standart olarak kabul edilebilir konuma gelmiştir. PZR ile yapılan çeşitli çalışmalarda, %100 özgüllük ve %92-98 aralığında değişen duyarlılığa ulaşılabilmektedir. Ayrıca PZR ile *Leishmania* parazitlerine tür ve alt tür seviyesinde tanı konulabilmektedir. Türe dayalı tanı konması tedavinin yönlendirilmesi ve prognozun belirlenmesinde önem taşımaktadır. Bu durum PZR analizinin dünyada yalnızca gelişmiş merkezlerde değil leishmaniasisin endemik olduğu ülkelerde saha koşullarında da yapılabilmesi ile bu konuda daha da gelişmeler sağlanacağı vurgulanmaktadır^(10,17).

Her bir amaca yönelik olarak uygulanan yöntemler, yöntemlerin kombinasyonları ve genomdaki hedefler değişebilmektedir. Belirtilen bütün bu konularda çalışmalar devam etmektedir. Tanı, kantitasyon ve canlılık çalışmaları için hassasiyetin en yüksek seviyede olması gerekli olduğu için kopya sayısı yüksek olan hedeflerle çalışılmaktadır (rRNA genleri, kinetoplast DNA'nın küçük daire bölümü, mini-exon genleri ve genomik tekrar bölgeleri gibi). Tür ayırımında hedef bölgenin hassasiyeti sağlaması kadar taksonomik düzeyde değişken olması gerekliliği de önem taşımaktadır. Bu nedenle kopya sayısı çok ve polimorfik bölgeler [*gp63*, rRNA geninin "internal transcribed" bölgeleri, *ısı şok proteini 70 (hsp70)*, *sistein proteinaz* genleri gibi] hedeflenmektedir. Parazit düzeyinde ayırım içinse çözünürlük düzeyi yüksek olması gerektiğinden kinetoplast DNA küçük dairesinin değişken bölümü, mikrosatellitler veya bazı antijen kodlayan genler kullanılmaktadır^(10,17-20).

Leishmaniasis tanısı için dokudan izole edilen DNA örneklerinin kullanıldığı birçok PZR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemler vektör ve rezervuarların epidemiyolojik araştırmalarında da başarıyla kullanılmaktadır. PZR hedefi olarak çok kopyalı dizilerin seçilmesiyle en yüksek duyarlılığa ulaşılmaktadır. PZR'nun özgünlüğü *Leishmania*'nın genomundaki korunan ya da değişken bölgelerin seçilmesiyle özel gereksinimlere göre adapte edilerek parazit cins kompleksi, tür ya da bireysel izolat seviyesinde tanımlanabilir. Ayrıca görünürde başarılı bir tedaviden sonraki kontrolde PZR uygulanarak relapslar, PKDL ve MKL gelişecek hastalıkların saptanması gibi hastalığın prognozu belirlenebilmektedir⁽¹⁰⁾.

Yapılan bir çalışmada, çeşitli kan ile beslenen vektörlerin kuş ve memeli konaklarını tanımlamak için kullanılan mitokondriyal *cyt b* geninin çoklu dizilimlerine göre tasarlanmış primerlere dayanan DNA sekansı yapılarak GZ-PZR protokolü uygulanmıştır. *Cyt b* geninin 359 bp'lik sekansını kodlayan bir fragmentin amplifikasyonu yapılarak analiz edilen toplam 362 dışıdan 192 dışı kum sineğinde (%53) tanımlanmış amplifikasyon ürünlerini verdiğini bulunmuştur⁽²¹⁾.

Genetik seçimin neden olduğu genetik farklılık, kum sineklerinin ve diğer artropodların insektisid hassasiyetini ve vektörel kapasitesini etkilemektedir. *Lutzomyia* spp'deki mitokondriyal *cyt b* geninin genetik çeşitliliği üzerine yapılan bir çalışmada, Peru'da dolaşan 13 türdeki *cyt b* gen dizileri belirlenmiş ve Peruvian Andes'deki *Leishmania* (*Viannia*) *peruviana*'ın ana vektörü olan *Lutzomyia peruensis*'deki tür içi genetik farklılık değerlendirilmiştir. Otuz altı *Lutzomyia peruensis*'in *cyt b* gen sekanslarındaki tür içi genetik farklılık analizlerinde genin orta bölgesinde yüksek derecede polimorfik olan 3 bölge tanımlanmıştır. Ülkedeki 3 bölgenin 9 alanındaki 130 *Lutzomyia peruensis*'in *cyt b* gen sekansları üzerine haplotip ve gen ağı analizleri yapılmıştır. Yapılan bu çalışma ile kum sineği popülasyonunun genetik yapısının analizi için *cyt b* geninin orta bölgesinin yararlı olduğu bildirilmiştir⁽²²⁾.

Çeşitli türlerde ve çalışmalarda, gerek genotiplemede gerekse popülasyonların genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde *cyt b* gen bölgesi kullanılmaktadır. *Leishmania*'larda ise *Leishmania* genomuna ait, ribozomal DNA, kinetoplast DNA'sı, *katepsin L-benzeri sistein proteaz B* gen bölgesi ve *cyt b* gen bölgesi kullanılan bölgelerinden bazılarıdır. *cyt b* gen bölgesi türlere özgü spesifik değişikliklere sahip olmakla birlikte, A (Adenin) ve T (Timin)'den oldukça zengin ve homopolimeri bulunan bölgedir ve primer probe tasarımını gerçekleştirmek oldukça zor olmasına rağmen türe, özgü genetik materyalleri de taşımaktadır. Bizim çalışmamızda 22 leishmaniasis hastasından elde edilen hasta izolatu parazitinin *cyt b* gen bölgesine ait yeni tasarladığımız primer ve FRET problemlerinin GZ-PZR yöntemi ile genotiplendirildiğinde *L. tropica*, *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. aethiopica* ve *L. infantum/donovani* hibrit türlerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak tasarlanan primer ve FRET problemlerinin Yeni Dünya leishmaniasis etkenleri olan *L. braziliensis* ve *L. amazonensis* referans suşlarında çalışmamıştır.

Sonuç olarak, yeni tasarlanan *Leishmania*'nın *cyt b* gen bölgesine özgü primer ve problemler kullanılarak yapılan GZ-PZR analizi sonucunda elde edilen eğriler

değerlendirildiğinde bölgemizdeki *Leishmania* türlerini başarılı bir şekilde ayırdığı görülmüştür.

Özellikle ülkemizde Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgesinde, dünyada ise Akdeniz havzası başta olmak üzere birçok ülkede tasarladığımız primer ve probler kullanılarak leishmaniasis etkeninin kısa sürede doğru bir şekilde tanınması ve tür ayrımını yapabiliyor olması hastalığın tedavi sürecini ve yaşam kalitesini olumlu etkileyecektir. Bu bir pilot çalışma olup, fazla sayıda hasta izolatu ve klinik materyal ile geniş kapsamlı çalışmaların yapılması ileride planlanacaktır. Daha sonra bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar kit hâline dönüştürülerek ileride patent alınması düşünülmektedir.

Teşekkür: Bu çalışmayı BAP 2016-149 nolu projesi ile desteklemiş olan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na sağladıkları katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. *Leishmania* and the Leishmanioses. In: Parasitology and Vector Biology. Academic Press, San Diego, CA. 2000:57-71.
2. Osman OF. The PCR and direct agglutination test for diagnosis and management. Universiteit van Amsterdam [Doktora tezi], 1998.
3. Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 4. baskı. İstanbul: İstanbul: İÜ Cerr Tıp Fak Yayınları; 1991.
4. Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995;73(1-2):145-55. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00108-D](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00108-D)
5. de Paiva-Cavalcanti M, de Moraes RCS, Pessoa-e-Silva R, et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 2015;5:31. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
6. Nath-Chowdhury M, Sangaralingam M, Bastien P, et al. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation. Parasit Vectors. 2016;9:255. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1531-4>
7. Gebhardt M, Ertas B, Falk TM, Blödorn-Schlicht N, Metz D, Böer-Auer A. Fast, sensitive and specific diagnosis of infections with *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsies by cytochrome b polymerase chain reaction. Br J Dermatol. 2015;173(5):1239-49. <https://doi.org/10.1111/bjd.14088>
8. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, et al. A real-time ITS1-PCR based method in the diagnosis and species identification of *Leishmania* parasite from human and dog clinical samples in Turkey. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(5):e2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
9. Jhingaran A, Chatterjee M, Madhubala R. Leishmaniasis: Epidemiological trends and diagnosis. In: Myler PJ, Fasel N (Eds.) *Leishmania: After the genome*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2008:1-14.
10. Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, et al. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. Parasit Vectors 2013;6:342. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-342>
11. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. Ann N Y Acad Sci. 2004;1026:139-43. <https://doi.org/10.1196/annals.1307.018>
12. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305-18. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
13. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(5):951-8. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>
14. El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, et al. *Leishmania donovani*: Intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. Exp Parasitol. 2001;97(1):35-44. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>
15. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(5):575-9. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)
16. Kuhls K, Mauricio IL, Pratlong F, Presber W, Schönian G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. Microbes Infect. 2005;7(11-12):1224-34.

- <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.009>
17. Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(2):97-101.
<https://doi.org/10.1097/01.aco.0000065077.06965.4d>
 18. Le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1953-7.
 19. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007;45(1):21-5.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
 20. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Heal.* 2002;7(8):641-51.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2002.00911.x>
 21. Carvalho GML, Rêgo FD, Tanure A, vd. Bloodmeal identification in field-collected sand flies from Casa Branca, Brazil, using the cytochrome b PCR method. *J Med Entomol.* 2017;54(4):1049-54.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjx051>
 22. Yamamoto K, Cáceres AG, Gomez EA, et al. Genetic diversity of the mitochondrial *cytochrome b* gene in *Lutzomyia* spp., with special reference to *Lutzomyia peruensis*, a main vector of *Leishmania* (Viannia) *peruviana* in the Peruvian Andes. *Acta Trop.* 2013;126(2):156-63.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.02.007>