

## Kutanöz Leishmaniasis Tanısında Serolojinin Yeri

Fadile YILDIZ ZEYREK \*   
Seray TUMER \*

Derya DIRIM ERDOGAN \*\*  
Metin KORKMAZ \*\*

Nermin ULUCA \*

\* Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, TR-63100 Şanlıurfa - TÜRKİYE

\*\* Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-35100 İzmir - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2011-6083

### Özet

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi parazitler ile enfekte dişi kum sinekleri aracılığıyla insana bulaştırılan bir hastalıktır. Kutanöz leishmaniasis (KL) olarak da adlandırılan şark çıbanı, Türkiye'de en çok Batı ve Güneydoğu bölgelerinde endemik olarak görülmektedir. Kliniği, parazit ve konakla ilgili çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Lezyondan alınan örnekte parazitin gösterilmesiyle kesin tanı konmaktadır. Ancak etkenin gösterilemediği olgularda serolojik tanı yöntemlerine başvurulmaktadır. Bu çalışmada, mikroskopi ve kültürün negatif bulunduğu KL şüpheli olgularda anti-*Leishmania* antikorlarının araştırılması amaçlanmıştır. Temmuz 2008 - Haziran 2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına KL şüpheli cilt lezyonu olan 192 olgu başvurmuştur. Mikroskop ve kültür incelemeleri negatif olan KL şüpheli 11 hastadan serum örnekleri alınarak serolojik inceleme için Ege Üniversitesi Parazitoloji AD'na gönderilmiştir. İndirekt Floresan Antikor (IFA) yöntemi ile anti-*Leishmania* antikorları araştırılan 11 örneğin 9'u (%82) pozitif bulunmuştur. Pozitiflik saptanan bu hastalar 5 değerli antimon bileşikleriyle tedavi edilmiş ve tamamının lezyonlarında iyileşme görülmüştür. Bilindiği gibi KL tanısında, serolojik yöntemlerle çok düşük titrede saptanabilen veya hiç saptanamayan antikorlar oluştuğu için seroloji tercih edilmemektedir. Ancak KL'nin endemik olduğu Şanlıurfa'da direk mikroskopi ve kültür sonuçları negatif olan bu hastaların serolojik yöntemle tanı konulup tedavi edilmeleri nedeniyle, serolojinin önemli bir alternatif olduğu ve şüpheli hastalarda mutlaka akıldan tutulması gerektiği düşünülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Kutanöz leishmaniasis, Seroloji, 5 değerli antimon bileşikleri

## The Role of Serology in The Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

### Summary

Leishmaniasis is a parasitic disease that is caused by *Leishmania* spp and transmitted to humans by female sandflies. The cutaneous form of the disease, Cutaneous Leishmaniasis (CL), is endemic in western and southeastern Anatolia, and its clinical manifestations of the disease vary according to the factors related to the parasite and host. Definitive diagnosis of CL relies on the identification of the parasite in lesion samples; however, serological diagnosis is preferred when the parasite is not identified. The aim of this study is the investigation of anti-*Leishmania* antibodies in CL-suspect cases which were found to be negative in microscopy and culture. A total of 192 cases with CL-suspect skin lesions were admitted to Parasitology Laboratory of Harran University Hospital between July 2008 and June 2011. Sera of 11 CL-suspect cases with negative microscopic and culture results were sent to Ege University School of Medicine Department of Parasitology for serological assessments. Nine of 11 (82%) samples were found to be positive with indirect fluorescent antibody (IFA) test, and successfully treated with pentavalent antimony compounds. Serology is generally not preferred in CL diagnosis due to low or neglected antibody levels; however, serological diagnosis of microscopy and culture-negative CL-suspected cases from Şanlıurfa province, an endemic site for CL in Turkey, indicates that serology may be a significant option in CL diagnosis in suspected cases.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, Serology, Pentavalent antimony compounds

### GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi parazitler ile enfekte dişi kum sineklerinin (Tatarcık, Phlebotomus) kan emmesi sırasında insanlara bulaştırdığı bir hastalık olup, dünya-

da yaklaşık 98 ülkede endemiktir. İnsidansının yılda 2 milyon yeni olgu (0.5 milyon kala-azar, 1.5 milyon kutanöz leishmaniasis) olduğu tahmin edilmektedir<sup>1,2</sup>. Şark çıbanı



İletişim (Correspondence)



+90 532 2241193



fadilezeyrek@hotmail.com

olarak da adlandırılan kutanöz leishmaniasis (KL) Türkiye'de en çok Batı ve Güneydoğu bölgelerinde endemik olarak görülmektedir. Şanlıurfa'da 1981-2000 yılları arasında toplam 22.335 KL vakası bildirilmiştir. Ülkemizde halen KL olgularının %70'i Şanlıurfa'dan rapor edilmektedir. Etken *Leishmania tropica* antroponotik (insan - vektör - insan geçişli)'tir <sup>3,4</sup>.

KL'de tanı epidemiyolojik veri, klinik özellikler ve laboratuvar testlerine dayanmaktadır. KL için endemik bölgede yaşamak veya nonendemik bölgeden endemik bölgeye seyahat öyküsü önemli epidemiyolojik tanı kriterleridir. Klinik, parazit (*Leishmania* türü vb) ve konak (immün sistem vb) ile ilgili çeşitli faktörlere bağlı olarak oldukça farklılık gösterebilmektedir. Ancak tatarcığın ısırdığı bölgede lezyonların başlangıcı genellikle benzerdir. 2 hafta - 3 aylık bir inkübasyon döneminden sonra oluşan küçük eritematöz papül/nodüle bazen lenfadenopati de eşlik edebilir. Bu başlangıç lezyonu kendiliğinden düzelebileceği gibi birkaç ay sonra çok farklı klinik özelliklere sahip olabilir <sup>5</sup>. KL tanısının doğrulanması için lezyondan alınan örneklerde parazit (mikroskopi, NNN - Novy, McNeal, Nicolle - besi yerinde kültür), *Leishmania* DNA'sı (moleküler yöntemler) veya parazit antijen/molekülünün (immunohistokimyasal yöntemler) saptanması gereklidir <sup>2</sup>. Ancak bunlar negatif çıkarsa dolaylı tanı yöntemleri olan serolojik testler kullanılabilir. KL tanısında en sık kullanılan serolojik tanı yöntemleri IFA ve enzime bağlı immunosorbent test (ELISA)'dir <sup>5</sup>.

Bu çalışmada, Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına KL şüpheli cilt lezyonuyla başvuran ancak mikroskop ve kültür incelemeleri negatif saptanan hastalardan alınan serum örneklerinde anti-*Leishmania* antikorlarının araştırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Hasta Örnekleri

Temmuz 2008 - Haziran 2011 yılları arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına KL şüphesi ile cilt lezyonu olan 192 olgu başvurmuştur. Her hastada lezyondan alınan örnekler smear yapılarak giemsa ile boyanıp mikroskopik olarak değerlendirilmiş ve aynı zamanda NNN besi yerine ekilerek kültürleri yapılmıştır.

Mikroskop ve kültür incelemeleri negatif olan, diğer deri hastalıkları ile ayırıcı tanısı yapılmış ve klinisyenin KL ön tanısında ısrarlı olduğu, şüpheli 11 hastadan serum örnekleri alınarak serolojik inceleme için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Anabilim Dalı Seroloji Laboratuvarına gönderilmiştir.

### Seroloji

Tüm serum örneklerinde laboratuvarımızda hazırlanan

IFA IgG testi ile anti-*Leishmania* antikorları araştırılmıştır. IFA testinde kullanılan antijen, NNN besiyerinde üretilip, %10 fetal calf serumu (FCS) içeren RPMI 1640 sıvı besiyerinde çoğaltılan yerli *Leishmania infantum* zimodem MON-1 stoklarındaki promastigotlardan elde edilmiştir. Çoğaltılan promastigotlar, PBS (pH:7.4) ile 3.000 devirde 10 dak. santrifüj edilerek 5 kez yıkandıktan sonra, x200 büyütmede her sahada 20-30 parazit olacak şekilde teflon kaplı lamlara yayılmış ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Kaynak literatürdeki prosedür modifiye edilerek IFA testi uygulanmıştır <sup>6</sup>. Testin standardizasyonunu sağlamak için her çalışmada önceden negatif ve pozitif (1/1024 sulandırım) olduğu bilinen kontrol serumları kullanılmıştır. Hasta ve kontrol serumları PBS (pH:7.4) ile 1/16, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024 olmak üzere 6 sulandırım çalışılarak antijenli teflon kaplı lamlara aktarılmış ve 37°C etüvde, nemli ortamda 30 dak. inkübe edilmiştir. PBS (pH:7.4) ile 3 kez 5'er dakika yıkanan lamlara kurutulduktan sonra konjuge eklenerek 37°C etüvde, nemli ortamda 30 dak. inkübe edilmiştir. Fluorescein izotiyosiyanat (FITC) ile işaretli anti-insan IgG konjuge (BioMerieux, 75692) önceden belirlenmiş olan 1:1750 (1:100 oranında evans blue içeren PBS) sulandırımında kullanılmıştır. PBS (pH:7.4) ile 3 kez 5'er dakika yıkanan lamaların üzerine IFAT kapatma solüsyonu (8:2 gliserol:PBS) eklenerek lamelle kapatılmıştır. Lamlar karanlık odada x200 büyütmede flouresan mikroskopda değerlendirilmiş ve flouresans veren en son serum sulandırımına göre pozitiflik düzeyi belirlenmiştir. KL için 1/16 sulandırım ve üzeri pozitif olarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR

IFA yöntemi ile anti-*Leishmania* IgG antikorları araştırılan 11 örneğin 9'u (%82) pozitif bulunmuştur. Daha önce KL tedavisi görmemiş olan 2-60 yaş arası bu 11 hastanın (%63.6'sı erkek, %36.4'ü kadın), 1-3 adet ve 1 hafta-15 yıl arasında değişen sürede iyileşmeyen ülsere cilt lezyonları mevcuttu (Tablo 1).

Pozitiflik saptanan bu hastalar, 5 değerli antimoni bileşikler (meglumin antimoniyat) ile 1 ay süreyle, haftada 2 gün, 20 mg/kg/gün dozunda sistemik yolla (intramuskuler) tedavi edilmiş ve tamamının lezyonlarında iyileşme görülmüştür. IFA testinde en düşük sulandırımında (1/16) pozitif saptanmış olan iki nolu hastanın elindeki lezyonun tedavi öncesi ve sonrası resimleri *Şekil 1*'de gösterilmiştir.

Dokuz nolu hastanın kolundaki ülsere lezyonun tedavi öncesi ve sonrası resimleri *Şekil 2*'de gösterilmiştir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

KL enfeksiyonuna karşı oluşan temel immün yanıt hücrelidir ve lokalize KL'den, diffüz KL'e kadar değişebilen geniş bir klinik spektrumdan sorumludur. Hümorale immün yanıt ise sadece enfeksiyonun aktif döneminde oluşan ve

**Tablo 1.** KL hastalarının demografik ve klinik özellikleri ile IFA sonuçları**Table 1.** Demographic and clinical features of CL patients and their IFA test results

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Lezyon Sayısı	Lezyon Yeri	Lezyon Tipi	Lezyon Süresi	Önceki KI Tedavisi	IFA Sonucu
1	Kadın	8	1	Yüz	Ülsere	4 ay	Yok	1/512
2	Erkek	21	1	El	Ülsere	1 yıl	Yok	1/16
3	Erkek	2	1	Kol	Ülsere	6 ay	Yok	1/512
4	Erkek	47	1	Yüz	Ülsere	3 yıl	Yok	1/128
5	Kadın	60	1	Yüz	Ülsere	2 yıl	Yok	1/16
6	Erkek	48	1	El	Ülsere	3 yıl	Yok	1/128
7	Erkek	40	3	Yüz, El	Ülsere	6 ay	Yok	1/256
8	Kadın	45	1	Yüz	Ülsere	15 yıl	Yok	Negatif
9	Erkek	60	3	Yüz, Kol	Ülsere	1 hafta	Var	1/128
10	Kadın	60	1	Yüz	Ülsere	2 yıl	Var	1/512
11	Erkek	10	1	Yüz	Ülsere	2 yıl	Var	Negatif

**Şekil 1.** İki nolu hastanın tedavi öncesi (A-B) ve tedavi sonrası (C) resimleri**Fig 1.** The photographs of the second patient pretreatment (A-B) and posttreatment (C)**Şekil 2.** Dokuz nolu hastanın tedavi öncesi (A) ve tedavi sonrası (B) resimleri**Fig 2.** The photographs of the ninth patient pretreatment (A) and posttreatment (B)

tedavi bitiminden 6-9 ay sonra kaybolan genellikle düşük titrede ve geçici bir antikor üretimiyle sınırlıdır <sup>3,7,8</sup>. Bu nedenle KL tanısında, serolojik yöntemlerin öncelikli olarak

tercih edilmediği, ancak parazit yükü ve enfeksiyonun kronikliğine bağlı olarak yüksek titrede bir antikor cevabının da oluşabileceği bildirilmiştir <sup>9</sup>.

Eski Dünya'da KL'in birden fazla klinik formunun görülebildiği endemik bölgelerde, direk tanının kolay ve ucuz olması ve çapraz reaksiyonlar nedeniyle KL tanısında serolojik testlerin kullanımı sınırlıdır. Leishmaniasisin endemik olduğu bazı ülkelerde klinik olarak şüpheli fakat klasik yöntemlerle parazit saptanamamış olgularda KL tanısında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılmaktadır<sup>10,11</sup>. Ancak biyopsi, histopatoloji ve moleküler yöntemlerin yapılamadığı yerlerde kolay uygulanan ve maliyeti düşük olan serolojik tanı testlerinin tanı veya tarama amaçlı uygulanabileceği bildirilmektedir<sup>12,13</sup>.

Daha önce bildirilen bir olgu sunumunda, Şanlıurfa doğumlu, yüzünde 50 yıldır iyileşmeyen skatrisyel plak şeklinde lezyonu olan ve lupus vulgaris tanısıyla dört kez tüberküloz tedavisi gören 51 yaşındaki erkek olgunun deri lezyonundan alınan deri biyopsi örneğinin giemsa ile boyalı yaymalarının mikroskopik incelemesi, NNN besiyerinde kültürü ve PZR'u negatif saptanmış. Anti-*Leishmania* antikorlarını saptamak için uygulanan IFA (1/1024 pozitif) ve hızlı tanı testinin (rK39) pozitif saptanması üzerine, endemik bölgede yaşama öyküsü, klinik ve laboratuvar bulgularına göre lupoid leishmaniasis tanısı alan hastanın lezyonunun, sistemik ve lezyonu içine uygulanan meglumin antimoniyat tedavisiyle tamamen iyileştiği bildirilmiştir<sup>14</sup>. Çalışmamızda da bu olguya benzer şekilde, mikroskopi ve kültür sonuçları negatif olan ancak IFA testiyle farklı sulandırılmalarda anti-*Leishmania* IgG antikor pozitifliği saptanan 9 olgunun cilt lezyonları sistemik meglumin antimoniyat tedavisiyle tamamen düzelmiştir.

Çalışmamızın yapıldığı Şanlıurfa ili antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL) için oldukça endemik bir bölge olup, bugüne kadar KL'in diğer klinik tipleri bildirilmemiştir<sup>3</sup>. Bu bölgede KL şüpheli lezyonlardan alınan örnekler giemsa ile boyanıp mikroskopiyle değerlendirilmekte ve aynı zamanda NNN besi yerine ekilerek kültürleri yapılmaktadır. Ancak çalışmamızda direk mikroskopi ve kültür sonuçları negatif olan bu 9 hastanın serolojik yöntemle tanı konulup tedavi edilmeleri nedeniyle, serolojinin önemli bir alternatif olduğu ve şüpheli hastalarda mutlaka akılda tutulması gerektiği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Atasoy A, Pasa S, Ozensoy Toz S, Ertabaklar H:** Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis around the Aegean coast of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (1): 1-6, 2010.
- WHO Technical Report Series, 949:** Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010.
- Yıldız Zeyrek F, Korkmaz M, Ozbel Y:** Serodiagnosis of Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa province, Turkey, Where ACL is Highly Endemic. *Clin Vaccine Immunol*, 14 (11): 1409-1415, 2007.
- Erhan H, Emekdaş G, Direkel Ş:** Mersin ili Mut ilçesinde değişik yaş gruplarında *Leishmania* antikor düzeyleri. *Mersin Üniv Sağlık Bil Derg*, 1 (1): 36-39, 2008.
- Goto H, Jose ALL:** Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8 (4): 419-443, 2010.
- Özcel MA, Üner A, Ertuğ S:** Immunofloresans Yöntemi. In, Özcel MA, Altıntaş N (Eds): Parazit Hastalıklarında Tanı. s. 215-239, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 1997.
- Romero GAS, Orge MGO, Guerra MVF, Paes MG, Mac'edo VO, Carvalho EM:** Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Tropica*, 93, 49-56, 2005.
- Singh S:** New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123, 311-330, 2006.
- Isaza DM, Restrepo M, Mosca W:** Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 12 (35): 3043-3047, 1997.
- Ozbilge H, Aksoy N, Gure MS, Yazar S:** IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. *J Med Microbiol*, 55, 1329-1331, 2006.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL:** Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 44, 1435-1439, 2006.
- Kumar R, Bumb RA, Ansari NA, Mehta RD, Salotra P:** Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Bikaner, India: parasite identification and characterization using molecular and immunologic tools. *Am J Trop Med Hyg*, 76, 896-901, 2007.
- Barroso-Freitas APT, Passosc SRL, Mouta-Conforta E, Madeira MF, Schubachb AO, Santosb GPL, Nascimento LD, Marzochi MCA, Marzochi KBF:** Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 103, 383-389, 2009.
- Gerçeker Türk B, Türkmen M, Kandiloğlu G, Dirim Erdoğan D, Dereli T:** Erythematous annular cicatricial plaques on the face. *J Turk Acad Dermatol*, 5 (1): 1151c3, 2011.