



T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
VİH - YL- 2011 - 0002

**LEISHMANIASISİN ENDEMİK OLDUĞU  
AYDIN/KUŞADASI'NDA ASEPTOMATİK KÖPEKLERDE  
*LEISHMANIA INFANTUM* ENFEKSİYONUNUN  
ARAŞTIRILMASI**

**Veteriner Hekim  
Mine KESKİN KÜRKLÜ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Serdar PAŞA**

**AYDIN – 2011**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
VIH-YL-2011-0002

LEISHMANIASISİN ENDEMİK OLDUĞU  
AYDIN/KUŞADASI'NDA ASEPTOMATİK KÖPEKLERDE  
*LEISHMANIA INFANTUM* ENFEKSİYONUNUN  
ARAŞTIRILMASI

Veteriner Hekim  
Mine KESKİN KÜRKLÜ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Serdar PAŞA

AYDIN-2011

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE  
AYDIN

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mine KESKİN KÜRKLÜ tarafından hazırlanan 'Leishmaniasisin Endemik Olduğu Aydın/Kuşadası'nda Asemptomatik Köpeklerde *Leishmania infantum* Enfeksiyonunun Araştırılması' başlıklı tez, 03.10.2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

**Unvanı, Adı ve Soyadı :**

**Üniversitesi :** \_\_\_\_\_

**imzası:**

Prof. Dr. Serdar PAŞA

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç.Dr. Bülent ULUTAŞ

Adnan Menderes Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Nuran AYSUL

Adnan Menderes Üniversitesi



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

## ÖNSÖZ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen hastalıklar içerisinde, en önemlilerinden biri olarak kabul edilen leishmaniasis, zaman zaman görülen kendiliğinden iyileşebilen deri formundan, iç organlara yerleşebilen, çoğunlukla da ölümcül seyreden bir protozoal hastalıktır.

Köpek visseral leishmaniasis oluşmasında uygun bir vektör, enfekte konak ve rezervuarın bulunması ile nem, ışık, hava hareketi, beslenme ve konağın bağışıklık reaksiyonu gibi faktörler önemli rol oynamaktadırlar. KVL vektörü Eski Dünya ülkelerinde *Phlebotomus*, Yeni Dünya ülkelerinde ise *Lutzomyia* cinsi tatarcık sinekleridir.

KVL’de klinik bulgular aylar yada yıllar sonra görülebilir. KVL’li köpeklerin düşük oranında klinik bulgular görülürken, bazı köpeklerde klinik bulgu göstermeden asemptomatik taşıyıcı olarak kalabilmektedirler. Asemptomatik taşıyıcı köpekler hastalığın vektörü olan kum sineklerini enfekte ederek insan, köpek ve diğer duyarlı hayvanlara hastalığı bulaştırırlar.

Bu çalışmada, leishmaniasisin endemik olduğu Aydın/Kuşadası’nda asemptomatik köpeklerde *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları ile enfeksiyon etkeninin insan ve köpekler gibi duyarlı hayvanlara taşınmasında önemli rol oynayan asemptomatik köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonunun olup olmadığının aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Etiyoloji	3
1.2. Epidemiyoloji	4
1.3. Patogenez	7
1.4. Bulgular	9
1.4.1. Klinik Bulgular	9
1.4.2. Laboratuvar Bulguları	12
1.5. Tanı	13
1.5.1. Parazitolojik Yöntem	14
1.5.2. Serolojik Yöntem	15
1.5.3. Moleküler Yöntem	15
1.6. Ayırıcı Tanı	16
1.7. Prognoz	16
1.8. Sağaltım	17
1.9. Koruma	18
1.10. Asemptomatik Olguların Genel Dağılımı	19
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1. Gereç	21
2.2. Yöntem	21
2.2.1. Indirekt Florasan Antikor Testi	21

2.2.1.1. IFAT Antijenli Lamların Hazırlanması	21
2.2.1.2. IFAT Yöntemi Uygulanması	22
2.2.2. DNA İzolasyonu ve Polimerize Zincir Reaksiyonu	23
2.2.2.1. DNA İzolasyonu	23
2.2.2.2. PZR Testi	24
2.2.3. Sonuçların Yorumlanması	24
2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme	24
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	25
3.1. IFAT Sonuçları	25
3.2. PZR Sonuçları	31
4. TARTIŞMA	32
5. SONUÇ	37
ÖZET	38
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	49
TEŞEKKÜR	50

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CL	: Kanin Leismaniasis
DCL	: Diffuz Kutanöz Leismaniasis
ELISA	: Enzim-Linked Immunosorbent Assay
IFAT	: İndirekt Floresan Antikor Testi
LRT	: Likelihood Ratio Test
KVL	: Köpek Visseral Leismaniasis
MCL	: Mukokutanöz Leismaniasis
PZR	: Polimerize Zincir Reaksiyon
PKDL	: Post Kala Azar Leismaniasis
RES	: Retikülo Endotelial Sistem
VL	: Visseral Leismaniasis

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Köpek, kedi ve insanda coğrafi yayılım ve klinik formlarına göre <i>leishmania</i> türleri	3
Çizelge 1.2	Türkiye’de KVL ile ilgili yapılan seroprevalans çalışmalarına genel bakış	6
Çizelge 1.3	KVL’de görülen klinik bulgular ve bu belirtilerin görülme sıklığı	10
Çizelge 1.4	KVL’de başlıca laboratuvar bulgular ve görülme sıklığı	13
Çizelge 1.5	Leishmaniasisin endemik olduğu dünyanın farklı yerleşim yerlerinde asemptomatik köpeklerde visseral leishmaniasisin seroprevalansı	20
Çizelge 3.1.1	Çalışmanın yapıldığı yerleşim alanı, incelenen köpek sayısı, seropozitif köpeklerin sayısı ve yüzde oranı	25
Çizelge 3.1.2	Köpeklerin yaş grubu ve anti- <i>Leishmania infantum</i> antikoru arasındaki dağılım	26
Çizelge 3.1.3	Köpeklerde cinsiyet ve anti- <i>Leishmania infantum</i> antikoru arasındaki dağılım	26
Çizelge 3.1.4	Köpeklerin ırk ve anti- <i>Leishmania infantum</i> antikoru arasındaki dağılım	27



- Çizelge 3.1.5 Köpeklerin aktiviteleri ile anti-*Leishmania infantum* antikorları 28 arasındaki dağılım
- Çizelge 3.1.6 Köpeklerin kıl örtüleri ile anti-*Leishmania infantum* antikorları 28 arasındaki dağılım
- Çizelge 3.1.7 Köpeklerin buldukları ortam ile anti-*Leishmania infantum* 20 antikorları arasındaki dağılım
- Çizelge 3.1.8 Köpeklerin antiparaziter bant kullanımı ile anti-*Leishmania infantum* 30 antikorları arasındaki dağılım
- Çizelge 3.2.1 Çalışmanın yapıldığı yerleşim alanı, incelenen köpek sayısı, PZR 31 pozitif köpeklerin sayısı ve yüzde oranı

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1	Leishmania promastigot ve amastigotunun görünümü	4
Resim 1.2	Leishmania etkeni taşıyan tatarcık sineği	4
Resim 1.3	Leishmania parazitinin yaşam döngüsü	5
Resim 1.4	Leishmania enfeksiyonunu olası sonuçları	7
Resim 1.5	Seropozitif bir köpekten alınan popliteal lenf bezi aspiratında amastigot form	9

# 1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen zoonoz hastalıklar içerisinde, en önemlilerinden biri olarak kabul edilen leishmaniasis, zaman zaman görülen kendiliğinden iyileşebilen deri formundan (kutanöz leishmaniasis), iç organlara yerleşebilen (visseral leishmaniasis) ve ölümlere neden olan forma geçebilen, çoğunlukla da ölümcül seyreden bir protozoal hastalıktır (Unat 1981).

Leishmania paraziti, ilk kez güney Amerika da yer alan And dağları bölgesinden dönen mevsimlik İspanyol işçilerinde görülmesinden sonra “Valley Sickness” veya “Andean Sickness” olarak adlandırılmıştır. Ülseratif deri lezyonlarıyla karakterize bu hastalığa 15. ve 16. yüzyıllardan kalma Inca yazılarında da değinilmiştir. İyileşemeyen bu ağız ve burun lezyonlarıyla cüzama çok benzemesinden dolayı hastalığa “beyaz cüzam” adı da verilmiştir. 1882 yılında Clarke, Hindistanlı hekimler tarafından Sanskritçe “kala azar” adı verilen ve anlamı kara ateş “black fever” olan hastalığın Hindistan’da bazı yerlerde hemen hemen hiç insan bırakmayacak kadar ölümlere neden olduğu bildirilmiştir (Unat 1981).

Bu çok eski tarihlere dayanan ve nedeni bilinmeyen hastalık ilk kez 1900 yılında Leishman tarafından ölen bir askerin dalağında alınan yayma preparasyonunda ufak oval cisimler görmesiyle ortaya konulabilmiştir. Aynı yıl Donovan kala-azar vakalarında dalaktan hazırladığı yayma preparasyonlarda etkeni görmüş ve bunların Trypanosoma olmadığını vurgulamıştır. 1903 yılında Major Ross bu parazitler için, Leishmania cinsini ortaya koymasıyla, kala-azar etkenine *Leishmania donovani* ismini vermiştir (Unat 1981, Kuman ve Altıntaş 1996).

Türkiye’de, leishmaniasis’in varlığı ilk kez Kristamonas tarafından ortaya konmuş ve İzmir’de ilk bildirim de 1918 yılında Dr. Hofer Kaller tarafından yapılmıştır. Yapılan incelemeler 1931 yılında İbrahim Osman, 1936 yılında ise Dr. Akil Özden tarafından kala-azar vakalarının varlığının ortaya konulduğunu göstermiştir. 1936 yılı ve sonrasında Dr. Arif İsmet Çetingel tarafından yapılmış olan araştırmalarda hastalığa dikkat çekilmiş ve ülkemizde 1948 yılına kadar yüzden fazla kala-azar vakası belirtilmiştir. Yurdumuzda köpeklerde kala-

azar bulunduğuna dair ilk yayın 1946 yılında Dr. Nurettin Onur tarafından yapılmıştır (Unat 1981, Kuman ve Altıntaş 1996).

Bu alışmada,

Leishmaniasisin endemik olduğu Aydın/Kuşadası'nda asemptomatik köpeklerde *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

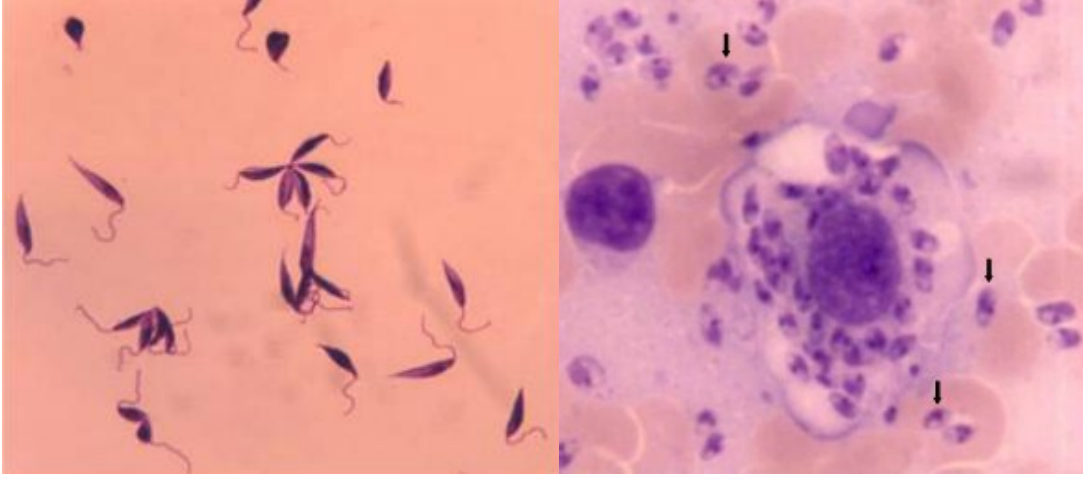
## 1.1. ETİYOLOJİ

Trypanosomatidae ailesine ait bir protozoon olan *Leishmania* paraziti, yaşamını devam ettirebilmek için kemirgen, köpek veya insan gibi omurgalı ve tatarcık sinekleri gibi iki farklı konakçıya ihtiyaç duymaktadır (Unat 1981). *Leishmania* parazitlerinin insanlarda; Visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (CL), post-kala-azar leishmaniasis (PKDL), diffuz deri leishmaniasis (DCL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MCL) gibi değişik formları görülmesine rağmen, eski tarihlerden günümüze değin hastalık ülkemizde visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (CL) ve köpek visseral leishmaniasis (KVL) olarak karşımıza çıkmaktadır (Çizelge 1.1).

**Çizelge 1.1.** Köpek, kedi ve insanda coğrafi yayılım ve klinik formlarına göre *leishmania* türleri

	Klinik Olarak Sınıflandırma			
	Parazit	Köpek	Kedi	İnsan
Eski Dünya	<i>L. tropica</i>	CL, VL		CL, VL
	<i>L. donovani</i>			VL, CL, PKDL
	<i>L. infantum</i>	VL	DCL	VL, CL
Yeni Dünya	<i>L. braziliens</i>	CL, MCL		CL, MCL
	<i>L. chagasi</i>	VL		VL, CL
	<i>L. mexicana</i>		CL	CL, DCL, MCL

*Leishmania* türlerinin yaşam devrelerinde, vektör *Phlebotomus*'larda promastigot, insan ve diğer memelilerde amastigot olarak iki form görülmektedir (Özbel 2000). Flagellata formu (promastigot) vektör olan tatarcık sineklerinde görülüp, 10-15 m uzunluğunda 1.5-2.5 nm genişliğinde bir vücuda ve ön uçta 15-28 nm uzunluğunda bir kamçıya sahiptir. Konakçı üzerinde beslenme esnasında promastigotlar konakçıya geçer ve kamçılarını yitirerek amastigot forma geçerler. Omurgalı konakçıda bulunan flagellasız olan amastigot formu ise 2-5 nm boyutundadır (Özbel 2000) (Resim 1.1).



**Resim 1.1.** Leishmania promastigot ve amastigotunun görünümü (Atasoy 2005).

## 1.2. EPİDEMİYOLOJİ

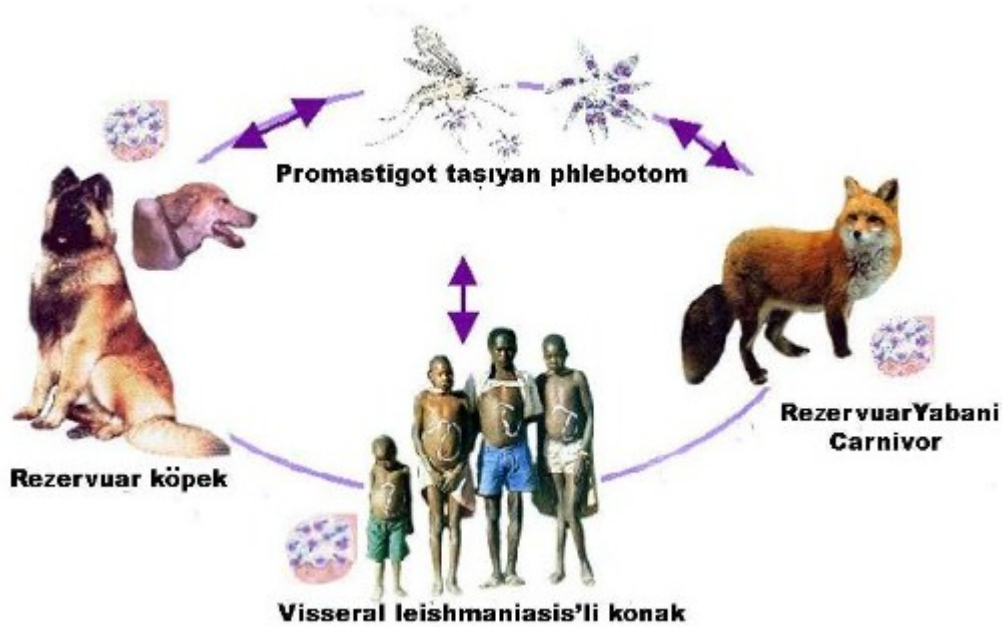
Epidemiyolojik olarak Leishmaniasis zoonotik ve antroponotik olarak iki formda görülmektedir. Zoonotik formda hastalığın asıl rezervuarları dişi tatarcık sinekleri tarafından enfekte edilen köpeklerdir ve daha çok Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. Anthroponotik formda ise vektör olan tatarcık sinekleri (Resim 1.2) ile insandan insana bulaşma söz konusudur ve sıklıkla Doğu Afrika'da, Bangladeş'te ve Hırvatistan'da görülmektedir (Gallego 2001).



**Resim 1.2.** Leishmania etkeni taşıyan tatarcık sineği (Baneth ve Strauss 2000).

Köpek visseral leishmaniasisin oluşmasında uygun bir vektör, enfekte konak ve rezervuarın bulunması ile nem, ışık, hava hareketi, beslenme ve konağın bağışıklık reaksiyonu gibi faktörler önemli rol oynamaktadırlar (Baneth 2000). KVL'in vektörü Eski Dünya ülkelerinde Phelebotomus, Yeni Dünya ülkelerinde ise Lutozomyia cinsi tatarcık sinekleridir (Baneth 2000).

Phelebotomlar, sıcaklığın 25-28 derece, nem oranının ise %50 olduğu dönemlerde aktif olabilmektedirler. Hastalığın bulaşmasında 2-3 cm uzunluğundaki Phlebotomların dişileri rol almaktadırlar. Yumurtalarının gelişimi için gerekli olan proteinleri elde etmek amacıyla, amastigotları taşıyan enfekte omurgalı konaktan kan emerken içinde parazit bulunan makrofajları da alırlar. Vektör tarafından alınan amastigotların bir kısmı sindirilirken diğer bir kısmı bölünerek çoğalırlar ve Promastigot'lara dönüşürler. Enfekte kanın dişi phlebotom tarafından alınmasından 4-7 gün sonra ilk enfektif safhalar phlebotom hortumunda görülür. Enfektif promastigotlar vektör tarafından yine kan emme sırasında yeni omurgalı konağın kanına geçerek bulaşılır. Enfekte konağın çeşitli savunma mekanizmalarını kırma özellikleri vardır. Özellikle komplemanın sitotoksik ve eritici etkisine karşı koyarak, savunma mekanizmalarını kendi lehine kullanarak konağın makrofajlarına girerler ve burada amastigot formuna dönüşerek bölünme yoluyla çoğalırlar. İçinde buldukları makrofajları patlatarak serbest kalan amastigotlar tekrar diğer makrofajları işgal ederek dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlara dağılarak bir çok patolojiye sebep olurlar (Resim1.3) (Slappendel ve Ferrer 1990, Baneth ve Strauss 2000)



**Resim 1.3.** Parazitin yaşam döngüsü (Baneth ve Strauss, 2000).

Genellikle enfekte köpeklerde kronik bir süreç şeklinde generalize lenfadenopati, anemi, desquamatif yada ülseratif deri lezyonları ve proteinüri ile birlikte seyreden bir glomerulonefritis oluşur (Blavier ve Keroack 2001).

Köpekler özellikle de endemik bir bölgede yaşıyorlarsa, bir yada birden fazla semptomu göstermeleri dahilinde tanıya gitmek oldukça kolaydır. Bununla birlikte köpek sadece bir semptom gösteriyorsa ya da hiç göstermiyorsa, tanıya gitmek oldukça güçtür (Blavier ve Keroack 2001). Türkiye de KVL ile ilgili yapılan seroprevalans çalışmaları Çizelge 1.2 de özetlenmiştir.

**Çizelge 1.2.** Türkiye’de KVL ile ilgili yapılan seroprevalans çalışmalarına genel bakış.

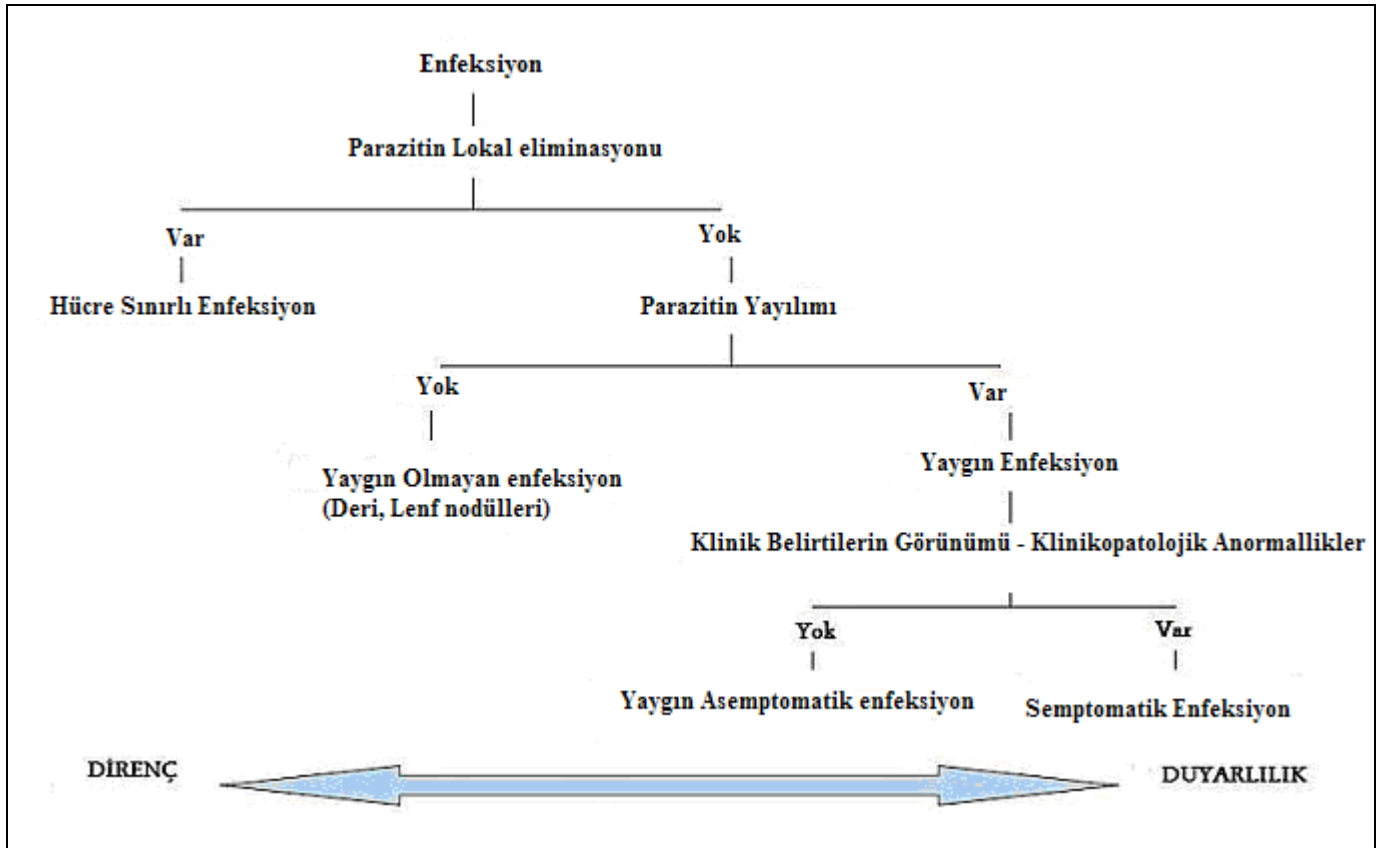
Yıl	Bölge veya şehir(ler)	İncelenen Köpek sayısı	Prevalans Oranı	Araştırmacılar
1997	Bursa, Muğla, İstanbul	182	% 5,5	Coşkun ve ark
1998	Manisa/ Alaşehir Karabük	494	% 3,6-% 8,7	Özensoy ve ark
2000	Manisa	490	% 3,6-% 19	Ozbel ve ark
2001	Eskişehir	111	% 25	Doğan ve ark
2001	Muğla Göktepe Köyü	52	% 3,8	Ertabaklar ve ark
2002	Karaburun ve Urla	55	% 23-% 27	Özensoy Töz ve ark
2004	Aydın, İzmir/Selçuk	158	% 3,2	Voyvoda ve ark
2005	Kuşadası	253	% 16,6	Özensoy ve ark
2005	Çorum	131	% 3,7-% 28,26	Ertabaklar ve ark
2005	Ankara	116	% 2,58	Aslantaş ve ark
2005	Aydın/Kuşadası	253	% 16,6	Özensoy ve ark
2005	Eskişehir, Afyon, Bilecik	111	% 13,51	Doğan ve ark
2008	Kuzey Kıbrıs Türk Cum.	281	% 3,6	Çanakçı ve ark
2009	Antalya	176	% 7,95	Balcıoğlu ve ark
2010	Adın, Muğla, İzmir, Manisa	300	% 9	Atasoy ve ark



### 1.3. PATOGENEZ

KVL'in etkeni dişi tatarcılar ile taşınır ve bunların konakçıdan kan emmesi sırasında bulaşır. Etkenler ilk olarak buradaki immun sistem ile karşılaşır. Bu ilk karşılaşmayı takiben, makrofajlar tarafından alınarak bölgedeki lenf yumrularına doğru taşınırlar. Enfeksiyonun ortaya çıkması; etkilenen canlının genetik faktörlerine, hücresel ve humoral immun yanıtına, sitokin reseptörlerine ve eşzamanlı başka bir hastalık taşıyıp taşıyamama gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterir (Saridomichelakis 2009).

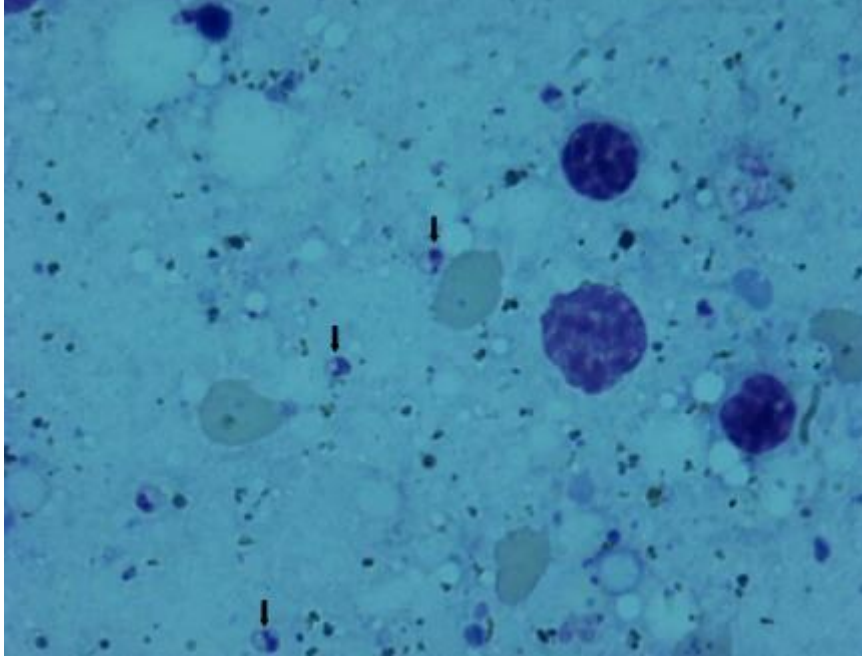
Köpeklerde etken tüm vücuda yayılmadan ve semptomlar görülmeden önce, lokal bir deri yangısı gelişir (Cotran ve ark 1999). Konakçının immun sistemine bağlı olarak 1 aydan 7 yıla kadar belirgin klinik bulgular görülebilir (Slappendel ve Ferrer 1990). Hastalığa yakalanan hayvanların immun yanıtına bağlı olarak hastalığın seyri asemptomatik veya semptomatik olabilmektedir. İmmun yanıtın güçlü olmasına göre parazitin kontrolü sağlanabileceğinden hastalığın seyri asemptomatik olarak devam edebilmektedir (Resim 1.4) (Belkaid ve ark 2000).



**Resim 1.4.** Leishmania enfeksiyonunu olası sonuçları (Saridomichelakis 2009).

Leishmania zorunlu intraseluler bir parazittir ve bu nedenle savunma sisteminin direnci ve makrofaj aktivitesi T lenfosit aktivitesine bağlıdır. Hastalığa yakalanan hayvanlardaki T lenfosit miktarının hasta olmayan hayvanlara göre belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır (Moreno ve Alvar 2002). T lenfosit miktarının lenfoid dokularda azalması, hastalığa karşı savunma amacıyla sayısını arttıran plazma hücreleri ve/veya makrofajların aktivitesini ve amastigotların elemine edilme yeteneklerini kısıtlar. Aynı zamanda B lenfositler, histiositler ve makrofajların sayısını artması generalize lenfadenopati ve hepatosplenomegali gibi klinik bulguların meydana gelmesine neden olur (Guarga ve ark 2000).

Parazitin neden olduğu hasar dokulardaki direk etki ve indirekt etki olmak üzere iki faktöre dayandırılmaktadır (Noli 1999). KVL'de genel patolojik olay parazitin girdiği dokuda makrofajların toplanması, proliferasyonu ve ana dokunun yerini almasıdır. Leishmania paraziti kan monositleri, histiositler, makrofajlar, epiteloid hücreler, karaciğerde Kupffer hücreleri, dalakta kırmızı pulpa hücreleri, kemik iliği, bağırsak duvarının ve lenfoid dokunun mononükleer fagositik hücreleri içerisinde çoğalarak şiplenomegali ve hepatomegaliye, kemik iliğinde genellikle hiperplazi ve diseritropoezise, lenfadenopatiye, dalakta hipertrofiye bağlı olarak ortaya çıkan splenomegali sonucunda eritrositlerin, granülositlerin ve trombositlerin kısa sürede yıkımına neden olmaktadır (Resim 1.5). Bununla birlikte etkisiz eritropoez sonucu ciddi pansitopeni tablosunun ortaya çıkabilmesine, ince bağırsaklarda özellikle peyer plaklarının etrafında bulunan submukozanın amastigotlu makrofajlarca istilasına bağlı malabsorpsiyon, diyare ve özellikle albumin kaybının sıklıkla meydana gelebildiği belirtilmektedir (Buracco ve ark 1988, Lappin 1992, Engwerda ve Kaye 2000).



**Resim1.5.** Seropozitif bir köpekten alınan popliteal lenf bezi aspiratında amastigot form.

## **1.4. BULGULAR**

KVL' de klinik bulguların değişkenlik göstermesi, bazı köpeklerin ise hiçbir klinik bulgu göstermeksizin asemptomatik taşıyıcılar olduğu rapor edilmiştir (Saridomichelakis 2009). Hastalıkla ilgili orta dereceli en az 2 klinik bulgu gösteren köpekler oligosemptomatik, belirgin 3 ya da daha fazla klinik bulgunun görüldüğü hastalar polisemptomatik, hiçbir klinik bulgu göstermeksizin taşıyıcı olanlar ise asemptomatik olarak nitelendirilirler (Saridomichelakis 2009). KVL'de seropozitif köpeklerin yaklaşık %20-40 gibi bir oranı asemptomatik vakalardan oluşmaktadır (Oliveira 1992).

### **1.4.1. Klinik Bulgular**

KVL köpeklerde sistemik ve kronik seyirli olarak kendini gösterir. Hastalık retikülo endotelial sistem hücrelerinin yoğunluklu olduğu organlara göre değişik bir patolojik dağılımla bulunduğu organa özgü semptomlar gösterebilir. Hastalıkta başlıca klinik bulgular

lenfadenopati, kilo kaybı, fiziksel aktivitede azalma, deri lezyonlarıdır, sogunluk, şipenomegali ve oküler lezyonlardır (Koutinas ve ark 1999) (Çizelge 1.3).

**Çizelge 1.3.** KVL’de görülen klinik bulgular ve bu belirtilerin görülme sıklığı (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999 ).

<b>Klinik Bulgular</b>	<b>Görülme sıklığı (%)</b>
Deri lezyonları	81–89
Lenfadenomegali	65,2–90
Solgun muköz membranlar	58
Oküler bulgular	18
Kaşeksi	10,1–47,5
Siplenomegali	9,5–53,3
Ateş	4–36
Epistaksis	6,3–10
Artropatiler	3,2–4
Asites	1,3–3

KVL’de klinik bulgular içerisinde en sık olarak deri lezyonları görülür. Saptanan olgularda bu deri lezyonları hiperkeratoz, kepeklenme gibi hafif seyirden ülseratif deri lezyonlarına kadar değişim gösterebilmektedir. Deri ve kıl örtüsü üzerinde görülen bu anomaliler tüm vücutta olabileceği gibi, sadece göz çevresi, kulaklar, burun ve ayaklarda da lokalize olabilmektedir (Slappendel ve Ferrer 1990, Saridomichelakis 2009).

KVL ile enfekte köpeklerin %53-73 kadarında, genellikle simetrik bir yayılım gösteren, multifokal ya da diffuz eksfoliyatif dermatit görülmektedir. Histopatolojik değerlendirmelerde, granulamatoz ve pyogronulamatoz yangının varlığı belirtilmektedir (Saridomichelakis 2009).

Lenf nodüllerinin kortikal ve medüller alanlarında hipertrofi gerçekleşmektedir. Makrofajların enfeksiyonu henüz dermisteyken, lenf nodüllerine ilerlememişken gerçekleşebilir. CD+8 hücrelerinde artış, CD+21 hücrelerinde azalma meydana gelmektedir.

Bütün bunların sonucunda periferik lenfadenopati gerçekleşmektedir ve bu en çok görülen KVL belirtilerinden biridir (Saridomichelakis 2009).

Etkenlerin karaciğerde makrofajlar içinde oğalmasi kronik aktif hepatitise neden olmaktadır. Karaciğer palpasyonda dahi hissedilebilir bir büyümeye uğrar, bununla birlikte kusma, poliüri, polidipsi, anoreksi, kilo kaybı, ilerleyen dönemlerde asites gelişebilmektedir. İlk olarak karaciğerde hasara neden olabileceğinden dolayı, leishmaniasisin endemik olduğu bölgelerde klinik ve labratuar olarak karaciğer bulgularına rastlanılıyorsa, akla leishmaniasis gelmelidir (Koutas ve ark 1999, Saridomichelakis 2009).

Kronik lseratif kolitisle birlikte, kalın bağırsak ishali ve akut ölümcül enteritisin de leishmaniasise eşlik edebildiği bildirilmektedir (Ferrer ve ark 1991). İntestinal lezyonlar parazitin varlığına bağlı olarak, pyogranulatoz ve granulatoz yangı reaksiyonları ile ilişkilidir. Kronik ince veya kalın barsak ishali şekillenebilir.

Renal lezyonlar genellikle membranoproliferatif glomerulonefrit, tubulointersititiyel nefrit ve nadir olarakta amiloidos nefrit şeklindedir. Glomerulonefrite, glomerullerde biriken immun kompleksler neden olmaktadır. Bu lezyonlar proteinüri ve hipertansiyon gibi belirtilerin şekillenmesinde rol oynamaktadırlar. Bazı enfekte köpeklerde orta Őiddetten Őiddetliye kadar değişebilen renal yetmezlik belirtilerine de rastlanmıştır (Koutas ve ark 1999, Saridomichelakis 2009).

Çiğneme ve iskelet sistemi de, enfeksiyondan etkilenen sistemdir. Çeşitli bölgelerde kas atrofileri ve bununla birlikte serum kreatinin kinaz miktarında artış görülebilmektedir. Leishmania amastigotlarını taşıyan makrofajlar ve immun kompleks depolanması sonucunda da polimiyozitis meydana gelebilmektedir (Saridomichelakis 2009).

Eklemlerde biletarel, simetrik, nonerosiv poliartiritis ve laminitis görülebilir. Bunun sebebi sekonder sinovyal enfeksiyon ve yangı ile beraber immun kompleks birikimidir. (Saridomichelakis 2009).

KVL'de kardiyak ve trombozise dair bulgulara nadiren rastlanılmaktadır. Granulatoz yangı veya immun kompleks birikimleri ve sistemik hipertansiyonun miyokardiyak bulgulara neden olduğu düşünülmektedir (Font ve ark 1991, Saridomichelakis 2009).

Oküler lezyonlar nadir olarakda birçok sebeple meydana gelebilirler. Granulamatöz yangı ve ikincil olarakta etkenin kendi varlığı blefaritis, primer konjunktivitis, ve lakrimal bez yangısına, immun komplekslerin birikimi üveitise; hipertansiyon gibi KVL' nin sistemik bulguları ise retinal ayrılmalara sebep olabilmektedir (Saridomichelakis 2009).

Daha önce bahsedildiği gibi, bir çok bulgunun atında yatan patomekanizma ve klinik bulgular kompleks ve belirsizdir. İştahsızlığa bağlı olarak kilo kaybı şekillenebilir. Trombositopeni sebebiyle sekonder olarak epistaksis şekillenebilir. Pnömoni çok ender görülebilen bir bulgudur. İmmun kompleks birikimi veya immun yetersizlik sonucu sekonder olarak şekillenebilir. Yine granulamatöz yangı, immun kompleks birikimi ve vasküler patolojilerle ilişkili meningitis ve buna bağlı olarakta sentral sinir sistemi belirtileri çok nadir de olsa görülebilmektedir (Saridomichelakis 2009).

Anemi, en sık görülen labratuar bulgularından biridir. KVL'de anemi epistaksisle gerçekleşen kan kaybı, otoantikör ve immun komplekslerin neden olduğu hemoliz, kronik enfeksiyon, kronik böbrek yetmezliği ve beslenme bozukluğuna bağlı demir yetersizliği ile birlikte eritropoiezinin azalması ile açıklanabilmektedir (Saridomichelakis 2009).

#### **1.4.2. Laboratuvar Bulguları**

KVL'de klinik bulgular, etkenin etkilediği organa, hastalığın seyrine, safhasına ve şiddetine göre değişiklik gösterebilmektedir. Görülebilen bazı laboratuvar bulguları ve görülme sıklıkları çizelge 1.4'te özetlenmiştir.

**Çizelge 1.4.** KVL’de başlıca laboratuvar bulgular ve görülme sıklığı (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999).

<b>Labratuar Bulguları</b>	<b>Görülme sıklığı (%)</b>
Hiperproteinemi	63,3 -72,8
Hiperglobulinemi	70,6 – 100
Hipoalbuminemi	68 – 94
Albumin/Globulin oranında azalma	76
Nonregenerative anemi	60 -73,4
Trombositopeni	29,3 - 50
Lökositozis	24
Lökopeni	22
ALT, GGT ve ALP aktivitesinde artış	16
Üre ve kreatinin düzeyinde artış	16 – 45
Hafif veya şiddetli proteinuri	71,5 – 85

## **1.5. TANI**

KVL’de klinik muayene bulguların spesifik olmaması ve diğer bir çok hastalıkla benzerlik göstermesi nedeniyle, hastalığın tanısı, parazitolojik yöntemler, serolojik testler ve moleküler biyolojik testlerden bir veya birkaçının birlikte değerlendirilmesi ve desteklenmesi ile konabilir. Enfekte köpeklerin %10-30 kadarının subklinik formda belirti göstermeksizin yaşıyor olması ve klinik bulgu gösterenlerinse özellikle deride lokalize bulguların diğer bir çok hastalıkla benzerlik göstermesinden dolayı klinik belirtiler ile tanıya gitmek oldukça güçtür. Kesin tanı parazitolojik, serolojik ve moleküler biyolojik yöntemler olmak üzere 3 şekilde konulabilir (Slappendel ve Ferrer 1990, Ciaramella ve ark 1997, Roura ve ark 1999, Strauss-Ayali ve Baneth, 2000).

### **1.5.1. Parazitolojik Yöntemler:**

Etkenin direkt veya indirekt yolla belirlenmesi esasına dayanır.

#### **Direkt Yöntem:**

Etkenin amastigot formlarının, lenf yumruları ve/veya kemik iliği aspiratlarından hazırlanan yayma preparatlarda veya deri lezyonlarından ve mukozalardan hazırlanan sürme preparatlarda direkt olarak görülmesi esasına dayanan bir yöntemdir (Font ve ark 1996, Straus-Ayali ve Baneth 2000). KVL'nin tanısında kullanılan bu yöntemin spesifitesi % 100 olmasına rağmen sensitivitesi oldukça düşüktür (Ciaramella ve ark 1997). Giemsa boyama yöntemiyle boyanan frotilerde parazitler koyu nükleuslu, küçük kinetoplast içeren oval hücreler (2–5 µm) tarzında görülmektedir (Straus-Ayali ve Baneth 2000). Ayrıca kabukların ve pullanmaların altından veya kutanöz nodüllerden hazırlanan impresyon sitolojik preparatlarda da bulunabilirler. Fakat KVL'de tanısal açıdan sitolojinin sensitivitesi düşüktür.

#### **İndirekt Yöntem:**

Etkenin amastigot formları indirekt olarak dokulardan alınan biopsi örneklerinin immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmesiyle de tespit edilebilmektedir (Ferrer ve ark 1988, Roura ve ark 1999).

**İn Vitro Kültür:** Kemikiliği, dalak, deri ve lenf nodülleri aspiratlarının Novy-Nicolle-McNeal (NNN), Scheneider's Drosophila ve % 10–30 Fetal Sığır Serummu (FCS) ilave edilmiş RPMI 1640 gibi besi yerlerine ekilmesiyle de parazit tespit edilebilmektedir (Baneth 2001). Ancak bu yöntem 1 ay kadar uzun bir süre sonra sonuç verdiği için, rutinde kullanımı oldukça güçtür.

**İn Vivo Kültür :** Bu yöntemle tanı, şüpheli hayvanlardan alınan enfekte dokuların hamsterlere inokülasyonu ve oluşan klinik semptomların izlenmesi şeklindedir (Baneth 2001).

**İmmunohistokimyasal Yöntem :** Enfekte köpeklerin serumlarında indirekt peroksidaz reaksiyonunun saptanması esasına dayanmaktadır (Baneth 2001).



### 1.5.2. Serolojik Yöntem:

Serolojik yöntemin uygulandığı semptomatik veya asemptomatik seyir gösteren KVL'li köpeklerde hemen hemen her zaman spesifik humoral yanıtın gelişeceği saptanmıştır. Günümüzde etkene karşı gelişen anti-*Leishmania* antikorlar, farklı serolojik yöntemlerle belirlenmektedir. KVL'in etkenine karşı gelişen anti-*Leishmania* antikorları immunofloresans antikor (IFA), direkt agglutinasyon test (DAT), enzymlenk immunosorbent assay (ELISA), Dot-ELISA, slide-ELISA, western blott gibi serolojik testlerle belirlenebilmektedir (Mancianti ve Meciani 1988, Neogy ve ark 1992, Aisa ve ark 1998, Soto ve ark 1998, Schallig ve ark 2002). Bunlar arasında IFA, Dot-ELISA ve DAT bugün için en çok kullanılan serolojik testlerdendir (Ferrer ve ark 1995, Mancianti ve ark 1995, Schallig ve ark 2002) Bu serolojik testler genellikle yüksek spesifite ve sensitiviteye sahiptirler (% 80-100). Bu yöntemlerde yeterli sensitivite ve spesifitenin sağlanmasının en çok saf antijenlerin kullanılmasına bağlı olduğu belirtilmektedir (Strauss-Ayali ve Baneth 2000).

ELISA'daki recombinant antijen rK39'la birlikte seroreaktivitenin, akut KVL'nin görünümüyle doğru orantılı olduğu vurgulanmaktadır (Baneth ve ark 1999, Rhalem ve ark 1999). Ancak yalnızca antikorların varlığının tespiti diğer kinetoplastid parazitlerle çapraz reaksiyonlar gösterebileceğinden anti-*Leishmania* antikor titrelerinin belirlenmesi ile daha doğru sonuçların elde edilebileceği bildirilmektedir (Noli 1999, Gradoni 1999). KVL'de serolojik titreler ile hastalığın klinik bulgularının şiddeti arasında bir ilişkinin olmadığı, hatta bazı hastalarda klinik iyileşmeden sonra anti-*Leishmania* antikor titrelerinin yüksek kaldığı rapor edilmektedir (Lanotte ve ark 1979, Ferrer 2002, Fisa ve ark 1999, Noli 1999, Pasa ve ark 2005).

### 1.5.3. Moleküler Yöntem:

Köpeklerden alınan taze veya formaldehit ile tespit edilmiş doku örneklerinden *Leishmania* tür ve alt türlerinin identifikasyonu yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle belirlenebilmektedir (Berrahal ve ark 1996, Campino ve ark 2000, Lachaud ve ark 2002). Alınan doku örneklerindeki parazit DNA'sı; r-RNA genindeki küçük alt ünitenin *Leishmania* segmentine karşı, *Leishmania* kinetoplast DNA'sının değişmeyen bölgesine karşı (Ozbel ve ark 2000, Roura ve ark 1999) veya 51

kD'luk antijeni kodlayan *Leishmania* DNA'sına karşı (Berrahal ve ark 1996) dizayn edilmiş primerler kullanılarak tespit edilmektedir. Pek çok dokudan alınan örneklerin incelenebildiği bu test, özellikle kemik iliği ve lenf yumrusu aspiratlarının ve konjunktival svabın incelenmesiyle diğer parazitolojik yöntemlere göre daha yüksek spesifite ve sensiviteye sahiptir (Reale ve ark 1999, Zerpa ve ark 2001, Schalling ve Oksam 2002).

## **1.6. AYIRICI TANI**

KVL de ayırıcı tanı, değişken olan klinik görünümünden dolayı oldukça güçtür. Sistemik bulgu göstermeksizin deri lezyonları ile karakterize olgular diğer dermatolojik hastalıklarla karışabilmektedir. Hastalıkta açığa çıkan ülseratif lezyonlar, lupus eritematosus, derin mikozlar ve kutanöz neoplazilerden ayırtedilmelidir (Ciaramella 1997).

KVL, bu yukarıda bahsi geçen hastalıklarla klinik olarak karıştırılabildiği gibi, hayvanların immun sistemlerini zayıflattığından dolayı beraber de seyrebilmektedir (Ciaramella 1997).

## **1.7. PROGNOZ**

KVL de amaç, parazitin elimine edilmesi ve enfekte köpeğin tamamen sağlıklı hale getirilmesidir. Fakat bu durum, hastalığın nüks etme oranının çok yüksek olmasından dolayı imkansızdır. KVL'li köpeklerde prognoz genellikle kötü olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalara göre uzun süreli allopurinol kullanımının klinik iyileşme sağladığı belirtilmektedir. Genel olarak uygun sağaltım periyodu uygulanmayan hastalarda bulguların şiddetlendiği, uzun ve kombine sağaltım uygulanan hastalarda ise prognozun olumlu olduğu bildirilmiştir. (Noli 1999)

## 1.8. SAĞALTIM

İnsan ve evcil köpeklerde leishmaniasis'in sağaltımında kullanılan ilaçlar birbirine benzerlik göstermektedir. Afrika Tripanomiazis'in tedavisinde etkili olan tartar emetiğin (Antimone potasium tartarat) aynı zamanda Kuzey Amerika'da *Leishmania braziliensis*'in tedavisinde de etkili olduğu 1912 yılında Gaspar Viaana tarafından rapor edilmiştir (Manson 1996). O zamandan bugüne kadar trivalen antimonial bileşiklerin diğer coğrafik bölgelerde de visseral ve kutanöz leishmaniasis'in tedavisinde hızlı ve geniş kullanım alanı bulmuştur. 1920'de benzen halkalarıyla bağlı toksik etkisi daha az olan pentavalent antimonial içeren fenilstibonik asit, 1937'de ise daha güvenilir olan pentavalen antimonial bileşiklerden sodyum stiboglukonat Schmidt tarafından Almanya'da sentez edilmiştir.

İnsanlarda ve köpeklerde hastalığın tedavisinde son 50 yıldan beri pentavalent antimonial bileşiklerden olan meglumine antimoniat ve sodyum stiboglukonat en sık kullanılan ilaçlardır (Herwaldt ve Berman 1992, Baneth ve Shaw 2002). Meglumine'nin, yan etkilerinin sodyum stiboglukonat'dan daha az olduğu bildirilmektedir (Noli 2005). KVL'in tedavisinde, meglumine antimoniat'ın 100 mg/kg ve sodyum stiboglukonat'ın 30-50 mg/kg deri altı, 3-4 hafta uygulanması sonucu iyi yanıtların alınabileceği rapor edilmektedir (Slappendel ve Ferrer 1990, Valladares ve ark 1998).

Antimonial tedavide, tam bir parazitolojik iyileşmenin olmayışı, ilaca karşı direnç gelişimi, meydana gelebilen nöksler, toksisite ve ilacın pahalı olması gibi nedenlerden dolayı KVL'in tedavisinde daha etkili farklı tedavi protokollerini amaçlayan çalışmalar yapılmıştır (Strauss-Ayali ve Baneth 2000, Baneth ve Shaw 2000, Pasa ve ark 2005). Avrupada, visseral leishmaniasis'li köpeklerin, pentavalent antimonlar ile yalnız başlarına (Valladares ve ark 1998) veya allpurinol ile kombine edilerek tedavi edilebildikleri bildirilmektedir (Alvar ve ark 2004, Ferrer ve ark 1995, Slappendel ve Ferrer 1998, Denerolle ve Bourdoiseau 1999, Pasa ve ark 2005). Bazı araştırmacılar da (Liste ve Gascon, 1995, Noli 1999) KVL'nin tedavisinde allopurinol'ün uzun süre yalnız başına kullanılabilceğini de ifade etmektedirler.

Amfoterisin B, Aminosidin, Pentamidin gibi ilaçlarında KVL'nin tedavisinde kullanılabilceği bildirilmektedir (Oliva ve ark 1995, Lamothe 2001, Poli ve ark 1997, Rhalem ve ark 1999).

Diğer taraftan, KVL'in tedavisinde ketokanazol ve flukanazol gibi antimikotikler ve metronidazol'un yalnız başına veya spiramisin ile kombine kullanıldığında daha düşük terapötik etkinlik sağladığı rapor edilmektedir (Gangneux ve ark 1996, Pennisi ve ark 2005).

## 1.9. KORUMA

Köpekleri enfeksiyondan korumanın ilk yolu, vektörün en sık görüldüğü gün batımı saatlerinde köpeklerin dışarıda tutulmaması, evlerin insektisidlerle ilaçlanmasıdır. Klinik iyileşme göstergeleri dahi köpeklerin etkeni taşımaları ve bulaşma riski bulundurmaları açısından bu köpekler de potansiyel risk oluşturmaktadırlar. Batı ülkelerinde seropozitif köpeklerin eliminasyonu, evcil petlerin birer aile bireyi olarak kabul edilmesinden dolayı uygulamaya geçirilebilecek bir seçenek değildir (Strauss-Ayali ve Baneth 2000).

Diğer bir çok hastalıkta olduğu gibi etkin koruma sağlayan aşilar geliştirilinceye kadar uygulanabilecek en etkin yol deltametrin içeren tasmaların kullanılmasıdır. Böylece köpekler, etkeni taşıma riski olan sineklerden uzak tutulmuş olmaktadır (Reithinger 2002).

İtalya'da leishmaniasisin endemik olduğu bir bölgedeki iki çiftlikte deltametrin içeren tasma kullanımı ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. İlk sezonda kontrol grubu köpeklerde seropozitivite %5, deltametrinli bant kullanılan köpeklerde %2.7, ikinci sezonda ise bant kullanılan köpeklerde %3.5, kontrol grubunda ise %25.8 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre bant kullanımı ile 1. yıl %50, 2. yıl ise %86 lık bir korunma sağlandığı görülmüştür (Maroli ve ark 2002).

Hastalığa karşı etkin koruma sağlamak amacıyla aşı kullanımı ilk kez leishmaniasisin endemik olduğu Brezilya'da 2009 yılında denenmiştir. Leishmun adı verilen bu aşı ile, köpek ve insanlarda ki leishmaniasis insidansını düşürmek amaçlanmıştır.

## 1.10. ASEPTOMATİK OLGULARIN GENEL DAĞILIMI

Yapılan çalışmalara göre leishmaniasisin endemik olduğu belirlenen bölgelerde bulunan köpeklerin %60-70 gibi büyük bir yüzdesi, hastalığa özgü herhangi bir belirti göstermeksizin paraziti taşımaktadırlar (Ferrer 1999, Ciaramella ve ark 1997). Klinik çalışmalarla, kilo kaybı, keratokonjunktivitis, tırnak deformasyonu, deri lezyonları, alopesi, dermatitis ve lenfadenopati gibi bulgular enfekte köpeklerin sadece düşük bir oranında görünmektedir. Bu bulguların ortaya çıkmadığı durumlarda hastalığın subklinik olarak varlığı serolojik ve moleküler çalışmalarla ortaya konabilmiştir (Ferrer 1999). Yapılan serolojik çalışmalarda asemptomatik seropozitif köpeklerin oldukça yüksek oranlarda olduğu rapor edilmiştir (Molina ve ark 1994).

Leishmaniasisin endemik olarak seyrettiği bazı ülkelerde asemptomatik köpeklerde visseral leishmaniasisin seroprevalansı çizelge 1.5'de özetlenmiştir. Yunanistan yapılan bir çalışmada, IFAT yöntemi ile serolojik olarak incelenen 1638 asemptomatik köpeğin 366 (%22,4)'sının seropozitif olduğu belirlenmiştir (Sideris ve Papadopoulou 1998). Yunanistan'da 2004 yılında yapılan bir araştırmada; 1200 adet asemptomatik köpektan alınan kan örneklerinin IFA testi ile incelenmesinde 293 adet köpeğin seropozitif olduğu belirlenmiştir (Papadopoulou ve Kostaula 2004). Bulgaristan da 2005 yılında yapılan bir çalışmada, 220 sağlıklı köpeğin serumları IFA testi ile incelenmesi sonucunda hiçbir köpekte seropozitivite saptanmamıştır (Papadogiannakis ve Kontos 2005). Madrid' de 1996-2006 yılları arasında 1803 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada, 141 (%7, 8) köpekte serpozitivite belirlenmiştir. Bu seropozitivite gösteren köpeklerin 112 (%79,5)' nin herhangi bir klinik belirti göstermeyen asemptomatik köpekler olduğu bildirilmiştir (Miro ve ark 2007). Hırvatistan' da 2005 yılında yapılan bir çalışmada, toplam 306 sağlıklı köpeğin 46 (%15)'sının seropozitif olduğu rapor edilmiştir (Zivicnjak ve ark 2005). İran da 2006 yılında asemptomatik 20 köpek üzerinde PZR ile yapılan bir çalışmada 6 (%30)'sının pozitif olduğu belirlenmiştir (Rassi ve Azizi 2004). İspanya da 2000 yılınca 100 sağlıklı köpek üzerinde, PZR testi ile yapılan yapılan bir araştırma da 15(%15) köpeğin pozitif olduğu belirlenmiştir (Solano ve ark 2000).

**Çizelge 1.5.** Leishmaniasisin endemik olduğu dünyanın farklı yerleşim yerlerinde asemptomatik köpeklerde visseral leishmaniasisin prevalansı.

<b>Bölge</b>	<b>Test Tekniği</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı (%)</b>	<b>Referans</b>	<b>Yıl</b>
YUNANİSTAN	IFAT	1638	366 (%22.4)	Papadopoulou ve ark.	<b>1998</b>
İSPANYA	PZR	100	15(%15)	Solano ve ark.	<b>2000</b>
BULGARİSTAN	IFAT	120	0	Papadogiannakis ve ark.	<b>2001</b>
HIRVATİSTAN	Dot-ELISA	306	46 (%15)	Zivicnjak ve ark.	<b>2001</b>
YUNANİSTAN	IFAT	1200	293 (24.4)	Papadopoulou ve ark.	<b>2004</b>
İRAN	PZR	20	6 (%30)	Rassi ve ark.	<b>2006</b>
MADRİD	IFAT	1803	106 (75,2)	Miro ve ark.	<b>2007</b>

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

### 2.1. GEREÇ

Bu çalışmada, Leishmaniasisin endemik olduğu Aydın/Kuşadası'nda veteriner kliniklerine koruyucu (aşı uygulaması) amaçla getirilen ve klinik olarak sağlıklı görünen asemptomatik köpeklerde *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması için farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten toplam 100 köpek değerlendirilmiştir. Her bir hayvanın fiziksel muayeneleri yapılmıştır. Köpekler fiziksel muayenede olarak sağlıklı değerlendirilmiştir. Aynı zamanda paraziter enfeksiyona maruz kalma açısından çeşitli sınıflandırmalara (Gece ve gündüz bulunduğu ortam, kıl örtüsünün durumu, transport durumu, antiparaziter bant kullanımı gibi) tabi tutulmuştur. Örnek toplanması Mayıs 2010 – Mart 2011 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Aydın/Kuşadası ilçesinde asemptomatik köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonunun serolojik ve moleküler tanısı için her bir köpeğin *vena cephalica antebrachi*'sinden, antikoagülansız ve EDTA içeren antikoagülanlı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Laboratuvara getirilen antikoagülansız kan örnekleri oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum örnekleri ve EDTA içeren antikoagülanlı tüplerdeki kan örnekleri test yapılncaya kadar -20 °C de saklanmıştır.

### 2.2. YÖNTEM

#### 2.2.1. IFAT (İNDİREKT FLORESAN ANTİKOR TESTİ)

##### 2.2.1.1. IFAT Antijenli Lamların Hazırlanması

Antijen hazırlanacağı zaman % 20 Fetal Sığır Serum ve % 2 antibiyotik solüsyonu içeren RPMI 1640 besi yeri hazırlanmış 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklere konulmuştur. NNN besi yeri tüpünden RPMI 1640 besi yerinin bulunduğu flask'e 4-5 damla aktarılmış ve 26 °C'de saklanarak 2 günde bir inverted mikroskop ile kontrol edilmiş, 1 hafta sonra, promastigotlar bol olarak ürediğinde antijen hazırlanmak için toplanmıştır.

Yaklaşık 5 mm'lik besi yeri santrifüj tüpüne aktarılarak 2500 r.p.m.'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısmı atılmış ve dipte kalan kısım üzerine serum fizyolojik eklenerek aynı şartlarda santrifüj yapılmıştır. Bu yıkama işlemi 7 kez tekrar edilmiştir.

En son yıkama işleminden sonra çökelti 1 ml serum fizyolojik ile sulandırılmış ve promastigotlar Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve 2.000.000 promastigot/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Elmas kalem ile daireler çizilerek hazırlanmış IFAT lamalarının her bir çukuruna 10 µl antijen konulmuş ve kurutulduktan sonra pelur kağıtlara sarılarak kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### **2.2.1.2. IFAT Yöntemi Uygulanması:**

#### **Tampon ve Solüsyonlar**

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2.40 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0.44 g

NaCl : 17 g

Distile su : 2000 ml karıştırılıp Ph 7.4'e ayarlanmıştır.

Kapatma Solüsyonu

PBS : 1 ml

Gliserin : 9 ml karıştırılmıştır.

#### **Testin uygulanması**

**a-** Köpek serumları sulandırma plaklarında PBS ile 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 ve üzeri oranlarında sulandırılmış ve her bir sulandırmadan 1 damla antijen kaplı yerlerine aktarılmıştır. 1/128 ve üzeri dilüsyonları çalışılmıştır.

**b-** Lamalar 37°C'lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş ve süre sonunda PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkanıp oda ısısında kurutulmuştur.

**c-** FITC işaretli tavşan anti-dog IgG 1:200 oranında sulandırılarak kullanılmış ve her deliğe bir damla konulmuştur.



**d-** Lamlar 37°C'lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır.

**e-** Lamlar kurumadan kapatma solüsyonu damlatılmış ve lamel kapatılmıştır.

**f-** Lamlar, Floresan mikroskopunda (Olympus BHS<sub>50</sub>) X 20 objektifde ışık kaynağı olarak HBO 50 cıva buharlı ampul ve mavi bant filtre seti kullanılarak (Uyarma Filtre Seti 490) engelleme filtresi 510 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

## **2.2.2. DNA İZOLASYONU ve PZR (polimerize zincir reaksiyonu)**

### **2.2.2.1. DNA izolasyonu**

Köpeklerden alınan kan örneklerinin öncelikle DNA ekstraksiyonları yapılmıştır. Bunun için 69504 Katalog nolu Qia-gen DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılmıştır. Efendorfa 20'şer µl Proteinaz K konulduktan sonra üzerine 50-100 µl çökeltilmemiş kan ve 220 µl PBS ilave edilmiştir. 200 µl AL buffer eklenmiş, 56 °C' de 10 dk. bekletilmiştir. 200 µl etanol ekleyip, vortekslenmiştir. Tamamını toplama tüpüne alıp 8000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılarak yeni toplama tüpüne konulduktan sonra 500 µl AW1 buffer eklenmiş ve 8000 rpm 1 dk. santrifüj edildikten sonra yeni tüpe alınmış ve AW2 bufferdan 500 µl konularak, 14000 rpm 3 dk. Santrifüj edilmiştir. Santrifüj tüpüne filtre kısmı yerleştirilmiştir ve üzerine 200 µl (100 µl) AE buffer eklenmiştir. Oda ısısında 1 dk. bekletildikten sonra, 8000 rpm 1 dk. santrifüj edilmiştir.

### **2.2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) Testi**

LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) (forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', reverse primer; 5'- GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3', Fluorescein probe; 5'- CCGTTTATACAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT – FI-3'; LCR640 probe; 5'- LCR640- GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-P-3') ile real time PZR primerleri ve problemleri birlikte kullanılarak ITS1 bölgesinde, tür ayrımı yapılmıştır.

Real time online PZR, 50 ng genomik DNA, her bir primerden 400 nM (200-bp'ye yükseltildi), her bir proba 400 nM, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1.6 µl, LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes kitinden (Roche Applied Science) 2 µl ve PZR grade water (Roche Applied Science) 3,4 µl eklenerek, 20 µl total hacme ulaştırıldı. PCR amplifikasyonu şöyle yapıldı; 10 dakika 95°C'de, bunu takiben 45 denatürasyon siklusları 95°C'de 10 dakika 50°C'de 10 saniye ve 72°C'de 10 saniye, erime basamağında 95°C'de 0 saniye, 40 °C'de 10 saniye, 80 °C'de 0 saniye, 50°C'de 10 saniye ve soğutma 40 °C'de 30 saniye tutularak yapıldı. Deneme, Charalampos Aslandis ve Gerd Schmitz (Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg, Germany) protokolüne göre LightCycler™ cihazı (Roche Applied Science; Mannheim, Germany) ile gerçekleştirildi. Tür ayrımı kendine özgü erime sıcaklıklarına göre tespit edildi. *Leishmania major* örnekleri 54°C'de, *Leishmania tropica* örnekleri 61°C'de ve *Leishmania infantum* örnekleri 66°C'de pik seviyeye ulaşmış olarak değerlendirildi.

### **2.2.3 Sonuçların Yorumlanması**

Parlak sarı yeşil floresans pozitif, soluk veya hiç sarı yeşil floresans görülmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir. Floresans veren en yüksek serum dilüsyonu, her bir örneğe ait antikor titresi olarak değerlendirilmiştir. Immuno floresan antikor titresi 1/128 ve üzeri olan serum örnekleri KVL için pozitif olarak kabul edilmiştir (Abranches ve ark 1991). PZR açısından örnekler *L. infantum*, *L. major* ve *L. tropica* açısından değerlendirilmiştir.

### **2.2.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Köpeklerde *L. infantum* seropozitivitesi ile yaş, cinsiyet, ırk, aktivite, kıl örtüsü, bulunduğu ortam arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 software programında non-parametrik ki-kare testiyle yapılmış ve aralarındaki korelasyonlar Pearson yöntemine göre belirlenmeye çalışılmıştır.  $p < 0,05$  değerlerindeki parametreler istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Aydın/Kuşadası bölgesinde, leishmaniasise yönelik herhangi bir belirti göstermeyen ve sahiplerinin de izinleriyle kanları alınan köpeklerin, bakım ve beslenme koşullarının iyi olduğu belirlenmiştir. Bir çoğunun bilinçli ve düzenli beslendiği, aşılamalarının takip edildiği ve gerekli durumlarda veteriner hekime başvurduğu belirlenmiştir.

#### 3.1. IFAT Sonuçları

Çalışmada örneklerin alındığı yerler, araştırılan köpek sayısı, seropozitif köpek sayıları ve yüzdeleri Çizelge 3.1.1.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, anti-*L.infantum* antikorlarının araştırılması için kullanılan 100 köpeğin 23 (%23)'ünün seropozitif olduğu belirlenmiştir. Seropozitivite gösteren köpeklerin anti-*L.infantum* antikorlarının titreleri 1/128 ve 1/256 arasında olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 3.1.1.** Çalışmanın yapıldığı yerleşim alanı, incelenen köpek sayısı, seropozitif köpeklerin sayısı ve yüzde oranı

Örnekleme Yeri	İncelenen Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)
Kuşadası/AYDIN	100	23	%23

Köpeklerin yaş grubu ile *L. infantum* seropozitifliği arasındaki dağılımı Çizelge 3.1.2.'de gösterilmiştir. Çalışmada, örnek alınan köpekler yaş gruplarına göre 1-3 yaş arası ve 4-12 yaş arası olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışmada, 1-3 yaş arasında incelenen 55 köpeğin 11 (%20)'i seropozitivite gösterirken, 4-12 yaş arasında incelenen 45 köpeğin 12 (%26,6)'sinin seropozitif olduğu belirlenmiştir. Anti-*L.infantum* antikorlarının seropozitivitesi ile yaş arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) bir farklılık bulunmamıştır,

**Çizelge 3.1.2.** Köpeklerin Yaş Grubu ve Anti-*Leishmania infantum* Antikorları Arasındaki Dağılım

Yaş grubu	İncelenen Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)
1-3 Yaş Arası	55	11	% 20
4-12 Yaş Arası	45	12	% 26,6
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin cinsiyeti ile *L. infantum* seropozitivite arasındaki dağılımı Çizelge 3.1.3.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, incelenen 56 erkek köpeğin 14 (%25)'ünün, 44 dişi köpeğin 9 (%20,5)'unun anti-*L.infantum* antikorları yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. *L.infantum* seropozitivitesi ile cinsiyet arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.3.** Köpeklerde Cinsiyet ve Anti-*Leishmania infantum* Antikorları Arasındaki Dağılım

Cinsiyet	İncelenen Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Sayısı	Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)
Erkek	56	14	%25
Dişi	44	9	%20,5
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin ırkı ile *L.infantum* seropozitivitesi arasındaki dağılımı Çizelge 3.1.4’de sunulmuştur. Bu çalışmada, incelenen 32 kırma ırkın 10 (% 31,25)’unun, rotweiler ırkı 17 köpeğin 7 (%41,2)’sinin, husky ırkı 12 köpeğin 2 (%17)’sinin, kangal ırkı 8 köpeğin 2 (%25)’sinin, golden retriever ırkı 4 köpeğin 1(%25)’inin, Alman kurdu 3 köpeğin 1 (%33.3)’inin anti-*L.infantum* antikorları yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. *L.infantum* seropozitivitesi ile ırk arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.4.** Köpeklerin Irk ve Anti-*Leishmania infantum* Antikorları Arasındaki Dağılım

<b>İrk</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)</b>
Kırma Irk	32	10	% 31,25
Rottweiller	17	7	% 41,2
Terrier	14	-	-
Husky	12	2	% 17
Kangal	8	2	% 25
Golden Ret.	4	1	% 25
Alman Kurdu	3	1	% 33,3
Boxer	2	-	-
Labrador	4	-	-
Cocker	1	-	-
Papillon	1	-	-
Doberman	1	-	-
Pointer	1	-	-
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin aktiviteleri ile *L. infantum* seropozitivitesi arasındaki dağılım Çizelge 3.1.5’de özetlenmiştir. Bu çalışmada, incelenen 22 ev köpeğin 2 (%9,1)’sinin, 78 koruma köpeğinin 21 (%27)’inin anti-*L.infantum* antikorları yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. *L. infantum* seropozitivitesi ile köpeklerin aktiviteleri arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.5.** Köpeklerin Aktiviteleri ile Anti-*Leishmania infantum* Antikorları Arasındaki Dağılım

<b>Aktivite</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)</b>
Ev Köpeği	22	2	% 9,1
Koruma Köpeği	78	21	%27
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin kıl örtüleri ile *L. infantum* seropozitifliği arasındaki dağılımı Çizelge 3.1.6’de gösterilmiştir. Bu çalışmada, incelenen 16 kısa tüylü köpeğin 3(%19,75)’ünün, 40 uzun tüylü köpeğin 6(%15)’sının 44 normal tüylü köpeğin 14(%32)’ünün anti-*L.infantum* antikorları yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. *L.infantum* seropozitivitesi ile köpeklerin kıl örtüleri arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.6.** Köpeklerin Kıl Örtüleri ile Anti-*Leishmania infantum* Antikorları Arasındaki Dağılım

<b>Kıl Örtüsü Durumu</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)</b>
Kısa Tüy	16	3	% 19,75
Uzun Tüy	40	6	% 15
Normal Tüy	44	14	% 32
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin buldukları ortam ile *L. infantum* seropozitifliği arasındaki dağılım Çizelge 3.1.7.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, incelenen gece-gündüz evde bulunan 11 köpeğin hiç birinde Anti- *L. infantum* antikoru yönünden seropozitiviteye rastlanmadığı, gece-gündüz bahçede duran 60 köpeğin 15(25)inin, gece-gündüz sokakta bulunan 10 köpeğin 2(%20)'sinin, gündüz bahçe-gece evde bulunan 7 köpeğin 1(%14,29)'inin, gündüz sokak-gece evde bulunan 2 köpeğin 1(%50)'inin, gündüz sokak-gece evde bulunan 10 köpeğin 4(%40)'ünün anti-*L.infantum* antikoru yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. *L.infantum* seropozitivitesi ile köpeklerin kıl örtüleri arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.7.** Köpeklerin Buldukları Ortam ile Anti-*Leishmania infantum* antikoru Arasındaki Dağılım

<b>Bulduğu Yer</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)</b>
Gece-Gündüz Ev	11	-	-
Gece-Gündüz Bahçe	60	15	%25
Gece-Gündüz Sokak	10	2	%20
Gündüz Bahçe-Gece Ev	7	1	%14.29
Gündüz Sokak-Gece Ev	2	1	%50
Gündüz Sokak-Gece Bahçe	10	4	%40
<b>Toplam</b>	100	23	% 23

Köpeklerin antiparaziter olarak deltametrin içeren bant kullanımı ile *L. infantum* seropozitifliği arasındaki dağılımı Çizelge 3.1.8.'de gösterilmiştir. Bu çalışmada, incelenen 9 bant kullanan köpeğin hiç birinde seropozitiviteye rastlanmamışken, antiparaziter bant kullanmayan 91 köpeğin 9 (%9,89)'unun anti-*L.infantum* antikorları yönünden seropozitif oldukları belirlenmiştir. Antiparaziter bant kullanmayan köpeklerde seropozitivite oranının yüksek çıkmasına rağmen *L.infantum* seropozitivitesi ile deltametrin içeren antiparaziter bant kullanımı arasında istatistiksel açıdan önemli ( $p>0,05$ ) düzeyde bir farklılığın bulunmadığı saptanmıştır.

**Çizelge 3.1.8.** Köpeklerin Antiparaziter Bant Kullanımı ile Anti-*Leishmania infantum* antikorları arasındaki dağılım

<b>Antiparaziter Bant Kullanımı</b>	<b>İncelenen Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Sayısı</b>	<b>Seropozitif Köpek Yüzdesi (%)</b>
Kullanan	9	0	% 0
Kullanmayan	91	9	% 9.89
<b>Toplam</b>	100	23	% 23



### 3.2. Polimerize Zincir Reaksiyon Test sonuçları

Her bir hayvana ait EDTA'lı tüplere alına periferel kan örneklerinde DNA izolasyonu yapılmış ve *L. infantum*'a özgü primer ve prob ile bu enfeksiyonun araştırılması için kullanılan 100 köpeğin gerçek zamanlı PZR testi ile köpeklerin hiç birinde *L.infantum* DNA'sı pozitif bulunmamıştır (Çizelge 3.2.1).

**Çizelge 3.2.1.** Çalışmanın Yapıldığı Yerleşim Alanı, İncelenen Köpek Sayısı, PZR Pozitif Köpeklerin Sayısı ve Yüzde Oranı

Örnekleme Yeri	İncelenen Köpek Sayısı	PZR pozitif Köpek Sayısı	PZR Pozitif Köpek yüzdesi (%)
Kuşadası/AYDIN	100	0	0

## 4. TARTIŞMA

Köpeklerde leishmaniasisin ekolojisinin ve epidemiyolojisinin özellikle endemik bölgelerde bilinmesi hasatlığın kontrolo için gereklidir. Leishmaniasis ile enfekte köpekler insan visseral leishmaniasis ve duyarlı hayvanlar için önemli rezervuardırlar (Moshfe ve ark 2009, Dantas-Tores ve ark 2006). Visseral leishmaniasisin endemik olduğu bölgelerde *L. infantum* ile enfekte köpeklerin birçoğunun asemptomatik olduğu rapor edilmiştir (Dantas-Tores ve ark 2006). Asemptomatik köpeklerin *leishmania*'yı kum sineklerine bulaştırabildikleri ve bulaşmasının önlenmesi için KVL'in tanısının mümkün olduğunca erken yapılması gerekmektedir.

Serolojik çalışmalarda, *L. infantum* ile enfekte asemptomatik köpeklerin belirlenmesine yönelik sınırlı bilgiler olmasına rağmen hastalığın belirlenmesinde IFAT en sık olarak kullanılan tanı yöntemlerindedir (Miro ve ark 2007). Anti-*L. infantum* antikörlerinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada, IFAT 1/128 ve üzeri olan köpek serumlarının seropozitif olarak kabul edildiği rapor edilmiştir (Abranches ve ark 1991). Bu çalışmada, IFAT kullanılarak yapılan serolojik araştırmada asemptomatik 100 köpeğin 23 (%23)'ünde anti-*Leishmania* antikör titresinin 1/128 ve 1/256 olduğu tespit edilmiştir.

Köpeklerde visseral leishmaniasis üzerine yapılan seroepidemiolojik araştırmalarda, seropozitif köpeklerin yüksek bir oranının yıllarca leishmaniasise ilişkin klinik bulguları göstermediği rapor edilmiştir (Solano-Gallego ve ark 2001, Dantas-Tores ve ark 2006). Köpeklerde visseral leishmaniasisin Akdeniz ülkelerinin çoğunda endemik olarak seyrettiği ve hastalığın seroprevalansının %10 ile %37 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Moshfe ve ark., 2009). Gradoni ve ark. (1980), Ciaramella ve ark. (1997), Ferrer (1999) tarafından yapılan saha çalışmalarında leishmania seropozitif köpeklerin %50'sinden daha fazlasının asemptomatik olduğu belirlenmiştir. Acedo Sanchez ve ark. (1996), Papadopoulou ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmalarda, asemptomatik köpeklerde KVL'in prevalansının %5,3 ile %24,8 arasında değiştiği rapor edilmiştir. Miror ve ark. (2007) Madrid'de sokak köpekleri arasında yaptıkları bir çalışmada, leishmaniasis ile ilişkili herhangi bir klinik bulgu göstermeyen köpeklerde hastalığın seroprevalansının %75,2 olduğunu rapor etmişlerdir. İran'da asemptomatik köpekler üzerinde yapılan bir çalışmada 20 hayvanın 6 (%30)'sının seropozitif olduğu belirlenmiştir (Rassi ve Azizi 2004). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada,

IFAT yöntemi ile serolojik olarak incelenen 1638 asemptomatik köpeğin 366 (%22,4)'sının seropozitif olduğu belirlenmiştir (Sideris ve Papadopoulou 1998). Yunanistan'da yapılan diğer bir çalışmada ise 1200 adet asemptomatik köpekten alınan kan örneklerinin IFAT ile incelenmesinde 293 (%24,4) adet köpeğin seropozitif olduğu belirlenmiştir (Papadopoulou ve Kostaula 2004). Bulgaristan'da yapılan bir çalışmada, 120 sağlıklı köpeğin serumları IFAT ile incelenmesi sonucunda hiçbir köpekte Anti- *L.infantum* yönünden seropozitivite saptanmamıştır (Papadogiannakis ve Kontos 2005). Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada, toplam 306 sağlıklı köpeğin 46 (%15)'sının seropozitif olduğu rapor edilmiştir (Zivicnjak ve ark 2005). Bu çalışmada, hastalığın seroprevalansının Sideris ve Papadopoulou (1998), Papadopoulou ve Kostaula (2004)'nın yapmış oldukları çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Diğer araştırmacıların elde ettikleri seroprevalans sonuçlarına göre bu çalışmada leishmania seropozitivitesinin düşük yada yüksek oranda seyretmesi bölgesel farklılıkla, immün yanıtla, tanıda kullanılan testin türüyle, enfekte vektörün bulunması ve rezervuarların varlığıyla ilişkili olabileceğini düşündürebilmektedir. Cabral ve ark (1998) leishmania yönünden asemptomatik seropozitif hayvanların yüksek oranda seyretmesini hastalığın ortaya çıkışını sınırlayan hücrel immün yanıtın gelişmesiyle ilişkilendirilebileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre Aydın/Kuşadası ilçesinde yaşayan asemptomatik köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonu insan ve diğer duyarlı hayvanlar için risk oluşturabileceği kanısındayız.

*L. Infantum* prevalansı köpeklerin yaş, cinsiyet, ırk, aktiviteleri, kıl örtüsü ve bulunduğu ortam gibi bir takım faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Zivicnjak ve ark 2005). Yaşın köpeklerde leishmania enfeksiyonu için bir risk faktörü olup olmadığına dair farklı görüşler ileri sürülmüştür. Bazı araştırmacılar (Amela ve ark 1995, Acedo-Sanchez ve ark 1996, Miranda ve ark 2005, Dantas-Torres ve ark 2006) köpeklerde leishmania enfeksiyonu için yaşın bir risk faktörü olabileceğini, bazı araştırmacılar da (Papadopoulou ve ark 1998, Fakhar ve ark 2011) yaşın leishmania enfeksiyonu için bir risk faktörü oluşturmadığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada, leishmania enfeksiyonunun 4 aylık köpekler ile 10 yaşdan daha yaşlı hayvanlarda daha sık görüldüğü belirlenmiştir (Miro ve ark 2007). Dantas-Torres ve ark (2006) tarafından yapılan çalışmada, leishmania seropozitivitesinin 1 yaş ve 1 yaşın altındaki köpeklerde daha fazla görüldüğünü rapor etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, 3 yaş altı köpeklerde ve 8-10 yaş arası köpeklerde leishmaniasisin en yüksek orana çıktığı rapor edilmiştir (Amela ve ark 1995, Acedo-Sanchez ve ark 1996, Miranda ve ark 2005). Yunanistan da yapılan bir çalışmada, 3-5 yaşlı köpeklerde seropozitivitenin yüksek olduğu belirlenmiş, fakat aynı çalışmada yaş ile seropozitivite arasında bir farklılık bulunmamıştır

(Papadopoulou ve ark 1998). Bazı araştırmacılara (Leonidas ve ark 2002) göre yaş ve seropozitivite arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir. Fakhar ve ark (2011) yaptıkları bir çalışmada 1-5 yaş arası köpeklerde enfeksiyonun yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak yaş ve enfeksiyon arasında bir ilişkinin bulunmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada, asemptomatik köpeklerde en yüksek seropozitivite oranı 4 ile 12 yaş arası köpeklerde görülmesine rağmen yaş ile seropozitivite arasında istatistiksel açıdan önemli düzeyde bir ilişkiye rastlanmamıştır.

*Leishmania infantum* ile enfekte köpeklerde cinsiyetin hastalık için önemli bir risk faktörü olmadığı rapor edilmiştir (Miro ve ark 2007, Dantas-Torres ve ark 2006). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda hastalığın prevalansının erkek köpeklerde dişi köpeklere göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Fisa ve ark 1999, Zaffaroni ve ark 1999). Nitekim bu durum dişi köpeklerde gebelik ve emzirme dönemimde ölüm riskinin daha fazla olması ile ilişkilendirilebilmektedir (Fisa ve ark 1999). Yapılan bir çalışmada, Hırvatistan'da leishmania seropozitif erkek köpeklerin sayısının dişi seropozitiflerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Zivicnjak ve ark 2005). Papadopoulou ve ark (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, *L. infantum* ile enfekte köpeklerde seropozitivite ve cinsiyet arasında hiçbir korelasyonun bulunmadığı rapor edilmiştir. İnan'da yapılan bir çalışmada köpeklerde leishmania enfeksiyonunun erkek köpeklerde %6,5 dişilerde %4,1 oranında görülmesine rağmen cinsiyet ile seropozitivite arasında istatistiksel açıdan önemli düzeyde bir farklılık bulunmamıştır (Fakhar ve ark 2011). Bu alışmada, *L. infantum* ile enfekte asemptomatik köpeklerde en yüksek seroprevalans erkekler arasında bulunurken, hem erkek hemde dişi seropozitivite arsında cinsiyet ile ilişkili herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

Bütün köpek ırkları teorik olarak *Leishmania* enfeksiyonuna karşı duyarlıdırlar. Bir alışmada İbizian hound ırkı köpeklerin *Leishmania* enfeksiyonuna karşı daha dirençli oldukları rapor edilmiştir (Solano-Gallego ve ark 2000). Diğer çalışmada ise boxer ve cocker ırkı gibi ırkların kırma ırklara göre *L. infantum* enfeksiyonuna karşı daha duyarlı oldukları belirlenmiştir (França-Silva ve ark 2003). Miranda ve ark (2005) tarafından yapılan bir çalışmada genel köpek populasyonlarıyla karşılaştırdıklarında köpek leishmaniasisine karşı Alman oban köpeği, rottweiler ve boxer ırkı köpeklerin daha eğilimli oldukları rapor edilmiştir. Sideris ve Papadopoulou (1998) kırsal bölgede yaşayan Alman oban köpeği ve melez ırkı köpeklerin diğer ırklara göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek sayıda seropozitivite gösterdiğini saptamışlardır. Papadopoulou ve Kostaula (2004) tarafından miks

ırkların hastalığa karşı direncinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, Leishmania seropozitif köpeklerin rottweiller, Alman kurt köpeği ve kıрма ırkı köpeklerde daha yüksek oranda görüldüğü belirlenmiştir. Bu duru araştırmacıların köpek leishmaniasisi seroprevalansı üzerine yaptıkları çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Sideris ve Papadopoulou 1998).Leishmaniasise karşı doğal dayanıklılık köpeklerin genetik yapısıyla ilişkilendirilebilmiştir (Miranda ve ark 2005, Sanchez-Robert ve ark 2005). Bazı ırk köpeklerde Leishmania enfeksiyonuna karşı doğal dayanıklılığın köpeklerin genetik yapısıyla ilişkili olabileceği kanısındayız (Sanchez-Robert ve ark 2005).

Köpeklerin gün boyu ve gece boyunca buldukları yer göz önünde bulundurulabilecek önemli noktalardan biridir. Sokakta yaşayan köpeklerde seropozitivitenin sahipli köpeklere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Miro ve ark 2007). Bu durum, sokak köpeklerinin kum sineği daha fazla ısırığına maruz kalması ile açıklanabilmektedir. Bu çalışmada, 11/100 (%11) gece- gündüz evde olup seropozitivite 0 (%0), 60/100 (%60)'ı gece gündüz bahçede olup seropozitivitesi 15 (%25), 10/100 (%10) gece-gündüz sokakta olup seropozitivitesi 2 (%20), 7/100 gündüz bahçe-gece evde olup seropozitivitesi 1 (%14,29), 2/100 (%2) gündüz sokak-gece evde olup seropozitivitesi 1(%50), 10/100 gündüz sokak-gece bahçe de olup seropozitivitesi 4(%40) olarak saptanmıştır.

Köpeklerin görevleri ve anti-*L.infantum* antikorları arasındaki ilişki açısından düşünüldüğünde; Zivicnjak'a göre incelenen 306 köpekten, avcı köpeklerin %16,91 inin, bekçi köpeklerinin %10,58 inin, ve petlerin ise %13,33'ünün seropozitif olduğu belirlenmiştir (Zivicnjak ve ark 2005). Bu çalışmada incelenen 100 köpekten, ev köpeği olarak bakılan 22 köpeğin 2 (% 9,09) si ve bekçi köpeği olarak bakılanların 78 köpeğin 21 (%26,92)'i seropozitif olarak bulunmuştur. Bu durum, bekçi olarak bakılan köpeklerin bahçe veya sokakta kum sineğine daha fazla maruz kalmasıyla ilişkilendirilebilir.

KVL' de PZR sonuçları ile serolojik sonuçlar arasında uyumluluk konusunda açıklanmış net bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda PZR tekniği ile negatif olan köpeklerin Leishmania yönünden seropozitif oldukları veya PZR yöntemi ile pozitif köpeklerin Leishmania yönünden seronegatif oldukları belirlenmiştir ( Olivia ve ark 2006). Yapılan bir çalışmada PZR tekniği ile test edilen 26 köpeğin yalnızca 1 inin Leishmania yönünden pozitif olduğu belirlenirken diğer sağlıklı köpeklerin seropozitif oldukları tespit edilmiştir (Berrahal ve ark 1996). Bir başka çalışmada ise Leishmania yönünden seropozitif

tespit edilen köpeklerin PZR tekniği ile negatif oldukları rapor edilmiştir (Solano-Gallego ve ark 1001). PZR yöntemi aktif visseral leishmaniosiste yüksek sensitivite ve spesifite göstermektedir fakat asemptomatik olgularda spesifik olarak değerlendirilmeyebilir (Alborzi 2008). Alborzi (2008) leishmaniasisin endemik olduğu bir bölgede yapmış olduğu bir çalışmada, PZR, ELISA, IFAT, LST gibi yöntemlerle incelenen 388 köpeğin; 95 (%24.5)i PZR açısından pozitif, 212 (%54.4) si IFAT açısından pozitif ve 132 (%34) si LST açısından pozitif bulunmuştur. Bu çalışmaya göre PZR testinin aktif olmayan asemptomatik vakalarda spesifik olmadığı belirlenmiştir. Negatif PZR ile negatif ve IFAT ile pozitif çıkması, bir cross-reaksiyon sonucu (tuberkülozis, toksoplazmosis, brucellosis) ya da retiküloendotelyal sistemde persiste bir paraziter enfeksiyon gibi sebeplerden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Alborzi, 2008). Martin-Sanchez (2004) tarafından İspanya da yapılan bir çalışmada, incelenen 139 köpeğin 95 (% 68)'inin 1/20 ve 1/320 arasında seropozitif iken, sadece 23 (% 16)' ünün PZR açısından pozitif olduğu saptanmıştır.

Köpeklerde Leishmaniasis yönünden seropozitif bulunan köpeklerin PZR tekniği ile negatif bulunması enfeksiyonu geçirdikten sonra parazitolojik olarak artan iyileşmeyle, parazitin kemik iliğinden başka diğer dokularda bulunmaması ile ilişkilendirilebilmektedir (Leonidas ve ark 2002). Visseral leishmaniasisli köpeklerde PZR sonuçları alınan örneklerle de ilişkilendirilmiştir. Nitekim bir çalışmada kanın rezervuar organdan ziyade parazitin transportu olarak önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (Manna ve ark 2006). Diğer bir çalışmada ise, kanın deri ve lenf yumrularıyla karşılaştırılması, kanın Leishmaniasis için uygun bir örnek olmadığı rapor edilmiştir (Strauss Ayali ve ark 2004). Bu çalışmada seropozitif bulunan asemptomatik köpeklerin kanda PZR ile negatif oldukları belirlenmiştir. Bu durum araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir.

## 5. SONUÇ

Kuşadası/Aydın ilçesinde sahipli asemptomatik köpeklerde, anti-*L.infantum* antikorlarının saptanması için alınan kan örneklerinden elde edilen serumların IFA testi ile çalışılması sonucunda 100 köpeğin 23 (%23)'ünün seropozitif olduğu belirlenirken, kanda gerçek zamanlı PZR testi ile köpeklerin hiçbirinde *Leishmania* DNA'sı pozitif bulunmamıştır. *Leishmania infantum* seropozitivitesinin bahçede ve sokakta vakit geçiren köpeklerde, evde yaşayan köpeklere göre daha göre daha yüksek sıklıkla görülmesi muhtemelen *Leishmania. infantum* ile enfekte kum sineklerine daha fazla maruz kalma ile ilişkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, elde edilen verilere göre leishmaniasisin endemik olarak seyrettiği Aydın/Kuşadası ilçesinde *Leishmania infantum* ile enfekte asemptomatik köpeklerin insanlar ve duyarlı hayvanlar açısından risk faktörü olabileceği ve elde edilen verilerin gelecekte yapılacak çalışmalar için referans olarak kullanılabilceği kanısındayız.

Ülkemizde veteriner hekimlerin bu hastalığın bulaşması ve korunması hakkında bilgilendirilmesi, asemptomatik leishmaniasisin köpekler tarafından taşınması ve insana bulaşma açısından risk oluşturması ve hastalığın ulusal ekonomideki kayıpları düşünüldüğünde hastalığın saptandığı bölgelerde korunma önlemlerinin alınması, ayrıca semptomatik ve özellikle asemptomatik köpeklerin tespiti amacıyla prevelans çalışmalarının düzenli yürütülmesinin gerekli olduğu kanısındayız.

## ÖZET

### **Leishmaniasisin Endemik Olduğu Aydın/Kuşadası'nda Asemptomatik Köpeklerde *Leishmania infantum* Enfeksiyonunun Araştırılması**

Bu çalışmada, Kuşadası/Aydın ilçesindeki sağlıklı köpeklerde *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, genel olarak klinik olarak sağlıklı görünen 100 köpek değerlendirilmiştir. Her bir hayvana ait serum örnekleri anti-*L. infantum* antikollarının belirlenmesi için ticari bir kit (Qia-Gen) kullanılarak indirekt florasan antikor testi (IFAT) ve her bir hayvana ait EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinde DNA izolasyonu yapılmış ve *Leishmania. infantum*'a özgü primer ve prob ile gerçek zamanlı PZR testi uygulanmıştır. *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması için kullanılan 100 köpeğin 23 (%23)'ünün IFAT yöntemi ile seropozitif olduğu belirlenirken, gerçek zamanlı PZR testi ile köpeklerin hiçbirinde *Leishmania* DNA'sı pozitif bulunmamıştır. Seropozitif bulunan köpeklerin 9 (9/44 %20,45)'unu dişi, 14(14/56 %25)'ünü erkek köpekler; 11 (11/55 %20)'ini 1-3 yaş arası, 12 (12/45 %26,6)'sini 4-12 yaş arası köpekler; 2 (2/22 % 9,09)'sini ev köpeği, 21 (21/78 %26,92)'ini koruma köpekleri; 3 (3/16 %19,75)'ünü kısa tüylü köpekler, 6 (6/40 %15)'sini uzun tüylü köpekler, 14 (14/ 44 %31,82)'ünü normal tüylü köpekler; 15(15/60 %25)' ini gece-gündüz bahçede duran köpekler, 2(2/10 %20)'sini gece-gündüz sokakta olan köpekler, 1 (1/7 %14,29)'ini gündüz bahçe-gece evde olan köpekler, 1 (1/2 %50)'ini gündüz sokak-gece evde bulunan köpekler oluşturmuştur. Köpeklerin yaşları, cinsiyetleri ve ırkları ile *Leishmania* seropozitivite arasında herhangi bir istatistiksel korelasyon bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak, elde edilen verilere göre leishmaniasisin endemik olarak seyrettiği Aydın/Kuşadası ilçesinde *Leishmania infantum* ile enfekte asemptomatik köpeklerin insanlar ve duyarlı hayvanlar açısından için risk faktörü olabileceği kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** Asemptomatik; Köpek; *Leishmania infantum*; PZR; Seroprevalans



## SUMMARY

### **The research for *Leishmania infantum* Infection of Asymptomatic Dogs at Aydın/Kuşadası where leishmaniasis is endemic**

The aim of this study is researching of *L. Infantum* in healthy dogs in Aydın/Kuşadası. In the study, 100 apparently healthy dogs were evaluated clinically in general. Each of the serum samples of animals were applied Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) to determine anti-*L. Infantum* antibodies and each animals peripheral blood samples taken into tubes containing EDTA were isolated DNA and real-time PCR test was applied with specific primers and probe of *L. infantum*. From examined 100 dogs to *L. infantum* detection, 23 (23%) were determined to be seropositive by IFAT method, none of the dogs DNA's were found positive with real-time PCR test. In detected seropositive dogs contain 9 (9/44 %20,45) female, 14(14/56 %25) male; 11 (11/55 %20) between 1-3 age, 12 (12/45 %26,6) between 4-12 age; 2 (2/22 % 9,09) pet dog, 21 (21/78 %26,92) guard; 3 (3/16 %19,75) short hairy, 6 (6/40 %15) long hairy, 14 (14/ 44 %31,82) normal hairy; 15(15/60 %25) are live in garden day-night, 2(2/10 %20) are live in street day-night, 1 (1/7 %14,29) is day garden- night home, 1 (1/2 %50) is day street-night home. There was not statistically significant difference among seropositivity and age, breed, gender, hair length, place ( $p>0,05$ ). As a result, according to data in Aydın/Kuşadası, where canine leishmaniasis is endemic, infected by *L. Infantum* asymptomatic dogs are may be a risk factor for the people and sensitive animals.

**Key Words:** *Leishmania infantum*; Asymptomatic; Dog; Seroprevalence; PCR.

## KAYNAKLAR

Abranches P, Silva-Pereira MC, conceicao-Silva FM,. Santos-Gomes GM,. Janz JG; Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection *Parasitology* 1991; 77(4): 557-561

Acedo-Sanchez C, Martin-Sanchez J, Velez-Bernal ID, Sanchis-Marin MC, Louassini M, Morillas-Marquez F. Leishmaniasis eco-epidemiology in the alpujarra region (Granada Province, southern Spain) *International Parasitology* 1996; 26. 303-310.

Aisa J, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, De colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M, Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998 ; 58(2): 154-159.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J, Canine leishmaniasis *Advences in Parasitology*, 2004; 57:1–88.

Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C, Alvar J. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol.* 1995 Apr;11(2):157-61.

Balcioğlu I C, Ertabaklar H, Paşa S, Ozbel Y, Toz SO, *Turkiye Parazitoloji Dergisi* 2009, 33(1):4-7

Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999;59(5):722-755.

Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2000; 106(4):315-324.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology* 2000;

165(2):969-977.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996;55:273-277.

Blavier A, Keroack S, Ph. Denerolle, Goy I, Thollot, L Chabanne, JL Cadore and G Bourdoiseau Department of Small Animal Internal Medicine; Department of Parasitology, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon Marcy l'Etoile, France 2001; 83, 69280.

Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in dog. *Journal of Small Animal Practice* 1988;38:29-30.

Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* 1998; 15;76(3):173-80.

Campino L, G Santos-Gomes, MJ Rica-Capela, S Cortes, P. Abrahanches. Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 2000 ; 92; 269-275.

Ciaramella P, Oliva G, De luna R, Grandoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 1997;141: 539-543.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Diseases of Immunity. Cotran RS, Kumar V, Collins T (Eds.). *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia: WBS Saunders 1999; p.188-259.

Dantas-Tores F, Felino De Brito EM, Brandaho Filho PS, Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2006; 140; 54-60.

Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999;13(5):413-415.

Doğan N, Ozbel Y, Ozensoy S *Oxford Journals Medicine Journal of Tropical Pediatrics* 2005; Volume52, Issue3Pp. 212-217.

Engwerda CR, Kaye PM. Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunology Today* 2000;21:73–78.

Fakhar M, Motazedian MH, Hatam GR, Asgari Q, Kalantari M, Mohebbali M. *Ann Trop Med Parasitol*. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. 2008;102(7):577-83.

Ferrer L, Rabanal R, Domingo M, Ramos JA, Fondevila A. Identification of *Leishmania amastigotes* in canine tissues by immunoperoxidase staining. *Research in Veterinary Science* 1988;44:194-196.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Porus. Serological Diagnosis and Treatment of Canine Leishmaniasis. *Veterinary Record* 1995; 136:514-516.

Ferrer L. The pathology of canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, Intervet International BV 2002; 21-24.

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M. *Veterinary Parasitology*. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. 1999 15;83(2):87-97.

Font A, Durall N, Domingo M, Cardiac Tamponade in a Dog with Visceral Leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1991; 21: 481-487

Font A, X Roura, D Fondeville, JM Closa, J Mascort, L Ferrer, Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the Animal Hospital Association*., 1996; 32: 137.

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2003 Feb 13;111(2-3):161-73.

Gallego SL. *Leishmania infantum* and dog: Immunological and epidemiological studies about infection and diseases. Tesi doctoral, Facultat de veterinaria, Universitat autonoma de Barcelona, 2001.

Gangneux J.P, Sulahian A, Garn YJ, Farinotti R, Derouin F. Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996; 40(5):1214-1218.

Gradoni L, Pozio E, Bettini S, Gramiccia M., Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1980;74(3):421-2.

Gradoni L, Killick-Kendrick R. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europa. In: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International canine leishmaniasis forum ed, , Barcelona, Spain, 1999; 32-39 s.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. Research of Veterinary Science 2000; 9(3):249-253.

Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1992; 46(3):296-306.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A., Plevraki KG. Clinical Considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). Journal of the American Animal Hospital Association 1999; 35:376-383.

Kuman HA, Altıntaş N. Protozoon Hastalıklar. Ege Üniversitesi Basımevi. İzmir; 1996; p.79-100.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabberd E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of Six PCR Methods Using Peripheral Blood for Detection of Canine Visceral Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology 2002;40(1):210-215.

Lanotte G, JA Rioux, J Perieres, Y Vollhardt, Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental Stages and Clinical Characterization of Canine Leishmaniasis in Relation to Epidemiology. (author's transl). Annales de Parasitologie Humaine et Comparee. 1979; 54(3):277-295.

Lamothe J. Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. Journal of Small Animal Practice 2001; 42(4):170-175.

Lappin MR.. Protozoal Diseases. In: Small Animal Practise ed, Churchill livingstone: Morgan RV 1992; p.1231-1234.

Liste F, M Gascon, Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Rec.*, 1995 137(1): 23-24.

Mancianti F, Meciani N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. *American Journal of Veterinary Research* 1988;49(8):1409-1411

Mancianti F, S Sozzi, Isolation of *Leishmania* from a newborn puppy. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 89(4): 402.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*. 2006 Dec 20;142(3-4):271-80. Epub 2006 Aug 22.

Manson Barh PEC old World Leishmaniasis. In: C OX, f.e.g. (Ed) *Illustrated History of Tropical Disease*. The Welcome Trust, London, pp. 1996; 207-217.

Maroli M, Orndorff GR, Cooper B, Rankin SE. Leishmaniasis in Sicily (Italy): an investigation of the distribution and prevalence of phlebotomine sandflies in Catania Province. *Source Occupational Medicine Department, Naval Medical Center, Portsmouth, VA 23708, USA*. 2002;167(9):715-8.

Martín-Sánchez J, Pineda JA, Morillas-Márquez F, García-García JA, Acedo C, Macías J. Detection of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA in peripheral blood from asymptomatic individuals at risk for parenterally transmitted infections: relationship between polymerase chain reaction results and other *Leishmania* infection markers. *Am J Tropical Medical Hygena*. 2004 May;70(5):545-8.

Miranda JC, Ashford DA, Bozza M, Freire M, Sherlock I, Eulalio C, Lopes U, Fernandes O, Degraeve W, Barker RH Jr. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am J Tropical Medical Hygena*. 1995 Sep;53(3):251-5.

Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R. A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res*. 2007; 101(2):253-257.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo J, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1994; 88:491-493.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 2002; 18(9):399-405.

Moshfe A, Mohebbali M, Edrissian GH, Zarei Z, Akhouni B, Kazemi B, Jamshidi S, Mahmodi M, Canine visceral Leishmaniasis: Asymptomatic infected dogs are as a source of *L. Infantum* infection. 2009; *Acta Tropica* 112:101-105

Neogy AB, I Vouldoukis, OA Silva, Y Tselentis, JC Lascombe, T Segalen, D Rzepka, L Monjour, Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg.*,1992 ; 47(6): 772-777.

Noli C. Canine leishmaniasis. *Waltam Focus* 1999; 9(2):16-24.

Noli C, Auxilia S. Treatment of Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology* 2005;16:213-232.

Oliva G, Gradoni L, Ciaramella P, De Luna R, Cortese L, Orsini S, Davidson RN, Persechino A. Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1995;36(6): 1013-1019.

Oliveira, GGS, Santoro F , Sadigursky M; The Subclinical Form of Experimental Visceral Leishmaniasis on Dogs 1992.

Ozbel Y, Oskam L, Ozentoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Ozcel MA. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica* 2000;74(1): 1-6.

Ozensoy Toz S, Ozbel Y, Ertabaklar H, Yıldızlı N, Korkmaz M, Alkan MZ. Comparisons of clinical findings and serological data in the diagnosis of canine leishmaniasis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2005; 29:269-273.

Papadogiannakis I, Kontos V, Tsachev I, Ivanov A, Chakarova B, Stojanchev K, Peshev R. Seroepidemiology of *Leishmania* among Healthy Dogs in Bulgaria. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science* 2005; 31(1): 73-74.

Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G.J *Infect. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece.* 2004; 50(1):53-60

Pasa S, Toz SO, Voyvoda H, Ozbel Y. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology* 2005; 128(3-4):243-249.

Pennisi MG, De Majo M, Masucci M, Britti D, Vitale F, Del Maso R. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Record*, 2005; 156(11): 346-349.

Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F, Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 71(4); 1997; 263-271.

Rassi Y, Azizi K, Motazedian MH, Javadian E, Rafizadeh S, Fakhar M, Hatam GR. The Seminested PCR Based Detection of *Leishmania infantum* Infection in Asymptomatic Dogs in a New Endemic Focus of Visceral Leishmaniasis in Iran *Iranian Journal Arthropod-Borne Disease*, 2004; 1(1): 38-42

Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G, Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(9); 2931-2935.

Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. The 2nd International Forum on Canine Leishmaniasis. Spain. 2002.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 1999; 81:173-184.

Roura X, Sanchez A, Ferrer L, Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec.*, 1999; 144; 262 -264.

Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O.J Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *Hered.* 2005; 96(7):755-8.

Saridomichelakis M. N., Advances in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: Epidemiologic ve Diagnostic Implications. The Author Journal compilation, *Veterinary Dermatology* 2009; 20;471-489.

Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine and International Health* 2002;7(8):641-51.



Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E, Asymtomatic canine leishmaniasis in greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology* 1998; 15; 271-276.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In *Infectious diseases of the dog and cat* (eds), Greene CE. WB Saunders Co. Philadelphia 1990; p.769-777.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE (Ed.) *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia:WB Saunders; 1998; p.450–458.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizaian hound presents predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 2000; 90:37-45.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portús M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology* 2001; 96:265-276.

Soto M, JM Requena, L Quijada, C Alonso, Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(1); 58-63.

Strauss-ayali D, Baneth G. Canine visceral leishmaniasis. In “Recent Advances in Canine Infectious Diseases” 2000. Erişim: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Document No. A0107.0300, [Electronic Journal].

Unat EK. *Leyismanyaz’ların Tarihçesi*. “Leishmaniasis”. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını*. 1981; p.1-9.

Valladares JE., Riera C, Alberola J, Gallego M, Portus M, Cristofol C, Franquelo C, Arboix M. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 1998; 75(1):33-40.

Voyvoda H, Pasa S, Ozensoy Toz S, Ozbel Y, Ertabaklar H. Aydın’ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir’in Selçuk ilçesindeki köpeklerde *Leishmaniosis* ve *Dirofilariosis*’in prevalansı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 2004; 28:1105-1111.

Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. *Vet Parasitol. Epidemiological patterns of canine leishmaniasis [correction of leishmaniosis] in Western Liguria (Italy) 1999; 81(1):11-9.*

Zerpa O, Pratlong F, Ulrich M, Convit J. Isolation of *Leishmania infantum*, zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96(7):901-902.

Zivicnjak T, Martinković F, Marinculić A, Mrljak V, Kucer N, Matijatko V, Mihaljević Z, Barić-Rafaj R. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently healthy dogs in Croatia. *Veterinary Parasitology*. 2005; 15;131(1-2):35-43.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Bursa'da doğdum. İlkokul öğrenimimi Bursa I. Murat İlkokulunda, ortaokulu ve lise öğrenimimi Bursa Cumhuriyet Lisesinde tamamladım. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesine girerek 2004 yılında mezun olduktan sonra özel bir klinikte 2 yıl veteriner hekimlik görevi, daha sonra Bursa Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliğinde 2 yıl danışman veteriner hekimlik görevi yaptım. 2008 yılında Adnan Menderes Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programını kazanarak yüksek lisans tezime başladım. Şuan Kuşadası'nda eşimle birlikte kendimize ait bir klinikte çalışmaktayız.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen danışmanım Prof. Dr. Serdar PAŞA'ya,

Laboratuvarlarını bize açarak tanı yöntemlerinin uygulanmasının her aşamasında emeği geçen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL'e, Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA'ya, Doç. Dr. Bülent ULUTAŞ'a, Doç. Dr. Kerem URAL'a,

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizlerinin yapılmasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Erbay BARDAKÇIOĞLU'na,

Saha çalışmalarında beni yalnız bırakmayan ve yardımlarını esirgemeyen eşim Uzman Veteriner Hekim Çağdaş KÜRKLÜ'ye, laboratuvar çalışmalarında destek sağlayan Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencileri Tuğba OYUR ve Özge ERMİŞ'e,

Özellikle tez yazım aşamasında göstermiş oldukları yardım ve sabırdan dolayı İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı araştırma görevlileri, yüksek lisans ve doktora öğrencileri arkadaşlarıma, Araştırma Görevlisi Uzman Veteriner Hekim Abidin ATASOY'a ve Uzman Veteriner Hekim Serdar AKTAŞ'a,

Beni bugünlere getiren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve eşim Uzman Veteriner Hekim Çağdaş KÜRKLÜ'ye sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.