

## Deney Hayvanı Olarak Gerbiller (*Meriones unguiculatus*): *Leishmania major* için İyi Bir Rol Model Olabilir mi?

Gerbils, As Experimental Animals (*Meriones unguiculatus*): Is A Good Role Model for  
*Leishmania major*?

Serkan Bakırcı<sup>1</sup>, Hüseyin Bilgin Bilgiç<sup>1</sup>, Onur Köse<sup>1</sup>, Ayça Aksulu<sup>1</sup>, Selin Hacılarlıoğlu<sup>1</sup>,  
Tülin Karagenç<sup>1</sup>, İbrahim Çavuş<sup>2</sup>, Ahmet Özbilgin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Celal Bayar Üniversitesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışma, deneysel olarak enfekte edilen gerbillerde (*Meriones unguiculatus*), klasik tanıdaki smear örnekleri yanında zenginleştirilmiş Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekim ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testi kullanılarak, *Leishmania major* amastigotlarının yayılabilme ve visseralize olabilme olasılıklarının gözlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir.

**Yöntemler:** Çalışmada kullanılan *L. major* suşu Bitlis ilimiz kırsalında yaşayan ve 18 yaşında olan erkek hastadan izole edilmiştir. Gerbillerin enfeksiyonu için de bu suştan faydalanılmıştır. 10 adet gerbille toplam  $1 \times 10^9$ /mL dozda promastigot inokule edilmiştir. Enfeksiyonun visseralize olup olmadığı yönünden incelenmesi amacıyla hayvanlara ötenazi uygulanarak nekropsileri yapılmıştır. Nekropside tüm iç organlardan preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyanmış ve promastigot gelişimi için NNN besiyerine ekimler yapılmıştır. Bununla birlikte enfeksiyonu doğrulamak için gerçek zamanlı PZR testi uygulanmıştır.

**Bulgular:** Enfeksiyondan sonraki ilk ayda, *L. major* ile enfekte edilmiş hayvanlardan alınan ve Giemsa ile boyanan doku örneklerinin muayenesinde, tüm dokularda (karaciğer, dalak, akciğer, böbrek, kalp, testis), *Leishmania* amastigotlarına rastlanılmış ve yapılan NNN besiyeri ekimlerinde 26°C'de *Leishmania* promastigotlarının ürettiği görülmüştür. *Leishmania* parazitlerinin ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesine özgü tasarlanan primer ve probler ile gerçek zamanlı PZR testi yardımıyla gerbillerden alınan örneklerin *L. major* parazitine uygun erime eğrisi gösterdiği görülmüştür.

**Sonuç:** Çalışma neticesinde, Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis etkeni olan *L. major*'un gerbillerde visseralize olduğu hem giemsa ile boyalı preparatlarda, hem de PZR ile doğrulanmıştır. (*Türkiye Parazitol Derg* 2015; 39: 212-7)

**Anahtar Kelimeler:** *Leishmania major*, gerbil, deneysel enfeksiyon

**Geliş Tarihi:** 13.05.2015

**Kabul Tarihi:** 13.08.2015

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to observation the possible visceralization tendency and dissemination of *L. major* amastigotes in gerbils (*Meriones unguiculatus*) using a classic smear technique, inoculated into enriched Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) culture and polymerase chain reaction (PCR) assay for diagnosis of infection.

**Methods:** In this study, *L. major* isolated from a man who 18 years old, living in Bitlis province of Turkey. This strain also was utilized to infect gerbils. A total of  $1 \times 10^9$ /mL promastigotes were inoculated to 10 gerbils. Necropsy was performed on infected gerbils for monitoring the visceralization tendency of the parasites. Tissue samples were prepared from each animal and stained by Giemsa and inoculated into NNN culture. However, a real-time PCR assay was performed to confirm the infection the clinical material.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Serkan Bakırcı. E.posta: serkanbakirci@adu.edu.tr

DOI: 10.5152/tpd.2015.4300

©Telif hakkı 2015 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine www.tparazitolog.org web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2015 Turkish Society for Parasitology - Available online at www.tparazitolog.org

**Results:** Examination of Giemsa-stained tissue smears showed that infected animals with *L. major* were positive for *Leishmania* amastigotes in all tissues at the first month post infection and *Leishmania* promastigotes were cultured at 26°C in culture flasks containing NNN. Melting curve analyses of ribosomal internal transcribed spacer 1 (ITS-1) PCR showed the peak concordant with *L. major*.

**Conclusion:** As a result, the present study confirmed by both Giemsa-stained smears and PCR, visceralization and dissemination of *L. major* amastigotes, the principal cause of zoonotic cutaneous leishmaniasis in gerbils. (*Türkiye Parazitolojisi Dergisi* 2015; 39: 212-7)

**Keywords:** *Leishmania major*, gerbil, experimental infection

**Received:** 13.05.2015

**Accepted:** 13.08.2015

## GİRİŞ

Leishmaniasis, tropikal ve subtropikal bölgelerde Phlebotominae ailesine bağlı kum sinekleri tarafından nakledilen ve *Leishmania* cinsindeki parazitlerin neden olduğu zoonotik karakterli bir hastalıktır (1). Leishmaniasis’de klinik olarak visseral, kutanöz ve mukokutanöz olmak üzere üç farklı tablo ortaya çıkmaktadır (2). Türkiye’de şimdiye kadar visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve köpek visseral leishmaniasis (KVL) formları görülmüştür (3). Türkiye, coğrafik olarak leishmaniasisin epidemiyolojisinde önemli olan farklı ekolojik ve iklimatik özelliklere sahip bir ülkedir (4). Hastalığın seyri ile coğrafi yayılışı yanında, zoonotik/antroponotik karakterde olması nedeniyle de ayrı bir önem taşıdığına dikkat çekilmektedir (2). Türkiye’de KL’ye neden olan başlıca parazit türü *Leishmania tropica* olup, az sayıda *L. infantum* ve nadiren *L. major* kaynaklı olgular da tespit edilmiştir (5-8). Kutanöz Leishmaniasis oluşturan *L. tropica* insan-vektör-insan geçişli antroponotik kutanöz leishmaniasis (AKL)’e neden olurken, bir diğer KL etkeni *L. major* ise ana rezervuarın kemirgenler olduğu zoonotik kutanöz leishmaniasis (ZKL)’e neden olmaktadır (4). Türkiye’de, *L. tropica*’nın neden olduğu AKL olgularının %98’inden fazlası, Güneydoğu Anadolu, Doğu Akdeniz ve Ege Bölgelerinden bildirilmektedir (9). Zoonotik kutanöz leishmaniasise yol açan *L. major* ise Türkiye’nin güneyde sınır komşuları olan Suriye, Irak ve İran’da oldukça endemik bir türdür (5, 10). Son yıllarda özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Suriye’deki iç savaş sonrası, Türkiye’ye gelen göçmenlerin de etkisiyle KL vakalarında ciddi bir artış dikkati çekmektedir (9, 11). Bu artış göz önüne alınarak gerçekleştirilen çalışmalarda KL olgularından *L. major* etkenlerine rastlandığı bildirilmiştir (11, 12).

*Leishmania major*, *Phlebotomus papatasi* ve *P. dubosqi* türü kum sinekleri tarafından nakledilmekte ve fare, hamster, gerbil gibi kemirici grubu hayvanlar, etkenin yayılmasında en önemli rezervuar olarak bilinmektedir (11, 13). Bunun yanında Türkiye’de *L. major* için vektör olan kum sineklerinden *P. papatasi*’nin varlığı farklı çalışmalarda ortaya konmuştur (3, 14). Ancak diğer tüm *Leishmania* türleri gibi *L. major* içinde rezervuar rol oynayan yabani kemiricilerin varlığı ile ilgili ayrıntılı bir çalışma bulunmamaktadır. Zoonotik kutanöz leishmaniasise yol açan *L. major* türünün rezervuarlarına yönelik çalışmalar daha çok doğal enfekte kemiriciler üzerinden yürütülmekte ve özellikle Ortadoğu ülkelerinde yapılan çalışmalarda, büyük gerbiller (*Rhombomys opimus*), Libya gerbili (*Meriones libycus*), Hint gerbili (*Tatera indica*), Hindistan büyük faresi (Bandicoot rats) (*Nesokia indica*), uzun kulaklı kirpi (*Hemiechinus auritus*), uzun tırnaklı bahçe sincabı (*Spermophilopsis leptodactylus*) gibi kemiricilerin *L. major* için rezervuar rol oynadıkları bildirilmektedir (15-18).

*Leishmania* enfeksiyonlarının patogenezi ve immunopatolojisi, laboratuvar hayvanlarının visserotropik *Leishmania* türleriyle enfekte edilmesiyle açıklanmaya çalışılmakta ve bu tarz çalışma-

larda başta fare olmak üzere, hamster, köpek, primatlar ve yabani kemirgenler model hayvan olarak kullanılmaktadır (19-22). Ancak bu çalışmalarda, genel olarak konak direncini aşacak dozlarda inokulasyonlar yapılmaktadır. Bunun sonucunda da elde edilecek sonuçlar parazitin enfekte evresine (promastigot veya amastigot), enfeksiyonun ilerleyiş yönüne, inokulasyonun büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir (23-25).

Son yıllarda, Dünya’da *L. major* türü için özellikle immün yanıt ile ilişkili çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır (22, 26-28). Türkiye’de ise, *L. major* türünün patogenezi veya immünolojisini ortaya koymak amacıyla, laboratuvar şartlarında üretilerek hayvan pasajlamalarının yapıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle bu çalışma, *L. major* için, Türkiye’de yaşayan ve sınır dışına hiç çıkmamış bir hastadan elde edilen ilk Türk suşu olarak, deney hayvanlarında üretilen ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Bu çalışma, aynı zamanda, Türkiye’de ZKL etkeni olan *L. major* türünün laboratuvar ortamında kültüre edilmesi amacıyla rol model olarak gerbilin (*Meriones unguiculatus*) kullanıldığı ilk çalışmadır.

## YÖNTEMLER

Bu çalışma, T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 28.08.2012 tarih ve 2012/046 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir.

### Çalışmada Kullanılan Gerbiller

Gerbiller (*Meriones unguiculatus*), Charles river (Erkrath, Almanya) laboratuvarından sağlanmış ve ADÜ Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Enstitüsü bünyesinde kullanım amaçlı olarak bakıma alınmıştır.

### Gerbillerin *Leishmania major* ile Enfeksiyonu ve Takibi

Araştırmada 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. Hastanın çene altı bölgesindeki lezyonundan alınan örneğin, laboratuvara adapte olmasında öncelikle; promastigotların gelişimi için zenginleştirilmiş Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) besiyerine ekimi gerçekleştirilmiş, promastigotların üremesini takiben ise içerisinde %10 fetal sıgır serumu, L-glutamin ve %1 antibiyotik solüsyonu içeren RPMI 1640 besi yerine ekimi yapılmıştır. Elde edilen suş Celal Bayar Üniversitesi (CBÜ) Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Parazit Bankası’nda muhafaza edilmiş ve MHOM/TR/2012/MANISAPB233 olarak kodlanmıştır. Kullanılacağı zaman sıvı azot tankından çıkarılan izolatin zenginleştirilmiş NNN besiyerine ekimi yapılmıştır. Zenginleştirilmiş NNN besi yerinde üreyen izolatin, 25 mL’lik flaks içerisinde 5 mL RPMI 1640 + %10 Fetal sıgır serumu içeren besi yerinde üremesi sağlanmıştır. Parazitlerin çoğaltılması takip edilip 2-3 günde bir besi yeri eklenecek şekilde 10 mL promastigot içeren besi yeri elde edilmiştir. Promastigot süspansiyonu  $1 \times 10^8$  promastigot/mL olacak şekilde mikroskopta sayıla-

rak ayarlanmıştır. Gerbillerin enfeksiyonu için de 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 cc olarak ayarlanmış insülin iğneleri ile sol ayak tabanlarından,  $1 \times 10^9$  promastigot/mL 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.

Promastigot inokulasyonundan sonraki yaklaşık 40 gün içerisinde de enfeksiyonun visseralize olup olmadığı yönünden incelenmesi amacıyla hayvanlar ötenazi edilerek nekropsileri yapılmıştır. Nekropside tüm iç organlardan preparatlar hazırlanarak Giemsa ile boyanmıştır.

#### DNA Ekstraksiyonu ve PZR

Doku örneklerinden hazırlanan tüm homojenizatlardan Promega Wizard Genomic DNA Extraction Kit (Madison, WI, USA) ile DNA izolasyonu yapılmıştır. Örnekler PZR çalışılana dek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Çalışmada, ITS1 problu gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testi uygulanmıştır. *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5.8S rRNA yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi, Forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', Reverse Primer; 5'-GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3' primerleri, QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı ile birlikte aşağıda yazılı özgün proplar kullanılarak çoğaltılmıştır.

**Probe 1:** 5'- LC610-GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG--PH

**Probe 2:** 5'-CCGTTTATACAAAAATATACGCGGTTTCGGTTT-FL

Gerçek zamanlı PZR analizi için hazırlanan toplam 25  $\mu\text{L}$ 'lik reaksiyon karışımında; 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (PCR grade water), 1  $\mu\text{L}$  Forward Primer, 1  $\mu\text{L}$  Reverse Primer, 0,5  $\mu\text{L}$  Probe1, 0,5  $\mu\text{L}$  Probe2, 12,5  $\mu\text{L}$  QuantiTect Probe PCR Kit Master karışımı (Qiagen) ve 5  $\mu\text{L}$  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 basamaklarından oluşmaktadır ve Rotor-Gene cihazının programına çalışma protokolleri olarak kaydedilmiştir.

Rotor-Gene'de melting analizi yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

#### BULGULAR

Enfekte edilen gerbillerin takibi sonucunda; enfeksiyonun 30. gününde erkek hayvanların testis dokusunda ödem şekillendiği, bir hayvanın ayak bölgesinde doku bütünlüğünün bozulduğu ve kanama odaklarının olduğu, başka bir hayvanın burun bölgesinde de kanama şekillendiği gözlenmiştir (Resim 1-2).

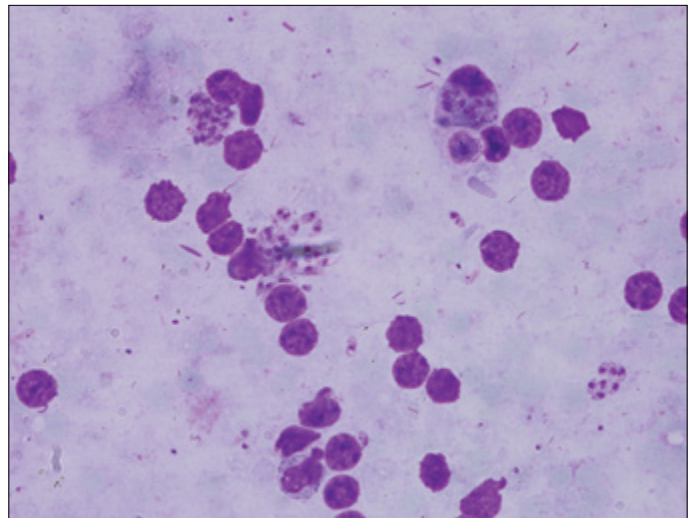
Enfeksiyonun otuz beşinci gününde de bir gerbille ötenazi yapılarak, nekropsisi gerçekleştirilmiştir. Nekropside başta, karaciğer ve dalak olmak üzere tüm iç organ ve dokularından (akciğer, böbrek, kalp, testis) preparatlar hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda amastigotların varlığı araştırılmıştır. Yapılan incelemelerde, tüm iç organ ve dokularda amastigotlara rastlanmıştır (Resim 3-6).



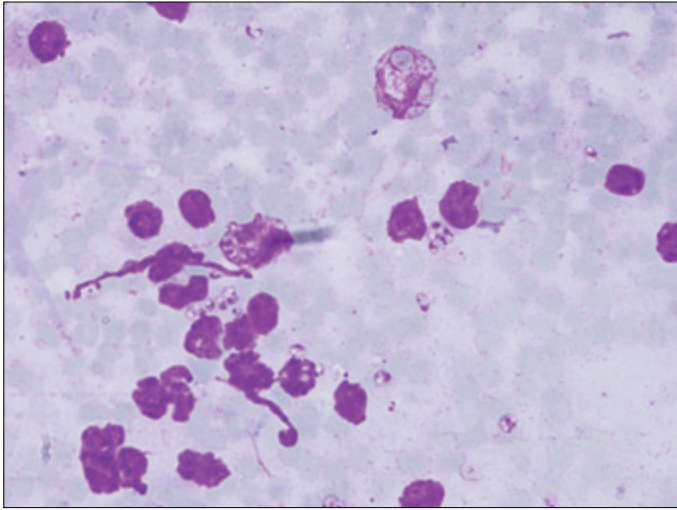
Resim 1. *L. major* ile enfekte gerbilde sol ayakta oluşan lezyonlar



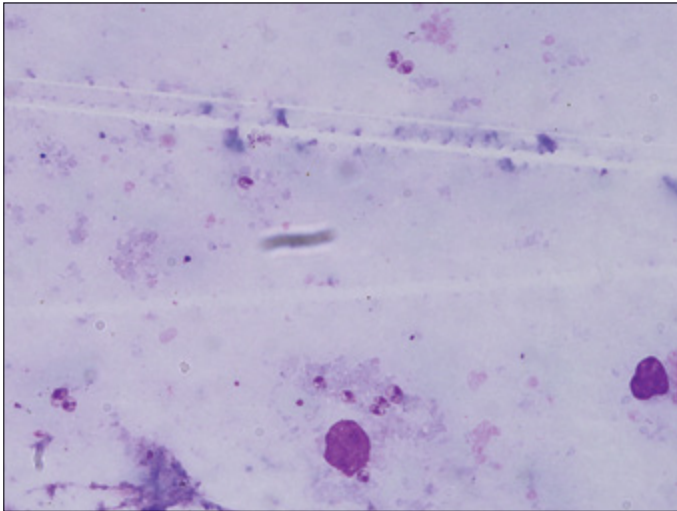
Resim 2. *L. major* ile enfekte gerbilde testisdeki ödem ve şişlik ve ayak tabanındaki yangı



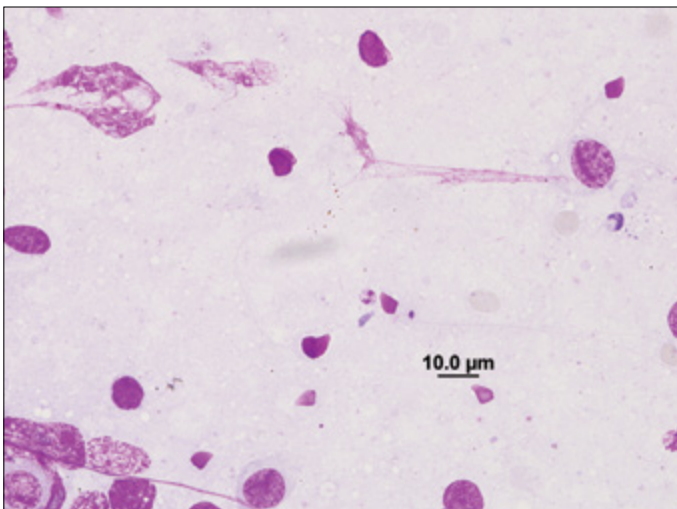
Resim 3. Böbrek dokusundan hazırlanan preparatlarda *L. major* amastigotları



**Resim 4.** Dalak dokusundan hazırlanan preparatlarda *L. major* amastigotları



**Resim 5.** Karaciğer dokusundan hazırlanan preparatlarda *L. major* amastigotları



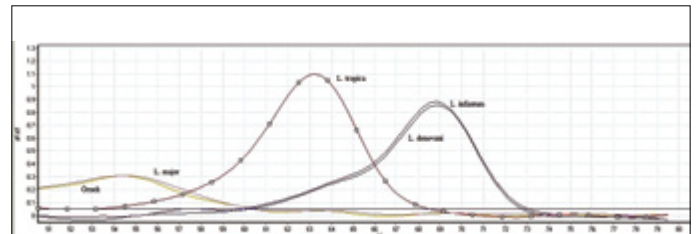
**Resim 6.** Testis dokusundan hazırlanan preparatlarda *L. major* amastigotları

Enfeksiyonun teyit edilmesi için gerçekleştirilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)nda da nekropsisi gerçekleştirilen gerbillerden alınan örneklerde *Leishmania* parazitlerinin ssu rRNA ve 5.8S rRNA yı kodlayan genleri ayıran ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS1) bölgesi, özgün proplar kullanılarak çoğaltılmış ve erime eğrileri grafikte verilmiştir (Resim 7).

## TARTIŞMA

*Leishmania major* türünün neden olduğu Zoonotik Kutanöz Leishmaniasis (ZKL), dünyanın pek çok bölgesinde sağlık problemlerine yol açan ve son zamanlarda ciddi artış gösteren bir hastalık olarak bilinmektedir (29, 30). Türkiye’de de özellikle son yıllarda Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu Bölgelerinde ZKL etkeni *L. major*’un izole edildiği çalışmalara rastlanmaktadır (11, 12, 31, 32). Bu çalışmalarda, hastalardan alınan klinik materyallerin uygun besi yerlerine ekimi yapılarak parazitlerin üremesinin sağlandığı ve yapılan izoenzim analizleri sonucunda *L. major* MON-103 zimodeminin olduğu ifade edilmiştir. Bununla beraber izole edilen parazitlerin tür tiplendirmesi için gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) testlerinden yararlanıldığı, aynı zamanda fare ve hamsterlar kullanılıp bir hayvan modeli oluşturularak etkenlerin oluşturduğu klinik seyirin takip edildiği ve hayvanlarda kısa sürede (7-10 gün) ağır lezyonların şekillendiği belirtilmiştir (31, 32).

Hastalığın rezervuarları olarak bilinen kemirgenlerde, doğal enfeksiyonların varlığını ortaya koymak için, özellikle hastalığın endemik olarak görüldüğü Orta Doğu ve Asya ülkelerinde pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir (15-18, 33). Leishmaniasis hastalığının kontrol altına alınması için uygulanacak aşı adaylarının belirlenmesi ve hastalığın immunolojik mekanizmalarının aydınlatılması gibi deneysel çalışmalarda ise başta fare olmak üzere, hamster, köpek gibi hayvanlar kullanılmıştır. (21, 22, 26, 27). Yapılan araştırmalarda, Suriye hamsterlarının visseralize olabilen *Leishmania* türleri ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlara son derece duyarlı oldukları ve insan vakalarına benzer klinik ve patolojik özellikleri çok iyi göstermelerinden dolayı Visseral Leishmaniasis (VL) çalışmaları için en uygun model hayvan oldukları düşünülmektedir (21). Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada da, Suriye hamsteri kullanılarak *L. major*’un visseralize olup olmadığı araştırılmıştır. Hamsterlara 1x10<sup>6</sup> sayıda promastigot verilmesini takip eden 1, 3, 6 ve 10. aylarda gelişen enfeksiyon seyri izlenmiştir. Çalışma neticesinde ZKL etkeni olan *L. major*’un visseralize olabilme yeteneğinin olduğu vurgulanmıştır (19). Diğer taraftan bu hayvanlarda enfeksiyonların immunopatolojisini ortaya koyacak antikor ve sitokin gibi bazı özel maddelerin eksikliğinden dolayı kullanımları günümüzde sınırlı kalmıştır (21). Bundan dolayı araştırmacılar, Leishmaniasis hastalığı ile ilişkili immun mekanizmaların ortaya çıkartılması için farklı deney



**Resim 7.** *Leishmania* parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve proplar ile gerçek zamanlı PZR yardımıyla gerbillerden alınan örneklerin *Leishmania major*’e uygun erime eğrisi

hayvanlarını kullanma arayışına girmişler ve primatlar dahil pek çok hayvanı rol model olarak düşünmüşlerdir (20). Ancak bu çalışmalarda şimdiye kadar gerbillerin kullanıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada Türkiye'den elde edilmiş bir suş kullanılarak, gerbillerde deneysel *L. major* enfeksiyonu oluşturulmaya çalışılmış ve etkenin, model hayvan olarak seçilen *M. unguiculatus* türü gerbillerde, oluşturduğu klinik seyir ve patogenezinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Kemiricilerin, vektörler aracılığı ile bulaşan pek çok zoonotik karakterli hastalığın epidemiyolojilerinde rezervuar rol oynadığı bilinmektedir (34). Dolayısı ile, kemiriciler ile taşınan hastalıklar ve enfeksiyonların epidemiyolojik siklusunda kemiricilerin işe karıştığı hastalıklar Türkiye ve yakın çevresindeki ülkelerde hala özel bir öneme sahiptir (34). Türkiye'de kaydedilmiş 150'den fazla memelinin, 65 tanesinin kemiriciler olduğu bilinmektedir (35). Bunların içerisinde *Meriones* cinsi olarak bilinen ve çöl faresi olarak adlandırılan türlerden beş tanesinin, ülkemizin farklı bölgelerinde varlığı önceki yıllarda ortaya konmuştur (36). *Meriones* cinsine ait *M. tristrami* türünün ülkemizin İran sınırı boyunca, hatta İzmir ili sınırlarına kadar bir alanda yayılış gösterdiği, bunun yanında *M. persicus* ve *M. dahli* türlerinin Türkiye'nin doğusunda, *M. crassus* türünün Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ve *M. vinogradovi* türünün ise Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde görüldüğü bildirilmiştir (36). *Meriones unguiculatus* türü ise laboratuvar hayvanı olarak kullanılan bir meriones türü olarak bilinmektedir (36).

*Meriones unguiculatus* türü; Leishmaniasis hastalığı ile ilişkili olarak hastalığın kontrolü, patogenezi veya konak immunolojisi üzerinde yapılacak araştırmalarda kullanılan hamsterlere ve farelere göre daha uysal ve çalışılması daha kolay bir deney hayvanı olduğu için bu tarz çalışmalarda iyi bir model hayvan olabilir. Bu çalışmada da hem ZKL etkeni olan *L. major*'un doğal rezervuarı olması hem de laboratuvar şartlarında kolay çalışılabilir bir deney hayvanı olması nedeni ile *M. unguiculatus* türü model hayvan olarak seçilmiştir. Çalışma neticesinde, ZKL etkeni olan *L. major* türünün gerbillerde visseralize olduğu, enfeksiyondan sonraki 35. günden itibaren başta karaciğer ve dalak olmak üzere tüm iç organ ve dokularda, parazitin amastigot formlarına rastlandığı tespit edilmiştir. Elde edilen verileri desteklemek için gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR ile de sonuçlar doğrulanmıştır. Daha önce hamsterlerin *L. major* ile enfekte edildiği bir çalışmada; sadece yaygın kutanöz lezyonların olduğu hayvanlarda etkenin visseralize olduğu ve sadece dalaktan hazırlanan örneklerde amastigot formlarına rastlandığı bildirilmektedir (19). Aynı çalışmada hamsterlerin karaciğer ve böbreklerinden hazırlanan preparatlarında amastigotlara rastlanılmadığı ifade edilmektedir (19).

## SONUÇ

Çalışma neticesinde elde edilen veriler dikkate alındığında, kutanöz ve visseral leishmaniasis ile ilişkili olarak gerçekleştirilebilecek ve model olabilecek deneysel çalışmalarda gerbillerin (*Meriones unguiculatus*) başarı ile kullanılacağı düşünülmektedir.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için etik komite onayı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.08.2012 tarihinde alınmıştır.

**Hasta Onamı:** Bu çalışma için hasta onamına gerek duyulmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış Bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir - S.B.; Tasarım - S.B., H.B.; Denetleme - S.B.; Veri Toplanması ve/veya işleme - S.B., H.B., O.K., H.E.; Analiz ve/veya Yorum - S.B., H.B., T.K.; Literatür taraması - S.B., H.B., T.K.; Yazıyı Yazan - S.B.; Eleştirel İnceleme - H.B., T.K.

**Teşekkür:** Projenin gerçekleşmesinde *Leishmania major* izolatını sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası'na teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu VTF 13004 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:** Not required in this study.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept - S.B.; Design - S.B., H.B.; Supervision - S.B.; Data Collection and/or Processing - S.B., H.B., O.K., H.E.; Analysis and/or Interpretation - S.B., H.B., T.K.; Literature Review - S.B., H.B., T.K.; Writer - S.B.; Critical Review - H.B., T.K.

**Acknowledgement:** *Leishmania major* isolates were kindly provided by Celal Bayar University, Faculty of Medicine from their available parasite bank.

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

**Financial Disclosure:** This project financially supported by Adnan Menderes University Scientific Research Projects Commission VTF 13004.

## KAYNAKLAR

1. Faiman R, Abbsi I, Jaffe C, Motro Y, Nasereddin A, Schnur LF, et al. A Newly Emerged Cutaneous Leishmaniasis Focus in Northern Israel and Two New Reservoir Hosts of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7: e2058. [CrossRef]
2. 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]
3. Ozbel Y. The infections transmitted by sand flies in Turkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2013; 60: 225-8. [CrossRef]
4. Ok UZ, Balcıoğlu IC, Ozkan AT, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Trop* 2002; 84: 43-8. [CrossRef]
5. 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]
6. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Control Team Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 2012; 7: e35671. [CrossRef]
7. Votýpka J, Kasap OE, Volf P, Kodým P, Alten B. Risk factors for cutaneous Leishmaniasis in Cukurova region, Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106: 186-90. [CrossRef]
8. Ser Ö, Çetin H. Kutanoz Leishmaniasis ve Antalya İlindeki Durumu. *Türkiye Parazit Derg* 2013; 37: 84-91. [CrossRef]
9. Salman IS, Vural A, Unver A, Saçar S. Suriye İç Savaşı Sonrası Nizip'te Kutanoz Leishmaniasis Olguları. *Mikrobiyol Bul* 2014; 48: 106-13.
10. Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y. Türkiye'de Kutanoz Leishmaniasis Durumu. *Türkiye Parazit Derg* 2012; 36: 121-9.

11. 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: 154-08. [\[CrossRef\]](#)
12. Zeyrek FY, Gurses G, Uluca N, Doni NY, Toprak S, Yesilova Y, et al. Is the agent of Cutaneous Leishmaniasis in Sanliurfa changing? First cases of *Leishmania major*. *Türkiye Parazit Derg* 2014; 38: 270-4. [\[CrossRef\]](#)
13. Tomás-Pérez M, Khaldi M, Riera C, Mozo-León D, Ribas A, Hide M et al. First report of natural infection in hedgehogs with *Leishmania major*, a possible reservoir of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in Algeria. *Acta Trop* 2014; 135: 44-9. [\[CrossRef\]](#)
14. Atakan E, Akbaba M, Sütuluk Z, Alptekin D, Demirhindi H, Uludağ SK. Hocalive Turunçlu (Adana) Köylerinde Phlebotomus (Diptera; Psychodidae; Phlebotomine) Türlerinin Populasyon Yoğunluğu ve Kutanöz Leishmaniasis ile İlişkisi. *Türkiye Parazit Derg* 2010; 34: 106-11.
15. Elfari M, Schnur LF, Strelkova MV, Eisenberger CL, Jacobson RL, Greenblatt CL, et al. Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa. *Microbes and Infection* 2005; 7: 93-103. [\[CrossRef\]](#)
16. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, et al. *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol* 2010; 126: 552-6. [\[CrossRef\]](#)
17. Ghawar W, Toumi A, Snoussi MA, Chlif S, Zâatour A, Boukthir A, et al. *Leishmania major* infection among *Psammomys obesus* and *Meriones shawi*: reservoirs of zoonotic cutaneous Leishmaniasis in Sidi Bouzid (Central Tunisia). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; 11: 1561-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Ghawar W, Attia H, Bettaieb, J, Yazidi R, Laouini D, Ben-Salah A. Genotype profile of *Leishmania major* strains isolated from tunisian rodent reservoir hosts revealed by multilocus microsatellite typing. *PLoS ONE* 2014; 9: 9. [\[CrossRef\]](#)
19. Soliman MFM. The persistence, dissemination and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Trop* 2006; 97: 146-50. [\[CrossRef\]](#)
20. Chanyalew M, Hailu A. Infection site dependent progression of cutaneous lesions in African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) experimentally infected with *Leishmania aethiopica* promastigots. *Ethiop J Sci* 2013; 36: 45-8.
21. Loria-Cervera EN, Andrada-Narváez FJ. Animal models for the study of Leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56: 1-11. [\[CrossRef\]](#)
22. Crosby EJ, Goldschmidt MH, Wherry EJ, Scott P. Engagement of NKG2D on Bystander Memory CD8 T Cells Promotes Increased Immunopathology following *Leishmania major* Infection. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003970. [\[CrossRef\]](#)
23. Slappendel RJ, Ferrer L. *Leishmaniasis*. Greene CE (editor). In *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998. p. 450-8.
24. Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, et al. Failure of a multi-subunit recombinant *Leishmanial* vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 2005; 23: 5245-51. [\[CrossRef\]](#)
25. Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, et al. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2008; 22: 866-72 [\[CrossRef\]](#)
26. Gonzalez-Leal IJ, Röger B, Schwarz A, Schirmeister T, Reinheckel T, Lutz MB, et al. Cathepsin B in Antigen-Presenting Cells Controls Mediators of the Th1 Immune Response during *Leishmania major* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3194. [\[CrossRef\]](#)
27. Mou Z, Liu D, Okwor I, Jia P, Orihara K, Uzonna JE. MHC Class II Restricted Innate-Like Double Negative T Cells Contribute to Optimal Primary and Secondary Immunity to *Leishmania major*. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1004396. [\[CrossRef\]](#)
28. Ghotloo S, Hoseini MHM, Alimohammadian MH, Khaze V, Memarnejadian A, Rostami A. Immunomodulatory effects of chitin microparticles on *Leishmania major*-infected BALB c mice. *Parasitol Int* 2015; 64: 219-21. [\[CrossRef\]](#)
29. Mostafa BH, Abderrazak Souha B, Sabe F, Nouredine C, Riadh BI. Evidence for the existence of two distinct species: *Psammomys obesus* and *Psammomys vexillaris* within the sand rats (Rodentia, Gerbillinae), reservoirs of cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Infect Genet Evol* 2006 Jul; 6: 301-8. [\[CrossRef\]](#)
30. WHO. Sustaining The Drive To Overcome The Global Impact Of Neglected Tropical Diseases, Second Who Report on Neglected Tropical Diseases 2013. p. 67-71.
31. Ozbilgin A, Çulha G, Zeyrek F, Kurt O, Töz S, Gündüz C, et al. Leishmaniasis in Turkey: Is *Leishmania major* present in Turkey? 23rd ECCMID. Berlin; Germany: 2013. P2262.
32. Ozbilgin A, Culha G, Uzun S, Harman M, Gunasti Topal S, Okudan F, et al. Leishmaniasis In Turkey: Emerging *Leishmania Major* Infections In Anatolia 24th ECCMID Barcelona; Spain: 2014. P0672.
33. Schlein Y, Warburg A, Schnur LF, Le Blancq SM, Gunders AE. Leishmaniasis in Israel: reservoir hosts, sandfly vectors and Leishmanial strains in the Negev, Central Arava and along the Dead Sea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984; 78: 480-4. [\[CrossRef\]](#)
34. Sözen M. Rodentler ve vektör özellikleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2011; 68: 1-5.
35. Karataş A. Türkiye'deki kemirici (Mammalia: Rodentia) Türleri. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 2011; 68: 7-18.
36. Yiğit Y, Çolak E, Saygılı F, Yüce D. Allozyme Variations in the genus *Meriones* (Gerbillinae: Rodentia) from Turkey. *Acta Zoologica Bulgarica* 2013; 65: 299-306.