

Leishmania major'un Rezervuar Hayvanlara Naklinde *Rhipicephalus sanguineus*'un Rolünün Belirlenmesi

Determination the Role of *Rhipicephalus sanguineus* for Transmission of *Leishmania major* to Reservoir Animals

Hüseyin Bilgin Bilgiç, Serkan Bakırcı, Onur Köse, Ayça Aksulu, Selin Hacılarlıoğlu, Tülin Karagenç

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, zoonotik kutanöz leishmaniasise neden olan *Leishmania major*'un naklinde *Rhipicephalus sanguineus*'un rolünün araştırılmasıdır.

Yöntemler: 10 gerbil (*Meriones unguiculatus*) *L. major* promastigotları ile enfekte edilirken, 10 gerbil, kontrol grubunu oluşturmuştur. Enfekte ve kontrol gruplarından birer gerbil üzerine bırakılan 2.000'er adet *Rh. sanguineus* larvasının kontrollü bir ortamda beslenmeleri sağlanmıştır. Larvaların gerbil üzerinde beslenmesini takiben, doymuş larvalar ve uygun koşullarda gömlek değiştiren larvalardan elde edilen aç nimflerden oluşan toplam 65 kene havuzu oluşturulmuştur. Bu havuzlar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) testi ile *L. major* yönünden test edilmiştir.

Bulgular: Enfekte edilerek, üzerine *Rh. sanguineus* larvası konulan gerbil, tüm kenelerin düşmesini takiben uyutulmuş ve nekropsisi gerçekleştirilmiştir. Yapılan incelemelerde, gerbilin tüm iç organ ve dokularında amastigotlara rastlanmıştır. *Rh. sanguineus* doymuş larvalarının beslenmeleri esnasında paraziti alıp almadıkları ve bir sonraki nimf aşamasına aktarıp aktarmadıklarının test edilmesi amacıyla yapılan PZR ve RT-PCR sonucunda kene havuzlarının hiçbirisinde *L. major*'a rastlanılmamıştır.

Sonuç: Çalışma neticesinde her ne kadar kenelerde etkenler tespit edilemese de, leishmaniasis ile ilişkili deneysel çalışmalarda asıl rezervuar olan köpeklerin kullanılması vektörlük potansiyeli yüksek olan insekt ve akarlar için daha net sonuçlar verebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Gerbil, *Leishmania major*, nakil, *Rhipicephalus sanguineus*

Geliş Tarihi: 24.05.2016

Kabul Tarihi: 06.10.2016

ABSTRACT

Objective: This study aimed to explore the role of *Rhipicephalus sanguineus* in the transmission of *Leishmania major*, the etiological agent of zoonotic cutaneous leishmaniasis.

Methods: Ten gerbils (*Meriones unguiculatus*) were infected with promastigotes of *L. major*, and 10 gerbils were maintained as controls. In a controlled environment, 2000 *R. sanguineus* larvae were fed to two gerbils. Following feeding to gerbils, 65 tick pools were prepared from the engorged larvae and molted unfed nymphs. These pools were tested for the presence of *L. major* using polymerase chain reaction and real time (RT) PCR.

Results: One of the infected gerbil was anesthetized and necropsied following the dropping of all fed larvae. Following the examination, amastigotes were detected in all organs and tissues. PCR and RT-PCR were performed to test whether the engorged *R. sanguineus* larvae successfully took the parasite while feeding and was able to transmit it to the next nymphal stage; however, none of the tick pools were found to be positive for *L. major*.

Conclusion: Although *L. major* was not detected in ticks that fed on gerbils, using dogs in experimental studies related to leishmaniasis will give clearer results in terms of detecting the potential role of insects and acarids.

Keywords: Gerbil, *Leishmania major*, transmission, *Rhipicephalus sanguineus*

Received: 24.05.2016

Accepted: 06.10.2016

Bu çalışma 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde sunulmuştur, 5-9 Ekim 2015, Erzurum, Türkiye.

This study was presented at the 19th National Parasitology Congress, 5-9 Ekim 2015, Erzurum, Turkey.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence: Hüseyin Bilgin Bilgiç E.posta: hbilgic@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2016.4911

©Telif hakkı 2016 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2016 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

GİRİŞ

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi protozoon olan *Leishmania* cinsindeki türlerin neden olduğu antroponotik ya da zoonotik karakterli ve farklı klinik belirtilerle kendini gösteren hastalıkların genel adlandırılmasıdır (1, 2). Her yıl 300.000'i visseral leishmaniasis (VL), 1.000.000'u kutanöz leishmaniasis (KL) olmak üzere ortalama 1.300.000 yeni vaka ortaya çıktığı düşünülmektedir ki bunlardan sadece 600.000'i rapor edilen vakalardır (3). *Leishmania* türleri yaşamlarını sürdürürebilmek için omurgasız ve omurgalı konaklara ihtiyaç duyarlar. İnsan, köpek, kemirgen gibi pek çok omurgalıda parazitini amastigot formu bulunurken, omurgasız konakları olan *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi sineklerde promastigot formunda bulunurlar (4, 5). Türkiye, gerek leishmaniasisin seyri ve coğrafik yayılışına uygun farklı ekolojik ve iklimatik özelliklere sahip coğrafik alanları bünyesinde barındırması, gerekse de hastalık hakkında yeterli veri bulunmayan farklı ülkelerden gelen çok sayıda mülteciye ev sahipliği yapması sebebiyle leishmaniasisin epidemiyolojisinde önemli bir ülkedir. Türkiye'de kutanöz leishmaniasise (KL) yol açan tür daha çok *L. tropica*; visseral leishmaniasise (VL) yol açan tür ise *L. infantum* olarak bilinmektedir (6). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda KL vakalarında VL öyküsü olmaksızın *L. infantum* türünün izole edildiği, yine VL vakalarında KL öyküsü olmaksızın *L. tropica* türünün tespit edildiği bildirilmektedir (1, 7, 8). Bununla birlikte, Türkiye'de KL'ye neden olan başlıca tür *L. tropica* olup, daha az sayıda *L. infantum* ve nadiren *L. major* kaynaklı olgular da tespit edilmiştir (7, 9, 10). *Leishmania tropica* insan-vektör-insan geçişli antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL)'e neden olurken, *L. major* ise ana rezervuarın kemirgenler olduğu zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL)'e neden olmaktadır (6). Türkiye'de, *L. tropica*'nın neden olduğu AKL olgularının %98'inden fazlası, Güneydoğu Anadolu, Doğu Akdeniz ve Ege Bölgelerinden bildirilmektedir (11). Zoonotik kutanöz leishmaniasise yol açan *L. major* ise Türkiye'nin güneyde sınır komşuları olan Suriye, Irak ve İran'da oldukça endemik bir türdür (7). Son yıllarda özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Suriye'deki iç savaş sonrası, Türkiye'ye gelen göçmenlerin de etkisiyle KL vakalarında ciddi bir artış dikkati çekmektedir (11, 12). Bu artış göz önüne alınarak gerçekleştirilen çalışmalarda KL olgularından *L. major* etkenlerine rastlandığı bildirilmiştir (12, 13).

Leishmania infantum'un naklinde, birincil derecede etkili rol oynayan kum sinekleri yanında başka faktörler de rol oynayabilmektedir. Bununla birlikte, pireler (*Ctenocephalides felis*) ve keneler (*Rh. sanguineus*) tarafından *L. infantum*'un nakledildiğine dair varsayımların bulunduğu ve son yıllarda yapılan çalışmalarda da bu hipotezlerin tekrar tartışmaya açıldığına dair bildirimler bulunmaktadır (14, 15). Köpeklerde enfestasyon oluşturan ve kahverengi köpek kenesi olarak da bilinen *Rh. sanguineus* türü, *Rickettsia conorii*, *R. rickettsii*, *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis* gibi pek çok patojene vektörlük edebilen tüm dünyada yaygın, tropik ve subtropik iklim kuşaklarında aktivite gösterebilen bir kene türüdür (16, 17). Son yıllarda yapılan çalışmalarda *L. infantum*'un köpeklere naklinde *Rh. sanguineus* kenesinin de rol oynadığı bildirilmektedir (18-22). Yapılan bir çalışmada *L. infantum*'un *Rh. sanguineus* ile transovarial olarak naklinin de mümkün olduğu ortaya konmuştur (22). Bu literatürler ışığında zoonoz karakterli bu protozoonun aynı zamanda rezervuar hayvan olan köpeklere naklinde *Rh. sanguineus* kenesinin rol oynayabileceği ve vektörlük yapabileceği varsayımlar arasındadır. Bu nedenle

çalışmamızda, model olarak seçilen *L. major*'un naklinde kahverengi köpek kenesi olarak da bilinen *Rh. sanguineus*'un rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEMLER

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyle Yeri Etik Kurulu'nun 28.08.2012 tarih ve 2012/046 sayılı kararı ile alınan etik kurul onayı ile gerçekleştirilmiştir.

Gerbillerin *Leishmania major* ile enfekte edilmesi

Araştırmada, enfeksiyon oluşturmak için beş olgun erkek ve beş olgun dişi, kontrol grubu olarak da yine beş olgun erkek ve beş olgun dişi gerbil kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *L. major* suşu ise Bitlis ili kırsalında yaşayan ve 18 yaşında olan erkek hastadan izole edilmiştir. Elde edilen suş Celal Bayar Üniversitesi (CB.) Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası'nda muhafaza edilmiş ve MHOM/TR/2012/MANISAPB233 olarak kodlanmıştır. Gerbillerin enfeksiyonu için bu promastigot süspansiyonundan faydalanılmıştır. Enfeksiyon için gerbiller öncelikle ksilazin/ketamin anestezisine alınmış ve daha sonra önceden hazırlanmış olan süspansiyonlardan her bir gerbil için 0,2 mL olarak ayarlanmış insülin iğneleri ile sol ayak tabanlarından, 1×10^8 promastigot içeren bu süspansiyon inoküle edilmiştir. Gerbillerde enfeksiyon şekillenmesi ve gelişimi günlük olarak izlenmiş, hayvanlarda şekillenebilecek olası klinik bulgular (tüy dökülmesi, deride kabuklanma ve kepeklenme, tırnaklarda anormal uzama vb.) takip edilerek not edilmiştir. Belirtilerin ortaya çıkmasını takiben, gerbillere nekropsi yapılması planlanmıştır. Nekropside başta, karaciğer ve dalak olmak üzere tüm iç organ ve dokularından (akciğer, böbrek, kalp, testis) preparatlar hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda amastigotların varlığı araştırılmıştır.

Rhipicephalus sanguineus larvalarının elde edilmesi

Sahadan elde edilen dişi *Rh. sanguineus*'lar 27°C'lik ($\pm 1^\circ\text{C}$) etüvde (Soğutmalı Etüv; Memmert, Schwabach, Almanya) %80 (± 5) nemli koşullarda muhafaza edilerek yumurtlamaları sağlanmıştır. Dişilerin yumurtlamasının bitimini takiben her bir dişinin yumurtalarından 100'er tanesi sayılarak, ağırlıkları belirlenmiş ve her bir şişede ortalama 2.000 yumurta olacak şekilde porsiyonlanmış ve larva çıkışı için 27°C'lik ($\pm 1^\circ\text{C}$) etüvde, %80 (± 5) nemli koşullarda muhafaza edilmişlerdir. Gömlek değiştirip kitinizasyonu tamamlayan aç larvalar, deneysel çalışmalarda kullanılmaya kadar 12°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) ısı ve %80 (± 5) nisbi nem sağlayan etüvde (Soğutmalı Etüv; Memmert, Schwabach, Almanya) tutulmuşlardır.

Enfekte gerbillerde *Rhipicephalus sanguineus* larvalarının beslenmesi

Enfekte edilen gerbillerde klinik olarak leishmaniasis belirtilerinin gözlemlenmesini takiben hem enfekte hem de kontrol grubundaki hayvanlardan birer tanesi üzerinde *Rh. sanguineus* larvalarının beslenmesi sağlanmıştır. Bu amaçla; gerbiller, bireysel olarak kafeste tutulmuş ve bu kafesler su dolu havuzda muhafaza edilmişlerdir. Gerbillerin vücuduna yaklaşık 2.000'er adet bir aylık yaştaki aç larvalar dökülmüştür. Gerbillerin vücuduna dökülen aç larvalar (2.000 larva/gerbil) ortalama beş (4-6) günde gerbili terk edip, suya düşmüşlerdir. Tam doymuş olarak gerbili terk eden larvalar süzgeç yardımı ile sudan toplanmış, kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra 200 adetlik gruplar halinde ağzı pamukla kapatılan steril şişeler içerisine alınmışlardır. Enekte gerbil

üzerinden elde edilen doymuş larvalarda, *L. major* etkeninin tespiti için, larvalardan 600 tanesi gömlek değişiminin baskılanması ve bu şekilde muhafaza edilmesi amacıyla, PZR testi yapılana kadar, 12°C (±1°C) ve %80 (±%5) nisbi nem içeren etüvde bekletilmişlerdir. Geriye kalan keneler, gömlek değiştirmek üzere 27°C (±1°C) ısı ve %80 (±%5) nisbi nem içeren etüve yerleştirilmişlerdir. PZR testi yapılmadan önce, doymuş larvalar ve gömlek değiştirerek aç nimf olanlar 4 gün süreyle 27°C (±1°C) ısı ve %80 (±%5) nisbi nem içeren etüvde tutulmuşlardır.

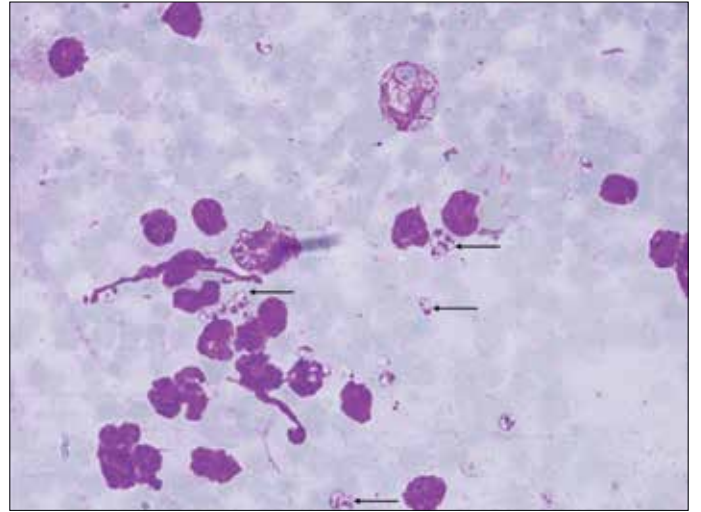
Kenelerde *Leishmania* etkenlerinin belirlenmesi

Enfekte gerbil üzerinde beslenen aç *Rh. sanguineus* larvalarında *L. major* etkeninin tespiti için PZR yöntemine başvurulmuştur. Bu amaçla; gerbil üzerinde beslenen doymuş larvalar ve 27°C (±1°C) ısı ve %80 (±%5) nisbi nem içeren inkübatörde gömlek değiştiren larvalardan elde edilen aç nimfler kullanılmıştır. Larvalar ve aç nimfler onarlı ve yirmişerli havuzlara ayrılmış ve doymuş larvalardan toplamda 65 kene havuzu oluşturulmuştur. Kene havuzlarından DNA ekstraksiyonu için Promega Wizard genomic DNA Ekstraksiyon kiti (Promega; Madison, WI, Amerika) kullanılmış ve kit protokolüne göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen DNA'lar, *Leishmania* genusunda yer alan; *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* ve *L. braziliensis* türlerine ait kDNA'ların 145 bp'lık kısmını çoğaltan RV1 (5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3') / RV2 (5'-CCA CCT GGC CTA TTT TAC AC-3') primerleriyle PZR yöntemiyle çoğaltılmasında kullanılmıştır (23). Bu amaçla uygulanan PZR'de; 25 µl'lik son hacimde, 10 mM Tris-HCL, pH 9,0, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 µM dNTP/dUTP stoğu, 1,5 U Taq DNA polimeraz, 1 µM primer çifti ile 2 µl DNA (≈ 50 pmol) örneği kullanılmıştır. Reaksiyon termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir (Simpling Amp™ Thermal Cycler; Life Technologies, Applied Biosystems, Paisley, İngiltere). Reaksiyon 95°C'de 12 dakikalık ön denatürasyonu takiben, 94°C'de 50 saniyelik denatürasyon; 57 °C'de 50 saniye bağlanma; 72°C'de 30 saniye uzamalardan oluşan 35 siklus ve 72°C'de 10 dakikalık son uzama şeklinde uygulanmıştır. Daha sonra, PZR ile çoğaltılan ürünlerden 10 µL alınarak 100 mL'sinde 5 µL Safe View™ Classic bulunan %1,5'luk agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulup, ultraviole ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçların doğrulanması için gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) testi uygulanmıştır. Bu amaçla, *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5,8S rRNA'yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi, forward primer; 5'-CTGGATCATTTCCGATG-3', reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri, QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı ile birlikte özgün problemler (Probe 1: 5'- LC610-GCG GGG TGG GTG CGT GTG TG -PH ve Probe 2: 5'-CCG TTT ATA CAA AAA ATA TAC GGC GTT TCG GTT T - FL) kullanılarak çoğaltılmıştır. Gerçek zamanlı PZR analizi için hazırlanan toplam 25 µl'lik reaksiyon karışımında; 1,5 µL H₂O (PCR grade water), 1 µL forward primer, 1 µL reverse primer, 0,5 µL Probe1, 0,5 µL Probe2, 12,5 µL QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (QuantiTect Probe PCR Kit; Qiagen, Mainz, Almanya) ve 5 µL genomik DNA örneği kullanılmıştır. Tür içi farklılıkların (*L. tropica*, *L. infantum* ve *L. major* ayrımı) saptanması için belirlenen termal profil; denatürasyon, amplifikasyon, erime eğrisi analizi ve soğutma basamakların-



Resim 1. *L. major* ile enfekte gerbilde sol ayakta oluşan yaralar

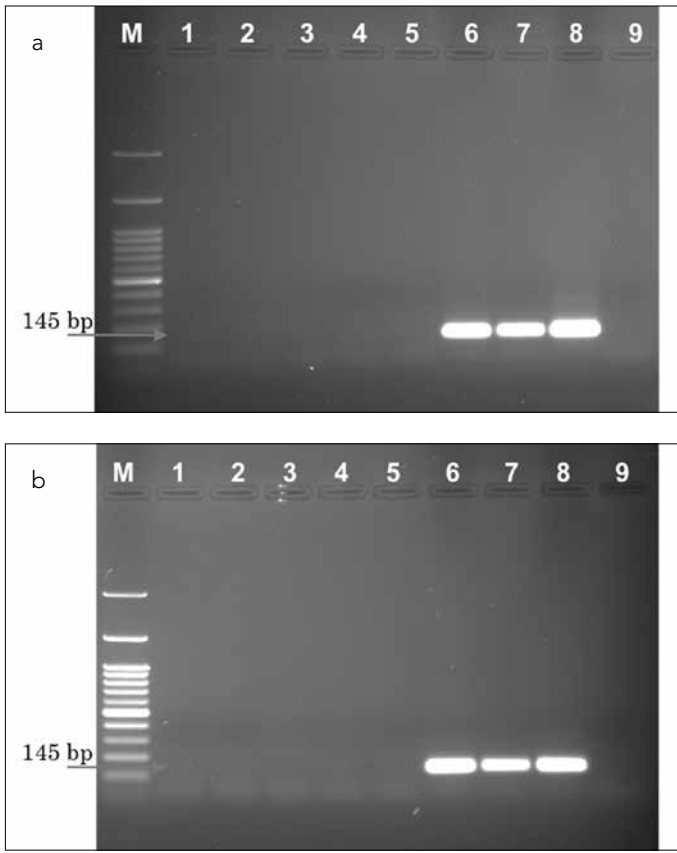


Resim 2. Dalak dokusundan hazırlanan preparatlarda *L. major* amastigotları

dan ibaret olup, Rotor-Gene cihazının (Rotor-Gene Q; Qiagen, Mainz, Almanya) programına, çalışma protokolleri olarak kaydedilmiştir. Rotor-Gene'de melting analizi yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlarda *L. major* için erime ısı 54°C±1°C olarak belirlenmiştir.

BULGULAR

Leishmaniasisin naklinde kenelerin rolünün belirlenmesi amacıyla enfekte edilen gerbillerin takibi sonucunda; enfekte gruptaki sekiz gerbil, enfeksiyondan 10 gün sonra herhangi bir klinik belirti göstermeden ölmüştür. Bununla birlikte, enfeksiyonun otuzuncu gününde erkek hayvanların testis dokusunda ödematöz bir tablo şekillendiği, bir hayvanın ayak bölgesinde doku bütünlüğünün bozulmuş olduğu ve kanama odaklarının olduğu, başka bir hayvanın burun bölgesinde de kanama şekillendiği gözlemlenmiştir. Gerbillerin ayak tabanlarında zaman içerisinde doku bütünlüğünün tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Resim 1). Belirtilerin ortaya çıkışıyla birlikte hem enfekte edilen hem de kontrol grubundaki gerbillerden birer tanesinin vücuduna yaklaşık 2.000'er



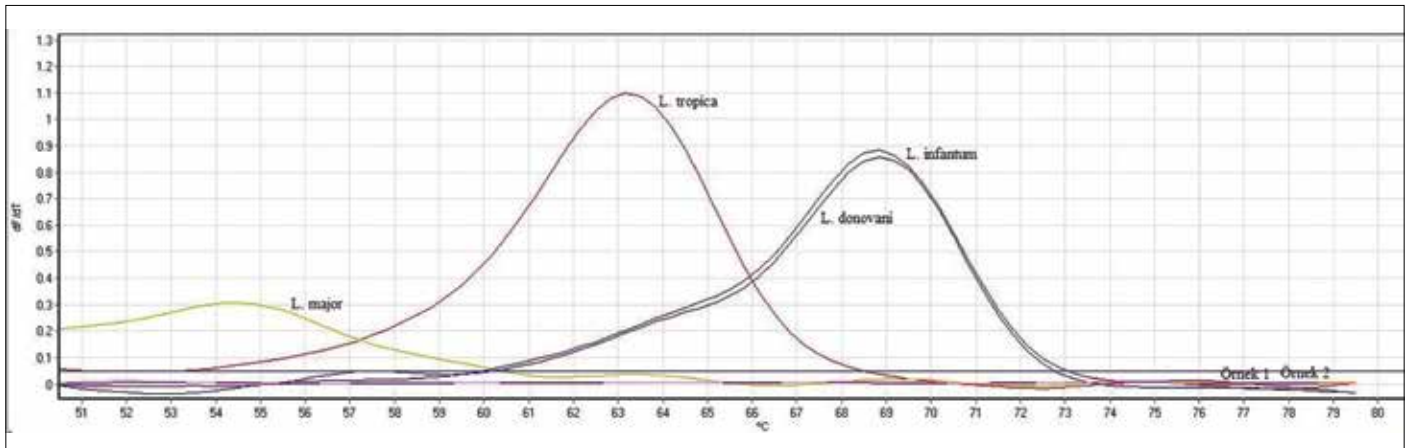
Resim 3. a, b. *Rhipicephalus sanguineus* doymuş larvaları (a) ile aç nimflerinin (b) bulunduğu havuzlardan elde edilen DNA örnekleri kullanılarak *Leishmania* genusunda yer alan; *L.infantum*, *L.donovani*, *L.major*, *L.tropica* ve *L.braziliensis* türlerine ait kDNA'ların 145 bp'lık kısmını çoğaltan RV1 / RV2 primerleriyle yapılan PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp'lık moleküler büyüklük belirleyici (Thermo Scientific Corp.); 1 ile 5 arasındaki kuyucuklarda *Rhipicephalus sanguineus* doymuş larvaları (a) / *Rhipicephalus sanguineus* aç nimflerinin (b) bulunduğu havuzlardan elde edilen DNA örnekleri; 6 ile 8 arasındaki kuyucuklarda sırası ile *L.infantum*, *L.major* ve *L.infantum* pozitif kontrol DNA'ları; 9. dH₂O konulmuştur.

adet bir aylık aç *Rh. sanguineus* larvaları dökülmüştür. Kontrol grubundaki gerbil üzerinden toplamda 1.618 adet, enfekte gerbil üzerinden ise toplamda 1.290 adet doymuş larva elde edilmiştir. Enfekte edilen gerbil üzerinden tüm kenelerin düşmesini takiben gerbille ötenazi yapılarak nekropsisi gerçekleştirilmiştir. Nekropsi sonucunda iç organlardan yapılan tuşeler Giemsa ile boyanarak *L. major* açısından incelenmiştir. Yapılan mikroskopik incelemelerde; dalak, karaciğer başta olmak üzere kalp, scrotum, böbrekler ve akciğer dokularının tamamında yoğun bir şekilde amastigotlara rastlanmıştır. (Resim 2). Leishmaniasisin naklinde kenelerin rolünün belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen PZR'de doymuş larva ve gömlek değiştirerek aç nimf olan keneler kullanılmıştır. Doymuş larvalardan toplamda 30 kene havuzu (yirmişerli), aç nimflerden ise toplamda 35 kene havuzu (bir adet onlu ve 34 adet yirmişerli) kullanılarak gerçekleştirilen PZR'de *Leishmania* DNA'sına rastlanılmamıştır (Resim 3). Elde edilen verileri desteklemek için gerçekleştirilen RT-PZR ile de sonuçlar doğrulanmıştır (Resim 4). Çalışma sonunda enfeksiyon grubundaki diğer gerbil de uyutularak *Leishmania* varlığı açısından değerlendirilmiş ve farklı organ ve dokularda amastigotlara rastlanmıştır.

TARTIŞMA

Leishmaniasis 350 milyon insanın risk altında olduğu 90'dan fazla ülkede endemik olan, tedavi edilmezse %100'e varan oranda ölümlü sonuçlanabilen zoonoz karakterli bir hastalıktır (5, 9, 24). Hastalık dünyanın pek çok yerinde visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL), diffuz deri leishmaniasis (DKL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) gibi değişik formları görülmesine rağmen (3), Türkiye'de şimdiye kadar VL, KL ve köpek visseral leishmaniasis (KVL) formları görülmüştür (25). Hastalık Türkiye'de, bölgelerin iklim durumuyla yakından ilişkili olarak genellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinden bildirilmiştir (1, 7, 10, 26, 27).

Epidemiyolojik olarak leishmaniasisde zoonotik ve antroponotik olmak üzere iki farklı bulaşma yolu görülmektedir (1). Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen zoonotik yolla bulaşmada, paraziti taşıyan dişi kum sinekleri tarafından enfekte edilen köpekler hastalığın asıl rezervuarıdır (20). Ancak son yıllarda özellikle keneler ile pirelerin de vektör olabileceği ve bu ektoparazitlerin hastalık



Resim 4. *Leishmania major* ile enfekte gerbillerden toplanan kene örneklerinin Gerçek Zamanlı PZR sonuçları, Grafikte örneklerin erime eğrileri görülmektedir. *L.major* için erime ısı 54°C±1°C'dir.

Örnek 1. *Rhipicephalus sanguineus* doymuş larvalarından elde edilen örnekler

Örnek 2. *Rhipicephalus sanguineus* aç nimflerinden elde edilen örnekler

etkenlerinin naklinde önemli roller üslenebilecekleri vurgulanmıştır (20, 21). Önceki yıllarda yapılan araştırmalarda, keneler ve pirelerin *Leishmania* türlerinin biyolojik siklusuna uygunluk göstermesine rağmen bu türlerin naklinde kesin olarak rol oynadıklarıyla ilgili bir kanıt bulunamamıştır (18, 28). Ancak, son yıllarda enfekte köpekler üzerinde bulunan kenelerin ve pirelerin etken ile enfekte oldukları ve 8 ile 10 gün bu enfektif durumlarının devam ettiği belirlenmiştir (21). Yapılan bir başka çalışmada da, köpekler üzerinden toplanan pire (*C. felis*) ve kene (*Rh. sanguineus*)'lerde moleküler testler ile *L. infantum* tespit edilmesi (29) ektoparazitlerin vektörlük potansiyellerini güçlendirmiştir. Benzer çalışmalarda da köpekler ve hatta kediler üzerinden toplanan *Rh. sanguineus*'larda ve *Ixodes* cinsine bağlı bazı türlerde moleküler yöntemler kullanılarak *L. infantum* belirlendiği bildirilmektedir (30-33). Bir çalışmada da, deneysel enfekte edilen *Rh. sanguineus* türü kenelerin yumurtalarının 4 ay sonra enfektif olabildiği rapor edilmiştir (19). Buna karşın bazı araştırmacılar (20) enfekte kenelerden yapılan ekimlerde, parazit kültüründe bir gelişmenin olmadığı ve biyolojik siklusuna uygunluğunun daha fazla araştırılmasının gerekliliğini belirtmektedirler. Takip eden yıllarda yapılan bir çalışmada ise araştırmacılar, *L. infantum* ve *L. braziliensis* ile doğal enfekte köpekler üzerinden toplanan *Rh. sanguineus* dişi, erkek ve nimflerinin tükrük bezleri ve barsaklarından izole ettikleri ve NNN besisi yerine yaptıkları ekim sonucunda kamçılı promastigot formları tespit ettiklerini bildirmişlerdir (34). Tüm bu çalışmalar, *Leishmania* etkenlerinin naklinde şimdiye kadar bilinen tek vektör olan kum sineklerinin dışında diğer ektoparazitlerin özellikle de kenelerin rol oynayabileceği kanısını kuvvetlendirmektedir. Ancak, bu çalışmalarda elde edilen veriler dikkate alındığında, kene ve pire gibi ektoparazitlerin *Leishmania* spp. etkenlerinin biyolojik vektörü olup olamayacağı konusunun henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamadığı anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada da, *L. major*'un naklinde kahverengi köpek kenesi olarak da bilinen *Rh. sanguineus*'un vektör olarak rolünün araştırılması amaçlanmıştır. *L. major* türü, ana rezervuarlarının kemirgenler olduğu zoonotik kutanöz leishmaniasise neden olmakta ve son yıllarda ülkemizde, özellikle de Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde karşılaşılan bir tür olarak bildirilmektedir (12). Bununla birlikte Ege Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada kedilerde *L. major* ve *L. tropica* türlerinin tespit edilmesi, Türkiye'de *L. major*'un hem farklı bölgelerde görülme olasılığını hem de etkenlerin rezervuar hayvan açığını genişletmiş olabileceği olasılığını kuvvetlendirmektedir (35). Bahsedilen literatür verileri doğrultusunda bu çalışmada, gerbiller *L. major* promastigotları ile ayak tabanlarından enfekte edilmişlerdir. Çalışmada enfekte edilen gerbil üzerine kontrollü bir ortamda dökülen aç *Rh. sanguineus* larvalarının beslenip doymasını takiben, larvalar; hem gömlek değiştirmeden doymuş larva formunda iken hem de gömlek değiştirerek aç nimf formuna geçtikten sonra, *Leishmania* etkenlerinin varlığı açısından incelenmiş, ancak yapılan moleküler testlerde etkene rastlanmamıştır. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. Birincisi; gerbillerin deri altı kan dolaşımı sisteminde bulunan kılcal damarlarda *Leishmania* etkenlerinin enfekte ettikleri makrofaj hücrelerinin sayısal olarak daha az olması olabilir. Gerbillerde monosit yüzdeleri ortalama %0-0,5 iken, bu oranın köpeklerde %3-10 oranında olması bu kanıyı kuvvetlendirmektedir (36). İkincisi ise; parazitlerin kenelerin sindirim sistemindeki enzimatik reaksiyonlarından kaçamamış olmaları düşünülebilir. *Leishmania* etkenlerinin bir kısmı konaklarından vektörleri olan kum sinekleri tarafından alındıktan

sonra sindirilirken, diğer bir kısmı türlere özgü olarak sindirim sistemi enzimatik reaksiyonlarından kurtularak, *L. major*'da lipofosfolikan aracılığı ile galektin'e bağlanarak *Phlebotomus papatasi*'nin mide epitellerine tutunmasında olduğu gibi, şekil değiştirmeden bölünerek çoğalma ve daha sonra uzun ve zayıf yapıdaki formlara (promastigot) dönüşme özelliği göstermektedirler (37, 38).

SONUÇ

Elde edilen veriler, her ne kadar kenelerin *Leishmania* etkenlerini beslenme esnasında alarak kendi vücutlarında geliştirip çoğalttıkları tezini zayıflatıyor olsa da çalışmaların farklı rezervuarlarda tekrarlanması, bu çalışmada elde edilen verileri destekleyecektir. Bunun yanında, leishmaniasis ile ilişkili deneysel çalışmalarda asıl rezervuar olan köpeklerin kullanılması, *Leishmania* etkenlerinin naklinde, vektörlük potansiyeli yüksek olan insekt veya akarlar için daha net sonuçlar verebilecektir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Protokol no: 2012/046).

Hasta Onamı: Çalışmada, belirli bir hasta grubu kullanılmadığından dolayı, hasta onam formu doldurulmamış ve hasta onamı alınmasına gerek duyulmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - H.B.B., S.B., T.K., O.K.; Tasarım - H.B.B., S.B.; Denetleme - H.B.B., S.B., T.K.; Kaynaklar - H.B.B., S.B., T.K.; Malzemeler - H.B.B., S.B., T.K.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - H.B.B., S.B., O.K.; Analiz ve/veya Yorum - H.B.B., S.B., T.K.; Literatür Taraması - H.B.B., S.B., T.K., S.H., A.A.; Yazıyı Yazan - H.B.B., S.B., T.K., S.H., A.A., O.K.; Eleştirel İnceleme - H.B.B., S.B., T.K., S.H., O.K., A.A.

Teşekkür: Yazarlar, çalışmanın gerçekleşmesinde *Leishmania major* izolatını sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na ve Gerçek Zamanlı PZR testi uygulamalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Özbigin ve İbrahim Çavuş'a teşekkür ederler.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, VTF-13004 kodu ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from Adnan Menderes University Local Ethic Committee of Animal Experiment.

Informed Consent: Informed consent was not obtained due to not having a specific group of patients for this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - H.B.B., S.B., T.K., O.K.; Design - H.B.B., S.B.; Supervision - H.B.B., S.B., T.K.; Funding - H.B.B., S.B., T.K.; Materials - H.B.B., S.B., T.K.; Data Collection and/or Processing - H.B.B., S.B., O.K.; Analysis and/or Interpretation - H.B.B., S.B., T.K.; Literature Review - H.B.B., S.B., T.K., S.H., A.A.; Writing - H.B.B., S.B., T.K., S.H., A.A., O.K.; Critical Review - H.B.B., S.B., T.K., S.H., O.K., A.A.

Acknowledgement: The authors would like to thank to Celal Bayar University School of Medicine Parasite Bank who ensures the major isolate of *Leishmania* and to Prof. Ahmet Özbigin and İbrahim Çavuş for their help on the execution of Real Time PZR test.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Adnan Menderes University Committee of Scientific Research Projects with code number VTF-13004.

KAYNAKLAR

1. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, 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: e2205. [CrossRef]
2. Dinçer E, Gargari S, Özkul A, Ergünay K. Potential Animal Reservoirs of *Toscana Virus* and Coinfections with *L. infantum* in Turkey. *Am J Trop Med Hyg* 2015; 92: 690-7. [CrossRef]
3. World Health O. Sustaining the Drive to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases, Second Who Report on Neglected Tropical Diseases. 2013; 67-71.
4. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Elcicek S, Koc RC, Oztel ON. Effect of Human Urine on Cell Cycle and Infectivity of *Leishmania* Species Promastigotes In Vitro. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85: 639-43. [CrossRef]
5. Ready PD. Epidemiology of visceral Leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 147-154. [CrossRef]
6. Ok UZ, Balcioglu IC, Ozkan AT, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84: 43-8. [CrossRef]
7. Toz SO, Nasereddin A, Ozbel Y, Ertabaklar H, Culha G, Sevil N, et al. Leishmaniasis in Turkey: Molecular Characterization of *Leishmania* From Human and Canine Clinical Samples. *Trop Med Int Health* 2009; 14: 1401-6. [CrossRef]
8. Eroglu F, Koltas IS, Genc A. Identification of Causative Species in Cutaneous Leishmaniasis Patients Using PCR-RFLP. *Bacteriol Parasitol* 2011; 2: 1000113.
9. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. The WHO Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLOS ONE* 2012; 7: e35671. [CrossRef]
10. Ser O, Cetin H. Kutanöz Leishmaniasis ve Antalya İlindeki Durumu. *Türkiye Parazit Derg* 2013; 37: 84-91. [CrossRef]
11. Salman İS, Vural A, Ünver A, Saçar S. Suriye İç Savaşı Sonrası Nizip'te Kutanöz Leishmaniasis Olguları. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 106-13.
12. 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: 154-108. [CrossRef]
13. Zeyrek FY, Gurses G, Uluca N, Doni NY, Toprak S, Yesilova Y, et al. Şanlıurfa'da Şark Çıbanı Etkeni Değişiyor mu? İlk *Leishmania major* Vakaları. *Türkiye Parazit Derg* 2014; 38: 270-4. [CrossRef]
14. Dantas-Torres F. Ticks as Vectors of *Leishmania* Parasites. *Trends Parasitol* 2011; 27: 155-159. [CrossRef]
15. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine Sandflies and the Spreading of Leishmaniasis and other Diseases of Public Health Concern. *Med Vet Entomol* 2013; 27: 123-47. [CrossRef]
16. Estrada Pena A, Bouattour A, Camicas JL, Walker AR, editors. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: a Guide to Identification of Species. Spain: Published by University of Zaragoza; 2004.
17. Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB. Managing Canine Vector-Borne Diseases of Zoonotic Concern: Part One. *Trends Parasitol* 2009; 25: 157-63. [CrossRef]
18. Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara TR, Botelho JR, De Maria M, et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the Epidemiology of Canine Visceral Leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128: 149-55. [CrossRef]
19. Dantas-Torres F, Lorusso V, Testini G, Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Stanneck D, et al. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks from Brazil and Italy. *Parasitol Res* 2010; 106: 857-60. [CrossRef]
20. Paz GF, Ribeiro MF, de Magalhães DF, Sathler KP, Morais MH, Fiúza VO, et al. Association Between the Prevalence of Infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the Presence of anti-*Leishmania* Antibodies: A Case-Control Study in Dogs From a Brazilian Endemic Area. *Prev Vet Med* 2010; 97: 131-3. [CrossRef]
21. Colombo FA, Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati EAB, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Detection of *Leishmania infantum* RNA in Fleas and Ticks Collected from Naturally Infected Dogs. *Parasitol Res* 2011; 109: 267-74. [CrossRef]
22. Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in Females, Eggs and Larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasite Vectors* 2011; 4: 56. [CrossRef]
23. Gao Chun-hua, Ding D, Wang Yun-yun, Steverding D, Wang X, Yang Yue-tao, et al. Development of a LAMP Assay for Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Using Conjunctival Swab Samples. *Parasite Vectors* 2015; 8: 370. [CrossRef]
24. De Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol* 2015; 16: 99-109. [CrossRef]
25. Ozbel Y, Karakuş M, Arserim SH, Kalkan ŞO, Toz S. Molecular Detection and Identification of *Leishmania* spp. in Naturally Infected *Phlebotomus tobbi* and *Sergentomyia dentata* in a Focus of Human and Canine Leishmaniasis in Western Turkey. *Acta Trop* 2015; 155: 89-94. [CrossRef]
26. Ozbel Y, Oskam L, Ozensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, et al. A Survey on Canine Leishmaniasis in Western Turkey by Parasite, DNA and Antibody Detection Assays. *Acta Trop* 2000; 74: 1-6. [CrossRef]
27. Atasoy A, Pasa S, Toz SO, Ertabaklar H. Seroprevalence of Canine Visceral Leishmaniasis Around the Aegean Coast of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2010; 16: 1-6.
28. Coutinho MTZ, Linardi PM. Can Fleas from Dogs Infected with Canine Visceral Leishmaniasis Transfer the Infection to Other Mammals? *Vet Parasitol* 2007; 147: 320-5. [CrossRef]
29. Silva de Morais RC, Goncalves SC, Costa PL, da Silva KG, da Silva FJ, e Silva RP, et al. Detection of *Leishmania infantum* in Animals and Their Ectoparasites by Conventional PCR and Real Time PCR. *Exp Appl Acarol* 2013; 59: 473-81. [CrossRef]
30. Trotta M, Nicetto M, Fogliazza A, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, and *Rickettsia* in Ticks Removed from Dogs Living in Italy. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3: 293-6. [CrossRef]
31. Campos JHF, Costa FAL. Participation of Ticks in the Infectious Cycle of Canine Visceral Leishmaniasis, in Teresina, Piauí, Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2014; 56: 297-300. [CrossRef]
31. Salvatore D, Aureli S, Baldelli R, Di Francesco A, Tampieri MP, Galuppi R. Molecular Evidence of *Leishmania infantum* in *Ixodes ricinus* Ticks from Dogs and Cats, in Italy. *Veterinaria Italiana* 2014; 50: 307-12.
32. Pennisi MG, Persichetti MF, Serrano L, Altet L, Reale S, Gulotta L, et al. Ticks and Associated Pathogens Collected from Cats in Sicily and Calabria (Italy). *Parasite Vectors* 2015; 8: 512. [CrossRef]
33. Silva VM, Gonçalves RG, Nitz N, Morales LEA, Cruz LM, Sobral IG, et al. Successful Isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodida) Collected from Naturally Infected Dogs. *BMC Vet Res* 2015; 11: 258. [CrossRef]
34. Paşa S, Vardarlı AT, Erol N, Karakuş M, Toz S, Atasoy A, et al. Detection of *Leishmania major* and *Leishmania tropica* in Domestic Cats in the Ege Region of Turkey. *Vet Parasitol* 2015; 212: 389-92. [CrossRef]
35. Weeks AM, Glomski CA. Cytology of the Bone Marrow in the Mongolian Gerbil. *Laboratory Animals* 1978; 12: 195-202. [CrossRef]
36. Bates PA. Transmission of *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Phlebotomine Sand Flies. *Int J Parasitol* 2007; 37: 1097-106. [CrossRef]
37. Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular Crosstalks in *Leishmania*-Sandfly-Host Relationships. *Parasite*; 2008: 15: 237-24. [CrossRef]