

Çukurova ve Şanlıurfa bölgelerinde deri lezyonlarından izole edilen *leishmania sp.* DNA'larının restriksiyon endonükleazlarla karşılaştırılması

Fuat DİLMEÇ¹, Ali MATUR², Soner UZUN³, Mehmet KARAKAŞ³, Hamdi R. MEMİŞOĞLU³

¹Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, ŞANLIURFA

²Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, ADANA

³Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dermatoloji AD, ADANA

ÖZET

Amaç: Leishmaniasis, dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir. *Leishmania* türlerinin tiplendirilmesinde, günümüzde klasik mikroskopik teknikler yanında DNA'ya dayalı teknikler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, Çukurova ve Şanlıurfa bölgeleri deri lezyonlarından izole edilen *Leishmania* suşları arasında genotipik farklılıkların olup olmadığını saptamak amaçlanmıştır.

Gereç-Yöntem: Hastaların deri lezyonu kenarlarından iğne aspirasyonu ile alınan örnekler NNN besiyerine ekilerek promastigotlar elde edilmiştir. Büyük hacimde promastigot kültürü yapıldıktan sonra promastigotlardan DNA izole edilmiş ve DNA; *Eco* RI, *Hind* III, *Hae* III, *Hinf* I, *Alu* I ve *Rsa* I restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş ve agaroz jelinde elde edilen DNA profilleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular: 18'i Çukurova, 7'si Şanlıurfa bölgelerinden elde edilen suşlardan ve 14 referans suştan izole edilen toplam 39 DNA örneği RFLP (Restriction fragment length polymorphisms) analizi ile karşılaştırılmış ve Çukurova bölgesinden izole edilen deri *Leishmania* örneklerinin, Şanlıurfa bölgesi *Leishmania* örneklerinden daha heterojen oldukları belirlenmiştir.

Sonuç: Her iki bölgeden izole edilen cutaneous leishmaniasis etkenleri arasında genotipik farklılıklar tespit edilmiştir. Tiplendirme için, PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniğinin uygulanması şarttır.

Anahtar kelimeler: Jel elektroforezi, Restriksiyon endonükleaz, RFLP analizi, DNA, total DNA İzolasyonu

Comparision of *leishmania sp.* DNA's isolated in the regions of Çukurova and Şanlıurfa with the restriction endonucleases

ABSTRACT

Objective: Leishmaniasis is widely seen in tropical and subtropical regions of the world. Today, DNA-based techniques are used in the identification of *Leishmania sp.* beside microscopic techniques. In this study, it has been aimed whether there are genotypic differences among *Leishmania strains* isolated from cutaneous lesions in Çukurova and Şanlıurfa regions.

Materials-Methods: The samples taken by needle aspiration from the edges of skin lesion have been inoculated to change to promastigotes in NNN medium. After the promastigote culture was achieved for the large volume, DNAs from promastigotes have been isolated and they have been cut with the restriction endonucleases, such as *Eco* RI, *Hind* III, *Hae* III, *Hinf* I, *Alu* I, and *Rsa* I, and their profiles obtained on agarose gel have been compared.

Results: The samples of 39 DNA isolated from 18 of Çukurova, 7 of Şanlıurfa regions, and 14 of reference strain have been compared with RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis and the cutaneous *Leishmania* samples isolated from Çukurova have been designated more heterogenicity than *Leishmania* samples taken from Şanlıurfa region.

Conclusions: The genotypic differences have been determined among the cutaneous Leishmaniasis agents isolated from either regions. PCR (Polymerase Chain Reaction) technique should be applied for the identification.

Keywords: Gel electrophoresis, Restriction endonucleases, RFLP analyses, DNA, Total DNA isolation

GİRİŞ

Dünya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde; kutanöz (şark çıbanı), mukokutanöz ve visseral leishmaniasis yaygın olarak görülmektedir. Kutanöz leishmaniasis; Çukurova'da endemik ve

Güney Doğu Anadolu bölgesinde epidemik bir seyir göstermektedir (1, 2).

Leishmaniasisin kontrol altına alınmasında, etkenlerin tanımlanması hastalığın epidemiyolojisinin anlaşılması açısından çok önemlidir. Visseral leishmaniasis saptanan insan ve rezervuar

olan köpeklerden izole edilen etkenlerin, DNA kaynaklı moleküler yöntemlerle *L.tropica* oldukları anlaşılmış ve Leishmania'nın bu visserotropizmi konunun önemini arttırmıştır (3, 4). Günümüzde identifikasyon amaçlı; kültürel, serodem, zimodem ve şizodem gibi moleküler tekniklere başvurulmaktadır. Serodemde çapraz reaksiyonların olması, zimodemde ise çok sayıda enzim gerekmesi, DNA'ya dayalı tekniklerin yaygın kullanılmasına neden olmuştur. Moleküler tekniklerden olan RFLP analizi için DNA problemlerinin hibridizasyon derecesi ve restriksiyon enzim polimorfizmi dikkate alınmıştır (2, 5, 6). Çin ve Peru'da *Leishmania* nDNA'ları (nükleer DNA) restriksiyon fragmanları, gp63 ve β -tubulin problemleri ile taranmış ve etkenlerin β -tubulin yönünden homojen, gp63 açısından da heterojen oldukları gösterilmiştir. Eski Dünya leishmaniasis etkenlerine ait total DNA'ların *Pst* I fragmanları, *L.major* nDNA'sından hazırlanan rekombinant pDK10 probu ve *L.infantum* cDNA'sından (complementary DNA) hazırlanan 7-059 probu ile taranmış ve zimodem analizi ile görülemeyen farklılıklar saptanmıştır. Ayrıca bu teknikle alınan sonuçlar şark çibani sebebi olan türler arasında *L. infantum*'un da katılmasına neden olmuştur. kDNA problemleri tür identifikasyonunda kullanılırken, nDNA problemleri tür identifikasyonu ile birlikte tür içi farklılıkları da gösterebildiğinden kDNA çalışmalarına göre daha hassas bulunmuştur (2, 7-10). Bazı leishmaniasis etkenlerinde kültürün zor, bazen de mümkün olamaması ve bu nedenle kDNA izolasyonunun zor olması şizodem analizini de zorlaştırmıştır (2, 11-14).

Daha önce tarafımızdan kala-azar etkenlerinin total DNA'ları üzerinde yapılan Restriksiyon profili çalışmalarına göre, etkenler arasında heterojenite belirlenmiştir (15). *L.infantum* genomik DNA'sı, *L.major* α - ve β -tubulin problemleri ile taranmış ve kala-azar etkenleri arasında

heterojenite olduğu gösterilebilmiştir (16-19).

Son zamanlarda zimodem analizi ile *L.major*, *L.turanica* ve *L.gerbilli* suşları arası gösterilemeyen polimorfizm, kültür yapılmaksızın PCR, PCR-RFLP, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) gibi moleküler teknikler kullanılarak yapılmaktadır (20-24).

Bu çalışmada; Çukurova ve Şanlıurfa yöresinden toplanan 25 deri lezyon etkeni *Leishmania* suşu ve 14 referans suşun total DNA'ları 6 farklı restriksiyon enzimi tarafından kesilmiş ve restriksiyon profilleri jel üzerinde karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deri lezyonlarının kenarlarından aseptik koşullarda izotonik solusyon yardımıyla alınan iğne aspiratı, bifazik besiyerine (NNN) ekilerek örnekte bulunan amastigotların promastigot formuna dönüşümü sağlandı. Daha sonra promastigotlar, büyük hacimde kültür için sıvı RPMI-1640 (Sigma) besiyerine alındı ve geç log fazına kadar üretildi. Promastigotlar, izotonik solusyonda yıkandıktan sonra, daha önce tanımlandığı gibi (25), hücre lizis tamponu (150 mM NaCl, 100 mM EDTA ve 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), %0.5 SDS ve 400 μ g/ml pronaz (Sigma) ile 60 °C'de 3 saat içinde parçalandı. Parçalanmış hücrelerdeki proteinler, Miller'in (26) tuzla-çöktürme yöntemi (1.2 M NaCl) ile uzaklaştırıldı. Total DNA içeren üst faz, 2.5 M NH₄OAc (Ammonyum asetat) ve iki hacim saf etanol ile toplandı. %70 etanol ile yıkamanın ardından total DNA, steril deiyonize su içinde çözülerek spektrofotometre aracılığıyla saflığı belirlendi ve konsantrasyonu ayarlandı. Restriksiyon kesimine kadar -20 °C'de saklandı.

Laboratuvar koşullarına göre, optimizasyon çalışmaları yapılarak reaksiyon hacmi, kesilecek DNA ve kesim için enzim miktarları, enzim aktivitesi ve kesim süresi gibi faktörler belirlendi. Buna

göre; 30 µl reaksiyon hacminde, 2µg total DNA, 6 U restriksiyon enzimi ve restriksiyon tamponu karıştırılarak 37 °C'de 4 saat süreyle kesim yapıldı. λ DNA (Biores) ilgili restriksiyonlarla kesilerek marker olarak hazırlandı. Kutanöz leishmaniasisli hastalardan elde edilen suşlar ve referans suşların (Tablo 1) total DNA'ları *Eco* RI, *Hind* III, *Hae* III, *Hinf* I, *Alu* I ve *Rsa* I (Sigma) enzimleriyle ayrı ayrı kesildi. Kesim reaksiyonları, 10 mM'lık EDTA (pH 8.0) ile durduruldu. Kesilmiş DNA'lar ile birer kesilmemiş total DNA izleme boyası varlığında 0.5xTBE (45 mM Tris.Cl, 45 mM Borik asit, 1 mM EDTA) ile hazırlanan ve 0.5 µg/ml EtBr (Etidyum Bromid) içeren %0.7 agaroz jeline (20x15x0.4 cm, Hoeffler) uygulandı. Elektroferez, 120V sabit potansiyelde 2 saat süre ile yapıldı ve hemen ardından transilminatör ile görüntüledikten sonra Tip 667 polaroid filme fotoğrafları alındı. Jel üzerindeki tüm DNA profilleri birbirleriyle karşılaştırıldı.

BULGULAR

Çukurova (18) ve Şanlıurfa (7) kutanöz leishmaniasis etkenleri ile referans suşların (14) total DNA'ları 6 değişik restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra elektroferez yardımıyla agaroz jeli üzerindeki profilleri birbirleriyle karşılaştırıldı (Şekil 1).

Buna göre; *Eco* RI (Şekil 1/A₁), *Hind* III (Şekil 1/B₁) ve *Hae* III (Şekil 1/C₁) DNA fragmanları incelendiğinde, Çukurova (1-18. kuyular) ve Şanlıurfa (19-25. kuyular) kutanöz leishmaniasis etkenlerinin genotipik olarak heterojen oldukları belirlendi. Aynı zamanda her iki bölge kutanöz leishmaniasis etkenleri ile referans suşlar arasında da heterojenite gözlemlendi. *Alu* I (Şekil 1/E₁) profiline göre Çukurova'dan izole edilen kutanöz leishmaniasis etkenlerinin kendi içinde heterojen oldukları, Şanlıurfa'dan izole edilen kutanöz leishmaniasis etkenlerinin ise kendi içinde homojen oldukları, ancak bunların Çukurova'dan izole edilen etkenlerden farklı oldukları görülmektedir.

25. kuyudaki Şanlıurfa örneğinin Çukurova örneklerine benzerliği saptandı. Aynı şekilde *Rsa* I profiline (Şekil 1/F₁) bakıldığında, Çukurova bölgesi kutanöz leishmaniasis etkenlerinin heterojen oldukları, Şanlıurfa bölgesi kutanöz leishmaniasis etkenlerinin, 22 no'lu örnek dışında homojen oldukları belirlendi.

TARTIŞMA

Leishmaniasis etkenlerinin tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olduğu ve insanlarda kutanöz (şark çıbanı), mukokutanöz ve visseral leishmaniasis yaptıkları bilinmektedir. Ülkemizde ise Çukurova yöresinde endemik ve Şanlıurfa yöresinde de epidemik kutanöz leishmaniasis odakları bulunmaktadır (1). Leishmaniasis, büyük bir insan popülasyonunu risk altında tuttuğuna göre epidemiyolojisinin anlaşılması gereği ortaya çıkmaktadır. Hastalarda leishmaniasis etkenlerinin tiplendirilmesi yanında, rezervuar ve vektörden izole edilen etkenlerin de tiplendirilmesi hastalığın epidemiyolojisi için büyük önem taşır. Mikroskopla morfolojiye bakarak tiplendirme yapmak; amastigot ve promastigot hücre şekillerinin çok benzer olması nedeniyle mümkün olamamaktadır (2, 23, 24).

Çalışmada; izole ettiğimiz *Leishmania* suşları ve referans suşların total DNA'larının, 6 değişik restriksiyon endonükleazla kesilmesi sonucu agaroz jeli üzerinde elde edilen DNA profilleri karşılaştırıldı (Şekil 1). Yapılan çalışmalarla bu tekniğin, çapraz reaksiyonlar veren serodem, çok sayıda enzimle taramayı gerektiren zimodem ve tür düzeyinde karakterizasyon yapan şizodem analizine göre üstünlüğü belirlenmiştir (2, 5, 6). Aynı şekilde total DNA üzerinde yapılan RFLP analizi, tiplendirmenin yanında türler arası akrabalık ilişkilerini de ortaya koyduğu belirlenmiştir (2, 8, 10).

Daha önce tarafımızdan her iki bölge leishmaniasis etkenlerinin mevcut laboratuvar koşullarımızda izolasyon ve

Tablo 1: Çalışmada kullanılan Referans Suşlar

Kuyu no'su	Referans adı	Referans kodu
1	<i>L.infantum</i>	MHOM/DZ/82/LEM-417
2	<i>L.major</i>	MHOM/SU/73/5-ASKH
3	<i>L.donovani</i>	MHOM/IN/80/DD-8
4	<i>L.tropica</i>	MHOM/SU/74/K-27
5	<i>L.infantum</i>	MHOM/FR/78/LEM-75
6	<i>L.infantum</i>	MHOM/ES/90/LEM-2205
7	<i>L.turanica</i>	MRHO/SU/83/KD-51
8	<i>L.turanica</i>	PHCAY/SU/95/PH-40
9	<i>L.turanica</i>	MRHO/SU/80/Clone-3720
10	<i>L.gerberilli</i>	MRHO/CH/60/gerbilli
11	<i>L.turanica</i>	MRHO/SU/86/TSH-III
12	<i>L.arabica</i>	MPSM/SA/84/JISH-220
13	<i>L.major+L.turanica(=mixture)</i>	MRHO/SU/95/9537
14	<i>L.major</i>	MRHO/SU/59/Nealp

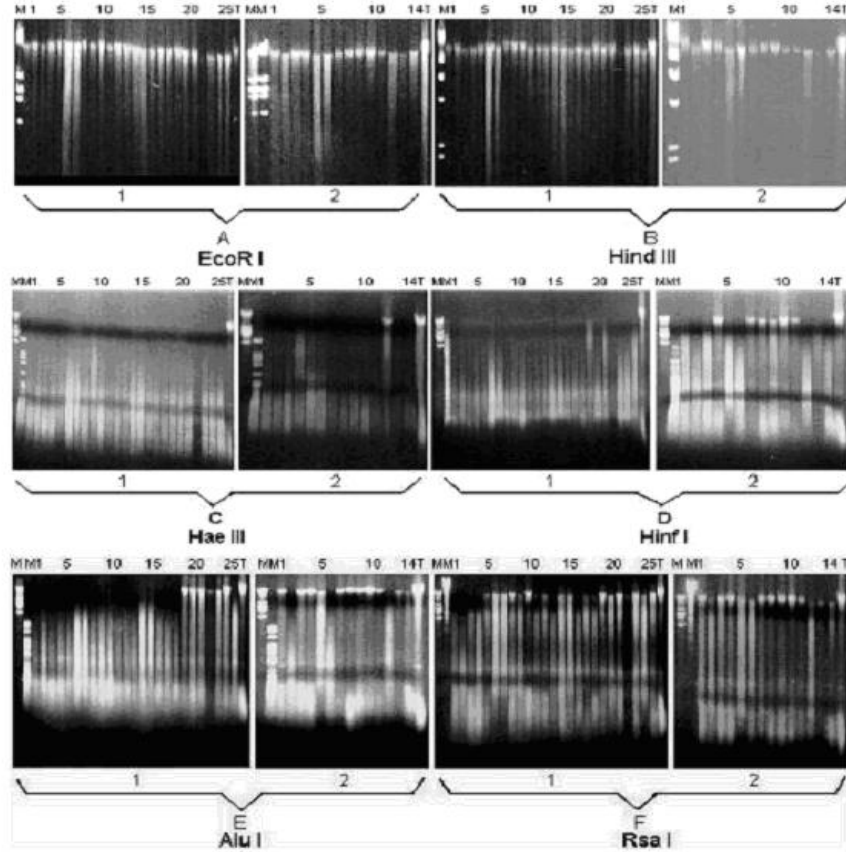
kültürleri sırasında, Şanlıurfa kutanöz leishmaniasis etkenlerinin besiyeri seçiminde hassas olmadıkları, kolaylıkla üreyebildikleri, ancak Çukurova kutanöz leishmaniasis etkenlerinin besiyeri seçiciliğinin fazla olduğu ve bu yüzden izolasyonlarının çok zor olduğu gözlemlenmiştir. Buradan Çukurova kutanöz leishmaniasis etkenlerinin fenotipik olarak heterojen olduğu anlaşılmıştır (14). Aynı şekilde Çukurova bölgesi visseral leishmaniasis etkenlerinin total DNA restriksiyon profilleri üzerinde tarafımızdan yapılan çalışmaya göre etkenler arası heterojenite olduğu da belirlenmiştir (15).

Jel üzerinde (Şekil 1) elde edilen kutanöz leishmaniasis etkenlerinin (Çukurova 1-18, Şanlıurfa 19-25. kuyular) total DNA *Eco* RI (Şekil 1/A₁), *Hind* III (Şekil 1/B₁) ve *Hae* III (Şekil 1/C₁) profilleri incelendiğinde her iki bölge etkenlerinin genotipik olarak heterojen oldukları ve kutanöz leishmaniasis etkenleri ile referans suşlar (Şekil 1/A, B, C) arasında da heterojenite görülmektedir.

Şekil 1'de Çukurova (1-18. kuyular) ve Şanlıurfa (19-25. kuyular) kutanöz leishmaniasis etkenlerinin total DNA-*Hinf* I profilleri (D₁), referans suşlardan (1-14. kuyular, D₂) *L.tropica* (K-27, 4. kuyu)'ya

benzememeleri önemlidir. Bu durum bölge coğrafyasının etkin olduğu bir varyasyonu düşündürebilmektedir. Örnekler kendi içlerinde değerlendirildiğinde de, heterojenitenin olduğu belirlenmiştir.

Çukurova (1-18. kuyular) ve Şanlıurfa (19-25. kuyular) kutanöz leishmaniasis etkenlerinin bölgesel olarak ayırımı *Alu* I (Şekil 1/E₁) restriksiyon endonükleaz profili ile tespit edilebilmiştir. Ancak bu enzim profiline göre Şanlıurfa kutanöz leishmaniasis etkenlerinin kendi aralarında homojen, Çukurova etkenlerinin ise kendi aralarında heterojen oldukları belirlenmiştir. Bu sonuç, daha önce tarafımızdan yapılan kültür çalışmalarında elde edilen fenotipik farklılığı, genotipik yönden desteklemektedir. Ayrıca her iki bölge etkenlerinin referans suşların genotiplerine tam olarak benzemediği de saptanmıştır. Şanlıurfa (19-24. kuyular, E₁) *Alu* I profilinde 25. kuyudaki etkenin Çukurova örneklerine benzerliği, bu örneğin Çukurova orijinli olduğunu düşündürmektedir. Aynı şekilde Şanlıurfa *Alu* I enzimi profili, *Hinf* I profilinin aksine bu örneklerin *L.tropica* (K-27, 4. kuyu) ile benzerliğini göstermektedir. Tıpa tıp bir benzerlik tüm enzim profillerinde görülememiştir.



Şekil 1: %0.7 agaroz jeli üzerinde deri Leishmaniaz etkenleri ve referans suşların total DNA restriksiyon profillerinin görünümü. **Eco RI/A₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Eco RI/A₂:** Referans suş total DNA kesim profilleri (1-14); **Hind III/B₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Hind III/B₂:** Referans suş total DNA kesim profilleri (1-14); **Hae III/C₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Hae III/C₂:** Referans suş total DNA kesim profilleri (1-14); **Hinf I/D₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Hinf I/D₂:** Referans total DNA kesim profilleri (1-14); **Alu I/E₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Alu I/E₂:** Referans suş total DNA kesim profili (1-14); **Rsa I/F₁:** Deri Leishmaniaz etkenleri total DNA kesim profilleri (1-25), **Rsa I/F₂:** Referans suş total DNA kesim profilleri (1-14). **M:** Marker (ilk kuyu λ DNA-Eco RI, ikinci kuyu λ DNA-İlgili enzim kesimi), **T:** *Leishmania* kesilmemiş total DNA.

Aynı şekilde *Rsa I* (Şekil 1/F₁) profillerine bakıldığında, Çukurova bölge etkenlerinin heterojen oldukları görülmektedir. Şanlıurfa örneklerinin (F₁) *Rsa I* profilleri yönünden, 22 no'lu örnek dışında kalan 6 örneğin (19-21. ve 23-25. kuyular) homojen oldukları belirlenmiştir

Sonuç olarak; Çukurova örnekleri genotiplerinin heterojen, Şanlıurfa örneklerinin çok daha homojen oldukları belirlendi. Ayrıca *L.tropica* (K-27) referans suşuna; Çukurova örneklerinin genotipik olarak Şanlıurfa örneklerinden daha uzak olduğu izlenimi alınmıştır. Daha önce yapılan çalışmalara göre şizodem analizi ile total DNA restriksiyon

profillerinin tür içi farklılıkları ortaya koyduğu saptanmıştır (9-10, 18). Bu yüzden çalışmamızda kullanılan tekniğin güvenilir olduğunu, ancak bölge etkenlerine hitap eden prob ya da problemlerin kullanımıyla hassasiyetin ve spesifitenin artırılabilceğini düşünüyoruz.

Çalışma sonuçları dikkate alınarak, özellikle Çukurova kutanöz leishmaniasis etkenlerinin identifikasyonu ve her iki bölgede visserotropik etkenlerin bulunabileceği ihtimaline karşı, kültür gerektirmeyen PCR'a dayalı identifiye edici moleküler tekniklerin kullanılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir).

Çalışmanın sınırlılığı: RFLP analizinin bir parçası olan problemlerin ve Southern blotlama ekipmanının laboratuvarımız şartlarında bulunmamasıdır.

TEŞEKKÜR

Deri aspiratlarını toplamamızda yardım eden ÇÜ Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Tropikal Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü Prof. Dr. Hamdi R. MEMİŞOĞLU'na, Laboratuvarı bize kullandıran TIBDAM yöneticilerine teşekkür ederiz. Ayrıca referans suşları sağlayan Dr J. ALVAR (İspanya) ve referans suş sağlama ile beraber izolasyon, kültür ve DNA çalışmalarında yardımcı olan Dr MV STRELKOVA'ya (Rusya) da sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Memişoğlu HR, Kotoğyan A, Acar MA ve ark: Leishmaniasis. Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH ve ark (eds): Dermatoloji, 2.baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1994, 221-231.
2. van Eys GJJM, Schoone GJ, Lighthart GS, et al: Identification of world leishmania by DNA recombinant probes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1989; 34: 53-62.
3. Kreutzer RD, Groggl M, Neva FA, et al: Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from operation desert storm. *Am J Trop Med Hyg*, 1993; 49(3): 357-363.
4. Guessous N, Berrag B, Riyad M, et al: Short report: *L.tropica* etiologic agent of a case of canine visceral leishmaniasis in Northern Morocco. *Am J Trop Med Hyg*, 1997; 57(2): 172-173.
5. Hashiguchi Y, Gomez EA, De Coronel VV, et al: Andean leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*-like parasites. *Am J Trop Med Hyg*, 1991; 44(2): 205-217.
6. Momen H, Grimaldi JrG, Pacheco RS, et al: Brazilian leishmania stocks phenotypically similar to *L.major*. *Am J Trop Med Hyg*, 1985; 34(6): 1076-1084.
7. Beverley SM, Ismach RB, McMahon-Pratt D: Evolution of genus leishmania as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Sci USA*, 1987; 84: 484-488.
8. Guizani I, van Eys GJJM, Ben Ismail R, et al: Use of recombinant DNA probes for species identification of world leishmania isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 50(5): 632-640.
9. Zvala-Castro J, Velasco-Castrejon O, and Hernandez R: Molecular characterization of mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. *Am J Trop Med Hyg*, 1992; 47(2): 201-209.
10. Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Zuluoaga Romero SZ, Perez-Becker R, Saavedra-Lira E, Perez-Montfort R, Crippa-Rossi M, Velasco-Castrejon O, and Becker I. *Leishmania mexicana mexicana*: Genetic Heterogeneity of Mexican Isolates Revealed by Restriction Length Polymorphism Analysis of Kinetoplast DNA. *Experimental Parasitology*, 2000; 95: 277-284.
11. Jackson PR, Wohlhieter JA, Jackson JE, et al: Restriction endonuclease analyses of leishmania kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg*, 1984; 33(5): 808-819.
12. Lu HG, Zhong L, Guan L, et al: Separation of Chinese leishmania isolates into five genotypes by kinetoplast and chromosomal DNA heterogeneity. *Am J Trop Med Hyg*, 1994; 50(6): 763-770.
13. Reiner NE, Lo R, Llanos-Cuentas A, et al: Genetic heterogeneity in Peruvian leishmania isolates. *Am. J Trop Med Hyg*, 1989; 41(4): 416-421.
14. Dilmeç F, Matur A, Uzun S, Karakaş M. *Leishmania promastigotlarının üretilmesinde kullanılan besiyerlerinin standardizasyonu ve üreme eğrisinin tespiti*. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1999; 24(4): 165-171.
15. Dilmeç F, Matur A, Alhan E ve ark: Çukurova bölgesi visseral Leishmaniya etkenlerinde total DNA restriksiyon endonükleaz profilleri. ÇÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 1999; 24 (4): 158-164.
16. Wincker P, Ravel C, Blaineau C, et al: The leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Research*, 1996; 24(9): 1688-1694.
17. Spithill TW, and Samaras N: Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1987; 24: 23-37.
18. Pacheco RS, Martinez JE, Valderrama L, et al: Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1995; 69: 197-209.
19. Strelkova MV, Pacheco RS, Bulat SA, et al: Comparison of some molecular-genetic techniques for identification of leishmania circulating in the central Asia region. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 1997; 92(1): 104-114.

20. Dobner P, Löscher T, Rinder H: Intra and interspecific polymorphisms of *Leishmania donovani* and *Leishmania tropica* minicircle DNA. *Parasitol Res*, 1994; 8: 474-477.
21. Özbek Y, Turgay N, Özensoy S ve ark: Klinik materyallerde leishmania parazitlerinin PCR (Polymerase Chain Reaction) ve Southern Blot hibridizasyon teknikleri yardımıyla saptanması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 1997; 21(4): 350-356.
22. Noyes HA, Belli AA, and Maingon R: Appraisal of various amplified polymorphic DNA, polymerase chain reaction for leishmania identification. *Am J Trop Med Hyg*, 1996; 55(1): 98-105.
23. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, and Felger I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of clinical microbiology*, 2003; 41(7): 3147-3153.
24. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynocha C, Schallig HDFH, Presbera W, Jaffeb CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003; 47: 349-358.
25. Gomez-Eichelmann MC, Holz JrG, Beach D, et al: Comparison of several lizard leishmania species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1988; 27: 143-158.
26. Miller SA, Dykes DD, and Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 1988; 16(3):1215.

Yazışma adresi: Yrd. Doç. Dr. Fuat DİLMEÇ
Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Dekanlık Binası)
63300 Yenişehir-ŞANLIURFA
fdilmec@harran.edu.tr