

# Layşmanyaz Tanısı İçin Karaciğer Ekstreli Besiyerinin Novy-MacNeal-Nicolle Besiyeri ve Moleküler Yöntemle Karşılaştırılması

## Comparison of Liver Extract Medium With Novy-MacNeal-Nicolle Medium and the Molecular Method for the Diagnosis of Leishmaniasis

Ahmet Özbilgin<sup>1</sup> , Özlem Tünger<sup>2</sup> , Işıl İnanır<sup>3</sup> , İbrahim Çavuş<sup>1</sup> , Nami Ege Perk<sup>1</sup> , Yener Özel<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

<sup>3</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

### Özet

**Amaç:** Layşmanyazın laboratuvar tanısı, kültür, mikroskopik inceleme, serolojik ve moleküler yöntemlere dayanır. Tüm dünyada kültür için sıklıkla Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyeri kullanılmaktadır. Moleküler tanı yöntemlerinin tanısasal amaçlı kullanımı sonrası NNN besiyerinin duyarlılığı konusunda şüpheler oluşmuştur. Bu çalışmada, yeni bir besiyerinin etkinliğinin NNN besiyeri ve moleküler yöntemle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'na Kilis, Osmaniye, Bitlis, Gaziantep ve Manisa illerimizdeki sağlık merkezlerinden tanı veya doğrulama amacıyla kutanöz layşmanyaz (KL) şüpheli 22 ve viseral layşmanyaz (VL) şüpheli 4 hasta örneği gönderilmiştir. Bu illerdeki sağlık merkezlerine önceden hazırlanan besiyerleri gönderilmiş ve alınan klinik örneklerden bu besiyerlerine ekim yapılması istenmiştir. KL için alınan iğne aspirasyon sıvısı ve VL için kemik iliği örnekleri, NNN besiyerine ve yeni geliştirilen karaciğer ekstreli besiyerlerine eşzamanlı olarak ekilmiş, yayma preparatlarıyla birlikte kurumumuza gönderilmiştir. Yayma preparatları Giemsa yöntemiyle boyanarak incelenmiştir. Ayrıca bu materyallerde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle parazit DNA'sı aranmıştır.

**Bulgular:** 26 örneğin 14'ünde *Leishmania* amastigotları görülmüştür. Örneklerden NNN besiyerine ekilenlerin 8'inde, yeni besiyerine ekilenlerin ise 24'ünde promastigot üremesi görülmüştür. KL şüpheli 2 hastada her iki besiyerinde de parazit üretilenmemiştir. Genotiplendirme yapıldığında dermatotropik yerleşim gösteren izolatların *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani*; viserotropik yerleşim gösteren izolatların ise *L. tropica* ve *L. infantum/donovani* olduğu saptanmıştır.

### Abstract

**Objective:** Diagnosis of Leishmaniasis is based on culture, microscopic examination, serological tests, molecular methods. Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium is mostly used for culture all over the world. The use of molecular methods for diagnostic purposes led to the questioning of the sensitivity of NNN medium. In this study, it is aimed to compare the performance of a new culture medium with those of NNN medium and the molecular method.

**Methods:** Samples of 22 patients with suspected cutaneous leishmaniasis (CL) and 4 patients with suspected visceral leishmaniasis (VL) were sent to Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine Department of Medical Parasitology for diagnosis or confirmation from Kilis, Osmaniye, Bitlis, Gaziantep and Manisa provinces. Pre-prepared media were sent to the health centers in these provinces and inoculation of these media with clinical samples was requested. Needle aspiration fluid for CL and bone marrow samples for VL were cultured simultaneously on NNN medium and newly developed liver extracted medium (LEM), and were sent to our institution with their smears. Smears were examined by staining with Giemsa method. In addition, parasite DNA was identified with real-time polymerase chain reaction method in these materials.

**Results:** *Leishmania* amastigotes were detected in 14 of 26 samples. Promastigote proliferation was observed in 8 and 24 of the samples cultured in NNN and LEM respectively. No proliferation was detected by either method in samples of 2 patients with suspected CL. *L. tropica*, *L. major* and *L. infantum/donovani* were detected among isolates showing dermatotropic location, and *L. tropica* and *L. infantum/donovani* were detected among isolates with viscerotropic location by genotyping.

**ORCID iDs of the authors:** A.Ö. 0000-0003-3613-8741; Ö.T. 0000-0001-9187-3402; İ.İ. 0000-0003-1383-3987; İ.Ç. 0000-0002-3860-0146; N.E.P. 0000-0002-6411-4096; Y.Ö. 0000-0001-6618-8251

**Cite this article as:** Özbilgin A, Tünger Ö, İnanır İ, Çavuş İ, Perk NE, Özel Y. [Comparison of liver extract medium with Novy-MacNeal-Nicolle medium and the molecular method for the diagnosis of leishmaniasis]. *Klinik Derg.* 2020; 33(2): 137-41. Turkish.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

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

E-posta / E-mail: icvs26@yahoo.com

(Geliş / Received: 19 Aralık / December 2019; Kabul / Accepted: 14 Haziran / June 2020)

DOI: 10.5152/kd.2020.29

**Sonuçlar:** Layşmanyaz tanısında yaygın olarak kullanılan NNN besiyeri ülkemizde bazı *Leishmania* suşlarının tanısında yeterli duyarlılıkta değildir. Bu nedenle tanı için çalışmamızda sunduğumuz karaciğer ekstreli besiyeri gibi zenginleştirici bir besiyeri kullanılması ve bu sonucun başka çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

*Klimik Dergisi 2020; 33(2): 137-41.*

**Anahtar Sözcükler:** Layşmanyaz, tanı, kültür teknikleri, Novy-MacNeal-Nicolle besiyeri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.

**Conclusions:** NNN medium, which is widely used in leishmaniasis diagnosis, is not sensitive enough for the diagnosis of some *Leishmania* strains in Turkey. Therefore, an enrichment medium such as liver extract medium which we have presented in this study should be used for diagnosis. However our results should be confirmed with more studies.

*Klimik Dergisi 2020; 33(2): 137-41.*

**Key Words:** Leishmaniasis, diagnosis, culture techniques, Novy-MacNeal-Nicolle medium, real-time polymerase chain reaction.

## Giriş

Layşmanyaz, tropikal ve subtropikal ülkelerde görülen, infekte dişi tatarcıgın (*Phlebotomus* spp.) kan emerken bulaştırdığı hücre içi bir protozoon olan *Leishmania* cinsindeki parazitlerin etken olduğu bir hastalıktır. Layşmanyazın, viseral layşmanyaz (VL), kutanöz layşmanyaz (KL) ve mukokutanöz layşmanyaz olmak üzere üç ana klinik formu vardır (1). Ülkemizde VL'ye *L. infantum*, *L. donovani* ve *L. tropica*, KL'ye ise *L. tropica*, *L. major* ve *L. infantum/donovani* türlerinin sebep olduğu bildirilmektedir (2). Hasta materyalinde amastigotların görülmesi veya parazitin kültürde üretilmesi kesin tanı konulması açısından önem taşır (3). Doku sıvılarından yapılan yayma preparatların metanolle fikse edildikten sonra Wright veya Giemsa yöntemiyle boyanarak amastigotların görülmesi veya bu materyallerin Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekilip promastigotların üretilmesi, layşmanyaz tanısında altın standard olarak kabul edilir (4). Kültürlerin duyarlılığı, aspirasyon materyallerinin boyanarak mikroskopik olarak incelenmesinden genellikle daha yüksektir (5). Tanı amacıyla hem boyama, hem de kültür yapılmasının daha uygun olduğu, çünkü kültürde üreme olmayan bazı olgularda boyamayla amastigotların görülebileceği de bilinmektedir (6).

Son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin tanısal amaçlı kullanımı sonrası, ülkemizin bazı bölgelerinde bazı *Leishmania* türlerinin NNN besiyerinde üremediği düşünülmektedir. Bu çalışmada kültür için kullanılacak yeni bir besiyerinin araştırılması ve etkinliğinin NNN besiyeri ve moleküler yöntemle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Yöntemler

Çalışmaya Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına layşmanyaz ön tanısıyla yönlendirilen hastalar alınmıştır. Her hasta için demografik bilgileri ve lezyon özelliklerini içeren bir olgu rapor formu doldurulmuştur.

**Karaciğer ekstreli besiyerinin hazırlanması:** Besiyerinin katı fazı hazırlanırken disodyum fosfat (Merck, Darmstadt, Almanya) 0.2 gr, D-glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya) 1 gr, karaciğer ekstresi (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, ABD) 5 gr, pepton (Merck, Darmstadt, Almanya) 1 gr, et ekstresi (Merck, Darmstadt, Almanya) 6 gr, agar (Merck, Darmstadt, Almanya) 2.4 gr tartıldıktan sonra bir balon içerisine konulmuş ve üzerine 100 ml distile su eklenerek karıştırılmıştır. Karışım 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak homojenize ve sterilize edilmiştir. Daha sonra 30 ml defibrinize insan kanı küçük steril bir balona alınmıştır ve 1.3 ml gentamisin solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Kan yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulmuş agarın üzerine eklenmiş, karışması sağlanmış ve hemen steril tüplere 3-4 ml miktarında dağıtılmıştır. Tüplere belli bir eğim verilerek katılaştıncaya kadar oda sıcaklığında

tutulduktan sonra +4°C'de saklanmıştır. Ekim yapılacağı zaman buzdolabından çıkarılan besiyerinin dip kısmında toplanan kondansasyon sıvısı üzerine 1 ml %15 fetal sıgır serumu (FBS) içeren Gibco™ RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) besiyeri eklenmiştir.

**NNN besiyerinin hazırlanması:** Besiyerinin katı fazı hazırlanırken agar (Merck, Darmstadt, Almanya) 5 gr, pepton (Merck, Darmstadt, Almanya) 2 gr, NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya) 1 gr tartılarak bir balon içerisine konulduktan sonra üzerine 200 ml distile su eklenerek 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra 30 ml defibrine tavşan kanı ve 1.3 ml gentamisin solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulmuş agarın üzerine kan eklenmiş, karışması sağlanmış ve hemen steril tüplere 3-4 ml miktarında dağıtılmıştır. Tüplere belli bir eğim verilerek katılaştıncaya kadar oda sıcaklığında tutulmuş ve +4°C'de saklanmıştır. Kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarılan besiyerinin dip kısmında toplanan kondansasyon sıvısı üzerine 1 ml %15 FBS içeren Gibco™ RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) besiyeri eklenmiş ve besiyeri ekim yapmaya uygun hale getirilmiştir.

**Yayma preparatların ve besiyerlerine ekimlerin yapılması:** KL şüpheli hastaların iğne aspirasyon sıvısı ve VL şüpheli hastaların kemik iliği aspirasyon sıvısından yapılan yayma preparatlar, metil alkolle tespit sonrası Giemsa yöntemiyle boyanarak mikroskop altında (100x) *Leishmania* amastigotlarının varlığı açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca bu materyallerden besiyerlerine ekim yapılmıştır. Besiyerleri 26°C'de inkübasyona bırakılmış ve promastigotların varlığı açısından 15 gün süreyle gün aşırı kontrol edilmiştir.

**Moleküler yöntemin uygulanması:** Hastalardan alınan materyalden hazırlanan tüm örneklerden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) ile üretici firmanın talimatları doğrultusunda DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen örnekler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. GZ PZR için "internal transcribed spacer" 1 (ITS1) problu test uygulanmıştır (7). *Leishmania* parazitlerinin küçük alt birim rRNA ve 5.8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal ITS1 bölgesine özgü aşağıda gösterilen primer ve problar kullanılarak çoğaltılmıştır: "Forward" primer: 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3'. "Reverse" primer: 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3'. Prob 1: 5'-CCGTTTATACAAAATATACGGCGTTTCCGTTT-Fluo-3'. Prob 2: 5'-LCRed-640-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-Pho-3'.

GZ PZR analizi için hazırlanan toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımı, 4.5 µl PCR Grade Water (Roche Applied Science, Penzberg, Almanya), her bir primerden 1 µl, her bir probdan 0.5 µl, QuantiTect® Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya)'ten 12.5 µl ve 5 µl genomik DNA içermektedir.

Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında belirlenen termal profil, 95°C'de 15 dakika ön denatürasyon, 40 döngü (95°C'de 15 saniye denatürasyon, 50°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 20 saniye uzama), 95°C'de 1 dakika ve 40°C'de 1 dakika sonlanmayla "melting" analizi yapılarak tür ayrımı yapılmıştır.

Çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin Klinik Araştırmalar Komitesi Etik Kurulu'ndan (23 Eylül 2010 tarih ve 6 sayı) ve Yerel Etik Kurulu'ndan (11 Mayıs 2016 tarih ve 20478486-171 sayı) onay alınmıştır.

## Bulgular

Çalışmaya Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına layşmanyaz ön tanısıyla yönlendirilen 26 hastadan 22'sinin ön tanısı KL ve 4'ünün ön tanısı VL'ydi. Bunlardan 24'ünde en az bir yöntemle pozitif sonuç alınmış ve hasta bilgileri Tablo 1'de verilmiştir.

Lezyon/lenf nodlarından iğne aspirasyonları ve kemik iliği aspirasyonlarından yapılan Giemsa boyalı preparatların incelenmesi, NNN besiyerine ve karaciğer ekstreli besiyerine yapılan ekim sonucunda, 6 hastada 3 yöntemle, 10 hastada 2

yöntemle ve 8 hastada 1 yöntemle pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo 2). Giemsa boyalı kemik iliği aspirasyonu sıvısından hazırlanan yayma preparatında görülen amastigotlar ve karaciğer ekstreli besiyerinde üreyen promastigotlar sırasıyla Resim 1 ve Resim 2'de verilmiştir.

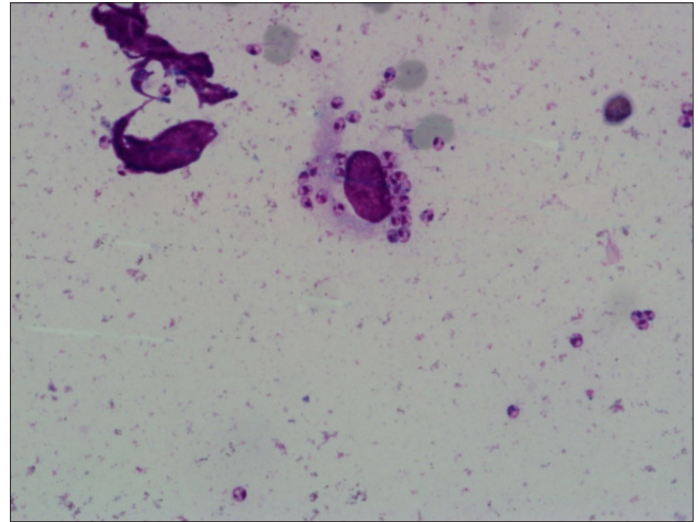
## İrdeleme

Tropik, subtropik ve Güney Avrupa'da bulunan ihmal edilmiş tropikal hastalık olarak sınıflandırılan layşmanyaz, vektör aracılığıyla bulaştırılan zoonotik/antroponotik karakterli bir protozoon paraziter infeksiyon hastalığıdır (8). DSÖ'ye rapor veren 200 ülke arasında, 97 ülke layşmanyaz açısından endemiktir. KL ve VL açısından endemik olan 65 ülke, VL açısından endemik olan 10 ülke ve KL açısından endemik olan 22 ülke bulunmaktadır (9). Endemik bölgede yaşayan yaklaşık 1 milyon insan risk altındadır (10).

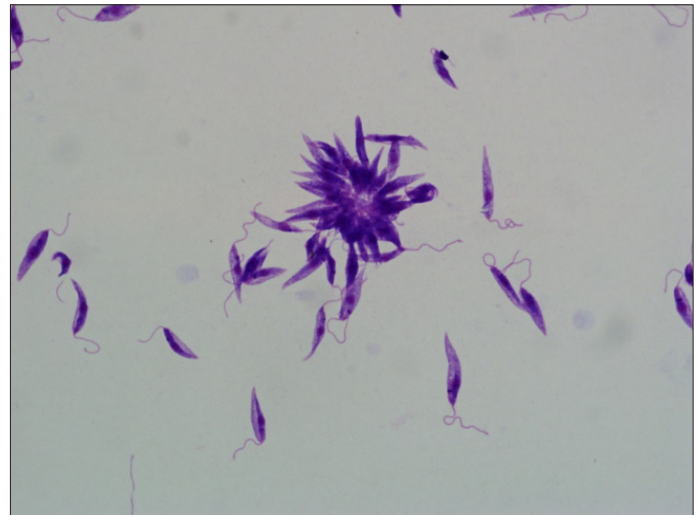
KL'nin son 10 yılda görülme sıklığında artış gözlenmekte, yaklaşık her 20 saniyede bir kişinin KL'ye yakalandığı hesaplanmaktadır. Bunun olası nedenleri arasında kırsal bölgeler-

**Tablo 1. Etkenlerin Elde Edildiği Hasta Bilgileri**

Kod	Cinsiyet	Klinik Tanı	Belirtilerin Geldiği Süresi (Ay)	Şehir
CBU 06	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	24	Kilis
CBU 07	Erkek	Viseral layşmanyaz	6	Manisa
CBU 11	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	12	Manisa
CBU 12	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	7	Manisa
CBU 14	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	6	Manisa
CBU 15	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	18	Osmaniye
CBU 17	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	3	Manisa
CBU 18	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	6	Bitlis
CBU 19	Erkek	Viseral layşmanyaz	8	Manisa
CBU 20	Erkek	Viseral layşmanyaz	12	Manisa
CBU 23	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	24	Manisa
CBU 24	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	18	Manisa
CBU 31	Kadın	Viseral layşmanyaz	7	Manisa
CBU 33	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	6	Manisa
CBU 39	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	3	Manisa
CBU 42	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	8	Gaziantep
CBU 43	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	8	Manisa
CBU 44	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	4	Manisa
CBU 50	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	5	Manisa
CBU 51	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	1	Manisa
CBU 56	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	1	Manisa
CBU 59	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	6	Manisa
CBU 61	Erkek	Kutanöz layşmanyaz	3	Manisa
CBU 73	Kadın	Kutanöz layşmanyaz	8	Manisa



**Resim 1.** Hasta materyalinde *Leishmania* amastigotları (Giemsa yöntemi, 100x).



**Resim 2.** Karaciğer ekstreli besiyerinde üretilmiş *Leishmania* promastigotları (Giemsa yöntemi, 100x).

**Tablo 2. Etkenlerin Tanısında Tüm Yöntemlerin Karşılaştırılması**

Kod	Giemsa Boyaması (Amastigot)	NNN Besiyerinde Kültür (Promastigot)	Karaciğer Ekstreli Besiyerinde Kültür (Promastigot)	Moleküler Yöntem
CBU 06	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 07	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 11	Negatif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 12	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 14	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 15	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. infantum/donovani</i>
CBU 17	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 18	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. major</i>
CBU 19	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. infantum/donovani</i>
CBU 20	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. infantum/donovani</i>
CBU 23	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 24	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 31	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. infantum/donovani</i>
CBU 33	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. major</i>
CBU 39	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 42	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 43	Negatif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 44	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 50	Pozitif	Pozitif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 51	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 56	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 59	Negatif	Negatif	Pozitif	<i>L. infantum/donovani</i>
CBU 61	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>
CBU 73	Pozitif	Negatif	Pozitif	<i>L. tropica</i>

NNN: Novy-MacNeal-Nicolle

den kentlere göç, infeksiyonun endemik olduğu bölgelerde iş sahalarının açılması, malnütrisyon, sosyoekonomik düzeyin düşüklüğü ve HIV/*Leishmania* koinfeksiyonundaki artış sayılmaktadır. Layşmanyazın gerçek prevalansının resmi rakamların üzerinde olduğu, çünkü dünyada sağlık hizmetlerine ulaşılması zor bölgelerdeki olgulara tanı konulmadığı tahmin edilmektedir. Layşmanyazın yol açtığı ekonomik kayıp, tıbbi bakım ve tedavilerle birlikte işgücü bakımından değerlendirildiğinde oldukça büyüktür; bu nedenle gelişmekte olan ülkelerin ekonomileri için layşmanyaz ciddi bir sağlık sorunudur. Gelişmiş ülkelerde ise HIV/*Leishmania* koinfeksiyonunda görülen artış ve iklim değişikliği sonucu vektör ve hastalığın yayılım alanının kuzeye doğru genişlemesiyle yeni alanlarda hastalığın görülme potansiyeli bulunması gibi nedenlerle layşmanyaza duyulan ilgi artmaktadır. Ortadoğu'da yıllardır savaşmakta olan Amerika Birleşik Devletleri askerlerinde 2002-2004 yılları arasında 500-700 arası KL olgusu belirlenmiştir (11-14).

KL, önceleri sporadik olguların görüldüğü Çukurova gibi yerlerde endemik özellik gösterirken, son derece nadir olguların bildirildiği Ege, Marmara, İç Anadolu, Batı Akdeniz gibi

bölgelerimiz de düzenli olarak olguların görüldüğü yerler haline gelmiştir. Bunun yanı sıra son yıllarda, *L. infantum*'un da etken olduğu şark çıbanı olguları ülkemizde saptanmaya başlamıştır (3,15-18).

Türkiye'de VL daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmekle birlikte, hemen hemen bütün bölgelerden bildirilmiş olgular bulunmaktadır. Hastalığın etkeni olan *Leishmania* parazitleri hem insandan hem de köpeklerden izole edilmiştir. Etkene yönelik uygulanan, izoenzim analizi, "excreted factor (EF)" analizi, monoklonal antikor ve PZR testleri, hastalığa neden olan türün diğer Akdeniz ülkeleriyle uyumlu olarak *L. infantum* olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu türün doğadaki rezervuarının köpekler olduğu epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de etken türün rezervuarı köpeklerdir. Böyle doğal rezervuarların varlığı zoonotik geçiş açısından risk oluşturmaktadır. Akdeniz havzasında yer alan ülkelerde yapılan çalışmalarda köpeklerdeki layşmanyazın %2-40 arasında görüldüğü, ülkemizde ise genel prevalansın %15.76 olduğu, bazı bölgelerde %40'lara çıkabildiği gösterilmiştir (3,17,18).

Kültürler, genellikle boyalı aspirasyon materyal preparatlarının mikroskopik incelemesinden daha yüksek duyarlılık göstermektedir. Lightner ve arkadaşları (19)'nın yaptığı bir çalışmada yaymaların mikroskopik incelemesinde duyarlılık %72 iken, kültürde bu oran %91 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada kemik iliği aspirasyonlarında mikroskopik incelemede duyarlılık %60 iken, kültürde %98 gibi oldukça yüksek bir oranda bulunmuştur (19,20).

Çalışmamızdaki hastaların klinik materyallerinden yapılan yaymaların 14'ünde amastigot görülürken NNN besiyerine yapılan ekimlerin sekizinde promastigot saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız *Leishmania* parazitlerinin karaciğer ekstreli besiyerine uyum sağladığı ve ekim yapılan tüm pozitif örneklerin bu besiyerinde üreyip çoğaldıkları tespit edilmiştir. Parazitin, karaciğer ekstreli besiyerine yapılan ekimlerin hepsinde üremesi, besiyerinin yayma preparatların mikroskopik bakısına göre üstünlüğünü ortaya koymuştur.

Ülkemizde infeksiyon yapan *Leishmania* suşlarının klasik NNN besiyerlerinde üretilerek tanı konulması son derece güç olmaktadır. Bu nedenle ülkemizde ve bölgemizde VL ve KL tanısında güvenle kullanılabilir, duyarlılığı yüksek, etkene yönelik, kullanımı ve sonucu yorumlaması kolay, kısa sürede sonuç veren, ortam şartlarına dayanıklı, düşük maliyetli, çalışmamızda sunduğumuz gibi bir besiyerine ihtiyaç vardır.

## Teşekkür

Bu çalışmanın 2010-057 ve 2014-10 no.'lu Bilimsel Araştırma Projeleri ile destek vererek gerçekleşmesini sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne ve katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

## Kaynaklar

- World Health Organization. Leishmaniasis Fact Sheet [Internet] Geneva: WHO [erişim 19 Aralık 2019]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- Özbilgin A, Töz S, Harman M, et al. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. *Acta Trop*. 2019; 190: 59-67. [Crossref]
- Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniasis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M, eds. *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. İzmir: Türkiye Parazitoloji Derneği, 2007: 197-244.
- Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S, Boduç E, Ertuğ S. Kutanöz leşmanyazis tanısında direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bül*. 2015; 49(1): 77-8. [Crossref]
- Evans D, Godfrey D, Lanham S, Lanotte G, Modabber F, Schnur L. *Handbook on Isolation Characterization and Cryopreservation of Leishmania*. Geneva: World Health Organization, 1989: 25-36.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2011; 105(1): 1-6. [Crossref]
- Töz Özensoy S, Çulha G, Yıldız Zeyrek F, 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. [Crossref]
- Centers for Disease Control and Prevention. Parasites-Leishmaniasis [Internet]. Atlanta, GA: CDC [erişim 19 Aralık 2019]. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>.
- World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. Leishmaniasis. Situation and trends [Internet]. Geneva: WHO [erişim 19 Aralık 2019]. [https://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/](https://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/).
- World Health Organization. Leishmaniasis [Internet]. Geneva: WHO [erişim 19 Aralık 2019]. <https://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
- World Health Organization. *Control of the Leishmaniases. Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases* (Geneva, 22-26 March 2010) WHO Technical Report Series 949. Geneva: WHO, 2010
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27(5): 305-18. [Crossref]
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10(2): 298-319. [Crossref]
- Weina PJ, Neafie RC, Wortmann G, Polhemus M, Aronson NE. Old World leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis*. 2004; 39(11): 1674-80. [Crossref]
- Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB. Leishmania and the leishmaniasis. In: Marquardt WC, Demaree RS, Grieve RB, eds. *Parasitology and Vector Biology*. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego, CA: Harcourt Academic Press, 2000: 57-61.
- Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, et al. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995; 89(Suppl. 1): 89-93. [Crossref]
- Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. *Int J Trop Insect Sci*. 1986; 7(2): 241-5. [Crossref]
- Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008; 6(9): 754-65. [Crossref]
- Lightner LK, Chulay JD, Bryceson AD. Comparison of microscopy and culture in the detection of Leishmania donovani from splenic aspirates. *Am J Trop Med Hyg*. 1983; 32(2): 296-9. [Crossref]
- Sinha R, Datta U, Sehgal S. Importance of bone marrow culture for diagnosis of Kala azar. *Scand J Infect Dis*. 1993; 25(6): 787-9. [Crossref]