

# Kuzey Kıbrıs'tan İzole Edilen Kutanöz Layşmanyazis ve Kanin Layşmanyazis Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Fare Modellerinde Klinik Yansımaları

## Molecular Characterization of Cutaneous Leishmaniasis and Canine Leishmaniasis Strains Isolated from Northern Cyprus and Their Clinical Reflections in Mice Models

Emrah GÜLER<sup>1</sup>(ID), Ahmet ÖZBİLGİN<sup>2</sup>(ID), İbrahim ÇAVUŞ<sup>2</sup>(ID), Yener ÖZEL<sup>3</sup>(ID),  
Cumhur GÜNDÜZ<sup>4</sup>(ID), Kaya SÜER<sup>5</sup>(ID), Tamer ŞANLIDAĞ<sup>6</sup>(ID)

<sup>1</sup> Lefke Avrupa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Lefke.

<sup>2</sup> European University of Lefke, Faculty of Arts and Sciences, Department of Molecular Biology and Genetics, Lefke, Turkish Republic of Northern Cyprus.

<sup>3</sup> Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

<sup>4</sup> Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Türkiye.

<sup>5</sup> Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

<sup>6</sup> Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.

<sup>7</sup> Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

<sup>8</sup> Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, İzmir, Türkiye.

<sup>9</sup> Yakın Doğu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa.

<sup>10</sup> Near East University, Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Nicosia, Turkish Republic of Northern Cyprus.

<sup>11</sup> Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Araştırma Enstitüsü, Tropikal ve Vektörel Hastalıklar Çalışma Grubu, Lefkoşa.

<sup>12</sup> Near East University, DESAM Research Institute, Tropical and Vector-Borne Diseases Research Group, Nicosia, Turkish Republic of Northern Cyprus.

\*Bu çalışmanın, sekans analizleri sonuçları 38. ANKEM Akılcı Antibiyotik Kullanımı Kongresinde (1-4 Haziran 2023 Girne, KKTC) poster bildirisi ve in vivo fare modellerindeki klinik yansımaları ise 23. Ulusal Parazitoloji Kongresi (30 Ekim-3 Kasım 2023 Antalya, Türkiye)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Makale Atfı:** Güler E, Özbilgin A, Çavuş İ, Özel Y, Gündüz C, Süer K ve ark. Kuzey Kıbrıs'tan izole edilen kutanöz layşmanyazis ve kanin layşmanyazis suşlarının moleküler karakterizasyonu ve fare modellerinde klinik yansımaları. Mikrobiyol Bul 2025;59(2):203-216.

### ÖZ

Layşmanyazis, tropikal ve subtropikal bölgelerde *Leishmania* türlerinin neden olduğu parazitik bir enfeksiyondur. Doğu Akdeniz havzasında yer alan Kıbrıs, layşmanyazis için endemik kabul edilmektedir. Bu çalışmada, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde izole edilen iki *Leishmania* suşunun sekanslanarak kökenlerinin araştırılması ayrıca bu suşların farelerdeki klinik yansımaları incelenerek in vivo hayvan modellerinin oluşturulması amaçlanmıştır. Alınanda lupoid lezyonu olan yedi yaşındaki bir kız hastadan biyopsi örneği alınmış ve yazma preparatlarında amastigotlar tespit edilmiştir. Örneğin zenginleştirilmiş NNN besiyerinde yapılan kültürü sonucu promastigotların saptanmasını takiben hastaya kutanöz layşmanyazis

(KL) tanısı koyulmuştur (no: 504). Dört yaşında boxer cinsi bir beğçi köpeği, kilo kaybı, halsizlik, tüy dökülmesi ve lenfadenopati şikayetleriyle bir veteriner kliniğine götürülmüştür. Kanin layşmanyazis (KanL) semptomları bulunan köpekten kan örneği alınmıştır. Kan örneğinin zenginleştirilmiş NNN besiyerinde kültürü yapılmış ve promastigotların üremesiyle KanL teşhisi konulmuştur (no: 753). KL ve KanL olgularından elde edilen *Leishmania* promastigotları kriyoprezerve edilmiş ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı Parazit Bankasında saklanmıştır. İzolatlar kullanılacakları zaman RPMI-1640 besiyerine aktarılmış, çalışma için gerekli olan  $10^7$  promastigot/mL konsantrasyonuna kadar çoğaltılmıştır. Üreyen izolatlardan, *Leishmania*'nın ITS-1 ve *cpb* E/F bölgelerine özgü primerler kullanılarak tür tayinleri yapılmıştır. Tür tanımlaması yapılan Kuzey Kıbrıs izolatlarının dizi analizlerinden elde edilen verilere göre bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur. In vivo çalışmalar için Kuzey Kıbrıs *Leishmania* izolatlarına ek olarak, karşılaştırma yapılması amacıyla, Manisa'dan izole edilen birer tane *Leishmania donovani* (MLd) ve *Leishmania tropica* (MLt) izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Her grupta beş adet *Mus musculus* (Balb/c) fare olacak şekilde sekiz çalışma grubu ve iki kontrol grubu (enfekte olmamış) (toplam 10 grup ve 50 Balb/c fare) oluşturulmuştur. KL hayvan modeli için MLt, 753, MLd ve 504 suşlarıyla ayrı ayrı dört fare çalışma grubu kullanılmıştır. Diğer dört fare grubu ise aynı suşlarla VL hayvan modeli için ayrılmıştır. Ayrıca, KL ve VL modelleri için birer grup negatif kontrol grubu olarak belirlenmiştir. KL gruplarındaki fareler, hazırlanan promastigot süspansiyonundan 100 µL ile sağ ayak tabanına intradermal yolla enfekte edilmiş ve farelerin ayak tabanı genişliği ve yüksekliği altı hafta boyunca her hafta olacak şekilde ölçülmüştür. VL gruplarındaki farelere ise 100 µL promastigot süspansiyonu intraperitoneal yolla peritondan verilmiş ve farelerdeki VL semptomları takip edilmiştir. Enjeksiyondan 30 gün sonra otopsi yapılarak dalak ve karaciğerleri çıkarılıp boyutları ölçülmüştür. Çalışmada, moleküler olarak karakterize edilen iki *Leishmania* izolatından biri *L. donovani* (insan suşu, no: 504), diğeri ise *L. tropica* (köpek suşu, no: 753) idi. KL ve VL gruplarında bulunan farelerde sırasıyla KL ve VL semptomlarının geliştiği ve hem Manisa hem de Kuzey Kıbrıs izolatlarının hayvan modellerindeki yansımalarının benzer olduğu tespit edilmiştir. Literatürde, Kuzey Kıbrıs'taki KanL olgularına *Leishmania infantum*'un neden olduğu belirtilmektedir. Fakat çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, farklı olarak, *L. tropica*'nın da adadaki KanL enfeksiyonlarının kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, Kuzey Kıbrıs izolatlarının, farelerde hem KL hem de VL enfeksiyonlarına neden olduğu görülmüş ve ileride yapılacak olan in vivo çalışmalarda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Layşmanyazis; moleküler karakterizasyon; fare modeli; Kuzey Kıbrıs.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic infection caused by *Leishmania* species in tropical and subtropical regions. Cyprus, located in the Eastern Mediterranean basin, is considered endemic for leishmaniasis. In our study, we aimed to investigate the origins of two *Leishmania* strains isolated from Turkish Republic of Northern Cyprus by sequencing and to establish in vivo animal models by examining the clinical reflections of these strains in mice. A biopsy material was taken from a seven-year-old girl with a lupoid lesion on her forehead and amastigotes were detected in the smears. Following culture of the specimen on enriched NNN media and detection of promastigotes, the patient was diagnosed with cutaneous leishmaniasis (CL) (no: 504). A four-year-old boxer dog was taken to a veterinary clinic with complaints of weight loss, weakness, hair loss and lymphadenopathy. A blood sample was taken from the dog, cultured in enriched NNN media and canine leishmaniasis (CanL) was diagnosed with the growth of promastigotes (no: 753). *Leishmania* promastigotes obtained from CL and CanL cases were cryopreserved and stored in the Parasite Bank, Manisa Celal Bayar University. When the isolates were to be used, they were transferred to RPMI-1640 medium and grown to the concentration of  $10^7$  promastigotes/mL required for the study. The isolates were identified to the species level using primers specific for ITS-1 and *cpb* E/F regions of *Leishmania*. A phylogenetic tree was constructed according to the data obtained from the sequence analysis. In addition to the Northern Cyprus *Leishmania* isolates for in vivo studies, one each of *Leishmania donovani* (MLd) and *Leishmania tropica* (MLt) isolates from Manisa were included for comparison. Eight study groups and two control groups (uninfected) were formed with five *Mus musculus* (Balb/c) mice in each group (total 10 groups and 50 Balb/c mice). Four mouse study groups were separately used with MLt, 753, MLd and 504 strains to establish the CL animal model. The other four mice groups were used

for the VL animal model with the same strains. In addition, one group each for the CL and VL models was used as a negative control group. Mice in the CL groups were infected with 100 µL of the prepared promastigote suspension on the sole of the right foot intradermally and the width and height of the sole of the foot were measured weekly for six weeks. Mice in VL groups were infected with 100 µL promastigote suspension intraperitoneally and VL symptoms were monitored. Thirty days after the injection, the spleen and liver were removed by autopsy and their sizes were measured. In our study, one of the two Northern Cyprus *Leishmania* isolates molecularly characterised was *Leishmania donovani* (human strain, no: 504) and the other was *Leishmania tropica* (canine strain, no: 753). Mice in the CL and VL groups developed symptoms of CL and VL, respectively, and both Manisa and Northern Cyprus isolates had similar reflections in mice. In the literature, it is reported that *Leishmania infantum* is the causative agent of CanL cases in Northern Cyprus. However, according to our study, *L.tropica* may also be the source of CanL infections in the island. In addition, it was observed that Northern Cyprus isolates caused both CL and VL infections in mice and it was concluded that they can be used in future in vivo studies.

**Keywords:** *Leishmaniasis; molecular characterization; mice model; Northern Cyprus.*

## GİRİŞ

Layşmanyazis, zorunlu hücre içi protozoon olan *Leishmania* cinsi parazitlerin neden olduğu zoonotik karakterli bir enfeksiyon hastalığıdır. Hastalık, kum sinekleri (*Phlebotomus* spp.) aracılığıyla bulaşmakta ve yirmiden fazla *Leishmania* türünün insanlarda enfeksiyona neden olduğu bildirilmektedir<sup>1</sup>. Layşmanyazis sıklıkla yoksul toplumları etkilemekte ve yetersiz beslenme, standartların altında barınma koşulları, nüfus hareketleri, zayıf bağışıklık sistemi ve finansal eksiklikler gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 700.000 ile bir milyon yeni olgu tespit edilmektedir<sup>2</sup>.

*Leishmania* parazitlerinin doğadaki öncelikli rezervuarı köpek ve köpekgillerdir. Ayrıca fare, tilki, kedi ve insanların da bu parazitler için rezervuar olabileceği bilinmektedir<sup>3</sup>. Hastalık, tropikal ve subtropikal bölgelerde diğer bölgelere oranla daha yaygındır. Avrupa, Afrika, Asya ve Amerika kıtalarındaki 98 ülkeden layşmanyazis olguları bildirilmesine rağmen yeni olguların %90'ından fazlası sadece 13 ülkede (Afganistan, Cezayir, Bangladeş, Bolivya, Brezilya, Kolombiya, Etiyopya, Hindistan, İran, Peru, Güney Sudan, Sudan ve Suriye) tespit edilmektedir<sup>4</sup>. Layşmanyazis ayrıca Kıbrıs ve Türkiye'yi de içeren Akdeniz havzasında, Orta Doğu, Hindistan ve Güney Amerika'da önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir<sup>5</sup>.

İnsanlarda temel olarak dört farklı klinik tablo izlenmektedir: visceral layşmanyazis (VL) (kala-azar), post kala-azar dermal layşmanyazis (PKDL), kutanöz layşmanyazis (KL) ve mukokutanöz layşmanyazis (MKL). Enfeksiyona neden olan suş ve konağın immünolojik durumu büyük ölçüde kliniği belirleyen faktörlerdir<sup>3</sup>. Doğu yarım kürede (Eski Dünya) KL'ye *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* ve *Leishmania aethiopica* neden olmakta; ancak, Orta ve Güney Amerika'da (Yeni Dünya) *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana* ve *Leishmania peruviana* türlerinin KL olgularında başı çektiği bildirilmektedir<sup>6</sup>. KL, tipik olarak enfeksiyondan sonraki birkaç hafta veya ay içinde cildin açıkta kalan bölgelerinde gelişen kapalı veya açık yaralar oluşturan deri lezyonları ile karakterizedir. Yaralar tipik olarak küçük, eritematöz papüller veya nodüler plaklardan,

kabuk veya pullarla kaplanabilen kabarık bir sınır ve merkezi krater (ülser) ile açık yaralara doğru ilerleme yolunu izlemektedir<sup>7</sup>. VL; düzensiz ateş, kilo kaybı, hepatosplenomegali ve anemiyle seyreden ve tedavi edilmediği takdirde %95 oranında ölümcül olan tablodur<sup>8,9</sup>. VL'ye esas olarak *L.infantum* neden olurken, *L.tropica* ve *L.donovani* türlerinin de VL sebebi olabileceği bildirilmiştir<sup>10</sup>. PKDL, VL'nin kutanöz bir sekelidir ve yüzü, üst kolları, gövdeyi ve vücudun diğer kısımlarını etkileyen maküler, papüler veya nodüler lezyonlar şeklinde görülür<sup>11</sup>. MKL, ağız boşluğu, burun ve boğazın mukozal bölgelerinde deformasyona neden olmaktadır ve bilinen etkenler arasında *L.braziliensis*, *L.panamensis*, *L.peruviana*, *L.tropica* ve *L.guyanensis* türleri bulunmaktadır. Tipik olarak, deri lezyonları ağız yakınında başlar ve şiddetine bağlı olarak diğer vücut bölgelerine ilerleyebilir<sup>12,13</sup>. KL en yaygın form, VL en şiddetli form ve MKL ise enfeksiyonun en hasar bırakan formudur<sup>11</sup>.

Kıbrıs adası, Akdeniz'in doğusunda yer alan ve layşmanyazis için endemik olarak kabul edilen bir ada ülkesidir. Kum sinekleri ve kanin layşmanyazis (KanL) olgularının varlığı, Kıbrıs adasını hastalık için önemli bir odak noktası haline getirmiştir<sup>14</sup>. Akdeniz bölgesindeki iklim değişiklikleri nedeniyle kum sineklerinin yaşam alanları genişlemekte ve hastalığın bu bölgelerde görülmesine neden olmaktadır<sup>3</sup>. Kıbrıs adasında 1940-1950 yılları arasında sıtmayla mücadele yapılmış ve sıtma vektörü sivrisinekleri elimine etmek için yoğun bir şekilde insektisit kullanılmıştır. Yapılan ilaçlamalar sayesinde kum sineklerinin de sayısında oldukça yüksek oranda azalma görülmüştür<sup>15</sup>. Fakat ilerleyen yıllarda, Kıbrıs'ta kum sinekleriyle ilgili yapılan çalışmalarda, özellikle *Phlebotomus tobbi*'nin KanL etkeni olan *L.infantum*'a vektörlük yaptığı bildirilmiştir<sup>16</sup>.

VL ve KL tanısı klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonlarından hazırlanan Giemsa boyalı preparatların mikroskopik incelenmesine dayanmaktadır. Hızlı tanı testi olan rK39, ticari olarak temin edilebilmekte ve son yıllarda giderek artan sayıda merkez tarafından kullanılmaktadır. Parazit izolasyonu için NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleri de mevcuttur<sup>17</sup>. Ayrıca, polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] gibi moleküler yöntemler son yıllarda hem KL hem de VL tanısında kullanılmaktadır<sup>18,19</sup>. Moleküler epidemiyolojik araştırmalarda, klinik olgu yönetiminde ve özellikle layşmanyazis salgınlarında *Leishmania* türlerinin tanımlanması çok önemlidir<sup>20</sup>.

Son yıllarda moleküler analizler sonucunda *Leishmania* türlerinin hibritler oluşturduğu ve genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüştür. Bu nedenle, tanımlanan *Leishmania* türlerinin tartışılması ve taksonominin yeniden yapılandırılması gerektiği vurgulanmaktadır. *Leishmania* türlerindeki genetik varyasyon, layşmanyazisin epidemiyolojisi, biyolojisi, patolojisi, tanısı, tedavisi ve kontrolü için önemli etkilere sahiptir<sup>17,21</sup>. Hastalığın patogenezi ve immünopatolojisi laboratuvar hayvanlarının *Leishmania* türleriyle enfekte edilmesiyle açıklanmaya çalışılmaktadır<sup>22</sup>. Ayrıca, bu çalışmalar ile enfeksiyonun klinik etkileri ve tedavi yanıtı hakkında da bilgiler edinmek mümkün olmaktadır<sup>21</sup>. Fareler, hamsterlar, köpekler, kemirgenler ve primatlar gibi hayvan modelleri in vivo layşmanyazis araştırmaları için son derece yararlıdır. Hızlı üreme, bakım ve beslenme kolaylığı

ğrı gibi avantajları nedeniyle farklı genetik yapılaraya sahip fareler (BALB/c, C3H/He, CBA, C57BL/6, CsS16 ve 129SvEv) layşmanyazis ile ilgili çalışmalarda en sık kullanılan hayvan modelidir<sup>23,24</sup>.

Çalışmada, Kuzey Kıbrıs'tan izole edilmiş biri insan KL, diğeri ise KanL olgusuna ait iki adet *Leishmania* izolatının moleküler karakterizasyonu yapılmış ve bu izolatların fare modellerindeki klinik yansımaları araştırılmıştır. Bu çalışmayla, Kuzey Kıbrıs *Leishmania* izolatlarının sekanslanması ve filogenetik analizler ile kökenlerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede, adada dolaşımda olan *Leishmania* türleri tespit edilebilecek ve hastalığın adadaki dinamikleri daha iyi anlaşılacaktır. Ayrıca çalışmada, bu izolatların fare modellerindeki klinik yansımalarının, Türkiye, Manisa'dan izole edilen referans suşlarla karşılaştırılması ve böylece ileride planlanacak anti-layşmanyal ilaç, aşı ve yeni tanı kitlerinin geliştirilmesi için temel in vivo hayvan modellerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Yakın Doğu Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (Tarih: 30.06.2022 ve Karar no: YDÜ/2022/104-1568) ve Manisa Celal Bayar Üniversitesi (MCBÜ) Tıp Fakültesi Dekanlığı, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (Tarih: 05.09.2023 ve Karar no: E-77637435-050.04.04-634996) onaylandı.

### *Leishmania* spp. İzolatları

Kuzey Kıbrıs'ın Lefkoşa şehrinde ikamet etmekte olan yedi yaşındaki kız hastanın alın bölgesinde bulunan lupoid leyzondan biyopsi materyali alındı ve MCBÜ, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına gönderildi. Biyopsi materyalinden hazırlanan yayma preparatları Giemsa ile boyanarak incelendi ve *Leishmania* parazitlerine ait amastigot formları görüldü. Bunun üzerine, hasta örneğinin zenginleştirilmiş NNN besiyerine ekilmesi ile *Leishmania* parazitlerine ait promastigot formları tespit edildi ve hastaya KL tanısı koyuldu (izolat no: 504).

Lefkoşa'da yaşayan dört yaşında (20 kilogram ağırlığında) erkek boxer cinsi beğci köpeği, kilo kaybı, halsizlik, tüy dökülmesi ve lenfadenopati şikayetleriyle bir veteriner hekim kliniğine götürüldü. Veteriner hekim tarafından alınan kan örneği yine MCBÜ, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına gönderildi ve kan örneği NNN zenginleştirilmiş besiyerine ekildi. Besiyerinde promastigotların üremesi sonucunda köpeğe KanL tanısı koyuldu (izolat no: 753).

In vivo çalışmalarda Kuzey Kıbrıs *Leishmania* izolatlarına ek olarak, karşılaştırma yapılması amacıyla Manisa'dan izole edilen bir adet *L.donovani* (MLd), bir adet de *L.tropica* (MLt) izolatı çalışmaya dahil edildi. Tüm *Leishmania* promastigotlarının kriyoprezervasyonu yapılarak MCBÜ, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarı, Parazit Bankasındaki sıvı azot tanki içinde muhafaza edildi.

## Zenginleştirilmiş NNN Besiyeri

Hasta örneklerinin ekilmesi ve sıvı azot tankından çıkartılan promastigotların canlandırılması amacıyla Özbilgin ve arkadaşlarının<sup>25</sup> tarif ettiği şekilde zenginleştirilmiş NNN besiyeri kullanıldı.

## DNA İzolasyonu

Her iki *Leishmania* izolatından "Roche high pure PCR template preparation kit" (Roche, İsviçre) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı ve elde edilen ürünler kullanılabildiği kadar -20 °C'de saklandı.

## *Leishmania* İzolatlarının Tanımlanması

Uygun koşullar altında sıvı azot tankından çıkartılan *Leishmania* promastigotları zenginleştirilmiş NNN besiyerine ekildikten sonra üremeleri izlendi. Besiyerine ekilen promastigotlar 26 °C'de inkübasyona bırakıldı ve gün aşırı olacak şekilde üremeleri kontrol edildi. Üremeleri gerçekleşen izolatlar %10 "fecal calf" serum içeren RPMI-1640 besiyerine aktarılarak çalışma için gerekli olan 10<sup>7</sup> promastigot/mL seviyesine getirildi. Üreyen izolatlardan *Leishmania*'nın ribozomal internal transcribed spacer 1 (ITS-1) ve cysteine protease B (*cpb*) E/F bölgelerine özgü primerler tasarlandı ve gerçek zamanlı PCR [real-time (Rt-PCR)] ile tür tayinleri yapıldı<sup>25,26</sup>. *cpb* E/F gen bölgesine özgü primerler, *L.infantum* ve *L.donovani* arasındaki farklılıkları ayırt etmek için kullanıldı. Rt-PCR çalışmaları üretici firmanın önerileri doğrultusunda Rotor-Gene® (Qiagen, Almanya) cihazında yapıldı.

## Sekans ve Filogenetik Analizler

GenBank'tan alınan *L.donovani*, *L.infantum*, *L.major*, *L.aethiopica* ve *L.tropica*'nın referans dizileri, çalışmada kullanılan izolatların ITS-1 ve *cpb* E/F dizileriyle karşılaştırıldı. Komşu birleştirme [neighbor-joining (NJ)] yaklaşımı kullanılarak, maksimum olabilirlik filogenisi (maximum likelihood phylogeny) modeli ve 1000 kopyalı ön yükleme testi kullanılarak evrimsel mesafe belirlendi.

## Deney Hayvanı Çalışma Grupları

Her grupta beş adet *Mus musculus* (Balb/c) fare olacak şekilde sekiz çalışma grubu ve iki kontrol grubu (enfekte olmamış) oluşturuldu (toplam 10 grup ve 50 Balb/c fare). Kullanılan tüm fareler erkek, 5-7 haftalık, 20-25 gr ağırlığında ve *ad libitum* beslendi. KL hayvan modelini oluşturmak için MLt, 753, MLd ve 504 suşlarıyla ayrı ayrı dört fare çalışma grubu belirlendi. Diğer dört fare grubu ise aynı suşlarla (MLt, 753, MLd ve 504) VL hayvan modeli için kullanıldı. Ayrıca, KL ve VL modelleri için birer grup (toplam iki grup) kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu gruptaki fareler enfekte edilmedi.

## Farelerin Enfekte Edilmesi

Sıvı nitrojenden çıkartılan tüm *Leishmania* promastigotları zenginleştirilmiş NNN besiyerinde canlandırıldı ve durağan faza gelmeleri sağlandı. Ardından 10<sup>7</sup> promastigot/mL yoğunluğunda promastigot süspansiyonu hazırlandı. KL gruplarındaki fareler, hazırlanan

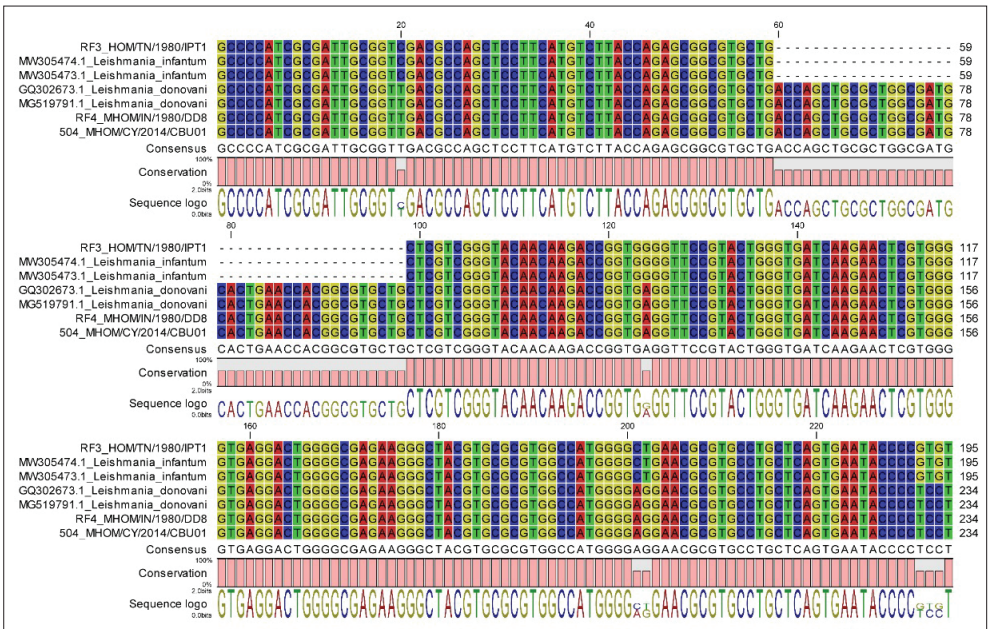
promastigot süspansiyonundan 100 µL ile sağ ayak tabanına intradermal yolla enfekte edildi. KL farelerinin ayak tabanları genişliği ve yüksekliği altı hafta boyunca her hafta olacak şekilde mikrometrik ölçüm aletiyle ölçüldü. Ayak tabanı ölçümleri mm cinsinden kaydedildi ve bu değerler gruplar arasında karşılaştırıldı. VL gruplarındaki farelere ise 100 µL promastigot süspansiyonu intraperitoneal yolla peritondan verildi. Bu farelerde VL semptomları takip edildi ve enjeksiyondan 30 gün sonra otopsi yapılarak dalak ve karaciğerleri çıkartıldı. Çıkartılan dalak ve karaciğerlerin uzunluğu (mm), genişliği (mm) ve ağırlığı (gr) ölçüldü. Çalışmada, farelere önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi ötanazi uygulandı<sup>27,28</sup>.

### İstatistiksel Analiz

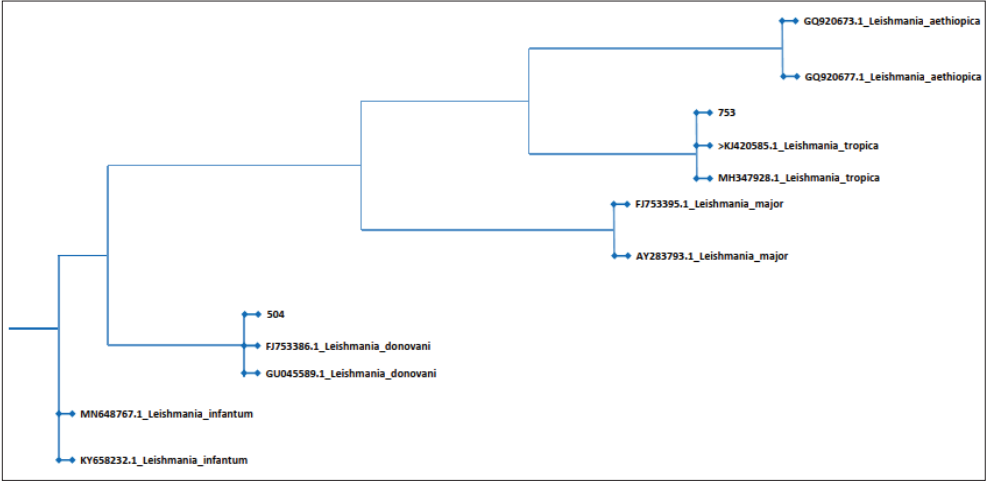
Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde SPSS v22.0 (SPSS Inc., ABD) programı kullanıldı. Tüm gruplarda bulunan fareler için alınan ölçümler (KL grubu için sağ ayak tabanı; VL grubu için dalak ve karaciğer uzunluk, genişlik ve ağırlık) kendi aralarında ve kontrol grupları ile bağımlı gruplar T-testi kullanılarak karşılaştırıldı ve elde edilen  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

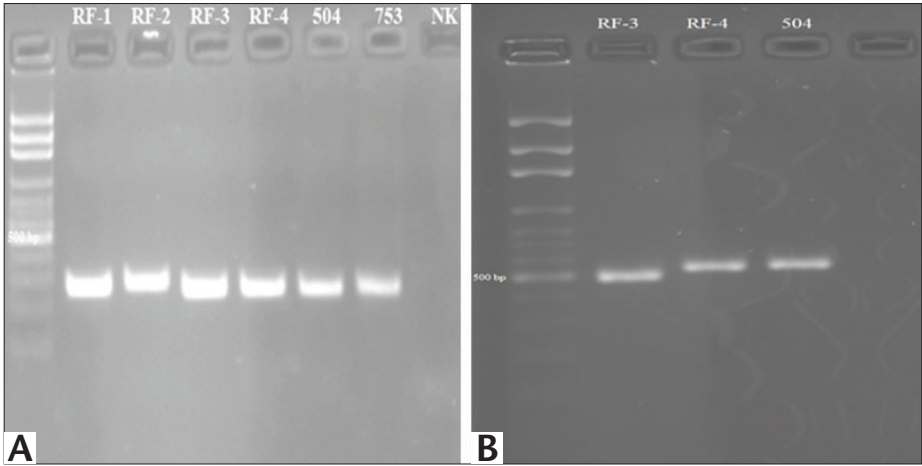
Çalışmada, moleküler olarak karakterize edilen iki *Leishmania* izolatından birinin *L.donovani* (insan suşu, no: 504), diğerinin ise *L.tropica* (köpek suşu, no: 753) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). *Leishmania* izolatlarının NJ analizleri Şekil 2'de gösterilmiştir. ITS-1 ve *cpb* E/F gen bölgelerinin PCR jel görüntüleri Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 1. Kuzey Kıbrıs *Leishmania* izolatlarının sekans analizleri.



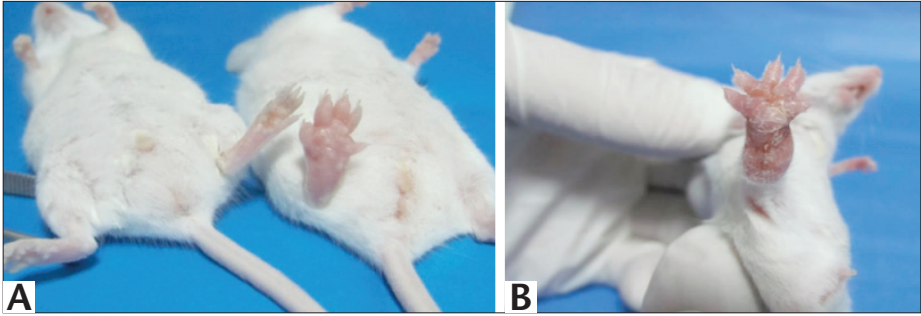
Şekil 2. Leishmania izolatlarının NJ ağacı analizleri.



Şekil 3. Leishmania izolatlarının ITS-1 (A) ve cpb E/F (B) bölgelerine ait jel görüntüsü.

KL grubundaki tüm farelerin taban genişliğinin arttığı ve KL lezyonlarının geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4). Bu bağlamda, 753, MLt, 504 ve MLd gruplarında bulunan farelerin ortalama sağ ayak tabanı ölçümleri kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve ayrı ayrı her birindeki ortalamaların kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir (sırasıyla  $p= 0.008$ ,  $p= 0.008$ ,  $p= 0.033$ ,  $p= 0.031$ ). Ayrıca, elde edilen ölçümler hem 753-MLt hem de 504-MLd arasında karşılaştırılmış ve anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (sırasıyla  $p= 0.175$ ,  $p= 0.638$ ). KL ve kontrol grubundaki farelerin altı haftalık ortalama ayak ölçümleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Otuzuncu gün sonunda yapılan otopsi sonucunda elde edilen dalak ve karaciğer uzunluk, genişlik ve ağırlık ölçümleri Tablo II'de verilmiştir. Buna göre, VL hayvan modeli



Şekil 4. (A). 753 (sağ) ve kontrol (sol) grubu farelerin sağ ayak tabanları; (B). 753 grubundaki bir farenin sağ ayak tabanındaki KL lezyonu.

**Tablo I.** KL ve Kontrol Grubu Farelerin Altı Hafta Boyunca Her Hafta Ölçülen Sağ Ayak Tabanı Ölçümleri (mm)

Grup	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta
753	1.32	1.40	1.55	1.68	1.87	2.22
MLt	1.34	1.40	1.54	1.69	1.88	2.23
504	1.11	1.17	1.30	1.40	1.55	1.74
MLd	1.10	1.19	1.30	1.42	1.53	1.75
Kontrol	1.09	1.10	1.10	1.09	1.10	1.10

\*MLt: Manisa *L.tropica*, MLd: Manisa *L.donovani*.

**Tablo II.** VL Grubundaki Farelerin 30. Gündeki Dalak ve Karaciğer Uzunluk, Genişlik ve Ağırlık Ölçümleri

Grup	Uzunluk (mm)		Genişlik (mm)		Ağırlık (gr)	
	Dalak	Karaciğer	Dalak	Karaciğer	Dalak	Karaciğer
753	1.10	2.00	0.18	1.71	0.05	1.01
MLt	1.11	2.01	0.19	1.70	0.03	1.00
504	2.10	3.15	0.71	2.58	0.12	1.33
MLd	2.05	3.00	0.70	2.53	0.10	1.30
Kontrol	1.12	2.00	0.20	1.72	0.04	1.02

\*MLt: Manisa *L.tropica*, MLd: Manisa *L.donovani*.

amacıyla oluşturulan 504 ve MLd grubundaki farelerde VL klinik semptomlarının (kilo kaybı, tüylerde dikleşme, hareketlerde yavaşlama, iştah azalması vb.) geliştiği tespit edilmiştir. Bu grupların her ikisinin dalak ölçümlerinin kontrol grubunda bulunan farelerdeki-lerden anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmış ( $p \leq 0.0001$ ), kendi aralarındaki ölçüm değerlerinin ortalamaları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p = 0.423$ ). Aynı şekilde, 504 ve MLd grubunda bulunan farelerin karaciğer ölçümlerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir ( $p \leq 0.0001$ ). 504 ve MLd grubundaki farelerin karaciğer ölçümleri kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman 504'teki ölçümlerin MLd'deki ölçümlerden yüksek olduğu görülmüştür ( $p \leq 0.0001$ ). *L.tropica* suşları ile enfekte farelerin

bulunduğu 753 ve MLt gruplarında VL semptomlarının gelişmediği ve her iki grubun dalak ve karaciğer ölçüleriyle kontrol grubundaki farelerin ölçümleri arasında anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (karaciğer, sırasıyla  $p= 0.153$ ,  $p= 0.573$ ; dalak, sırasıyla  $p= 0.122$ ,  $p= 0.144$ ). Her iki grubun da kendi içinde dalak ve karaciğer ölçümlerinin benzer olduğu ve aralarında istatistiksel bir farkın olmadığı görülmüştür (sırasıyla,  $p= 0.998$ ,  $p= 0.175$ ).

## TARTIŞMA

Kıbrıs'ta 1935 yılından itibaren yapılan çalışmalarda insan VL olguları saptanmıştır ve 1985-1987 yılları arasında iki olgu bildirilmiştir<sup>29</sup>. Ancak adada hem VL hem de KL enfeksiyonlarının yaygınlığı, yayılımı ve halk sağlığı açısından önemi konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Kuzey Kıbrıs'ta, 2016 yılında, üç pediatrik (16, 24 ve 34 aylık) VL olgusu bildirilmiştir. Her üç olgunun da *L.infantum* kaynaklı olduğu tespit edilmiştir<sup>30</sup>. Ruh ve arkadaşlarının<sup>14</sup> 2017 yılında Kuzey Kıbrıs'ın Girne şehrinde yaptıkları bir çalışmada 249 sağlıklı gönüllü incelenmiş ve bunların üçünde (%1.2) *Leishmania* antikorlarının pozitif olduğu saptanmıştır. Güney Kıbrıs'tan da insan layşmanyazis olguları bildirilmiştir. Güney Kıbrıs'ın Baf şehrinde dört kişilik bir ailede *L.donovani*'nin neden olduğu KL olguları rapor edilmiştir<sup>31</sup>. Son olarak, Özdoğaç ve arkadaşları<sup>8</sup>, Kuzey Kıbrıs genelinde 300 sağlıklı gönüllüyü incelemiş ve *L.infantum* IgG için %4.7 oranında (14/300) seropozitiflik tespit etmişlerdir. Aynı araştırmaya göre, layşmanyazis olasılığı özellikle doğada çalışan bireyler arasında daha yüksek bulunmuştur. Hatta, avcı ve çiftçi/hayvancı gruplarının diğer gruplara göre daha yüksek seropozitiflik oranlarına sahip olduğu da vurgulanmıştır.

Literatüre göre, Güney Kıbrıs'ın farklı bölgelerindeki KanL seroprevalansı %1.7 ile %26.2 arasında değişmekte olup, *L.infantum*'un etken olduğu bildirilmiştir<sup>32</sup>. Çanakçı ve arkadaşları tarafından Kuzey Kıbrıs'ta yapılan bir çalışmada<sup>33</sup>, rastgele seçilen 281 köpeğin serum örnekleri indirekt floresan antikor testiyle değerlendirilmiş ve köpeklerin %3.55 (10/281)'i seropozitif bulunmuştur. Mazeris ve arkadaşlarına göre<sup>34</sup>, adanın kuzey kesiminde *L.infantum*'un neden olduğu insan layşmanyazis olgularının gözlemlenmesi vektör dağılımı ile açıklanmakta ve *L.infantum*'a vektörlük yapan *Phlebotomus neglectus* sinekleri sadece bu bölgede bulunmaktadır. Çeşitli teorilere göre, *Phlebotomus neglectus*'un sadece bu bölgede yayılmasının başlıca nedenleri yeterli uçuş kabiliyetinin olmaması ve coğrafi engellerin neden olduğu izolasyondur.

Kuzey Kıbrıs Bölgesinde *Phlebotomus* spp. faunası ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça nadirdir. Demir ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışma<sup>35</sup>, Kuzey Kıbrıs'taki *Leishmania* parazitlerinin vektörlerinden olan *Phlebotomus neglectus*, *Phlebotomus tobbi*, *Phlebotomus galilaeus* ve *Phlebotomus papatasi* türlerinin varlığını göstermiştir. *Phlebotomus* türleri, Yetişmiş ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma<sup>36</sup> için Kuzey Kıbrıs'tan toplanmış ve bu sineklerin %2.63 (1/38) oranında *Leishmania* parazitlerini taşıdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada, *Leishmania* parazitlerini bulaştıran türün *Phlebotomus papatasi*, parazitin ise *L.major* olduğu öne sürülmektedir.

Araştırmalar sonucunda elde edilen veriler, *L.donovani* ve *L.tropica* türlerinin kesinlikle Kuzey Kıbrıs'ta mevcut olduğunu göstermektedir. Her iki tür Kuzey Kıbrıs'tan ilk kez moleküler yöntemlerle izole edilerek sekanslanmıştır. Yapılan çalışmalara göre, bu parazitlerin vektörleri olarak kabul edilen diğer *Phlebotomus* türleri de Kıbrıs adasında bulunmaktadır. İlgili çekici bulgu ise, *L.tropica*'nın adada ilk kez tespit edilmiş olmasıdır ve bu durum, *L.infantum*'dan kaynaklanan daha önceki KanL olgularının aksine, *L.tropica*'nın da adadaki KanL enfeksiyonlarının kaynağı olabileceğini göstermektedir. Araştırmada tespit edilen insan suşu *L.donovani* idi ve bu bulgunun, Koliou ve arkadaşlarının<sup>31</sup> araştırmasıyla uyumlu olduğu görülmüştür. *Leishmania* türlerinin moleküler olarak tanımlanması, Özbilgin ve arkadaşlarının çalışmasında<sup>37</sup> belirtildiği gibi, mevcut epidemiyolojinin, hasta klinik semptomlarının ve uygun tedavinin daha iyi anlaşılması için bir veri tabanı oluşturulması açısından çok önemlidir.

Literatürde, aynı veya farklı *Leishmania* türleri arasında doğal hibritler tanımlanmıştır<sup>21</sup>. *Leishmania* parazitlerinde, türler arası ve tür içi hibritler kum sineği vektöründe deneysel olarak üretilmiş ve parazitin promastigot aşamasının hibritler oluşturabildiği ve genetik değişim gerçekleştirebildiği doğrulanmıştır<sup>38</sup>. Hibridizasyon, parazitin insanlar ve evcil hayvanlar da dahil olmak üzere yeni çevresel koşullara, vektörlere ve konakçılara uyum sağlamasına ve yeni genotip özelliklerine sahip canlı organizmalarda etkili bir şekilde yerleşmesine ve hayatta kalmasına olanak tanır<sup>21</sup>. Farelerle yapılan in vivo çalışmalarla *Leishmania* izolatlarının klinik karakterizasyonunun belirlenebilmesinin yanı sıra ilaç ve aşı araştırmalarına da katkı sağlanmaktadır. Özbilgin ve arkadaşları<sup>17</sup>, yaptıkları bir çalışmada VL göstermesi beklenen bir *Leishmania* izolatının KL klinik tablosu oluşturduğunu görmüşlerdir. Bu nedenle, izole edilen Kuzey Kıbrıs *Leishmania* izolatlarının farelerdeki klinik yansımalarının takip edilmesi ve aynı zamanda Manisa'dan izole edilen izolatlar ile bu klinik yansımaların karşılaştırılması, bu çalışmanın hedeflerinden biridir. Elde edilen sonuçlar, Kuzey Kıbrıs ve Manisa izolatlarının hem KL hem de VL hayvan modellerinde benzer klinik tablo oluşturdukları yönündedir. KL çalışma gruplarında yer alan farelerin tümünün sağ ayak tabanında KL semptomlarının geliştiği ve kontrol grubuna göre sağ ayak taban ölçüm değerlerinde anlamlı düzeyde artış olduğu izlenmiştir. Buna rağmen, hem 753-MLt hem de 504-MLd gruplarındaki farelerin ortalama değerleri arasında herhangi bir farkın olmadığı yani benzer klinik tablo oluşturdukları anlaşılmaktadır. VL çalışma gruplarından *L.tropica* suşlarıyla enfekte olan farelerde (753 ve MLt) VL semptomları gözlenmezken, *L.donovani* ile enfekte gruplardaki (504 ve MLd) farelerde tipik semptomların ortaya çıktığı tespit edilmiştir. 504 ve MLd gruplarının her ikisinin de dalak ve karaciğer ölçümlerinin VL kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür.

Kıbrıs adasının layşmanyazis için endemik bir bölge olduğu ve adadaki insan VL/KL ve KanL olgularına ek olarak vektör sineklerin varlığı göz önüne alındığında, kapsamlı moleküler epidemiyolojik araştırmaların yapılması gerektiği açıktır. Böylece hem *Phlebotomus* sineklerinin hem de *Leishmania* parazitlerinin tüm ada genelindeki dinamikleri daha iyi anlaşılacaktır.

## ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu (Tarih: 30.06.2022 ve Karar no: YDÜ/2022/104-1568) ve MCBÜ Tıp Fakültesi Dekanlığı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından (Tarih: 05.09.2023 ve Karar No: E-77637435-050.04.04-634996) onaylanmıştır.

## TEŞEKKÜR

*Leishmania* suşlarının temin edilmesi ve hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesindeki yardımlarından dolayı MCBÜ, Parazit Bankası ve MCBÜ, Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Laboratuvarına teşekkürlerimizi sunarız.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

## KAYNAKLAR

1. Köse H, Temoçin F. Evaluation of Adult Cases of Visceral Leishmaniasis Reported in Turkey by Pool Analysis Method. *Klinik Derg* 2020; 33(2): 157-62. <https://doi.org/10.5152/kd.2020.33>
2. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis#:~:text=Leishmaniasis%20is%20caused%20by%20a,in%20over%2095%25%20of%20cases> (Erişim tarihi: 24.04.2024).
3. Ruh E, Taylan Özkan A. Leishmaniasis in Northern Cyprus. *Eur J Ther* 2019; 25(1): 1-5. <https://doi.org/10.5152/EurJTher.2019.18077>
4. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2017; 10: 82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
5. Güler E, Özbilgin A, Çavuş İ, Baddal B, Etikan İ, Başer KHC, Şanlıdağ T. In vitro anti-leishmanial activity of essential oils extracted from plants growing in Northern Cyprus Against *Leishmania tropica*. *Türkiye Parazitoloj Derg* 2021; 45(2): 101-7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.6888>
6. Madusanka RK, Silva H. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis and insights into species-specific responses: A narrative review. *Infect Dis Ther* 2022; 11: 695-711. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00602-2>
7. Kamb M, Roy S, Cantey P. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Travelers' health, leishmaniasis, cutaneous, CDC Yellow Book 2024, Travel-Associated Infections & Diseases. Erişim adresi: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/leishmaniasis-cutaneous> (Erişim tarihi: 24.10.2024).
8. Özdoğaç M, Güler E, Güvenir M, Hürdoğanoglu U, Kiraz A, Süer K. Investigation of *Leishmania infantum* seroprevalance and leishmaniasis knowledge level in Northern Cyprus. *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(3): 377-86. <https://doi.org/10.5578/mb.20229742>
9. Scarpini S, Dondi A, Totaro C, Biagi C, Melchionda F, Zama D, et al. Visceral leishmaniasis: Epidemiology, diagnosis, and treatment regimens in different geographical areas with a focus on pediatrics. *Microorganisms* 2022; 10: 1887. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101887>
10. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Gündüz C. Do The rodents have a role in transmission of cutaneous leishmaniasis in Turkey?. *Mikrobiyol Bul* 2018; 52(3): 259-72. <https://doi.org/10.5578/mb.66828>
11. Ghosh P, Roy P, Chaudhuri SJ, Das NK. Epidemiology of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J Dermatol* 2021; 66(1): 12-23. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_651\\_20](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_651_20)
12. Arya R, Dhembala C, Makde RD, Sundd M, Kundu S. An overview of the fatty acid biosynthesis in the protozoan parasite *Leishmania* and its relevance as a drug target against leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2021; 246: 111416. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2021.111416>

13. da Silva SSS, de Andrade AF, de Paiva-Cavalcanti M, de Carvalho JCM, de Araújo Viana-Marques D, Porto ALF, et al. Potential of bioactive molecules from photosynthetic microorganisms on *Leishmania* spp.: A review. *Algal Research* 2023; 103241. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103241>
14. Ruh E, Bostanci A, Kunter V, Tosun O, Imir T, Schallig H, et al. Leishmaniasis in Northern Cyprus: Human cases and their association with risk factors. *J Vector Borne Dis* 2017; 54: 358-65. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.225842>
15. Constantinou K. Anopheles (malaria) eradication in Cyprus. *Parassitologia* 1998; 40: 131-5.
16. Leger N, Depaquit J, Ferté H, Rioux JA, Gantier JC, Gramiccia M, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera Psychodidae) of Cyprus. II - Isolation and typing of *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908 (zymodème MON 1) from *Phlebotomus (Larrousius) tobbi* Adler and Theodor, 1930. *Parasite* 2000; 7: 143-6. <https://doi.org/10.1051/parasite/2000072143>
17. Özbilgin A, Çulha G, Güray MZ, Zeyrek FY, Akyar I, Töz S, et al. Diversity of leishmania strains isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Turkey and its reflection to clinics in mice model. *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(3): 429-43. <https://doi.org/10.5578/mb.69391>
18. Ertabaklar H, Özlem Çalışkan S, Boduç E, Ertuğ S. Comparison of direct microscopy, culture and polymerase chain reaction methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Mikrobiyol Bul* 2015; 49(1): 77-84. <https://doi.org/10.5578/mb.8344>
19. Gülen H, Türedi Yıldırım A, Çavuş İ, Türkmen H, Özgüven E, Özbilgin A. The wolf in sheep's clothing *Leishmania tropica*: Two pediatric visceral cases. *Mikrobiyol Bul* 2024; 58(3): 334-43. <https://doi.org/10.5578/mb.202497101>
20. Hijjawi N, Kanani KA, Rasheed M, Atoum M, Abdel-Dayem M, Irhimeh MR. Molecular diagnosis and identification of *Leishmania* species in Jordan from saved dry samples. *Biomed Res Int* 2016; 6871739. <https://doi.org/10.1155/2016/6871739>
21. Özbilgin A, Arserim SK, Tünger Ö, Çavuş İ, Yıldırım A, Tunalı V, et al. First presentation of the complete infection cycle of visceralizing *Leishmania infantum/donovani* hybrid strain in Turkey: The host, reservoir and vector. *Infect Dis Clin Microbiol* 2020; 2(1): 8-15. <https://doi.org/10.36519/idcm.2019.0032>
22. Bakırcı S, Bilgiç HB, Köse O, Aksulu A, Hacılarlıoğlu S, Karagenç T, et al. Gerbils, as experimental animals (meriones unguiculatus): Is a good role model for *Leishmania major*? *Türkiye Parazit Derg* 2015; 39: 212-7. <https://doi.org/10.5152/tpd.2015.4300>
23. Akkucuk S, Aycan Kaya O, Yaman M. What is the best animal model for Leishmaniasis studies? *JVR* 2018; 2(2): 28-31.
24. Muñoz-Durango N, Gómez A, García-Valencia N, Roldán M, Ochoa M, Bautista-Erazo DE, et al. A Mouse Model of Ulcerative Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) panamensis* to Investigate Infection, Pathogenesis, Immunity, and Therapeutics. *Front Microbiol* 2022; 13: 907631. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.907631>
25. Özbilgin A, Bağca BG, Harman M, Çavuş İ, Kaya T, Yıldırım A, et al. Designing of the primers and probes for real time polymerase chain reaction of cytochrome B gene region in leishmaniasis: A pilot study. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2020; 50(2): 86-94. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2020.087>
26. Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Tetik Vardarlı A, et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. *PloS Negl Trop Dis* 2013; 7(5): e2205. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002205>
27. Kurt Ö, Özen, NM, Aydın EM, Kaya DE, Kayhan CK, Öktem Okullu S, et al. Characterisation of the *Leishmania donovani/L. infantum* Hybrid Isolated from an Autochthonous Kala-Azar Patient: Preliminary Results of an In Vivo Model. *Türkiye Parazit Derg* 2021; 45(2): 95-100. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2021.14622>
28. Nieto A, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. *Vet Res* 2011; 42: 39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-39>
29. Minter DM, Eitrem UR. Sandflies and disease in Cyprus; 1944-1985. In: Hart, DT. (Ed.), *Leishmaniasis, The current status and new strategies for control*, 1989; vol. 3. NATO ASI Series, Life Sciences, Plenum Press, New York, 207-16.

30. Sayılı A, Taylan Ozkan A, Schallig HDFH. Case Report: Pediatric Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in Northern Cyprus. Am J Trop Med Hyg 2016; 95(6): 1386-88. <https://doi.org/1386-8.10.4269/ajtmh.16-0511>
31. Koliou MG, Antoniou Y, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Soteriades ES. A cluster of four cases of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania donovani* in Cyprus: A case series. J Med Case Rep 2014; 8: 354. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-8-354>
32. Deplazes P, Grimm F, Papaprodromou M, Cavaliero T, Gramiccia M, Christofi G, et al. Canine leishmaniasis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. Acta Trop 1998; 15: 169-78. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(98\)00064-3](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(98)00064-3)
33. Çanakçı T, Kurtdede A, Paşa S, Töz Özensoy S, Özbel Y. Seroprevalence of canine leishmaniasis in Northern Cyprus. Türkiye Parazitol Derg 2016; 40: 117-20. <https://doi.org/10.5152/tpd.2016.4807>
34. Mazeris A, Soteriadou K, Dedet JP, Haralambous C, Tsatsaris A, Moschandreas J, et al. Leishmaniasis and the Cyprus paradox. Am J Trop Med Hyg 2010; 82: 441-8. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0282>
35. Demir S, Gocmen B, Ozbel Y. Faunistic study of sand flies in Northern Cyprus. North-Western J Zoology 2010; 6(2): 149-61.
36. Yetişmiş K, Mert U, Caner A, Nalçacı M, Töz S, Özbel Y. Blood meal analysis and molecular detection of *Leishmania* DNA in wild-caught sand flies in Leishmaniasis endemic areas of Turkey and Northern Cyprus. Acta Parasitologica 2022; 67: 932-42. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00542-4>
37. Özbilgin A, Töz S, Harman M, Günaştı Topal S, Uzun S, Okudan F, et al. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. Acta Tropica 2019; 190: 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.11.001>
38. Lypaczewski P, Matlashewski G. *Leishmania donovani* hybridisation and introgression in nature: A comparative genomic investigation. Lancet Microbe 2021; 2: e250-8. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00028-8)



Bu eser CC BY-NC Atıf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine [www.mikrobiyolbul.org](http://www.mikrobiyolbul.org) web sayfasından ulaşılabilir.