**T.C.**

**AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARAZİTOLOJİ (VETERİNER)**

**YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**MUĞLA YÖRESİ KÖPEKLERİNDE *LEISHMANIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER VE SEROLOJİK OLARAK BELİRLENMESİ**

**ALİ DİNC TOPÇUOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Serkan BAKIRCI**

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-170065 proje numarası ile desteklenmiştir.

**AYDIN–2020**

# KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Ali Dinç TOPÇUOĞLU tarafından hazırlanan “Muğla Yöresi Köpeklerinde *Leishmania* Türlerinin Moleküler ve Serolojik Olarak Belirlenmesi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/12/2019

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Üye (T.D.) | : Doç. Dr. Serkan BAKIRCI | Aydın ADÜ | …… |
| Üye | : Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ | Aydın ADÜ | …… |
| Üye | : Prof. Dr. Anıl İÇA | Kütahya Dumlupnar | …… |

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ……………..……..… tarih ve ………………………… sayılı oturumunda alınan …………………… nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

……………………

Prof. Dr. Cavit KUM

Enstitü Müdürü

# TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Serkan BAKIRCI’ya çok teşekkür ederim. Ayrıca bana her konuda yardımcı olan ve desteğini esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Prof. Dr. Hasan EREN, Prof. Dr. Nuran AYSUL, Prof. Dr. Süleyman AYPAK, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Bilgin BİLGİÇ, Dr. Öğr. Üyesi Metin PEKAĞIRBAŞ, Dr. Öğr. Üyesi Selin HACILARLIOĞLU ile Ayça AKSULU ve Hakan KANLIOĞLU’na teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince gösterdiği sabır, özveri ve destekleri için aileme ayrıca teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**

[KABUL VE ONAY SAYFASI i](#_Toc24920030)

[TEŞEKKÜR ii](#_Toc24920031)

İÇİNDEKİLER…………………………………………………………………………..iii

[SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi](#_Toc24920032)

[ŞEKİLLER DİZİNİ vii](#_Toc24920033)

RESİMLER DİZİNİ………………………………………………………….………..viii

[ÖZET i](#_Toc24920034)x

ABSTRACT……………………………………………………………………………..x

[1. GİRİŞ 1](#_Toc24920035)

[2. GENEL BİLGİLER 3](#_Toc24920036)

[2.1. Leishmaniasis’in Tarihçesi 3](#_Toc24920037)

[2.2. *Leishmania*’nin Kökeni 3](#_Toc24920038)

[2.2.1. Fosil Kanıtları 3](#_Toc24920039)

[2.2.2. *Leishmania* Türlerinin Coğrafi Kökenleri 4](#_Toc24920040)

[2.2.3. Ortaçağ Dönemi 7](#_Toc24920041)

[2.2.4. Modern Zaman (16.-19. yy) 8](#_Toc24920042)

[2.2.5. Yirminci Yüzyıl Dönemi 9](#_Toc24920043)

[2.2.6. Mevcut Durum 11](#_Toc24920044)

[2.3. Etiyoloji 13](#_Toc24920045)

[2.4. Epidemiyoloji 14](#_Toc24920046)

[2.5. Yaşam Döngüsü Ve Bulaşma 18](#_Toc24920047)

[2.6. Leishmaniasisin Formları](#_Toc24920048) 20

[2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis 20](#_Toc24920049)

[2.6.2. Mukokutanöz Leishmaniasis 21](#_Toc24920050)

[2.6.3. Visseral Leishmaniasis 21](#_Toc24920051)

[2.6.4. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis 22](#_Toc24920052)

[2.7. Köpeklerde Leishmania 22](#_Toc24920053)

2.7.1. Klinik Bulgular…………………………………………………...………………24

[2.7.2. Laboratuar Bulguları 27](#_Toc24920055)

[2.8. Bağışıklık Tepkisi 28](#_Toc24920056)

[2.9. Tanı Yöntemleri 29](#_Toc24920057)

[2.9.1. Doğrudan yöntemler 31](#_Toc24920058)

[2.9.1.1. Mikroskopik inceleme 31](#_Toc24920059)

[2.9.1.2. Kültür 31](#_Toc24920060)

[2.9.2. Dolaylı Yöntemler 32](#_Toc24920061)

[2.9.2.1. Moleküler yöntem 32](#_Toc24920062)

[2.9.2.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu 32](#_Toc24920063)

[2.9.2.1.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu 33](#_Toc24920064)

[2.9.2.2. Serolojik Yöntemler 34](#_Toc24920065)

[2.9.2.2.1. Doğrudan aglutinasyon testi 34](#_Toc24920066)

[2.9.2.2.2. Dolaylı floresan antikor testi 34](#_Toc24920067)

[2.9.2.2.3. Enzim bağlantılı immünosorbent testi 35](#_Toc24920068)

[2.9.2.2.4. Flow cytometry 36](#_Toc24920069)

[2.9.2.2.5. Nanodiagnostikler 37](#_Toc24920070)

[2.10. Köpeklerde Leishmaniasis Tedavisi 38](#_Toc24920071)

[2.11. Takip Değerlendirme 40](#_Toc24920072)

[2.12. Önleme ve Kontrol 40](#_Toc24920073)

[3. GEREÇ VE YÖNTEM 42](#_Toc24920074)

[3.1. Gereç 42](#_Toc24920075)

[3.2. Yöntem 43](#_Toc24920076)

[3.2.1. Indirekt Florasan Antikor Testi 43](#_Toc24920077)

[3.2.1.1. IFAT antijenli lamların hazırlanması 43](#_Toc24920078)

[3.2.1.2. IFAT yöntemi uygulanması 44](#_Toc24920079)

[3.2.2. DNA İzolasyonu ve Polimerize Zincir Reaksiyonu 44](#_Toc24920080)

[3.2.2.1. DNA izolasyonu 44](#_Toc24920081)

[3.2.2.2. PCR testi uygulanması 45](#_Toc24920082)

[4. BULGULAR 47](#_Toc24920083)

[4.1. IFAT Sonuçları 4](#_Toc24920084)7

[4.2. PZR Sonuçları 4](#_Toc24920085)9

[5. TARTIŞMA](#_Toc24920086) 50

[6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 54](#_Toc24920087)

[KAYNAKLAR 5](#_Toc24920088)6

[EKLER 7](#_Toc24920089)5

Ek 1. Muğla ilinden toplanan köpek serum ve kan örnekleri………………….……….75

[Ek 2. Ticari aşılar ve etkileri 79](#_Toc24920090)

[ÖZGEÇMİŞ 80](#_Toc24920091)

# SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

|  |  |
| --- | --- |
| **ACh** | : Asetilkolin reseptörü |
| **AIDS** | : Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| **CAT** | : Katalaz |
| **CanVL** | : Canine Visseral Leishmaniasis |
| **CL** | : Kutanöz Leishmaniasis |
| **DAT** | : Direkt Aglütinasyon Test |
| **DKL** | : Diffüz Kutanöz Leishmaniasis |
| **DNA** | : Deoxyribonucleic Acid |
| **ELISA** | : Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| **GPx** | : Glutatyon peroksidaz |
| **GSH** | : Gulutatyon |
| **HIV** | : Human Immundeficiency Virus |
| **İHA** | : İndirekt Hemaglütinasyon |
| **IL-11** | : İnterlökin 11 |
| **İFAT** | : İndirekt Flouresan Antikor Testi |
| **KFR** | : Kompleman Fiksasyon Reasiyonu |
| **LPG** | : Lipofosfoglikan |
| **M-CSF** | : Makrofaj koloni stimüle edici faktör |
| **MKL** | : Mukokutanöz Leishmaniasis |
| **N.N.N.** | : Novy-Mac Neal-Nicolle |
| **PKDL** | : Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis |
| **RNA** | : Ribo Nükleik asit |
| **SOD** | : Süperoksit dismutaz |
| **Ss** | : Standart sapma |
| **VL** | : Visseral Leishmaniasis |
| **WHO** | : Dünya Sağlık Örgütü |

# 

# ŞEKİLLER DİZİNİ

[**Şekil 1.** Eski ve yeni dünyada visseral leishmaniasis coğrafi dağılımı 15](#_Toc17227756)

[**Şekil 2.** Yeni dünyada kutanöz ve mukokütanöz leishmania’nın coğrafi dağılımı 16](#_Toc17227757)

[**Şekil 3**. *Leishmania* yaşam döngüsü 19](#_Toc17227758)

[**Şekil 4.** Örneklemenin yapıldığı yerleşim alanları 43](#_Toc17227759)

# RESİMLER DİZİNİ

|  |
| --- |
| **Resim 1.** Dişi kum sineği ……………………………………..…………………………..20 |
| **Resim 2.** *Leishmania infantum* enfekte bir köpeğin dalak aspirasyonundan alınan bir makrofajda amastigotlar …………………………………………………………………..23 |
| **Resim 3.** Bir köpekde kutanöz leishmaniasis belirtileri ……………………………….….25 |
| **Resim 4.** IFAT ile pozitif belirlenen örnekler…………………………………….………..48 |
| **Resim 5**. IFAT ile pozitif belirlenen örnekler……………………………………………...48 |
| **Resim 6.** *Leishmania* spp.’ye ait RV primer çifti ile pozitif gelen örnekler %1,5 agaroz jel görüntüsü……………………………………………………….……………...…………...49 |
|  |

# 

# ÖZET

**MUĞLA YÖRESİ KÖPEKLERİNDE *LEISHMANIA* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER VE SEROLOJİK OLARAK BELİRLENMESİ**

**Topçuoğlu A.D. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1980 yıllarının başından beri önemi vurgulanan leishmaniasis, malaria ve lenfatik filariasis‘den sonra üçüncü vektör kaynaklı en önemli hastalık olarak değerlendirilmektedir. Hastalığın dünyanın pek çok yerinde visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL), diffuz deri leishmaniasis (DCL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MCL) gibi değişik formları görülmektedir. Türkiye'de ise KL ve VL formları en sıklıkla görülen formlar olarak bilinmektedir. Türkiye'de KL’ye yol açan tür daha çok *L. tropica* iken VL’ye yol açan tür ise *L. infantum* olarak bildirilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda KL vakalarında VL öyküsü olmaksızın *L. infantum* türünün izole edildiği, yine VL vakalarında KL öyküsü olmaksızın *L. tropica* türünün tespit edildiği ifade edilmektedir.

Bu çalışmada da Muğla yöresinde, Veteriner kliniklerine getirilen 69 dişi ve 62 erkek köpekten kan alınarak *Leishmania spp.* varlığının moleküler ve serolojik yöntemle araştırılması amaçlanmıştır. Köpeklerden EDTA içeren antikoagulanlı tüplere alınan kanlardan moleküler testlerde kullanılmak üzere DNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen DNA örneklerinde PZR yöntemi ile *Leishmania* spp. tespiti yapılmıştır. Aynı zamanda alınan kanlardan serum çıkartılarak, serolojik olarak IFAT testi ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda 131 köpekten alınan serum örneklerine uygulanan IFAT ile 49 köpekte (%37.4) anti-*Leishmania* antikor titresinin 1:64 ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Moleküler değerlendirmede ise dokuz köpekte (%6.87) PZR yöntemiyle *Leishmania* spp. bulunmuştur. Çalışma bölgesindeki 18 farklı yerleşim alanında toplam 131 köpeğin değerlendirilmesinde KVL’in seroprevalansı %37.4 olarak belirlenirken, moleküler prevalans %6.87 tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Köpek, *Leishmania*, muğla,prevalans.

**ABSTRACT**

**MOLECULAR AND SEROLOGIC DETECTION OF *LEISHMANIA* SPECIES IN DOGS IN MUĞLA PROVINCE**

**Topçuoğlu A.D. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Pharmacology and Toxicology (Veterinary) Program, Master’s Thesis, Aydin, 2019.**

*Leishmaniasis*, which has been emphasized by the World Health Organization (WHO) since the beginning of 1980, is considered the third most important disease after malaria and lymphatic filariasis. Disease of the world in many parts of visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) of different forms, such as, although seen (WHO), in Turkey cutaneous leishmaniasis (KLA) way *L.tropica*; the species causing visceral leishmaniasis (*VL*) is known as *L .infantum*. However, in recent studies, it has been reported that L. *infantum* species was isolated in patients with CL without a history of VL, and *L.tropica* was detected in patients with VL without a history of CL.

 In this study, blood was collected from 69 female and 62 male dogs brought to veterinary clinics in Muğla region and serum was extracted from the blood samples and serologically evaluated by IFAT test. DNA was isolated from the blood taken from anticoagulant tubes containing EDTA from the dogs and DNA samples were isolated by *Leishmania* spp. determination was made. As a result of IFAT application in serum samples from 131 dogs, anti-*Leishmania* antibody titer was found to be 1: 64 and higher in 49 dogs (37.4%). PCR was found to be positive in dokuz dogs (6.87%). Seroprevalence of KL was 37.4% and molecular prevalence was 6.87% in 131 dogs in 18 different settlements in the study area.

**Keywords:** Dog, *Leishmania*, mugla,prevalance.

# 1. GİRİŞ

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi protozoon olan *Leishmania* cinsindeki türlerin neden olduğu zoonotik karakterli, visseral (VL), kutanöz (KL) ve mukozal (MKL) enfeksiyonlara neden olan ve farklı klinik belirtilerle kendini gösteren hastalıkların genel adlandırılmasıdır (Sundar ve Rai 2002; İça ve ark, 2008; Atasoy ve ark, 2010; Bakırcı ve ark, 2016). Dünya Sağlık Örgütünün (WHO) en önemli altı enfeksiyon hastalığından birisi olarak kabul edilmektedir. Leishmaniasis, Afrika’dan Orta ve Güney Amerika’ya, Doğu ve Güney Avrupa’dan Asya’ya kadar yayılan geniş bir coğrafyayı etkilemektedir. Bununla birlikte, yeni vakaların %90'ından fazlası sadece 13 ülkede gerçekleşmektedir (Afganistan, Cezayir, Bangladeş, Bolivya, Brezilya, Columbia, Etiyopya, Hindistan, İran, Peru, Güney Sudan, Sudan ve Suriye) (WHO, 2016). Tahminlere göre her yıl 0.9-1.7 milyon insanenfeksiyona yakalanmaktave 20.000-30.000 kişi hastalık sonucu hayatını kaybetmektedir (WHO, 2016). Türkiye'nin leishmaniasisin epidemiyolojisinde önemli olan farklı ekolojik ve klimatik özelliklere sahip olduğu bilinmekte ve seyri ile coğrafi yayılışı yanında, zoonotik/antroponotik karakterli bir hastalık olması nedeniyle ayrı bir önem taşıdığına dikkat çekilmektedir (Ok ve ark, 2002). Köpek visseral leishmaniasis (KVL) *Leishmania* *infantum*'un (syn. *Leishmania chagasi;* Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) neden olduğu, köpeklerin vektörlerle bulaşan en önemli hastalıklarından biri olarak kabul edilmektedir (Bakırcı ve ark, 2016).

Klinik belirti gösteren visseral leishmaniasis'li enfekte köpeklerde; deri lezyonları, lenfadenopati, anemi, oküler lezyonlar, burun kanaması, topallık, iştahsızşık, kilo kaybı gibi bulgular görülmektedir (İça ve ark, 2008; Bakırcı ve ark, 2016). Bununla birlikte, hastalığın safhası, köpeklerin bağışıklık durumu ve hastalara uygulanan sağaltıma bağlı olarak klinik bulgular farklılık göstermekte, hatta enfekte köpeklerin 1/3’ünde herhangi bir bulguya rastlanılmamaktadır. Bu nedenlerle hastalığın klinik tanısının oldukça zor olduğu bildirilmektedir (Atasoy ve ark, 2010). Parazitin amastigot formlarının lenf yumrusu, kemik iliği veya dalak biopsisinde belirlenmesi güvenli bir tanı yöntemi olmakla birlikte, enfekte köpeklerin ancak %20-30’unda etken belirlenebilmektedir. Hastalıkta klinik bulguların değişken olması ve parazitin doğrudan belirlenmesindeki zorluklar nedeniyle kesin tanı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek serolojik testler (IFAT, ELISA) ve moleküler tabanlı bir test olan PZR ile konulabilmektedir (Bakırcı ve ark, 2016).

Bu çalışmada Muğla yöresindeki, veteriner kliniklerine getirilen köpeklerde *Leishmania* spp.’ninvarlığının moleküler ve serolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla köpeklerden kan alınması (antikoagulansız ve EDTA içeren antikoagulanlı tüpler kullanılarak) antikoagulansız tüplere alınan kanlardan serum çıkartılarak, serolojik olarak IFAT testi ile değerlendirilmesi, EDTA içeren antikoagulanlı tüplere alınan kanlardan ise DNA izolasyonu yapılarak, izole edilen DNA örneklerinde PZR yöntemi ile *Leishmania* spp. tespiti yapılması hedeflenmiştir.

# 

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Leishmaniasis’in Tarihçesi

Leishmaniasisin kökeninin uzun bir geçmişi bulunmaktadır. Arkeolojik çalışmalar leishmaniasisin kökeni hakkında çok büyük oranda katkıda bulunmuştur. Bu hastalık resim, papirüs, heykel, seramik ve mumyalaşmış insanlarda da bildirilmiştir (Altamirano-Enciso ve ark, 2003). Lysenko, *Leishmania*’nın Himalayaların kuzeyi, Asya’da kuzey Arap bölgesi, Afrikanın da kuzeyinden Sahara’yı kaplayan palaearktik bölgeden kaynaklandığını ileri sürmüştür (Lysenko, 1971; Kerr, 2000a). Paleosen döneminde Palaearktik bölgedeki phlebotomların varlığıyla hastalığın kemirgenlerden evrildiğini gösteren fosil kayıtlar ile de desteklenmiştir (Lewis, 1982). Kemirgenlerin yuvalarının yüksek nemli bir yerde ve soğuktan da korunaklı olması, kum sinekleri istilasıda göz önüne alındığında, onların önemli bir rezervuar konak olduğu düşündürmektedir (Kerr,  2000a).

## 

## 2.2. *Leishmania*’nin Kökeni

### 

### 2.2.1. Fosil Kanıtları

Tarih öncesi dönemde *Leishmania* benzeri türlerin varlığı iki fosil kayıtlarında belgelenmiştir. İlk *Leishmania* benzeri fosil, 100 milyon önce soyu tükenmiş dişi bir kum sineği *Palaeomyia burmitis*'in kanla dolu hortum ve sindirim sisteminde bulunmuştur (Poinar, 2004; Poinar ve Poinar, 2004a). *Leishmania* benzeri olan bu türler *Paleoleishmania* isimli yeni bir koloni fosilinde *P. proterus* olarak tanımlanmıştır (Poinar ve Poinar, 2004a).

Promastigotların yanı sıra, kum sineklerinin beslenme sırasında omurgalıların kanından parazit aldıklarını gösteren amastigotlar da bulunmuştur. Amastigotların varlığı, *P. proterus'*un digenetik yaşam döngüsünü düşündürmektedir. Ancak daha sonra kan hücrelerinin bir sürüngen türüne ait olduğu belirlenmiştir (Poinar ve Poinar, 2004b).

İkinci *Leishmania* benzeri fosil, *Paleoleishmania* *neotropicum* olarak tanımlanmış ve 20-30 milyon yıllık soyu tükenmiş kum sineği *Lutzomyia adiketis*'te bulunmuştur (Poinar, 2008). Kum sineklerinin bağırsak ve hortumunda promastigotlar, paramastigotlar ve amastigotlar gözlenmiş, ancak omurgalıya ait bir kan hücresi bulunamamıştır (Poinar, 2008). Bununla birlikte, amastigotların varlığı ve monogenetik flagellatların hiçbir zaman kolonize olmamış olması, omurgalı bir konak ile *P. neotropicum*'un bir digenetik yaşam döngüsünü ortaya koymaktadır.

Söz konusu bu fosil kayıtları, Neotropikal kum sineklerinin, *Leishmania* benzeri parazitler için vektörler olduğunu da göstermektedir.

### 2.2.2. *Leishmania* Türlerinin Coğrafi Kökenleri

*Leishmania* cinsinin muhtemelen süper kıta Panalea'nın parçalanması öncesi Mesozoik çağda (252-66 milyon yıl önce (MYÖ) evrimleştiği düşünülmektedir (Thomaz-Soccol ve ark, 1993). Bununla birlikte, farklı *Leishmania* türlerinin özel coğrafi kökeni devam eden bir tartışma konusudur. Bu konuda genel olarak üç hipotez öne sürülmektedir:

**Palaearktik hipotez**

Lysenko (Lysenko, 1971) *Leishmania*'nın Palaeocene'de (66-56 MYÖ), Himalayaların kuzeyinde, Asya'yı, Avrupa’yı, Arabistan ve Afrika Sahara'sının kuzeyini içeren bir alan olarak tanımlayabilecek Palaearktik bölgeden kaynaklandığını öne sürmektedir (Kerr, 2000a; Kerr, 2000b). Bu hipotez, fosil kayıtları ile de desteklenmektedir (Lewis, 1982; Nowak, 1999).

Murid kemirgenler muhtemelen önemli memeli rezervuar konaklarıdır, çünkü yuvaları kum sinekleri için gerekli olan yüksek rutubet ihtiva etmekte ve soğuktan korunaklı alanlar sağlamaktadır (Kerr, 2000a). Bu hipoteze göre, parazit konakçıları ile birlikte, Kuzey Kutup Bölgesi'nin, (Grönland, Orta Florida ve Meksika'nın yüksek bölgelerini kapsayan bir alan olan ve bering boğazı bozulmamış iken Eosen'de (56-34 MYÖ) bulunan), çoğunu kapsayan bölgelere yayılmıştır (Kerr, 2000a).

Bering boğazı bozulduktan sonra, Yeni Dünya'daki *Leishmania* türlerinin vektörleri olan *Lutzomia* kum sineği, Oligosen (34–23 MYA) sırasında Nearktik'te evrilmiştir (Kerr, 2000a). Yaklaşık 3 milyon yıl önce, sigmodontin kemirgenleri ve *Lutzomyia* kum sinekleri Neotropikal bölgeyi, Güney ve Orta Amerika’yı, güney Meksika ovalarını, Karayip adaları ve güney Florida’yı ve Pliyosen'de bir alanı kolonize etmiştir (5.33– 2.86 MYÖ) (Lysenko, 1971; Kerr, 2000b; Tuon ve ark, 2008).

Ancak, Panama boğazının yükselmesinden önce *Leishmania*'nın Miyosen (23–5.33 MYÖ) boyunca Neotropikal bölgeye sokulmuş olabileceğine dair kanıtlar da bulunmaktadır (Thomaz-Soccol ve ark, 1993; Kerr, 2000b). Artan sıcaklıkların, kum sineklerinin orman gölgelerinde yaşamaya başlamasının nedeni olabileceği düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak arboreal memeliler *Leishmania* parazitlerinin yeni konakları haline gelmiştir. İklim değişikliği ve vektörün yeni ev sahiplerini benimsenmesi, Eski Dünya ile karşılaştırıldığında yeni dünyadaki *Leishmania*'nın daha fazla çeşitliliğini açıklayan bir hipotez olmaktadır.

**Neotropik hipotez**

*Leishmania* cinsinin Neotropikal bölgeden kaynaklandığı hipotezi ilk olarak 1987'de Lainson ve Shaw tarafından ortaya atılmıştır (Lainson ve Shaw, 1987) ve 1998'de Noyes tarafından bu düşünce geliştirilmiştir (Noyes, 1998). Yeni Dünya *Leishmania*'sının Eski Dünya *Leishmania*'sına kıyasla daha fazla çeşitliliğe sahip olması türlerin Neotropikal kökenli olduğuna dair kanıtlar olarak öne sürülmektedir (Lainson ve Shaw, 1987; Croan ve ark, 1997). Gerçekte, *Leishmania*'nın Yeni Dünya'daki türleri, iklim değişikliği, artan konak aralığı ve coğrafi izolasyon nedeniyle Neotropikal bölgedeki hızlandırılmış evrime bağlanabilmektedir. Uyuşuk hayvanların (sloth) *Leishmania* için ilk omurgalı konak olarak hizmet ettiği ve Eosen sırasında da parazitin kirpilere adapte olduğu ileri sürülmektedir (Noyes, 1998).

**Pangaea hipotezi**

Üçüncü bir hipotezi ortaya atan Momen ve Cupolillo, (2000)’e göre Mesozoik'teki Gondwana'nın parçalanmasıyla birlikte, *Leishmania* ve *Sauroleishmania* subgenusları olarak Afrika'da evrim geçirdiği öne sürülmüştür (Momen ve Cupolillo, 2000). *Leishmania* subgenus*; L. aethiopica, L. donovani, L. infantum, L. major ve L. tropica* gibi tüm Eski Dünya türlerini içermekte ve *L. aethiopica* sadece Etiyopya ve Kenya'da olduğu için, bu türün Afrika'da ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Momen ve Cupolillo, 2000). Sahra altı Afrika'daki ilkel Arvicant-*Phlebotomus* sisteminin kısıtlı habitatına dayanarak, *L. major*'un büyük olasılıkla bu kıtadan kaynaklandığı düşünülmüştür (Ashford, 1986). *L. donovani* ve *L.* *infantum* türleri ise Doğu-Afrika kökenli bir klonistik izoenzimlerin analizine dayanmaktadır (Moreno ve ark. 1986). Doğu Afrika'da insanlar evrimleştikçe, *L.* *tropica*'nın antroponotik geçişinin, Afrika'nın bu kısmından ortaya çıktığı iddia edilmiştir (Momen ve Cupolillo, 2000). İlk hipoteze uygun olarak, *Leishmania* subgenusuna ait Yeni Dünya türü olan *L. mexicana'*nın *L. major* ile pek çok özelliği paylaştığı Eosen'de kemirgen konaklarıyla birlikte Nearctic'e dağıldığı varsayılmıştır (Lainson ve Shaw, 1987). Güney Amerika'ya girdikten sonra iklimsel ve ekolojik faktörler muhtemelen *L. venezuelensis, L. amazonensis ve L. waltoni* türlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Momen ve Cupolillo, 2000; Shaw ve ark, 2015). *Leishmania* subgenusuna ait bir başka Yeni Dünya türü olan *Leishmania chagasi,* Güney Amerika'ya tarihsel zamanlarda (Avrupalı yerleşimciler veya onların köpekleri tarafından yaklaşık 500 yıl önce) getirilen *L. infantum* ile eşanlamlı olarak kabul edilmektedir (Dantas-Torres, 2006). Sonuç olarak, tüm *Leishmania* benzeri tembel hayvan ve porcupine parazitleri, sırasıyla *Endotrypanum* ve yeni cins *Porcisia* genusunda gruplandırılmıştır. Ayrıca, *L. martiniquensis*'in dünya çapındaki dağılımı, Gondwana'nın dağılmasından önce *Leishmania* cinsinin eski bir küresel yayılımını desteklemektedir (Harkins ve ark, 2016). *L.* *enriettii* kompleksinin benzersizliği göz önüne alındığında *L. martiniquensis*'i içeren *L. enriettii* kompleksi için yeni bir subgenus *Mundinia* yaratılması önerilmiştir (Espinosa ve ark, 2016). Elde edilen verilere dayanarak, *Leishmania* tripanosomatidlerinin Gondwana'da Mesozoik'teki memelilerden kaynaklandığı ve muhtemelen, monokrom bir böcek flagellatı, memelilerde yerleşmiş ve bir dixenous türüne dönüşmüş olduğu öne sürülmektedir (Shaw ve ark, 2015; Espinosa ve ark, 2016).

Memelilerin çeşitlenmesi ile, *Endotrypanum, Porcisia* ve *Leishmania* türlerinin başlangıçta evrim geçirdiği düşünülmektedir. Gondwana'nın dağılmasından sonra, *Endotrypanum* ve *Porcisia* cinsleri, Güney Amerika kıtasındaki memeli konaklarıyla birlikte sona ermiştir. Genel düşünce Gondwana'nın ayrılması sırasında, *Leishmania* cinsi bölünmüş ve daha sonra Güney Amerika'daki *Viannia*'ya ve Afrika'daki alt-*Leishmania*, *Mundinia* ve *Sauroleishmania*'ya evrim geçirmiş olmasıdır. Yeni Dünya kertenkelelerinde *leishmanial* enfeksiyonların yokluğu ile *Leishmania* ve *Sauroleishmania*'nın filogenetik yakınlığının ortaya konması, *Sauroleishmania*'nın kertenkelelere adapte olan bir memeli hattında enfeksiyon yaratabileceğinin göstergesi olabilir (Shaw ve ark, 2015; Espinosa ve ark, 2016).

Son olarak, Eosen'de, alt-tabaka *Leishmania*'nın bir türü, Bering kara köprüsü üzerinden kemirgen konakları ile birlikte Asya'dan çevreye yayılmış ve Amerikan *Leishmania* türlerine dönüşmüş olduğu ifade edilmektedir (Shaw ve ark, 2015; Espinosa ve ark, 2016). Antik çağda leishmaniasis’in varlığına ilişkin diğer kanıtlar, eski Arap toplumlarının, iyileşmiş bölgeye özgü yaralara sahip bireylerin daha ileri enfeksiyonlardan korundukları bilgisidir (Boelaert ve Sundar, 2014). Bu anlayış, Orta Doğu ve Orta Asya'daki insanlar tarafından, bölgeye özgü yaralara karşı aktif bağışıklama için kullanılmıştır. Aktif lezyonlardan çıkan eksudatları, küçük çocukların kalçalarına inoküle etmişlerdir. Ayrıca bozucu yüz skarlarının gelişmesini engellemek için kum sineklerine maruz bırakmışlardır.

### 2.2.3. Ortaçağ Dönemi

Arap bilim adamları, Ortaçağ dönemlerinde CL'nin etkilerini ortaya koymuşlardır. 930'da, İranlı bilgin er- Rāzī (Abū Bekir Muhammed ibn Zakariyyā er-Rāzī, 854–935) Bağdat bölgesindeki kütanöz yaraların oluşumunu tanımlamıştır (Edrissian ve Rokni, 2016). Kutanöz yaralar hakkında ilk doğru tanımlamayı büyük İranlı filozof ve hekim Avicenna (Abū ʿAlī al-Ḥusayn ibn ʿAbd Allāh ibn Al-Hasan ibn Ali ibn Sīnā, 980–1037) yapmış *L.* *tropica*'nın neden olduğu kuru deri lezyonlarını düşündüren Kuzey Afganistan'da Belh yarası diye bilinen bir dermal durumu tanımlamıştır (Edrissian ve Rokni, 2016).

Yeni Dünyada, MCL'yi anımsatan yüz koşulları 5. yüzyıldan itibaren Kolomb öncesi seramiklere resmedilmiştir (Tuon ve ark, 2008). Ayrıca, kuzey Şili'deki San Pedro de Atacama çölündeki Coyo Oriente'nin arkeolojik mezarlığında bulunan 11. yüzyıla kadar uzanan dört dişi kafatası, Güney Amerika'da leishmaniasisin morfolojik ve moleküler kanıtını sağlamaktadır (Costa ve ark, 2009). Hastalığın normalde bulunmadığı yüksek rakımlı yerlerde (Atakama Çölü'nün deniz seviyesinden 2400 m üstünde) leishmaniasisin varlığı, hastalıklarla enfekte olan ovada yaşayanların çöl yaylalarına göçüyle açıklanmıştır (Costa ve ark, 2009).

### 2.2.4. Modern Zaman (16.-19. yy)

16. yüzyıldan itibaren Orta Doğu'daki farklı bölgelerden oryantal yaralar içeren çeşitli deri enfeksiyonları bildirilmiştir. Raporların çoğunda, açıklanan koşullar, edindikleri yere ve bugün bilinen yerlere göre adlandırılmıştır (örneğin, Aleppo boil, Baghdad boil, Jericho boil) (Manson-Bahr, 1996). 1756 yılında, İskoç hekim ve natüralist Alexander Russell (1715-1768) Halep'te çalışırken kutanöz yaraların hem kuru hem de ıslak formlarının ayrıntılı bir klinik tablosunu yayınlamıştır (Russell, 1756). Yerel halkın, kabaca *L. major’*un sebep olduğu ıslak zoonotik CL ve *L. tropica*’nın sebep olduğu kuru CL*’* ye sırasıyla karşılık gelen bir “erkek” ve “kadın” formunu ayırt ettiğini belirtmiştir. Ayrıca, lezyonların gelişimine ilişkin ayrıntılı bir açıklama yapmış ve hastalıkların 8 ay ve 1 yıl içinde iyileştiğini vurgulamıştır. Mukokutanöz leishmaniasis, ilk defa 1571'de İspanyol tarihçi Pedro Pizarro (1515–1602) tarafından ortaya konmuş ve Peru And Dağları'nın doğu yamaçlarında çalışan koka yetiştiricilerinin burnunun ve dudaklarının tahribattan muzdarip olduğunu bildirmiştir (Lainson, 2010).

Visseral leishmaniasis hakkında 19. yüzyıldan önce açık bilgiler bulunmamaktadır. En eskisi kaynak ise askeri cerrah William Twining (1790-1818) tarafından 1827'de Bengal ve Hindistan'da büyümüş dalaklar, akut anemi ve aralıklı ateş ile birlikte görülebilen hastalar hakkında yayınlanan bir makaledir (Twining, 1827). 1832'de Twining, cildin kurumuş ve pullu görünümünü içeren kala-azar belirtilerini daha ayrıntılı olarak tarif ettiği bir kitap da yayınlamıştır (Twining, 1832). İlk kala-azar salgını, Hindistan'ın Aşağı Bengal kentinde Jessore'nin 30 mil doğusunda, Mahomedpore köyünde 1824/25'te kaydedilmiştir (Gibson, 1983). Sonrasında, hastalık batıya doğru yayılmış ve 1860’da Batı Bengal’de Burdwan’a ulaşmıştır. Kala-azar salgın halini almış ve sonraki yıllarda Bengal'in kuzeyine ve Assam'a kadar yayılmıştır (Gibson, 1983). Kala-azar hastalarının etkilenen bölgelerdeki mortalitesinin yaklaşık %30 olduğu bildirilmiştir (Gibson, 1983). Hastalık ilerki yıllarda pek çok alanda endemik kalmıştır. Kala-azar kelimesi 19. yüzyılın sonlarında ortaya çıkmış ve kelimenin tam anlamıyla “kara hastalık” anlamına gelmektedir. Hastalığın kala-azar olarak isimlendirilmesi, enfeksiyon seyrinde açık renkli insan cildinin grimsi renk değiştirmesini ifade eder. 1885'te, İskoç doktoru David Douglas Cunningham (1843–1914), *Leishmania* parazitlerini delhi çıbanında görmüş, ama tam olarak ne olduklarını fark etmemiştir (Cunningham, 1885). Bunu takiben, Rus ordusu doktoru Piotr Fokich Borovsky (1863–1932), Kutanöz deri lezyonlarında bulunanların protozoon olduğunu ilk fark eden kişilerdendir (Hoare, 1938).

### 2.2.5. Yirminci Yüzyıl Dönemi

İngiliz Ordusu ile birlikte Hindistan'da hizmet veren İskoç patolog William Boog Leishman (1865–1926), 1900 yılının kasım ayında, Kalküta yakınlarındaki bir kasabada aşırı zayıflık ve splenomegaliden ölen bir askerin dalağından alınan smearda oval cisimler tespit etmiştir (Leishman, 1903). General Sir William Boog Leishman ile birlikte Charles Donovan, visseral leishmaniasis'e (VL) neden olan paraziti tespit etmişler ve keşiflerinin neticesinde parazit *Leishmania* ismini almıştır. Daha sonra deneysel olarak enfekte olmuş bir beyaz sıçanda benzer yapıları tespit etmişlerdir. 1903'te bulgularını yayınlayan Boog, oval hücrelerin dejenere olmuş tripanozom formları olduğunu ve bu nedenle “Dum-dum ateşi” dediği hastalığın bir tripanosomiasis formu olduğunu öne sürmüştür (Leishman, 1903). Birkaç hafta sonra, Madras Tıp Koleji'nde fizyoloji profesörü olan İrlandalı doktor Charles Donovan (1863-1951), yaşarken ve otopsi sonrası alınan dalgalı ateş ve büyümüş dalağa sahip yerli Hintli deneklerdeki splenik örneklerde benzer işaretler bulduğunu bildiren bir bildiri yayınlamıştır (Donovan, 1903). Donovan, oval hücrelerin dejenere olmuş tripanozomlar olduğunu düşünmediği için, parazitin bir parçasını Paris'teki Fransız Biyolog Félix Étienne Pierre Mesnil'e (1868-1938) göndermiş ve ona kendi örneğini o zaman protozoon parazitleri üzerinde bilgili olan biri Charles Alphonse Laveran'e (1845–1922) göstermesini istemiştir. Laveran ise, Piroplasma genusunda yeni bir parazit olduğunu düşünmüştür. Aynı zamanda, 1898'de Hint hükümeti tarafından Kala-Azar'ı araştırmak için gönderilen İngiliz doktor Ronald Ross (1857-1932), Ermeni bir kızın yarasından aldığı örneğin *Helcosoma tropicum* olduğunu tanımlamıştır (Wright, 1903). Alman hekim ve zoolog Max Lühe (1870-1916) 1906 yılında etkenin adını *Leishmania* *tropica* olarak değiştirmiştir.

1914'te Rus hekimler Wassily Larionovich Yakimoff (1870–1940) ve Nathan Isaakovich Schokhor (1887-1941), deri lezyonlarındaki parazitin büyüklüğüne göre *L. tropica*'nın *L. tropica minör* ve *L. tropica* *major* olarak iki alt türe ayrılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (*L. t. minör*, daha küçük amastigotlar; *L. t. major*, büyük amastigotlar) (Lühe, 1906). *L.* *tropica*'nın bu sınıflandırması önümüzdeki 60 yıl için standart hale gelmiştir. Aynı zamanda, *L.* *tropica*'nın iki alttürünün, iki tip lezyon ve epidemiyolojide farklılıklar ile ilişkili olduğu da keşfedilmiştir. *L. t.* *minör*’ün kuru nodüler lezyonlara neden olduğu ve kentsel ortamlarda daha sık karşılaşıldığı, *L. t. major’*ün ise ıslak ülseratif lezyonlar ürettiği ve kırsal bölgelerde daha çok ortaya çıktığı keşfedilmiştir (Schnur, 1987). Bu farklılıklara dayanarak Bray ve ark., 1973'te iki alttürü sırasıyla *L. tropica* ve *L. major* olarak sınıflandırmayı önermişlerdir (Bray ve ark, 1973). Aynı yayında, Etiyopya'da *L. aethiopica* adını verdikleri yeni bir *Leishmania* türünün keşfini bildirmişlerdir (Bray ve ark, 1973).

Yeni Dünya *Leishmania* parazitleri ilk önce bağımsız olarak Brezilyalı doktor Adolpho Carlos Lindenberg (1872-1944) (Lindenberg, 1909) ve İtalyan doktor Antonio Carini (1872-1950) ve Brezilya'daki meslektaşı Ulysses de Freitas Paranhos (1880-1954) tarafından tanımlanmıştır. Alfonso Splendore (1871-1953), espundia hastalarının mukokuenöz lezyonlarındaki paraziti bulmuştur. Başlangıçta, Yeni Dünya parazitlerinin *L.* *tropica* ile aynı olduğu düşünülmüştür. 1911'de Brezilyalı klinisyen ve bilim adamı Gaspar de Oliveira Vianna (1885-1914) Minas Gerais, São João de Além Paraiba'da ikamet eden bir hastanın cilt lezyonundan elde edilen leishmanial örnekleri inceleyerek parazitin *L.* *tropica*'dan farklı olduğu sonucuna varmıştır. Kararını görünen morfolojik farklılıklara dayandırmıştır ve yeni türlere lapsus calami *Leishmania* *brazilienses* adını vermiştir (Bray ve ark, 1973).

*Leishmania peruvianna*, 1913'de zaten tanımlanmış olmasına rağmen, CL ve MCL'ye neden olan diğer tüm Yeni Dünya *Leishmania* türleri daha sonra 1953'te *L. mexicana*, 1954'te *L. guyanensis*, 1972'de *L. amazonensis* ve *L. panamensis, L. venezuelensis* 1980'de, 1987'de *L. lainsoni*, 1989'da *L. naffi* ve *L. shawi*, 2002'de *L. lindenbergi* ve 2015'te *L. waltoni* olarak karakterize edilmiştir (Lainson, 2010; Shaw ve ark, 2015). Daha önce Kolombiya ve Panama'da insanlarda ve hayvanlarda leishmaniasis ile ilişkili olan başka bir tür olan *L. colombiensis* yakın zamanda *Endotrypanum colombiensis* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Kreutzer ve ark, 1991). VLilk olarak 1930'larda Latin Amerika'da kaydedilmiştir. Cunha, Latin Amerika'daki VL ajanının *L.* *infantum* ile aynı olduğu sonucuna varmıştır. Daha yakın zamanlarda, bu kavram *L. chagasi* suşlarının *L. infantum* suşlarından ayırt edilemeyeceğini gösteren modern moleküler analiz teknikleri ile desteklenmiştir (Mauricio ve ark, 1999). *L. martinicensis* türleri ise yeni keşfedimiştir. İlk olarak 1995 yılında izole edilmiş olup, 2014 yılında taksonomik konumu adlandırılmıştır (Desbois ve ark, 2014). 2009'dan itibaren literatürde *L. siamensis* görülmeye başlanmıştır. Bu yeni tür, Avrupa ve ABD'de (Müller ve ark, 2009; Reuss ve ark, 2012) at ve sığırlarda ve Tayland'da insanlarda VL ile ilişkili bulunmuştur (Bualert, 2012). Bununla birlikte, bu tür uygun şekilde tanımlanmadığından ve sınıflandırılmadığından, *L. siamensis* tam olarak kullanılmamaktadır. Ek olarak, son DNA dizi analizi daha önce “*L. siamensis*” olarak tanımlanan parazit izolatlarının çoğunun *L. martiniquensis* ile aynı olduğunu göstermiştir (Bualert ve ark, 2012). Böylece, *L. siamensis, L. martiniquensis*'in eş anlamlısı olarak görülmektedir (Espinosa ve ark, 2016).

Kum sineklerinin *Leishmania* parazitlerinin iletimi için vektörler olduğundan şüphelenildiği halde, Fransız biyologlar Edmond Sergent (1876-1969) ve Étienne Sergent (1878-1948) tarafından yapılan çalışmalara kadar (1921) bu tam olarak kanıtlanamamıştır. Ancak, bu deneyin sonucu genellikle kum sineklerinin doğu çıbanı (şark çıbanı) vektörleri olduğunun bir kanıtı olarak kabul görmemiştir. Kum sineğinin ısırığı yoluyla gerçekleşen asıl geçiş şekli, 1941 yılında İngiliz-İsrailli parazitolog Saul Adler (1895-1966) tarafından 1941'de laboratuvarda *L. tropica* ile deneysel olarak enfekte edilmiş sineklerle yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur. Bir yıl sonra, kum sineklerinin kala-azar vektörü olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır (Adler ve Ber, 1941; Swaminath ve ark, 1942).

Brezilyalı doktor Henrique de Beaurepaire Rohan Aragão (1879-1956), 1922 yılında kum sineklerinin Güney Amerika'daki leishmaniasis'in aktarılmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Daha sonra Yeni Dünya'da leishmaniasis ileten kum sineklerinin *Lutzomyia* cinsine ait olduğu bulunmuştur. Bu bağlamda, 42 *Phlebotomus* ve 56 *Lutzomyia* türünün, sırasıyla Eski ve Yeni Dünyadaki leishmaniasis bulaşmasında rol oynadığı ifade edilmektedir (Maroli ve ark, 2013).

### 2.2.6. Mevcut Durum

Leishmaniasis hala birçok endemik ülkede önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Yüksek endemik potansiyeli olan 14 ülkede (Brezilya, Çin, Etiyopya, Gürcistan, Hindistan, Kenya, Nepal, Paraguay, Somali, Güney Sudan, İspanya, Sudan ve Uganda) yıllık rapor edilen VL vakalarının toplam sayısı 2006'da 60.000'den 2014 yılında 30.000’e düşmüştür (Anonymous, 2016). Rakamlardaki bu düşüş esas olarak Hindistan'daki VL vakalarındaki 5 katlık bir düşüşüne bağlıdır (Ashford, 1986).

Öte yandan, 12 CL yüksek endemik ülkesinde (Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Fas, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan, Suriye, Tunus ve Türkiye) yıllık bildirilen toplam CL vakası değişmemiş aynı dönemde yaklaşık 150.000 vaka ile yüksek seyrini sürdürmüştür (Anonymous, 2016).

Dünyada son 25 yılda gözlenen leishmaniasis vakalarının sayısındaki artış, birkaç faktörden kaynaklanmaktadır. Küreselleşme ve iklim değişikliği, leishmaniasis'in endemik olmayan alanlara yayılmasına katkıda bulunan iki faktördür (Shaw, 2007). Örneğin, son on yılda uluslararası gezginlerde (turistler ve iş adamları) leishmaniasis vakası artmıştır (Mansueto ve ark, 2014). Ayrıca, uluslararası kan ürünleri trafiği, leishmaniasis endemik bölgelerine hiç seyahat etmeyen hastaların *Leishmania* enfeksiyonlarına yakalanmalarına neden olmuştur (Shaw, 2007). Buradaki problem, hiçbir kan bankasının, anti-*leishmanial* antikorların varlığı için kan koruyucuları taramamasıdır. Küresel ısınmanın, endemik olmayan bölgelere gelmekte olan leishmaniasis'in yayılmasıyla sonuçlanabileceğine dair kanıtlar da vardır (Shaw, 2007).

*Leishmania*’nın ortaya çıkması ve yayılması için diğer risk faktörleri savaş ve huzursuzluktur (Shaw, 2007). Şu anda, büyük endişe, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'daki Eski Dünya CL'nin patlamasıdır. Bu CL salgını Suriye iç savaşı ve mülteci krizi tarafından tetiklenmiş ve şimdi mülteci kamplarında yaşayan ya da çatışma bölgelerinde yakalanan yüzbinlerce insanı etkilemektedir (Du ve ark, 2016; Al-Salem ve ark, 2016). İç savaşın başlamasından önce, Suriye'deki Eski Dünya CL'nin yıllık insidansının yaklaşık 23.000 vaka olduğu tahmin edilmektedir. Bu sayı günümüzde iki katından fazla artmıştır: sırasıyla 2012'de ve 2013'ün ilk yarısında 53.000 ve 41.000 vaka bildirilmiştir. Benzer bir kriz doğu Libya'da ve Yemen'de ortaya çıkıyor gibi görünmektedir. Ayrıca, Türkiye, Lübnan, Ürdün ve Tunus'taki mülteci kamplarından leishmaniasis salgınları kaydedilmiştir (Du ve ark, 2016).

## 

## 2.3. Etiyoloji

Leishmaniasis, Trypanosomatidae(Kinetoplastida) ailesindeki bir protozoan parazit olan *Leishmania* türünden kaynaklanmaktadır. Memelilerde yaklaşık 30 tür tanımlanmıştır. Bu organizmaların çoğunun insanları ve/veya evcilleştirilmiş hayvanları etkilediği bilinmektedir. Bununla birlikte bugüne kadar birkaç tür vahşi hayvanda da tespit edilmiştir.

*Leishmania* cinsi iki subgenera, *Leishmania* ve *Viannia* içerir. İnsan visseral leishmaniasis'e neden olma eğilimi gösteren türler çoğunlukla *Leishmania*'ya aittir, her iki alt cins kapsamında kutanöz leishmaniasis'e neden olan türler mevcutken, *L. enriettii* kompleksi adı verilen kompleksler içinde, diğer *Leishmania*'ların epidemiyolojisinden bir miktar farklılık gösteren *Mundinia* adlı üçüncü bir subgenus önerilmiştir (Solano-Gallego ve ark, 2017).

*Leishmania enriettii* kompleksi halen *L. enriettii*, *L. makropodum* (eski adı “*L. australiensis*”), *L. martiniquensis,* “*L. siamensis*” ve Gana'daki kişilerden isimlendirilmemiş bir *Leishmania*'yı içermektedir. İnsan ve hayvan klinik vakalarından “*L. siamensis*” daha çok *L. martiniquensis* olarak yeniden sınıflandırılmıştır, ancak bu organizma Tayland'da ayrı bir tür olarak da tanımlanmıştır. *Leishmania*'nın sınıflandırması karmaşıktır ve bazı durumlarda tartışmalıdır; tür adı bir organizma için kullanılabilir ve bazı isimler sonunda geçersiz kılınabilir. Yeni genetik analizler, şu anda ayrı türler olarak kabul edilen bazı organizmaların (örn., *L. infantum* ve *L. donovani*) tek bir organizmanın alt türü olarak yeniden sınıflandırılması gerektiğini göstermektedir ve diğerlerinin yeniden adlandırılması gerektiği düşünülmektedir (Steverding, 2017). Bu yeni sistemin klinisyenler için kafa karıştırıcı olması muhtemel olduğundan, bu veri sayfası eski geleneksel taksonomiyi kullanmaya devam etmektedir.

İnsan visseral ve kutanöz leishmaniasis'e neden olan *Leishmania* türleri: İnsan visseral leishmaniasis esas olarak *Leishmania* *donovani* ve *L.* *infantum*'dan kaynaklanmaktadır. *L. donovani* ayrıca *L. archibaldi* ve *L. killicki* gibi daha önce bireysel isimler verilmiş bazı organizmaları da içermektedir. “Eski Dünya” da *L. infantum* (Doğu Yarımküre), “Yeni Dünya” da (Batı Yarıküre) *L. chagasi* olmak üzere iki farklı isim kullanılmaktadır (Zeouk ve ark, 2018). Bununla birlikte, *L. chagasi*'nin *L. infantum*'un bir alt türü olduğu düşünülmektedir, Visseral leishmaniasis, bazen normal olarak kutanöz leishmaniasis (örn. *L.* *tropica*. *L. braziliensis*, *L. amazonensis* ve *L. martiniquensis*), yanı sıra *L. colombiensis* ve “*L. siamensis*” ile ilişkili organizmalar da dahil olmak üzere diğer türlerden de kaynaklanmaktadır. Bu türlerin neden olduğu bazı vakalar, bir cilt-tropik *Leishmania* bağışıklık sistemi baskılanmış bir kişide iç organı işgal ettiğinde ortaya çıkmaktadır. Batı Yarımküre'de insan kutanöz leishmaniasis'e neden olan *Leishmania* türleri *L. braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis, L. shawi ve L. peruviana*) ve *L. mexicana* kompleksi (*L. mexicana, L. amazonensis, L. venezuelensis*) ile *L. lainsoni, L. naiffi* ve *L. lindenbergi* kompleksini içerir.

Doğu Yarımküre'de kutanöz leishmaniasis'e neden olan türler *L. tropica* kompleksinin tüm üyeleri olan *L. tropica, L. majör* ve *L. aethiopica*'dır. Birkaç vakada *L. martiniquensis, L. kolombiensis* ve Gana'daki *L. enriettii* kompleksinin isimsiz bir üyesi tespit edilmiştir. Visserotropik organizmalar *L. infantum* ve *L.* *donovani*, bazen viseral tutulum olmaksızın kutanöz leishmaniasiste ortaya çıkar. Bazı durumlarda, bunun, bir lokalize alanla sınırlı bir *L.* *infantum* ya da *L. donovani* varyantının neden olduğu görülmektedir.

Batı Yarıküredeki mukokutanöz leishmaniasis genellikle *L. braziliensis*'den ve daha az ölçüde *L. panamensis, L. guyanensis, L. amazonensis* ve *L. peruviana*'dan kaynaklanır. *L. infantum, L. donovani, L. tropica, L. majör* ve *L. aethiopica*, bazen Doğu Yarımküre'deki konaklarda mukozaları etkilemektedir. Hayvanlarda görülen leishmaniasis klinik vakalarında insanlarda leishmaniasise neden olan etkenlerin birçoğu da bulunmuştur. *L. macropodum* ve *L. enriettii* gibi insanlarda rastlanılan iki türe ise bugüne kadar hayvanlarda rastlanılmamıştır (Sundar ve Singh, 2018). Köpekler *L.* *infantum* için önemli rezervuar konakları olduğundan, “köpek leishmaniasis” genellikle bu organizma ile enfeksiyonlara işaret eder, ancak köpekler diğer *Leishmania* türleri tarafından da enfekte olabilir.

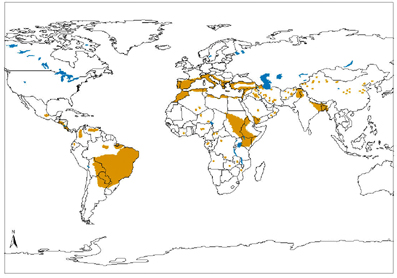
## 2.4. Epidemiyoloji

Leishmaniasis sıtma ve uyku hastalığından sonraki en önemli vektör kaynaklı hastalıktır. Hastalığın yıllık insidansı 2 milyon civarındadır (1.5 milyonu kutanöz ve 500 000'i viseral formdur). Mortalite yılda 50.000'den fazla kişidir. 350 milyondan fazla insanın enfeksiyon riski altında olduğu düşünülmektedir. Brezilya, Hindistan, Bangladeş, Sudan, Etiyopya ve Nepal'de çok sayıda leishmaniasis (>%90) görülmüştür. Leishmaniasis genellikle uzak bölgelerdeki yoksul toplulukları etkilemektedir. Hastalığın insidansının artmasından sorumlu başlıca faktörler; sosyoekonomik koşullar, nüfus hareketliliği, çevresel ve iklim değişiklikleri, malnütrisyon ve anti-*leishmanial* ilaç direncidir. Dünya genelinde birçok insan vakaları, iğnelerin paylaşılmasından dolayı kontamine olmuş kan ve damar içi uyuşturucu kullanıcıları nedeniyle de ortaya çıkmaktadır (Sundar ve Rai, 2002). İnsan leishmaniasis insidansının artması, çoğunlukla insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) etkisi altında 1990'larda kaydedilmiştir (Serhat, 2013). Bu dezenfeksiyon, güney Avrupa bölgesinde önemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir. *Leishmania*'nın 20'den fazla türü, insanları, hayvanları enfekte edebilmektedir. Organizmanın yaygınlığı coğrafi dağılıma bağlıdır.

*Leishmania* türleri iki gruba ayrılır:

Eski Dünya (Afrika, Akdeniz bölgesi, Orta Doğu, Uzak Doğu): *L. donovani, L. infantum, L. tropica, L. majör, L. aethiopica* ve;

Yeni Dünya (Merkez, Güney ve Kuzey Amerika): *L. infantum (L. chagasi), L. mexicana, L. amazonensis, L. panamensis, L. braziliensis, L. guyanensis, L. peruviana ve L. venezuelensis* (Roberts, 2005; Piscopo ve Mallia, 2006; Miro ve ark. 2008; McGwire ve Satoskar, 2014).



**Şekil 1.** Eski ve yeni dünyada visseral leishmaniasis coğrafi dağılımı (WHO).



**Şekil 2.** Yeni dünyada kutanöz ve mukokütanöz leishmania’nın coğrafi dağılımı (WHO).

Doğu Afrika'daki (Etiyopya, Kenya, Güney Sudan ve Sudan) visseral leishmaniasisin tekrarlayan salgınları, etkilenen topluluklarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmuştur. Benzer şekilde, kutanöz leishmaniasisin başlıca salgınları Afganistan ve Suriye Arap Cumhuriyeti'nin farklı bölgelerini etkilemiştir. WHO Güneydoğu Asya Bölgesi'nde eleme programı tatmin edici bir şekilde ilerlemektedir ve 2006 yılında 9000'den fazla vaka bildiren Bangladeş gibi ülkeler, sırasıyla 2016 ve 2017 yıllarında 255 ve 192 yeni vaka rapor etmiştir. Kutanöz leishmaniasis vakalarının çoğunluğu Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran İslam Cumhuriyeti, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye Arap Cumhuriyeti'nde görülür. Antroponotik kutanöz leishmaniasis (insanların parazitin ana rezervuarı olduğu) genellikle yoğun nüfuslu şehirlerde, özellikle savaş ve çatışma bölgelerinde, mülteci kamplarında ve nüfusun büyük ölçekli göçünün olduğu ortamlarda büyük salgınlarla karakterizedir. Amerikadaki kutanöz leishmaniasis epidemiyolojisi, iletim döngülerinde, rezervuar konaklarında, vektörlerinde, klinik tezahürlerde ve tedaviye yanıtta intra ve spesifik varyasyonlar ve aynı coğrafi bölgede birden fazla dolaşan *Leishmania* türü ile karmaşıktır. Mukokütanöz leishmaniasis vakalarının yaklaşık %90'ı Bolivya, Brezilya ve Peru'da gerçekleşmektedir (Rassi ve ark, 2004 ).

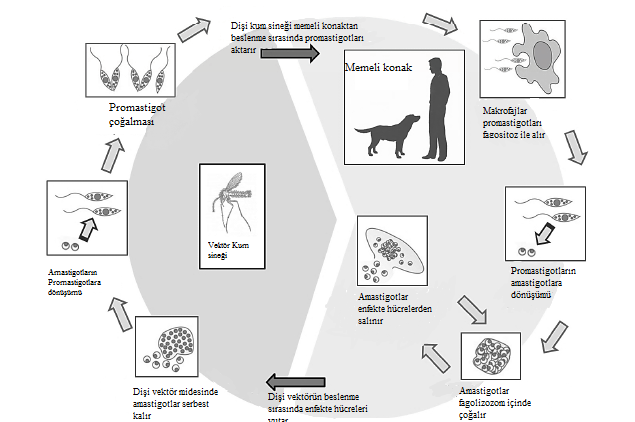
Subtropikal bir iklim altında üç kıta arasındaki kavşaklarda yer alan Türkiye, diğer vektör kaynaklı hastalıkların yanı sıra leishmaniasis açısından da riskli bir ülke konumundadır. Leishmaniasis, Türkiye de dahil olmak üzere Akdeniz havzasındaki çoğu ülkede yaygındır. Türkiye'de özellikle iki form gözlenmektedir. Bunlardan *Leishmania* *infantum* türünün VL’den sorumlu olduğu, *L. tropica’*nın ise KL’ye neden olduğu bilinmektedir. *Phlebotomus sergenti, P. papatasi, P. major ve P. syriacus* muhtemel vektörler olarak kabul edilmekte ve köpekler *L.* *infantum*'un ana rezervuarı olarak ifade edilmektedir. Visseralleishmaniasis ağırlıklı olarak Ege, Akdeniz ve İç Anadolu Bölgelerinde görülür, ancak kutanöz leishmaniasis, özellikle Güneydoğu ve Akdeniz Bölgelerinde endemiktir. Başlıca turistik yerler her iki enfeksiyondan da özgürdür ve hiçbir turistte enfeksiyon bildirilmemiştir. Son dört yılda Sağlık Bakanlığı'na bildirilen yıllık viseral leishmaniasis ve kutanöz leishmaniasis vakalarının sayısı sırasıyla 40 ve 1,204'tür.

Türkiye'de sadece 2005-2014 yılları arasında resmi olarak toplam 14.587 kutanöz leishmaniasis ve 207 viseral leishmaniasis vakası bildirilmiştir (Gürel ve ark, 2012). 2015 yılında WHO, visseral leishmaniasis ve kutanöz leishmaniasis açısından 14 ülkeyi yüksek hastalık yüküne sahip (vaka sayısı> 2500) ülke olarak belirlemiştir. Türkiye ise bu ülkeler arasında kutanöz leishmaniasis için yüksek prevelansa sahip ülkelerden biridir (World Health Organization, 2010; 2016).

Türkiye’de visseral leishmaniasis ve kutanöz leishmaniasis vakalarının nedensel ajanlarının, sırasıyla *Leishmania infantum* ve *L. tropica* olduğu belirtilmektedir (Bakırcı ve ark, 2016). Kutanöz leishmaniasis Güneydoğu Anadolu'da yüzyıllardır endemiktir; Son on yılda, endemik odakların ülkeye yayıldığını gösteren orta ve batı Anadolu'daki bazı illerden yeni vakalar sporadik olarak bildirilmiştir (Özbel ve ark, 2000). Leishmaniasis'in, son on yılda günlük yaşam için büyük bir problem olduğu ve önemli bir halk sağlığı sorunu olduğu iyi bilinmektedir. Visseral leishmaniasis vakaları, Türkiye'nin Ege ve Akdeniz Bölgelerinde ağırlıklı olarak görülmektedir ve ana etken ajan diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi *Leishmania* *infantum* MON-1'dir. Asya ve Afrika endemik ülkelerinde VL'nin bir diğer nedensel ajanı olan *L. donovani*, Türkiye'de 2014 yılına kadar görülmezken, 2014 yılından sonraki günümüze kadar olan süreçte Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgesinde yaşayan 19 hastada belirlenmiştir (Koltaş ve ark, 2014).

## 2.5. Yaşam Döngüsü ve Bulaşma

Leishmaniasis, karmaşık bir parazit-konak etkileşimin örneklerinden biridir. Parazitin yaşam döngüsü, *Pschodidae* ailesine ait bir omurgasız konak ile omurgalı konak arasında heterokseniktir. İnsan, köpek, kemirgen gibi pek çok omurgalıda parazitin amastigot formu bulunurken, omurgasız konakları olan *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi sinekler ile kültür ortamında promastigot formunda bulunurlar (Ready, 2014). Flagellata formu (promastigot) 10-15 µm uzunluğunda 1.5-2.5 µm genişliğinde bir vücuda ve ön uçta 15-28 µm uzunluğunda bir kamçıya sahiptir. Konak üzerinde beslenme esnasında promastigotlar konağa geçer ve kamçılarını yitirerek amastigot forma geçerler. Omurgalı konakta bulunan flagellasız olan amastigot formu ise 2-5 µm boyutundadır (Özbel ve ark, 2000). *Leishmania* türlerinin hayat siklusu vektör *Phlebotomus’*larla, vertebralı konak arasında birbirini takip eden düzenli bir döngüyü içerir. *Phlebotomus* dişileri enfekte bir konaktan kan emme esnasında makrofaj veya monositlerle birlikte onların içindeki etkenin vertabralı konaktaki formu olan amostigotları da alırlar. Vektör olan *Phlebotomus’*ların barsağında amastigot formlar promastigot forma dönüşür ve ikiye bölünerek çoğalır. Bunların bir kısmı ön sindirim sistemine yani orta barsağın ön kısmına doğru ilerlerler ve farinksi tıkayacak kadar çoğalarak metasiklik promastigot forma dönüşür ve yeni bir konaktan kan emme esnasında bu konağa aktarılır. Bu formlar konağın savunma mekanizmalarına karşı koyabildiği gibi bu mekanizmaları kendi lehine çevirerek çoğalmalarını sürdürürler (Bates, 2006).

****

**Şekil 3**. Leishmania yaşam döngüsü (Cardoso ve ark, 2014).

Parazitler, retiküloendotelyal sistemdeki diğer makrofajları ve monositleri enfekte edebilir ve böbreklere, karaciğere, üreme organlarına, idrar torbasına, deriye, solunum sistemine ve sindirim sistemine yayılabilir (Solano-Gallego ve ark, 2009).



**Resim 1.** Dişi kum sineği (Frank Collins, Armed forces pest management board,Technical Guide No. 49).

**2.6. Leishmaniasis’in formları**

Leishmaniasis üç ana farklı formda sınıflandırılır: kutanöz (KL), mukokutanöz (MKL) ve visseral leishmaniasis (VL). Bu hastalığın karakteri *Leishmania* türlerinin türüne ve konağın bağışıklık yanıtına bağlıdır (Roberts, 2005).

#### 2.6.1. Kutanöz Leishmaniasis

Bu tip leishmaniasis hastalığın en yaygın şeklidir ve diğer formlara ilerleyebilir. KL genellikle, genişlemiş ve ülserasyon gösterebilen, kum sineği ısırıkları bölgelerinde deri nodülleri olarak başlar. Bu lezyonlar tipik olarak vücudun maruz kalan bölgelerinde (ör., yüz, bacaklar ve ön kollar) lokalize olur. Histolojik olarak KL, dermiste granülom oluşumu olan monositik ve lenfoid infiltrat ile tanımlanır. Kuluçka dönemi, ilk ısırmadan sonraki iki haftadan birkaç aya kadardır. Çoğu durumda, lezyonlar, konağın geliştirilmiş humoral immünitesi nedeniyle 3 ila 18 ay arasında kendiliğinden iyileşir (Ready, 2014).

#### 

#### 2.6.2. Mukokutanöz Leishmaniasis

Mukokutanöz leishmaniasis, mukozada kronik ve lokal destrüksiyon ile karakterizedir. MKL burun, ağız boşluğu, orofarenks, nazofarenks ve göz kapaklarını içerir. Hastalar burun kanaması, ülserasyon ve nazal septumun delinmesinden muzdariptir. Solunum fonksiyonunu etkileyebilir ve yeme ile ilgili sorunlara neden olabilir. İkincil enfeksiyon ve yetersiz beslenme, MKL'nin mortalitesinden sorumlu ana nedenlerdir (Chappuis ve ark, 2007). İnkübasyon süresi 1 ila 3 ay arasındadır ve kutanöz formun aksine, bu ülserler kendi kendine iyileşmezler. Genellikle kutanöz leishmaniasisin ilk döneminden aylar veya yıllar sonra ortaya çıkarlar. Mukokutanöz leishmaniasis tedavi edilmediğinde, dudakların, damak ve yanakların aşırı tahribatına yol açabilir (Chappuis ve ark, 2007).

#### 2.6.3. Visseral Leishmaniasis

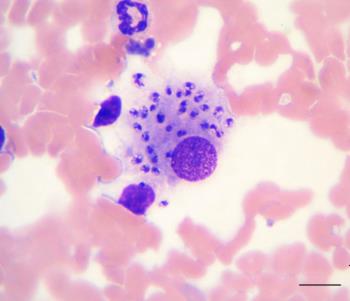
Bu tür hastalık en şiddetli formdur. Progresiftir ve tedavi edilmezse ölümcül olabilir. Kum sineği ısırmasından hastalığın sunumuna kadar kuluçka dönemi, 2 haftadan 18 aya kadar değişir, ancak daha uzun olabilir. VL hastalarında düzensiz ateş, halsizlik, kilo kaybı, halsizlik ve iştah kaybı vardır (Reis ve ark, 2009). Bu semptomlar uzun süreli ve sistemik enfeksiyon nedeniyle ortaya çıkmaktadır. VL, parazitlerin kan ve retiküloendotelyal sistemden yayılması ile karakterize edilir ve genişlemiş lenf nodları, hepathosplenomegali, lenfadenopati, anemi ve pansitopeni içerir. Kemik iliği baskılanması ve hepatosplenomegali, kemik iliği, karaciğer ve dalakta makrofajların içinde parazitik proliferasyondan kaynaklanır. Hastalar tedavi edilmediğinde pansitopeni ve immünsüpresyon gelişebilir ve sekonder bakteriyel enfeksiyonlara daha duyarlı olabilirler. İnsan VL'si, çoğunlukla küçük çocuklar ve AIDS'den muzdarip kişilerde görülür. VL-HIV ko-enfeksiyonu olan hastalar, gastrointestinal sistemi (mide, duodenum veya kolon), akciğerleri, bademcikleri ve deriyi içeren hastalığın atipik bir şekilde ortaya çıkmasına neden olabilir (Reis ve ark, 2009).

#### 2.6.4. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis

Post-Kala-Azar dermal leishmaniasis (PKDL), visseral leishmaniasisin bir komplikasyonudur. Bu form genellikle *L. donovani* tarafından enfekte olan hastalarda Afrika ülkelerinde, Sudan ve Hindistan'da tedaviden sonra görülür. PKDL'de hastalar aylar ya da yıllar boyunca semptomsuz olabilirler ve bundan sonra belirti ve semptomlar geliştirebilirler. PKDL, vücudun her yerinde lokalize olan maküla, makülo-papüler veya nodüler deri lezyonları ile karakterize olmakla birlikte, özellikle insanların yüzünde görülür. Bu lezyonlar birçok parazit içerir ve bu nedenle bu tip hastalık çok bulaşıcıdır. Tedavi edilen VL ve PKDL arasındaki periyot coğrafi alana bağlıdır (örneğin Sudan'da 0-6 ay arası, Hindistan'da 6 aydan 3 yıla kadar) (Esch ve Petersen, 2013).

## 2.7. Köpeklerde *Leishmania*

Köpeklerde hastalığa neden olan türler arasında *Leishmania* *infantum* *L. chagasi, L. tropica, L. major* ve *L. braziliensis* bulunmaktadır (Reithinger ve Davies 1999; Andrade ve ark, 2006). Köpeklerde görülen tipik kanin leishmaniasis semptomları arasında özellikle yüz, kulak ve ayaklarda yaralar, anoreksi, kilo kaybı, lenfadenopati, alopesi ve kaşıntılı olmayan eksfoliyal dermatit bulunur (Handman ve Bullen, 2002). Görülebilecek diğer semptomlar ateş, kaşıntılı ülserler, nazal ve dijital hiperkeratoz, uzun ve deforme olmuş tırnaklar (onikogripoz) ve oküler tutulumdur (Özbel ve ark, 2000). Bununla birlikte, hastalığın safhası, köpeklerin bağışıklık durumu ve hastalara uygulanan sağaltıma bağlı olarak klinik bulgular farklılık göstermekte, hatta enfekte köpeklerin 1/3’de herhangi bir bulguya rastlanılmamaktadır. Bu nedenlerle hastalığın klinik tanısının oldukça zor olduğu bildirilmektedir (Atasoy ve ark, 2010).



**Resim 2**. *Leishmania infantum* enfekte bir köpeğin dalak aspirasyonundan alınan bir makrofajda amastigotlar (Baneth G.).

Köpeklerde leishmaniasis'in inkübasyon süresi 3 ila 18 ay arasında değişebilmektedir. İstisnai olarak, hastalık birkaç yıl boyunca sessiz kalabilir. Bazı köpekler dirençlidir ve enfekte kum sinekleri tarafından ısırılsalar bile, uygun şekilde beslendikleri ve strese maruz kalmadıkları sürece hiçbir zaman hastalık belirtileri göstermezler. Bu direnç muhtemelen genetik olarak belirlenir ve asemptomatik parazit taşıyıcılarının gelişmesine neden olabilir. Leishmaniasis, hemen hemen her tür köpeği etkileyebilse de, cins, yaş ve cinsiyet bakımından, erkek ve 3 yaşından küçük veya 8 yaşından büyük olanlar hastalığa daha duyarlıdır (Deplazes ve ark, 1995).

Köpek leishmaniasis, klinik belirtileri olan ve sistemik ölümcül hastalıklara kadar değişen multisistemik bir hastalıktır. Köpeklerde iki tür leishmaniasis vardır: visseral ve kutanöz. Her tür köpeğin vücudunun farklı bölgelerini etkiler. En sık rastlanan klinik semptom, özellikle gözlerin, kulakların ve burnun etrafındaki kıl dökülmesidir. Hastalık ilerledikçe köpek kilo kaybeder. Lenfadenomegali ve aşırı tırnak büyümesi (onychogryphosis), ayrıca iyileşmeyen cilt yaraları gibi belirtiler, özellikle köpeğin otururken yere temas ettiği alanlarda, baş ve bacaklarda sık görülür. Ayrıca kas atrofisi, uyuşukluk, sarkıklık veya eklem iltihabı, burun kanaması, burun dijital hiperkeratoz, palpebral veya konjonktival lezyonlar da görülebilir. Hastalık kronik hale geldiğinde, birçok durumda hastalık böbrek yetmezliği ile ilgili komplikasyonlara neden olabilir.

### 2.7.1. Klinik Bulgular

Klinik bulguların sayısı ve yoğunluğu parazit suşu, genetik ve konakçı bağışıklık durumunu içeren bir dizi faktör tarafından belirlenir. Bu yüzden, bazı köpekler enfeksiyonu klinik belirtiler olmadan uzun yıllar boyunca kontrol edebilir ve bazen kendiliğinden iyileşmeyi bile geliştirebilir. Öte yandan enfekte bazı köpeklerde uygun tedavi kabul edilmezse akut gelişim ve ağır hastalık bulguları ölüme kadar varan bir şekilde ilerleyebilir. Kanin leishmaniasisin klinik tanısı karmaşıktır, çünkü etkilenen köpek popülasyonunun neredeyse %50'si klinik belirtiler göstermez (Mancianti ve ark, 1988). Ayrıca, köpekler hasta olduklarında değişken ve spesifik olmayan bir klinik spektrum sergilerler (Ribeiro ve ark, 2013) zira KVL potansiyel olarak herhangi bir organı etkileyebilecek kronik ve multisistemik bir hastalıktır (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik belirtiler köpeklerin enfekte olmasından üç ay ila birkaç yıl sonra ortaya çıkabilir (Koutinas ve Koutinas, 2014). Klasik kutaneoviseral formda, hastalığın en eski ve en yaygın klinik belirtilerinden biri, temel olarak popliteal preskapular ve submaksiller lenf nodlarını etkileyen lenfadenopatidir (Lima ve ark, 2004). Dermatolojik anormallikler sıktır ve sonra ortaya çıkar. Lezyonların karakterizasyonu değişken ve uzun sürelidir. Bu köpeklerin yaklaşık %90'ı deri lezyonları gösterir; Ancak, dermatolojik değişiklikler hastalığın diğer belirtilerinin yokluğunda nadirdir (Foglia ve ark, 2013). Klasik dermatolojik lezyonlar arasında, alopesi ile seyreden ya da seyretmeyen eksfoliyatif dermatitis, erozif ülseratif dermatit, nodüler, papüler veya püstüler dermatit; nazal hiperkeratoz, nazal depigmentasyon ve onikogripoz yer alır (Roura ve ark, 2013; Koutinas ve Koutinas, 2014; Ordeix ve ark, 2017).



#### Resim 3. Bir köpekte kutanöz leishmaniasis belirtileri (Baneth G.).

Diğer bulgular anoreksi, kronik enterit ve kilo kaybı, splenomegali ve hepatomegali, oftalmopati ve kas güçsüzlüğünü içerir (Solano-Gallego, 2011; Roura ve ark, 2013; Pietro ve ark, 2016). Artrit ve nörolojik bulgular gibi olağandışı veya atipik bulgular da görülebilir (Sbrana ve ark, 2014; Giannuzzi ve ark, 2017). Böbrek hastalığı, KVL 'ın tek klinik belirtisi olabilir ve hafif proteinüriden nefrotik sendroma veya son dönem böbrek hastalığına ilerleyebilir (Solano-Gallego ve ark, 2011). Kronik böbrek yetmezliği hastalığın ilerlemesinin ciddi bir sonucudur ve en yaygın ölüm nedenidir (Solano-Gallego ve ark, 2011; Proverbio, 2016). KVL için bilinen iki klinik evreleme sistemi vardır (Proverbio, 2016). Etkilenen köpekleri klinik sunumlarının ciddiyetine göre gruplamak daha kesin tanı, prognoz ve tedavinin belirlenmesine yardımcı olur (Solano-Gallego ve ark, 2009). LeishVet Sisteminde, hastalık evrimi dört aşamaya ayrılır. Aşama I: hafif hastalık; Evre II: orta hastalık (A ve B alt evreleri); Evre III: Şiddetli hastalık; Evre IV: çok şiddetli hastalık. İndirekt immünofloresan ve biyokimyasal-hematolojik bulgular ile belirlenen antikor seviyeleri ile ilişkilendirilir (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Köpek Leishmaniasis Çalışma Grubu (CLWG) Sistemi köpekleri klinik duruma göre, serolojik ve parazitolojik (sitoloji, histoloji veya PCR) tanı ve klinikopatolojik anormallikler ile ilişkili olarak beş aşamada sınıflandırır. Aşama A: korumasız köpekler; Aşama B: Enfekte köpekler; Aşama C: hasta köpekler (klinik olarak belirgin leishmaniasisli köpekler); Aşama D: ağır hasta köpekler; Evre E: Klinik duruma göre tedaviye yanıt vermeyen veya erken nüks edenler (Paltrinieri ve ark, 2010; Roura ve ark, 2013).

Her klinik formun parazitin transmisyon döngüsündeki ilişkisi konusunda tam olarak fikir birliği yoktur. Bazı kanıtlar, vektörlere aktarım olaylarının çoğunun, çok yüksek cilt parazit yükü olan bulaşıcı köpeklerin küçük bir kısmından kaynaklandığını ve bu durumun ağır hastalıklarla ilişkilendirileceğini göstermektedir (Courtenay ve ark, 2002; Courtenay ve ark, 2014). Öte yandan, asemptomatik köpekler de endemik bölgelerde parazitin taşınması ve yayılması için etkili rol oynayıp yüksek derecede bulaşıcı olabilir (Laurenti ve ark, 2013). Bu çelişkili sonuçlara rağmen, spesifik ve hassas bulaşıcılık belirtecine kadar, ister doğrudan ister dolaylı olsun, mümkün olduğunda, hem semptomatik hem de asemptomatik köpeklerin kum sinek vektörlerine bulaşıcı olabileceğini ve bu nedenle kontrol önlemleri önerirken eşit olarak düşünülmeleri gerekmektedir. Enfeksiyona direnç veya duyarlılıktan sorumlu olan bağışıklık mekanizmaları henüz iyi bilinmemektedir. İmmün yanıtın etkinliği, hastalığın patogenezinde ve ilerlemesinde (Tafuri ve ark, 2001) KL'ın klinik belirtilerinde önemli bir rol oynayan temel bir özelliktir (Cardoso ve ark, 2007).

Çalışan köpek ırklarında daha yüksek enfeksiyon oranı, dış ortamlarda vektörüyle daha fazla temas süresi nedeniyle olabilir. Tartışmalı olsa da, tüyün uzunluğu muhtemelen enfeksiyon riskini etkileyebilir, çünkü köpek ırkları arasında büyük ölçüde değişkenlik gösteren bir özelliktir. Kısacası, *Leishmania* enfeksiyonunun yakalanma oranı, uzun tüylü karışık cins dişi köpeklerde, evsel olarak sınırlandırılmış (içeride yetiştirilen köpekler) veya evlere yakın yeşil bir ortamda bulunmayan evcil hayvanlarda düşüktür (Belo ve ark, 2013).

### 

### 2.7.2. Laboratuar Bulguları

Hematopoez ile ilgili parametrelerin laboratuvar analizi, böbrek fonksiyonları ve serum elektroforetik profili, klinik rutinde tanı koymada tamamlayıcı bir araç olarak kullanılmalıdır (Ikeda Garcia ve ark, 2008). Enfeksiyondan sonra ortaya çıkan belirgin poliklonal humoral yanıt, elektroforetik plazma profilinde gözle görülür değişikliklere yol açar ve böbrekler, gözler ve cilt gibi organların hasar görmesine katkıda bulunur. Ek olarak, mononükleer fagosit sisteminin (MPS) bileşenlerindeki yüksek parazit yükleri, örneğin, kemik iliği ve karaciğerdeki , hepatik ve hematopoetik fonksiyonlarla ilgili klinik patolojinin oluşumunu tetikler (Ribeiro ve ark, 2013).

Anemi, hemogramdaki ana laboratuvar bulgularından biridir. Kanama, hemoliz, kronik böbrek yetmezliği, kemik iliği hipoplazisi veya aplazisi gibi anemi etiyolojisinde birden fazla faktörün bulunması ve eritrositembranın lipid akışkanlığının azalması muhtemeldir (Burillo ve ark, 1994; De Luna ve ark, 2000; Ribeiro ve ark, 2013).

Hastaların %50 ila 70'inin normositik / normokromik ve rejeneratif olmayan anemi göstermesi, en azından, kronik enfeksiyonlu hastalığın katılımını ve/veya kemik iliği ve/veya böbreklerdeki enfeksiyon kaynaklı değişikliklere bağlı eritropoezinin bozulmasına işaret eder (Ribeiro, 2013). Anlaşılan, anemi ile hastalığın klinik formları arasında bir ilişki vardır (Reis ve ark, 2006; Amusategui ve ark, 2003; Ribeiro ve ark, 2013).

Kemik iliği disfonksiyonu genellikle lökositlerin prekürsör hücrelerini içermez (Amusategui ve ark, 2003; Ribeiro ve ark, 2013), ancak ikincil bakteriyel enfeksiyonlar veya diğer komorbiditeler eşliğinde dermatolojik lezyonlar bunu yapabilir.

Disproteinemi hastalığın en önemli değişikliklerinden biri olarak kabul edilir (Ribeiro ve ark, 2013). Protein dengesizliği, albumin / globulin oranındaki inversiyonu da belirleyen toplam serum proteinlerinin (hiperproteinemi), hiperglobulineminin ve hipoalbümineminin artmasıyla temsil edilir (Lewis, 1982). Hiperglobülinemi, hipergamaglobülinemiyi belirleyen, gama globülinlerin belirgin bir şekilde artmasıyla birlikte alfa ve beta fraksiyonlarının ayrı veya az yükselmesinin bir sonucudur. Albümin seviyelerinin azalması kısmen, hastalık sırasında ortaya çıkan glomerüler hasar ve karaciğer yetmezliği durumunda karaciğer tarafından düşük üretim nedeniyle ve artan renal atılımın bir sonucudur.

KVL genellikle total serum proteinlerinde artış (hiperproteinemi), azotemi, hipergamaglobülinemi (poliklonal B hücre yanıtı), hipoalbüminemi (böbrek ve / veya karaciğer yetmezliği) ve referans alt sınırının altındaki A-G oranı değerlerinde bir artış ile karakterize edilir. Hastalıkla ilişkili böbrek hasarının neredeyse kaçınılmaz olduğu kabul edildiğinden (Ribeiro ve ark, 2013), bu parametreler tanı ve tedaviyi izleme için iyi belirleyicilerdir. KL'deki böbrek hastalığı, nefrotik sendroma karşı hafif proteinüri veya kronik böbrek yetmezliği olarak ortaya çıkabilir, bu arada, genellikle böbreklerde immün komplekslerin birikmesi ile ilişkili glomerülonefrit vardır. Hepatik enzimlerin etkinliği, genel olarak, köpek türleri için referans değerleri içindedir. Enfekte köpeklerde biyokimyasal bulgular aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalen fosfatazdaki değişiklikleri içerebilir (Heidarpour ve ark, 2012; Paltrinieri ve ark, 2016).

### 2.8. Bağışıklık Tepkisi

İnsanlarda (Kaye ve Aebischer, 2011), farelerde (Liew ve O’Donnell, 1993) ve köpeklerde (Koutinas ve Koutinas, 2014; Hosein ve ark, 2017) leishmaniasise karşı koruyucu bağışıklık T hücreleri aracılık eder ve bu durum IFN-N ve TNF-𝛼 üretimi ile ilişkilidir, IL-4 ve IL-10 gibi Th2 sitokinlerin rolü ve etkili humoral cevap ilerleyici hastalık ile ilişkilidir (Hosein ve ark, 2017; Barbieri, 2006). Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler ve Alman Çoban gibi bazı cinslerin KL'ye duyarlılığının, Slc11a1 (Solute Carrier ailesi 11a üyesi 1; eski adıyla NRAMP1) geninin ve/veya majör histo-uyumluluğunun kompleks (MHC) sınıf II polimorfizm ile ilişkili olabileceği görülmektedir (Sanchez-Robert ve ark, 2008; Vasconcelos ve ark, 2019). Buna karşılık, Ibizan Hound'un, baskın olarak hücresel bağışıklık tepkisi göstermesi nedeniyle, *Leishmania* enfeksiyonuna daha dirençli olduğu rapor edilmiştir (Solano-Gallego ve ark, 2000; Sanchez-Robert ve ark, 2008).

Leishmaniasisin immün tepkisi hem hücresel hem de humoral immüniteyi beraberinde getirir (Baneth ve ark, 2008). Hücresel bağışıklıkta, enfeksiyonun sonucu, karışık Thl / Th2 yanıtına bağlıdır. Aktive Thl (T yardımcı tip 1) hücreleri, interlökin 2 (IL-2), interlökin 3 (IL-3), interferon gama (IFN-y) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-a) gibi sitokinler salgılar. Bu sitokinler, makrofaj aktivasyonunu ve nitrik oksit (NO) sentezini indükleyebilir (Alvar ve ark. 2004; Piscopo ve Mallia 2006). Makrofajlar tarafından üretilen NO *Leishmania* parazitlerinin apoptozla hücre içi öldürülmesinden sorumludur (Piscopo ve Mallia 2006). Leishmaniasisde Th1 cevabı ve düşük seviyelerde spesifik antikorlar dirençle ilişkilidir (Alvar ve ark, 2004; Piscopo ve Mallia 2006).

Th2 (T yardımcı tipi 2) hücreleri, interlökin 4 (IL-4), interlökin 5 (IL-5), interlökin 6 (IL-6), interlökin 10 (IL-10) ve transforme büyüme faktörü beta (TGFy) üretir. B hücreleri tarafından antikor üretimi ve artan plazma hücresi aktivitesini indükler. Bu sitokinler ve yüksek seviyelerde spesifik antikorlar, enfeksiyona yatkınlıkla ilişkilidir ve hastalığın ilerlemesine neden olabilir. IL-10 ayrıca T düzenleyici hücreler (Treg) tarafından salgılanır ve Thl tepkisinin aşağı regülatörü olarak kabul edilir (Piscopo ve Mallia 2006; Baneth ve ark, 2008). Hümoral immün yanıt, *Leishmania*'ya özgü antikorların yüksek seviyeleri ile alakalıdır. Enfekte köpeklerde farklı immünoglobulinler üretimektedir. Semptomatik köpeklerde anti-*leishmania* antikor seviyeleri daha yüksektir. Enfeksiyonun ilk ve geç evresinde veya asemptomatik köpeklerde düşük seviyeler gözlenmiştir (Baneth ve ark, 2008; Maia ve Campino, 2008). Spesifik hümoral immün yanıt, IgG (immünoglobulin G), IgGl (immünoglobulin G alt sınıf 1), IgG2 (immünoglobulin G alt sınıf 2), IgM (immünoglobulin M), IgA (immünoglobulin A) ve IgE (immünoglobulin E) ile sunulmaktadır (Baneth ve ark, 2008; Maia ve Campino, 2008). Asemptomatik taşıyıcılarda artmış IgG1 düzeyi gözlenmiştir (Reis, 2009). Semptomatik köpeklerde ise yüksek düzeyde IgG2 bulunmuştur. Bu immünoglobulinin bir hastalık belirteci olduğu düşünülmektedir. IgM, hastalığın ilk aşamasından ve IgG oluşumundan sonra üretilir. IgE yalnızca klinik belirti ve semptomları olan hastalarda ve hayvanlarda geliştirilmiştir (Maia ve Campino, 2008).

## 2.9. Tanı Yöntemleri

Prognozu iyileştirmek ve hem insan hem de köpek bulaşmasından (yanlış negatif vakalardan) ve gereksiz ötenaziden (yanlış pozitif vakalardan) kaçınmak için tanı, mümkün olan en kısa sürede, sadece birkaç hatta tek bir klinik bulguya dayanarak yapılmamalıdır. Parazitolojik tanı, genellikle kemik iliği, lenf düğümleri ve dalak gibi lenfoid organlarda ve ayrıca karaciğer ve deride amastigotların gözlemlerine dayanan eşsiz kesin yöntemdir. Klinik rutinde, cilt biyopsisi ile elde edilen bir örnek, sitolojik ve histopatolojik / immünohistokimyasal teknikler için örnek hazırlanmasına izin verir (Tafuri ve ark, 2001).

Lenf bezleri, kemik iliği veya dalaktan gelen aspirasyon biyopsisi, Giemsa veya Panoptic yöntemleriyle ve daha nadir olarak kültür ortamlarında (NNN, LIT ve 𝛼-MEM, diğerleri) parazitlerin üretilmeleri ile değerlendirilebilir. Kemik iliği aspiratı duyarlılığı %60-85 ve lenf nodulü için %30-40’dır. Literatüre göre splenik aspiratlar, KL'de parazitolojik tanı için tercih edilen yöntem olarak kabul edilmektedir (Barrouin ve ark, 2004).

Moleküler teknikler yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir ve PCR ve qPCR şu anda özellikle takip için yararlı olan ve çeşitli biyolojik numuneler üzerinde (periferik kan, kemik iliği aspiratı veya lenf düğümleri, deri parçası ve diğerleri gibi) gerçekleştirilebilen veteriner tanısal rutininin bir parçasıdır. PCR/qPCR tarafından sağlanan bilgilerin klinikopatolojik ve serolojik değerlendirmelerden elde edilen verilerden ayrılmaması gerektiğini vurgulamak önemlidir (Solano-Gallego, 2011).

KVL, tercihen immünofloresan antikor testi (IFAT) ve enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) gibi kantitatif serolojik teknikler kullanılarak, *Leishmania* sp'ye karşı spesifik antikorların saptanmasıyla teşhis edilir. Bununla birlikte, serolojik testler, Trypanosoma parazitleri, kutanöz leishmaniasis türleri ve diğer hemoparazitler ile çapraz reaksiyonlar (Ferreira ve ark, 2007; Porrozzi ve ark, 2007) gibi önemli kısıtlamalar ve ayrıca alerji vakalarında veya düşük titrelerde (şüpheli reaksiyonlar) yanlış negatif sonuçlar vermektedir (Lopes ve ark, 2017).

Son zamanlarda, immüno-kromatografik analizler, veteriner kliniklerinde KVL dahil düzinelerce hastalığın tespiti için rutin laboratuvar testleri olarak kullanılmıştır. Bu testlerin yapılması hızlı ve kolaydır (yaklaşık 15 dakika), sonuçları yorumlamak için eğitimli personel veya uzman laboratuar eğitimi gerektirmez ve güvenilir hassasiyet ve özgüllük indeksleri sunar. KVL için, genellikle rK39 gibi parazitin rekombinant proteinlerinin nitroselüloz membranlar üzerine emdirimesi ve serum numunelerinin hızlı test platformuna uygulanması esasına dayanan testler sık kullanım alanı bulmaktadır. Brezilya Sağlık Bakanlığı resmen, hastalık taraması için çift yollu platformu temel alan ve doğrulayıcı olarak ELISA’yı kapsayan hızlı bir kromatografik immunoassay (DPP) oluşturmuştur (Fraga ve ark, 2016). Halk sağlığı açısından, serolojik testlerdeki olumlu sonuçlar, Brezilya'da kabul edilen VL'nin kontrolüne yönelik eleme programına dayanarak şüpheli köpeklerde ötenazi için bir kriter olarak kullanılmaktadır.

### 2.9.1. Doğrudan yöntemler

#### 

#### 2.9.1.1. Mikroskopik inceleme

Bu doğrudan parazitolojik test, *Leishmania* enfeksiyonunun kesin tanısı için ilk tercih edilen yöntem olarak kalmaya devam etmektedir (Silvestre ve ark, 2009). *Leishmania* amastigotları, kemik iliği, dalak, lenf düğümleri veya deriden gelen doku örneklerinde mikroskopi ile tespit edilir (Srivastava ve ark, 2011). Alınan örneklerden elde edilen yayma preperatlarda, Giemsa veya Leishman boyasıyla boyanması sonucu parazitin amastigot formları tek başlarına veya monosit, makrofaj ve nötrofiller gibi hücrelerin içinde oval, 2–4 mm çapında görülebilmektedir. Klinik bulgular olmadığında tanısal hassasiyetin daha yüksek olduğu kemik iliği, lenf nodülü veya *buffy coat*’tan örnek alınması enfeksiyonun tanı şansını arttırabilmektedir (Pennisi ve ark, 2005) (Sundar ve Rai, 2002; Srivastava ve ark, 2011). Bu yöntem oldukça spesifiktir, duyarlılık kullanılan dokuya ve parazitik yüke bağlıdır (Silva ve ark, 2014). Dalaktan gelen smearlerin duyarlılığı %93.1 - 98.7 iken, kemik iliği ve lenf nodları aspiratları düşük duyarlılık göstermektedir (%52 - 85) (Srivastava ve ark, 2011).

Asemptomatik enfeksiyonlarda, bu tekniğin duyarlılığı %30'un altında olabilir (Miro ve ark, 2008). Bu yöntemin en büyük dezavantajı, numunelerin (özellikle splenik aspiratların) ağrılı bir şekilde elde edilmesidir ve ciddi ve ölümcül kanama riski vardır (Maia ve Campino, 2008; Srivastava ve ark, 2011). Sitolojik değerlendirme hızlı ve ucuz bir tanı sağlasa da tür tayini yapılmasına izin vermemektedir. Test yapan personelin teknik becerisine bağlı olarak parazit yükü hakkında da kısmi bilgi vermektedir (Akhoundi ve ark, 2017).

#### 2.9.1.2. Kültür

Canlı promastigotların gelişimi ile *Leishmania* organizmasının *in vitro* kültürü muhtemelen en güvenilir ve en spesifik testtir. Kültürler, ilk olarak Novy–McNeal–Nicolle Media (3N besiyeri) gibi difazik ve daha sonra Schneider‘s insect medium, M199, RPMI, Grace‘s medium gibi monofazik üreme gösterirler. Gerekli ortam olsa dahi her *Leishmania* spp. suşu aynı oranda ürememekte, aynı parazit yüküne sahip organlarda bile aynı oranda üreme görülmemektedir. Enfekte köpeklerden alınan lenf yumrusu, kemik iliği, dalak ve karaciğerin kültür ekimlerinin %77,1 ilk haftada, %23‘ünün ise 2. ve 3. haftalarda pozitiflik verdiği görülmüştür. Bu yöntem için gerekli malzemelerin her labaratuvarda mevcut olmaması, maliyetinin yüksek olması ve sonuçların alınması için gerekli sürenin uzaması da bu yöntemin klinik için yararlı olmadığını göstermektedir.

### 2.9.2. Dolaylı Yöntemler

#### 2.9.2.1. Moleküler yöntem

Geleneksel PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ve qRT-PZR (kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) gibi moleküler biyoloji teknikleri, parazitin DNA veya RNA'sını tespit edebilen ve tanı için kullanılan güçlü testlerdir. Tüm vakalarda (KL, MKL, VL) pozitif sonuçlar elde edilir ve HIV-VL koinfeksiyonu gibi, immün yanıtın zayıf olduğu durumlarda enfeksiyonun onaylanmasında özellikle bu yöntemler sıklıkla kullanılır (Silvestre ve ark, 2009).

##### 2.9.2.1.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

PZR analizleri, yüksek hassasiyet ve özgüllüklerinden dolayı büyük başarılar kaydetmiştir. Bu nedenle, bu yöntemin sadece *Leishmania* DNA'sının tespiti için değil, aynı zamanda tedaviden sonra parazitemiyi izlemek için de etkili bir araç olduğu düşünülmektedir (Maia ve Campino, 2008). Polimeraz zincir reaksiyonu ayrıca belirtileri olmayan hastalarda da kullanılmalıdır, çünkü PZR, asemptomatik enfeksiyonun doğrulanmasında faydalıdır. Asemptomatik taşıyıcıların kan veya dokuları, *Leishmania* DNA'sı içerebilir ve enfeksiyon gizlediklerini ve klinik hastalık geliştiremediklerinin sinyallerini verir (Solano-Gallego ve ark, 2009).

PZR ilkesi, DNA'nın tamamlayıcı bazlarını, genomdaki spesifik alanın amplifikasyonunu ve saptanmasını, spesifik primerlerin kullanımıyla eşleştirmektir. Ürünün tespiti için agaroz veya poliakrilamid jellerinde elektroforez yapılması gereklidir. Ethidium bromid, SYBR Yeşil veya gümüş nitrat bir pigment olarak kullanılır. Kandaki *Leishmania* DNA'sının tespiti için biyolojik sıvılar, kemik iliği, lenf nodu, dalak, cilt, konjonktiva veya buffy coat örnekleri kullanılabilir (Solano-Gallego ve ark, 2009). PZR, ribozomal RNA (rRNA) geni, miniexon genleri, nükleer diziler veya kinetoplast DNA (kDNA) minicircles veya maxicircles kullanan çeşitli hedef dizilere dayanmaktadır (Solano-Gallego ve ark, 2009; Srivastava ve ark, 2011). Kinetoplast, maxicircles ve minicircles şeklinde olan birçok spesifik DNA sekansı içerir (Weirather ve ark, 2011). Kinetoplast DNA'sı parazit başına on binden fazla kopya halinde sunulur. Bunun aksine, *Leishmania* parazitleri 40-200 kopya rRNA geni içerir (Miro ve ark, 2008). PZR tanısı için kDNA'nın amplifikasyonu en duyarlı ve etkili hedef gibi görünmektedir (Antinori ve ark, 2009). Biyolojik materyal, primerlerin seçimi, DNA'nın ekstraksiyonu için kullanılan hedef metodun kopya sayısı ve PZR protokolü, PZR'nin özgüllüğünü ve duyarlılığını etkileyebilecek ana faktörlerdir (Alvar ve ark, 2004; Maia ve Campino, 2008). PZR, boyanmış örnekler veya parazit kültürlerinde amastigotların mikroskopik tespitinden daha hassastır. Bununla birlikte, bu teşhis metodu özel ve pahalı ekipman gerektirir. Bu koşullar, gelişmekte olan ülkelerde PZR'nin kullanımını sınırlayabilir (Silvestre ve ark, 2009).

##### 2.9.2.1.2. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR), aşırı düşük parazit yüklerinin tespiti, genetik karakterizasyonu ve parazitlerin miktarının belirlenmesi için kullanılan bir moleküler teknolojidir (Miro ve ark, 2008; Antinori ve ark, 2009). Kantitatif RT-PZR, parazit seviyelerinin sürekli izlenmesine ve amplifikasyonu sırasında ürünlerin tespitine izin verir. Geleneksel PZR ile karşılaştırıldığında, qRT-PZR hassasiyeti arttırmakta, kontaminasyona daha az eğilimli olmakta ve analiz süresini bir saat veya daha az sürede gerçekleştirmektedir (Maia ve Campino, 2008). Bu yöntem sırasında, oligonükleotid probları floroforlarla etiketlenir ve yayılan floresans, *Leishmania* DNA'sının saptanmasına izin verir (Veras ve ark, 2014).

## 

#### 2.9.2.2. Serolojik Yöntemler

##### 

##### 2.9.2.2.1. Doğrudan aglutinasyon testi

Bu serolojik yöntem yüksek klinik doğruluğa sahiptir, güvenilirdir, non-invaziv, basittir ve pahalı ekipman gerektirmez ve çoğu endemik bölgede yaygın olarak uygulanır (Chappuis ve ark, 2007; Weirather ve ark, 2011; Srivastava ve ark, 2011). Doğrudan aglütinasyon testi dondurulmuş halde veya bir antijen olarak bir süspansiyonda *leishmania spp* promastigotlarını kullanır. DAT, enfekte olmuş hastaların plazmasında veya serumunda antikorları tespit edebilir (Maia ve Campino, 2008; Adams ve ark, 2012).

Numuneler, mikrotitre plakalarda antijen ile inkübe edilir. Aglütinasyon gece boyunca inkübasyondan sonra görülebilir (Chappuis ve ark, 2007; Srivastava ve ark, 2011). Negatif örneklerde, DAT antijeni kuyunun bottonunda koyu mavi nokta oluşturur. *L. donovani*'ye karşı antikorlar mevcut olduğunda pozitif sonuçlar elde edilir. Antijen tüm kuyuların üzerinde mavi film yapar (Adams ve ark, 2012). DAT'ın duyarlılığının %88 ile %93 arasında olduğu, özgüllüğünün ise %70 ile %100 arasında olduğu belirtilmiştir (Veras ve ark, 2014). DAT'ın ana dezavantajı, uzun inkübasyon süresi (18 saat) ve numunelerin çoklu sulandırılmasıdır (Srivastava ve ark, 2011). DAT'ın modifiye edilmiş versiyonu hızlı aglütinasyon tarama testidir (FAST). FAST'ın gerçekleştirilmesi kolaydır, DAT'tan daha hızlıdır, daha yüksek parazit konsantrasyonu kullanır ve sadece tek dilüsyonlu serum dilüsyonu gerektirir. Sonuçlar 3 saat sonra değerlendirilir (Chappuis ve ark, 2007; Maia ve ark, 2008).

##### 2.9.2.2.2. Dolaylı floresan antikor testi

Leishmaniasis, dolaylı floresan antikor testi ile de değerlendirilebilir. Bu yöntem, anti-*Leishmania* antikorlarını yüksek hassasiyetle tespit eder ve epidemiyolojik çalışmalarda ve tedavi izlemede yararlıdır (Maia ve ark, 2008; Otranto ve ark, 2004). IFAT, antijen olarak tüm parazit gövdesini kullanır ve antikorlar, florokromlarla etiketlenir. Antijen-antikor reaksiyonu floresan mikroskopisi ile tespit edilir. Pozitif örnekler yeşil floresan gösterir, negatif örnekler mat kırmızı renklendirilir (Maia ve Campino, 2008; Veras ve ark, 2014).

IFAT hem nitel hem de nicel bir yöntem olup, anti-*Leishmania* antikorunun titrelerinin değerlendirilmesine olanak sağlar ve enfekte hastaların kitlesel taranması için kullanılır (Otranto ve ark, 2005). IFAT'ın özgüllüğü %60 ila %90 ve hassasiyet %68 ila %100 arasında değişmektedir. Bununla birlikte, bu teknik yüksek düzeyde beceri, pahalı laboratuar olanakları gerektirmesi ve seri serum seyreltileri yapılması gerekliliği düşünüldüğünde tanı için tek başına yeterli olamamaktadır (Maia ve Campino, 2008; Veras ve ark, 2014).

##### 2.9.2.2.3. Enzim bağlantılı immünosorbent testi

#### 

ELISA tabanlı teknikler birçok bulaşıcı hastalık için değerli bir serodiagnostik araç olarak kullanılmıştır (Sundar, 2002). ELISA, spesifik anti-*Leishmania* antikorlarının saptanmasına dayanan bir yöntemdir ve kısa sürede çok sayıda numuneyi tarayabilir (Silvestre ve ark, 2009; Santarem ve ark, 2010). Bu tahlil oldukça hassastır, ancak özgüllüğü kullanılan antijene bağlıdır. Çözünebilir promastigot ekstreleri ve saflaştırılmış veya rekombinant proteinler antijenler olarak kullanılabilir. Farklı *Leishmania* türlerinin promastigot aşaması, bu tahlilde en çok kullanılan antijenler olan toplam çözünür ham antijenleri sağlar (Solano-Gallego ve ark, 2009; Santarem ve ark, 2010).

Son yıllarda, semptomatik ve asemptomatik köpeklerde *Leishmania* hastalığının serodiagnozu için birçok rekombinant protein tanımlanmış ve test edilmiştir. RK39 (rekombinat K39 antijeni), rK28 (rekombinat K28 antijeni) veya LicTXNPx (*Leishmania* *infantum* sitozolik tryparedoxin peroksidaz) gibi birçoğunun çok faydalı olduğu gösterilmiştir (Santarem ve ark, 2010; Souza ve ark, 2013; Veras ve ark, 2014). Rekombinant proteinlere dayanan ELISA testleri, hassasiyet özgüllüğü ve doğruluğu arttırmıştır (Veras ve ark, 2014). Rekombinant protein rK39'un, hastalığın güçlü ve spesifik bir teşhis markörü olduğu düşünülmektedir. Bu antijen, *Leishmania* *chagasi*'nin amastigotlarında kinesin bölgesinde eksprese edilen 117 baz çift geni ile kodlanan 39-amino asittir (Sundar ve Rai, 2002; Silvestre ve ark, 2009). Bu protein %100 ve %96 duyarlılık ve özgüllük gösterir. RK39 semptomatik KL ve insan VL tanısında asemptomatik KL'den daha hassastır (Santarem ve ark, 2010). RK39'ın yararı, *L*. *infantum* ile enfekte olmuş HIV hastalarında da gösterilmiştir. Hastalığın aktivitesi, bu antijenin antikor titreleri ile birleşir. Rekombinant K39, tedavinin izlenmesi için kullanılabilir ve nüksün öngörülmesi için de yararlı olabilir (Houghton ve ark, 1998; Sundar ve Rai, 2002; Srivastava ve ark, 2011). RK39-bazlı immüno kromatografik test (ICT) son yıllarda ümit verici bir hızlı strip testi olarak geliştirilmiştir. Bu yağ çubuğu testi piyasada mevcuttur ve VL'nin serodiagnozu için ve ayrıca KL için kullanılabilir (Otranto ve ark, 2005; Srivastava ve ark, 2011). Parazitin rekombinant proteini, küçük bir nitroselüloz membran parçası üzerine sabitlenir ve enfekte olmuş hastaların serumunda sunulan benzersiz immünoglobulinler bu antijeni tanıyabilir. Tespit için spesifik kolloidal altın protein A kullanılır ve bu tahlilin gerçekleştirilmesi için sadece bir damla kan gereklidir (Otranto ve ark, 2005; Srivastava ve ark, 2011; Veras ve ark, 2014). Test edilen alanda kırmızı çizginin varlığı pozitif sonuç olarak kabul edilir. ICT hızlıdır (sonuçlar 10 dakika içinde görsel olarak okunabilir), en iyi format nedeniyle kullanımı kolaydır, saha koşullarında çok sayıda örneği tarayabilir ve pahalı ekipman gerektirmez. Duyarlılık %67-100 arasında ve özgüllüğü %97-100 arasındadır (Otranto ve ark, 2005; Srivastava ve ark, 2011; Veras ve ark, 2014). En büyük dezavantajı, ICT 'nin uzun süreli tedavinin ardından sağlıklı bireylerde olumlu sonuçlar vermesidir (Srivastava ve ark, 2011).

##### 2.9.2.2.4. Flow cytometry

Akış sitometrisi (FC) yeni, güvenilir, ümit verici bir yöntemdir ve insan leishmaniasis ve KVL (kanin visseral leishmaniasis) gibi bulaşıcı hastalıkların teşhisinde sıklıkla kullanılır (Silvestre ve ark, 2008; Sousa ve ark, 2013). Bu yöntem, bir sıvı akışında asılı olan birkaç bin mikroskobik parçacığı sayabilir, araştırabilir ve ayırabilir (Maia ve ark, 2008). Enfekte hastaların serumu, bu yöntemle incelenebilecek spesifik anti-*Leishmania* antikorları içerir (Sousa ve ark, 2013). FC için canlı parazitlerin, promastigotların ve amastigotların her iki formunu da kullanabilmektedir. Memelilerde bulunan canlı amastigotlar, semptomatik ve asemptomatik köpeklerin serodiagnozunda promastigotlardan daha yararlı bir hedef olduğunu göstermiştir (Silvestre ve ark, 2008).

Bu yöntem, *L. chagasi* tarafından enfekte edilmiş köpek örneklerinde ve KL'ye karşı aşılanmış köpeklerden sunulan promastigotların FC-AFPA-IgG (anti-sabit *Leishmania chagasi* promastigotları, akış sitometrisi ile tespit edilen IgG antikorlarını), FC-AFPA-IgGl (anti-sabit *Leishmania chagasi* promastigotları, akış sitometrisi ile tespit edilen IgG1 antikorlarını) ve FC-AFPA-IgG2'nin (anti-sabit *Leishmania chagasi* promastigotları, akış sitometrisi ile tespit edilen IgG2 antikorlarını) anti-sabit *L. chagasi* antikorlarını tespit edebilir (Andrade ve ark, 2009). Akış sitometrisi bu iki grup arasındaki serolojik profili ayırt edebilir. FC-AFPA-IgG metodu %95 duyarlı ve %100 spesifik olduğunu göstermektedir. Bu testin ana avantajları, tekrarlanabilir sonuçlar ile hızlı ve hızlı analiz, yüksek verim kapasitesi, analit miktar tayini olasılığı ve çoğullama potansiyelidir (Maia ve ark, 2008; Sousa ve ark, 2013).

##### 2.9.2.2.5. Nanodiagnostikler

Nanoteknoloji nispeten yeni ve hızla gelişen bir yöntemdir. Nanoteknoloji kullanım aralığı geniştir. Bu yöntemler sadece tanı için değil aynı zamanda ilaç verme, kanser yönetimi, doku görüntüleme, hastalığın durumu ile bağlantılı moleküler ve hücresel değişikliklerin izlenmesi ve saptanması için de uygulanmaktadır (McNeil, 2005).

Bu yöntemler daha fazla hassasiyet sunar, düşük maliyetle algılama hızlı olabilir (Azzazy ve ark, 2006). Hassasiyeti arttırmak için analiz edilen molekül ile partiküller arasındaki etkileşim gereklidir. Bu analitin tespit edilmesini sağlar. Nanopartiküller dahil olmak üzere çoğu tahlilde ilk adım, bir nanopartikül eğilimli veya etiketin biyomolekül hedefine bağlanmasıdır. Bu işlem, biyomoleküllerin karakteristik bir sinyali olarak ölçülebilen spesifik bir sinyal üretecektir (Azzazy ve ark, 2006).

Nanodiagnostikler, çoğu biyolojik yapının nanometre boyutuna sahip olması nedeniyle artan potansiyel göstermiştir. Nanopartiküller, boyuta bağlı belirli özelliklere sahiptir ve optik ve manyetik parametrelere uyması gerekir. Şimdiye kadar pek çok yapı tasarlanmış ve proton olarak kullanılabilmiştir. Nanopartiküllerin en güçlüsü kuantum noktaları (QD'ler) ve nanosellerdir (Azzazy ve ark, 2006). Kuantum noktaları, yüksek fotostabilite, hassasiyet, geniş uyarma spektrumları ve güçlü ışık emiciliği olan nanokristallerdir. Biyomoleküller için flüoresan işaretler olarak da kullanılabilirler. QD'ler çoğunlukla kanser teşhisi için kullanılır, fakat aynı zamanda antikorlara konjuge edilebilir. QD'lerin temel sorunu, insanlara toksisite ile ilişkilidir (Azzazy ve ark, 2006; Jain, 2007).

Nanojeller altın nanoparçacıkları tarafından sunulur. Antikorlar da dahil olmak üzere küçük DNA ve protein parçalarını tespit edip etiketleyebilirler (Azzazy ve ark, 2006; Jain, 2007). Nanoteknoloji mevcut teşhis ve diğer alanlarda ve ayrıca gelecekteki tedavi ve teşhis yöntemlerinin ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Nanodiagnostiklerin diğer gerçek teşhis yöntemlerinin yerini alıp alamayacağını zaman gösterecektir, çünkü birçok yönün değerlendirilmesi gerekmektedir (Azzazy ve ark, 2006; Jain, 2007).

## 2.10. Köpeklerde Leishmaniasis Tedavisi

Köpeklerde leishmaniasis'in ilaç tedavisi veteriner hekimler için bir zorluk olarak ortaya çıkmaktadır. Karmaşık patogenezi nedeniyle, leishmaniasis, hafif ve spesifik olmayan, çeşitli organların ciddi tutulumunu yansıtanlara kadar çeşitli klinik belirtilerle kendini gösterebilir. Bağışıklık tepkisi, köpeklerde *Leishmania* enfeksiyonunun tedavisinin geliştirilmesinde, sonuçlarında ve yanıtlanmasında önemli bir rol oynar (World Health Organization, 2010).

Köpeklerde kullanılan bilinen tüm anti- *Leishmania* ilaçları, klinik belirtilerin geçici veya kalıcı remisyonuna neden olabilir, ancak hiçbiri enfeksiyonu ortadan kaldırmak için yeterli değildir (Alvar ve ark, 2012). Aslında, şu anda köpeklerde kullanılan tüm *Leishmania* ilaçları, insanlarda leishmaniasisi tedavi etmek için keşfedilmiş ve geliştirilmiştir. Terapötik protokollerin çoğu, insan klinik çalışmaları yoluyla geliştirildi ve daha sonra köpeklerle ilgili, çoğu zaman köpeklerle ilgili yeterli farmakokinetik bilgi olmadan uyarlanmıştır.

Köpeklerde, *Leishmania* tedavisinin amaçları tipik olarak parazit yükünün genel bir azalmasını uyarmak, parazitin neden olduğu organ hasarını tedavi etmek, etkin bağışıklık tepkilerini geri kazanmak, ilaca bağlı klinik iyileşmeyi dengelemek ve klinik tedaviyi sağlamak ve nüksü önlemektir (Alvar ve ark, 2012).

KL tedavisinde kullanılan ana ilaçlar pentavalent antimon, amfoterinik B, miltefosin, aminosidin ve marbofloksasindir. Bu leishmanisidal tedavi genellikle allopurinol gibi parazitostatik ilaçlarla birleştirilir. Allopurinol ve meglumin antimonatın kombinasyonu, çoğu durumda kullanılmış ve etkinliği yüksektir. Miltefosine-alloprinol kombinasyonu da klinik olarak etkilidir (Noli ve Saridomichelakis, 2014; Solano-Gallego ve ark, 2016).

Parazitolojik tedavilerden nadiren olumlu sonuç elde edilse ve KL'deki klinik nüksler sıklıkla tedaviden sonra ortaya çıksa da mevcut protokollerin, yaşam kalitesini artırabileceğini ve kum sineği vektörlerine bulaşıcılık oranını düşürmeye yardım edeceğini söylemek gerekir. Bu nedenle, hasta bir köpeği tedavi etme kararı, köpek sahibi ile veteriner hekim arasındaki tartışmaların sonucudur. Analiz edilen önemli bir faktör, köpeğin, tedaviye tam bir serolojik, hematolojik ve biyokimyasal profil ve idrar tahlili ile tam bir serolojik, hematolojik profil ve idrar analiziyle kemik iliği ve böbrek ve karaciğer durumunu değerlerine potansiyel tepkisinin değerlendirilmesinin yanı sıra, tedavi protokolüne uyma kabiliyeti ve/veya istekliliğidir (Gharbi ve ark, 2015).

Literatüre göre, tedaviye verilen klinik yanıt, genel başlangıç klinikopatolojik durumlarına ve tedaviye spesifik cevaplara bağlı olarak, zayıf ila iyi arasında değişebilir. Örneğin, böbrek yetmezliği olan köpeklerin, böbrekleri veya sadece hafif proteinüri içermeyenlere kıyasla daha düşük bir iyileşme oranına sahip olması beklenir (Solano-Gallego ve ark, 2007).

Halk sağlığı nedenlerinden dolayı ve reenfeksiyonu önlemek için, permetrin spot on ve/veya flumethrin veya deltametrin emdirilmiş tasmaların tedavi edilmiş köpeklerde sürekli kullanımı ve sürekli veteriner hekim takibi önerilir. KL tedavisinde kullanılan bazı kemoterapötik bileşikler, leishmaniasise karşı Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Temel İlaçların Model Listesinin 19. baskısında yer almaktadır. Bunlar pentavalent antimonialler (Sbv), miltefosin, amfoterisin B deoksikolat veya lipozomal formülasyonlarda ve paromomisin ile formüle edilmiştir (Reguera ve ark, 2016).

Bahsedilen ilaçlara ek olarak, domperidon, sitokinler ve aşılar (immünoterapi) gibi hayvan organizmasını immünize eden immün yanıtı modüle etmek için önerilen başka ürünler de vardır. Bununla birlikte, veteriner hekimlikte, allopurinol (bir purin analoğu), genellikle ilk ay pentavalent antimonial veya miltefosin ile kombinasyon halinde, uzun süredir KanL tedavisi için birinci sıra ilaç olarak kabul edilir (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Leishmaniasis olan köpekler parazitin ana rezervuarı olduğundan, yeterli tedavi ile parazit yükünü azaltmak *Leishmania*'nın endemik olmadığı bölgelerde (örneğin, Amerika Birleşik Devletleri) uygulayıcıların en önemli amacını temsil etmektedir. (Gradoni ve ark, 1987; Bourdoiseau ve ark, 1997; Miranda ve ark, 2007; Manna ve ark, 2008).

Bu nedenle, mevcut vektörleri olan endemik olmayan bölgelerde, etkilenen köpekler için, özellikle pik vektör aktivitesinin başlangıcında veya sırasında, korunma tedavisi önerilmelidir. Bununla birlikte, eğer mevcut vektör türleri tespit edilmediyse, *Leishmania* spp'nin vektörel olmayan bulaşma potansiyeli göz ardı edilmediği için tedavi de gereklidir.

## 

## 2.11. Takip Değerlendirme

Tedavi başladıktan sonra köpeklerde leishmaniasis tedavisi için protokoller yayınlanmamıştır. Genel olarak köpekler, temel olarak tedavi öncesi ve tedavi sonrası sağlık durumları tarafından yönlendirilen bireysel ihtiyaçlara göre takip edilir. Tedaviyi kolaylaştırmak için, tedavi başladıktan sonra leishmaniasisli köpeklerin çoğuna uygulama için bir çok öneriler yayınlanmıştır.

Evre B veya C'deki Köpekler: Klinik ve laboratuvar bulguları, evre B veya C'deki leishmaniasisli köpeklerin yardımcı tedaviye ihtiyaç duymadıklarını önerebilir. Bu köpeklerde, meglumin antimoniat ile yapılan tedaviden sonra veya allopurinol ile 1 aylık bir tedaviden sonra tam bir fizik muayene, CBC, serum biyokimyasal analiz ve idrar tahlili yapılması tavsiye edilir. Laboratuar testlerinin sonuçları referans sınırları dahilindeyse, köpekler en az 5 ay daha allopurinol almaya devam etmelidir. *Leishmania* spp'ye karşı antikor titrelerinin serolojik testi de dahil olmak üzere, tedavinin sona ermesinden sonra her 6 ayda bir bu kategorideki köpekler yeniden değerlendirilmelidir. Klinik bir nüks gelişirse, tedavi başlangıcında kullanılan ilaçla veya daha önce alternatif bir tedavi olarak listelenen ilaçlardan biriyle yeniden başlatılmalıdır. Eğer tedavi klinik iyileşme ile sonuçlanmazsa veya tedaviden kısa bir süre sonra nüks olursa, köpekler E-a veya E-b evrelerinde düşünülmeli ve buna göre harekete geçilmelidir. Leishmaniasinin D evresindeki köpekler için gereken takip derecesi kesinlikle klinik koşullarla ilgilidir. Genellikle, tedavi sırasında özellikle bir köpeğin böbrek yetmezliği varsa, hem klinik hem de laboratuvar değerlendirmelerini yapmak gerekir. Tedavinin sonunda, takip etkilenen organların (örneğin böbrekler ve karaciğer) değerlendirilmesine özellikle önem verilerek 1-2 ay aralıklarla yapılmalıdır (Chappuis ve ark, 2007; Noli ve Saridomichelakis, 2014).

## 2.12. Önleme ve Kontrol

Kum sineği ısırmasının KL'ın en önemli iletim yolu olduğu göz önüne alındığında, enfeksiyon kontrol önlemleri öncelikle vektörü ile fiziksel engeller (pencerelerde ve kulübelerde finemesh ağlar), kimyasal engeller (kovucular), bakım (alacakaranlıkta dışarı çıkarmama, organik materyali ortadan kaldırma) ile teması önlemeye odaklanmalıdır.

KL'in önlenmesi için mevcut olan kovucu ürünler, yalnızca sentetik piretroidler (deltametrin, permetrin veya flumetrin) veya böcekler üzerinde sinerjistik bir etki sergileyen diğer böcek öldürücüler ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Kullanımdan sonra kum sineklerine karşı koruma etkisi, spot-on formülasyonlarda 2 ila 4 hafta ile hem enfekte olmayan hem de enfekte olmuş köpeklerde kullanılması gereken emdirilmiş PVC tasmalarda (Scalibor ve Seresto) dört ila sekiz ay arasında değişebilmektedir (Davoust ve ark, 2013; Wylie ve ark, 2014). KL'ye karşı aşılama, evcil hayvan sahipleri için son zamanlarda kullanılan bir araçtır ve ne yazık ki, mevcut iki ticari aşı, yaklaşık %68 ila %71 oranında düşük koruyucu etkinliğe sahiptir (Canileish %68.4; Leish-Tec %71) (Palatnik-de-Sousa, 2012; Fernandes ve ark, 2014; Oliva ve ark, 2014). Seropozitif köpeklerin toplatılmasının VL insidansını azaltabileceğine dair bilimsel bir kanıt yoktur (Costa ve Vieira, 2001; Romero ve Boelaert, 2010) ve bunun uygulandığı her yerde (örneğin Brezilya, Balkan ve Orta Asya ülkeleri) VL kontrolü için ulusal programlar başarısız olmuştur. Bu nedenle, topikal insektisitler ile ilişkili *Leishmania*'ya karşı aşılama, şüphesiz KL'nin önlenmesinde ve kontrol edilmesinde en etkili şeklidir.

# 

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 

## 3.1. Gereç

Bu çalışmada Muğla yöresinde, veteriner kliniklerine getirilen köpeklerin *Vena cephalica antebrachi*’sinden, antikoagülansız ve EDTA içeren antikoagülanlı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Laboratuvara getirilen antikoagülansız kan örnekleri oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen serum örnekleri 1.5 ml ependorflara koyularak test edilene kadar -20ºC’ de saklanmıştır. Elde edilen serumlar, IFAT testi ile değerlendirilmiştir. EDTA içeren antikoagülanlı tüplerdeki kan örnekleri de 1.5 ml ependorflara koyularak DNA izolasyonuna kadar -20ºC’ de saklanmıştır. Sonrasında bu kanlardan DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA örneklerinde PZR yöntemi ile *Leishmania* *spp*. tespiti yapılmıştır. Tez projesinde leishmaniasis'in endemik olduğu Batı Ege Bölgesinde yer alan Muğla yöresindeki kliniklere getirilen sahipli klinik bulgu gösteren doğal enfekte ve/veya asemptomatik köpekler incelenmiştir. Bu çalışma, Ekim 2017-Kasım 2018 tarihleri arasında Muğla bölgesi Merkez (n=37), ilçeleri; Marmaris (n=10) , Datça (n=5), Akyaka (n=12) Köyceğiz (n=25) Ula (n=6), Ortaca (n=6), Çıtlık (n=5) , Dalyan (n=2), Şirinköy (n=3), Göcek (n=1) , Ataköy (n=3), Yerkesik (n=1), Gölcük (n=1), Yatağan(n=2), Ören (n=2), Kavaklıdere (n=1), Gökova (n=5), Sarıgerme (n=1), Ortaköy (n=1), Gökçe (n=1), Döğüşbelen (n=1)’den sağlanan farklı ırk, 6 aylıktan büyük ve her iki cinsiyetten toplam 131 köpekte gerçekleştirilmiştir. Köpeklerin kan örneklerinin alındığı yerleşim alanları Şekil 4’de gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Örneklemenin yapıldığı yerleşim alanları.

## 3.2. Yöntem

### 

### 3.2.1. Indirekt Florasan Antikor Testi

#### 

#### 3.2.1.1. IFAT antijenli lamların hazırlanması

Antijen hazırlamak için %10 Fetal sığır serumu ve %2 antibiyotik solusyonu içeren RPMI 1640 besi yeri hazırlanarak, 25 cm2 'lik flasklara konulmuştur. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Prof. Dr. Seray TÖZ ÖZENSOY tarafından sağlanan *Leishmania* promastigot hücre kültürleri, hazırlanan besi yerine ekilmiş ve üretilen promastigotlardan, 1640 besi yeri içeren yeni flaska 4-5 damla aktarılmış ve 26oC de saklanmıştır. 1 hafta sonra, promastigotlar bol olarak ürediğinde antijen hazırlamak 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 edilmiştir. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. En son yıkama işleminden sonra çökelti 1 ml serum fizyolojik ile sulandırılmış ve promastigotlar Thoma lamı kullanılarak sayılarak ve 2x106 promastigot/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Elmas kalem ile daireler çizilerek hazırlanmış olan IFAT lamlarının her bir çukuruna 10 μl antijen konulmuş ve kurutulduktan sonra pelur kağıtlara sarılarak kullanıncaya kadar -20oC’de saklanmıştır.

#### 3.2.1.2. IFAT yöntemi uygulanması

Köpek serumları sulandırma plaklarında PBS ile 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 oranlarında sulandırılmış ve her bir sulandırımdan 1 damla, lamların antijen kaplı yerlerine aktarılmıştır. Lamlar 37oC’lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş ve süre sonunda PBS ile üç kez 5’er dakika yıkanıp oda ısısında kurutulmuştur. FITC işaretli tavşan anti-dog IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA) 1:200 oranında sulandırılarak kullanılmış ve lamların üzerinde çizilen her bir kuyucuğa bir damla konulmuştur. Lamlar tekrar 37oC’lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş ve süre sonunda PBS ile üç kez 5’er dakika yıkanmıştır. Lamlara, kurumadan kapatma solusyonu olan PBS-gliserin karışımından damlatılmış ve lamel ile kapatılmıştır. Lamlar, fluoresan mikroskobunda X 20 objektifde değerlendirilmiştir. Parlak sarı yeşil fluoresans pozitif, soluk veya hiç sarı yeşil fluoresans görülmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir. Fluoresans veren en yüksek serum dilüsyonu, o örneğe ait antikor titresi olarak değerlendirilmiştir. Immuno fluoresan antikor titresi 1/64 ve üzeri olan serum örnekleri KVL için pozitif olarak kabul edilmiştir (Abranches ve ark, 1991)

### 3.2.2. DNA İzolasyonu ve Polimerize Zincir Reaksiyonu

#### 

#### 3.2.2.1. DNA İzolasyonu

Köpeklerden alınan kan örneklerinden DNA ekstraksiyonları için Promega Wizard Genomic DNA ayırma kiti (Promega Corporation, Madison, WI, USA) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre; steril eppendorf tüplere 300 mikrolitre (μl) miktarında bölünmüş kan örnekleri oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra üzerlerine 900 μl hücre lize edici solüsyon eklenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürecinde tüpler 2-3 kez alt üst edilmiş ve inkübasyon sonrası 21910 x g’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipte görünen pelete dokunmadan üstteki süpernatant dikkatlice atılmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrar edildikten sonra dipte kalan beyaz kan hücreleri süspansiyon haline gelene kadar 10-15 saniye vortekslenmiştir. Üzerine 300 μl hücre çekirdeğini lize edici solüsyon eklenerek 37ºC‘ de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir saat sonunda üzerlerine 100 μl protein çöktürme solüsyonu eklenerek 5-10 saniye kadar vortekslenmiştir. Çözünen proteinlerin çöktürülmesi amacıyla 4’er dakika 21910 x g’de santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda dipte kalan beyaz protein peletine dokunmadan üzerindeki süpernatant içerisinde 300 μl isopropanol bulunan 1,5 ml’lik steril eppendorf tüplerine alınmıştır. Tüpler DNA bulutu görülünceye kadar birkaç kez alt üst edilmiş ve 1 dakika 21910 x g’de santrifüj edilmiştir. Isopropanol DNA gözetilerek dökülmüş ve üzerine 300 μl %70’lik ethanol eklenip tekrar 1 dakika 21910 x g’de santrifüj edilmiştir. Daha sonra üzerindeki ethanol dikkatlice uzaklaştırılıp peletin kuruması için 10-15 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda da tüplere 100 μl DNA rehidrasyon solüsyonu eklenip 65ºC’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri PZR’da kullanılıncaya kadar -20ºC ‘de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.2.2. PCR testi uygulanması

Köpeklerden alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lar öncelikle *L. infantum, L. donovani, L. major, L. tropica* ve *L. braziliensis* türlerini içeren *Leishmania* genusuna özgü primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR'larda, parazitin kinetoplast DNA (kDNA)'sındaki LT1 fragmanından 145 bp lik bir kısmı çoğaltmak için RV1 (5' CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3') ve RV2 (5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3') primerleri kullanılmıştır. Bu amaçla uygulanan PZR’da 50 µl’lik son hacimde, 10 mM Tris-HCL, pH 9.0, 1,5 mM MgCl2, 50 mM KCl, 200 µM dNTP/dUTP stoğu, 1,5 U Taq DNA polimeraz, 25 µM primer çifti (RV1; RV2) ile 2 µl DNA (10-20 ng DNA) örneği kullanılmıştır. Reaksiyon termal sikluslu makinede gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C’de 10 dakikalık ön denaturasyonu takiben, 95°C’de 1 dakikalık denatürasyon (45 siklus); 62 °C’de 1.5 dakika bağlanma; 70°C’de 30 saniye uzamalardan oluşan 45 siklus ve 70°C’de 10 dakikalık son uzama şeklinde uygulanmıştır. Daha sonra, PZR ile çoğaltılan ürünlerden 10 µl, ml’sinde 10 µl Safe ViewTM bulunan %1.5’luk agaroz jelde 100 voltluk akımda bir saat elektroforeze tabi tutulup, ultraviole ışık altında görüntülenmiştir.

# 4. BULGULAR

İncelenen 131 köpekten 49’u serolojik olarak pozitif bulunmuştur. Moleküler incelemede ise 131 köpekten 9’u pozitif bulunmuştur. Serolojik olarak pozitif örneklerden 4’ü moleküler incelemede de pozitif, 45’i negatif bulunmuştur.

## 4.1. IFAT Sonuçları

Muğla ilinden toplanan köpek serum örneklerinden; Datça 4 pozitif, Akyaka 3 pozitif, Çıtlık 2 pozitif, Şirinköy 1 pozitif, Muğla 15 pozitif, Gökova 4 pozitif, Göcek 1 pozitif, Ataköy 2 pozitif, Marmaris 3 pozitif, Köyceğiz 7 pozitif, Yerkesik 1 pozitif, Ula 4 pozitif, Ortaca 1 pozitif, Gölcük 1 pozitif olmak üzere değerlendirilen 131 köpekten 49’u (%37,4) serolojik olarak pozitif bulunmuştur (Tablo 1).

**Tablo 1.** Örnek toplanan ilçelere göre IFAT sonuç ve yüzdeleri.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Bölgeler** |  | | **Toplanan örnek sayısı** | | **Pozitif örnek sayısı(%)** |
| Datça |  | | 5 | | 4 (%80) |
| Akyaka |  | | 12 | | 3(%25) |
| Çıtlık |  | | 5 | | 2(%33) |
| Şirinköy |  | | 3 | | 1(%33) |
| Muğla |  | | 37 | | 15(%40.5) |
| Gökova |  | | 5 | | 4(%80) |
| Göcek |  | | 1 | | 1(%100) |
| Ataköy |  | | 3 | | 2(%66) |
| Marmaris |  | | 10 | | 3(%30) |
| Köyceğiz |  | | 25 | | 7(%28) |
| Yerkesik |  | | 1 | | 1(%100) |
| Ula |  | | 6 | | 4(%66) |
| Ortaca |  | | 9 | | 1(%11.1) |
| Ören |  | | 2 | | 0(%0) |
| Gölcük |  | | 1 | | 1 (%100) |
| Yatağan |  | | 2 | | 0 (%0) |
| Kavaklıdere |  | | 1 | | 0 (%0) |
| **Toplam(oran)** |  | | 131 | | **49**(%37.4) |
|  |  | |  | |  |
|  | |  | |  | |

## C:\Users\ali\Desktop\Ali Topçuoğlu Pozitif Kontroller 180419.tif

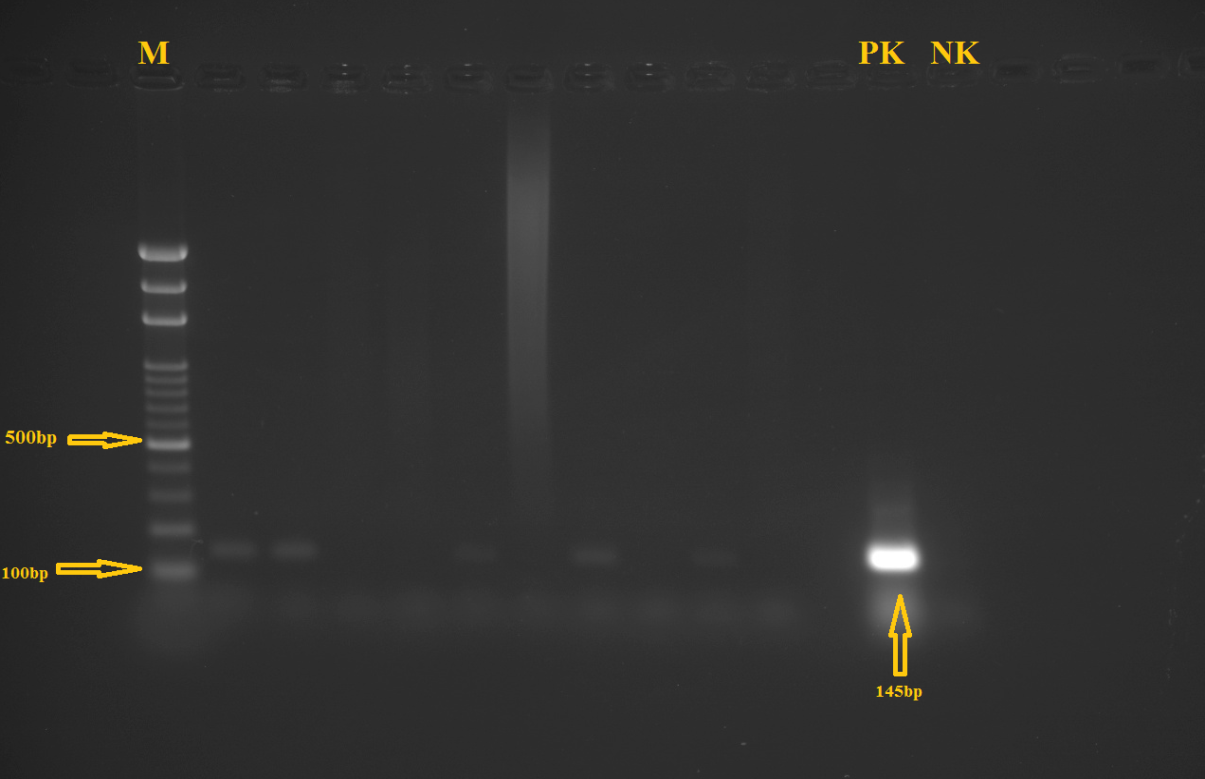
**Resim 4.** IFAT ile pozitif belirlenen örnekler.

## C:\Users\ali\Desktop\Ali topçuoğlu 35 numaralı örnek 1-64-1 (1).tif

## Resim 5. IFAT ile pozitif belirlenen örnekler.

## 4.2. PZR Sonuçları

Değerlendirilen 131 köpekten dokuz tanesi (%6.87) PZR pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan köpeklerin üç tanesi Köyceğiz, iki tanesi Akyaka, birer tanesi ise sırasıyla; Ortaca, Muğla (Merkez), Marmaris ve Gökova ilçelerinden tespit edilmiştir. Bu örneklerden Gökova, Akyaka, Marmaris ve Muğla Merkez’den elde edilen örneklerin IFAT testi ile de pozitif olduğu belirlenirken kalan beş örneğin (üç Köyceğiz, bir Akyaka ve bir Ortaca) IFAT değerlendirmesinde negatif oldukları ortaya konmuştur.

****

**Resim 6.** *Leishmania* spp.’ye ait RV primer çifti ile pozitif gelen örnekler %1,5 agaroz jel görüntüsü M: Marker (100 bp molecular size marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), M: Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol.

# 5. TARTIŞMA

# 

Leishmaniasis, Güneydoğu Asya ve Avustralya hariç Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Orta Doğu, Orta ve Güney Amerika ve Hindistan alt kıtası dahil olmak üzere, dünya genelinde 60'tan fazla ülkede endemiktir. KL vakalarının bir çoğunun (vakaların %90'ı) Afganistan, Pakistan, Suriye, Suudi Arabistan, Cezayir, İran, Brezilya ve Peru'da görüldüğü ifade edilmektedir. Visseral leishmaniasis vakalarında Hindistan, Bangladeş, Nepal, Sudan ve Brezilya önde gelmektedir. Son zamanlarda bildirilen vaka sayısı ve coğrafi alan, küresel ısınmanın etkilerinden dolayı artmıştır. İnsan dahil olmak üzere farklı türlerden bir çok memeli türünü tehdit ettiğinden dolayı WHO verilerine göre leishmaniasis; dünya çapında malaria ve lenfatik filariasis‘den sonra üçüncü vektör kaynaklı en önemli hastalık olarak değerlendirilmektedir. Aynı zamanda kala-azar olarak da bilinen VL vakaların %95'inden fazlasında tedavi edilmezse ölümcül seyretmektedir. Düzensiz ateş nöbetleri, kilo kaybı, dalak ve karaciğerin büyümesi ve anemi ile karakterizedir. Çoğu vaka Brezilya, Doğu Afrika ve Güney Doğu Asya'da ortaya çıkmakla beraber dünyada her yıl tahminen 50.000 ila 90.000 yeni VL vakası ortaya çıkmaktadır; bunun sadece %25-45'i WHO' ya bildirilmektedir. WHO'ya 2017'de bildirilen yeni vakaların %95'inden fazlası Bangladeş, Brezilya, Çin, Etiyopya, Hindistan, Kenya, Nepal, Somali, Güney Sudan ve Sudan dahil olmak üzere 10 ülkede meydana gelmiştir. Yeni KL vakalarının %95'inden fazlası 2017 yılında Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran (İslam Cumhuriyeti), Irak ve Suriye Arap Cumhuriyeti başta olmak üzere 6 ülkede meydana gelmiştir. Dünyada her yıl 600.000 ila 1 milyon arasında yeni vaka meydana geldiği tahmin edilmektedir.İnsanlar dahil olmak üzere yaklaşık 70 hayvan türü, *Leishmania* parazitlerinin doğal rezervuar konakları olarak bildirilmektedir (WHO, 2016).

Yapılan çalışmalar ile dünyanın farklı bölgelerinde vahşi, evcil ve sinatropik memelilerin çeşitli türleri *Leishmania* spp.’nin konakçıları veya rezervuar konakçıları sayılmıştır. Kemirgenler, firavun fareleri, köpekler, kediler, tilkiler, çakallar, kurtlar, yarasalar, primat armadillolar ve diğer bazı evcil hayvanlar farklı yerlere leishmaniasis bulaşmasını sürdürmek için rezervuar konak görevi görmektedirler (Rohousova ve ark, 2015). Dünyanın pek çok *Leishmania* endemik bölgesinde, enfekte olmuş köpekler, VL ve KL'nin insanlara zoonotik aktarımı için önemli bir rezervuar görevi görmektedir (Brachelente ve ark, 2005). Pek çok yeni çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki köpekler çoğunlukla olmak üzere köpeklerde leishmaniasis için yapılan testlerde pozitif sonuçlar alınmıştır. Lökositoz, nötrofili, sola kayma ve lenfopeni gibi kan anormallikleri, mevcut durumda klinik olarak pozitif değerlendirilen köpeklerle ilişkilendirilir. Anemi, köpek leishmaniasisinde bir başka yaygın bulgudur. Anemi genellikle medüller hipoplaziyle birlikte normositik normokromik formda ortaya çıkar. Aneminin hastalığın klinik evresi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Genellikle lökositoz ile sonuçlanan nötrofili, sekonder enfeksiyonun neden olduğu deri lezyonlarıyla ilişkilidir (Ikeda Garcia ark, 2008). Lenfopeni, hastalığın immün baskılayıcı doğası, medüller disfonksiyon veya ilgili organlarda lökosit alımı nedeniyle oluşabilir (Reis ve ark, 2006). Bununla birlikte, bu parametreler değişebilir ve hastalığın evresine bağlıdır (Amusategui ve ark, 2003). Doğrudan mikroskopi, *Leishmania spp*.'nin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntemdir.

Leishmaniasis, karmaşık bir parazit-konak etkileşimin örneklerinden biridir. Parazitin yaşam döngüsü, *Pschodidae* ailesine ait bir omurgasız konak ile omurgalı konak arasında heterokseniktir. İnsan, köpek, kemirgen gibi pek çok omurgalıda parazitin amastigot formu bulunurken, omurgasız konakları olan *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinsi sinekler ile kültür ortamında promastigot formunda bulunurlar. Phlebotomlara karşı çeşitli spreyler, damlalar ve ilaç emdirilmiş tasmalardaki topikal piretroidler (± neonikotinoidler) kovucu görevi görmektedir ve kum sineği ısırıklarının sayısını azaltmada etkili oldukları bilinmektedir. Araştırmalar piretroidlerin koruma sağladığını ve enfekte olmuş köpeklerin oranını azalttığını gösteriyor, ancak %100 etkili değildirler. Deltametrin emdirilmiş tasmalar da kullanılmaktadır. Ancak bu uygulamalar ile koruyucu seviyelerin sağlanabilmesi için muhtemel maruz kalmadan en az 1 hafta önce uygulanmaya başlanarak düzenli olarak uygulanmalıdır. Son yıllarda başlanan aşılama uygulamaları da 6 aydan büyük hayvanlar için kullanılmakta ve parazit yükünü ve klinik belirtileri topikal ilaçlarla beraber kullanıldığında hafifletmekte yardımcı olabileceğini göstermektedir. KVL'ye karşı aşılama, evcil hayvan sahipleri için son zamanlarda kullanılan bir araçtır ve ne yazık ki, mevcut iki ticari aşı, %68-71 kadar düşük koruyucu etkinliğe sahiptir (Canileish® %68.4; Leish-Tec® %71). Ayrıca parazitten korunmak için bu uygulamaların hiçbirisi kesin çözüm değildir. Ancak köpeklerin endemikten endemik olmayan bir alana hareketlerinden önce muayene ve test edilmesi leishmaniasis giriş olasılığını azaltmak için tam olarak etkili veya gerçekçi bir seçenek olarak görünmemektedir.

Endemik bölgelerde köpek visseral leishmaniasisin prevalansı, o bölgedeki vektör populasyonu, sıcaklık, nem gibi o bölgeye ait ekolojik şartlar ve rezervuar hayvanların populasyonu ile direkt ilişkilidir (Atasoy ve ark, 2010). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Türkiye'de 22 farklı kum sineği türünün olduğu, bunlardan yedi tanesinin, leishmaniasis enfeksiyonları açısından vektörlük yaptıkları bildirilmiştir (Özbel ve ark, 2011, Özbel 2013). Köpek visseral leishmaniasisin vektörlerinin belirlenmesine yönelik Ege Bölgesi'nin farklı illerinde gerçekleştirilen çalışmalardan birinde Denizli ilinde *Phlebotomus* cinsine bağlı sekiz farklı türün tespit edildiği, bunlardan köpek visseral leishmaniaisin vektörlüğünü yaptığı bilinen *P.neglectus*'un en sık görülen tür olduğu belirtilmiştir (Toz ve ark, 2009). Batı Ege Bölgesi'ndeki Aydın ilinde yürütülen diğer bir çalışmada, 11 *Phlebotomus*, üç *Sergentomyia* türünün identifiye edildiği, burada da *P.neglectus'*un en baskın ikinci tür olduğu belirlenmiştir (Özbel ve ark, 2011).

Yapılan bir çalışmada Muğla iline ait ilçeleri temsil eden kum sineği türleri arasında en dominant tür olarak %49.21 *P. neglectus/syriacus* tespit edilirken, bunu %17.77 ile *P. tobbi’*nintakip ettiği belirtilmiştir (Pekağırbaş, 2019). İtalya’da incelenen 518 istasyondan 113'ü (%21.8) *P. perniciosus* pozitif bulunmuştur. Türkiye’ye komşu olan Yunanistan ve Yunan Adalarında yapılan çalışmalarda; *L. infantum*’un olası/kesin vektörlerinin *P. neglectus*, *P. tobbi* ve *P. perfiliewi* türü kum sinekleri olduğu, ayrıca *L. tropica*’ ya *P. similis’* in, *L. donovani*’ye *P. tobbi*’ nin ve *L. major*’a da *P. papatasi* türü kum sineklerinin vektörlük yaptıkları bildirilmiştir. Muğla ilindeki tüm kum sinekleri incelendiğinde en dominant tür olan *P. neglectus/syriacus’*un, WHO (2010) tarafından visseral leishmanias’isin etkeni olan *L. infantum*’un vektörü olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde de kutanöz ve visseral leishmaniasis’e sebep olan *L. infantum*’un olası vektörleri arasında yer alan bu tür daha önce yapılan çalışmalarda başta Yunanistan, İtalya, Hırvatistan, Macaristan, Suriye, İsrail gibi ülkelerde sıklıkla tespit edilmiştir. Çalışma alanında %17.77 ile en dominant ikinci tür olan *P. tobbi*, Dünyada ve ülkemizde *L. infantum*’un kesin vektörü olarak bilinmektedir (Svobodova, 2009; WHO, 2010).

Köpek visseral leishmaniasis için endemik sayılan Ege Bölgesi'nde hastalığın seroprevalansının ortaya konulması amacı ile gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarda da köpeklerde %2,5 ile %23 arasında seropozitiflik belirlendiği tespit edilmiştir (Ozbel ve ark, 2000; Ertabaklar ve ark, 2001; Toz ve ark 2002; Gultekin ve ark 2003; Voyvoda ve ark, 2004; Toz ve ark, 2009; Atasoy ve ark, 2010). Bu sonuçlar bu bölgede ortaya konan vektör populasyon sonuçlarını da destekler niteliktedir (Toz ve ark, 2009). Bu çalışmada incelenen 131 köpekten 49'unda (%37,4) seropozitiflik ortaya konmuş olması, bölgede daha önce yapılan serolojik çalışmalarla örtüşmektedir. Diğer taraftan, Toz ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmalarda Aydın ve İzmir illerindeki köpeklerde, daha önceden doğrulanmış vakalardan elde edilen kültürler ve örnekler üzerinden gerçekleştirilen moleküler tabanlı testlerde de *L. infantum* DNA'sının tespit edildiği belirtilmektedir (Toz ve ark, 2009; Toz ve ark, 2013). Aynı şekilde bu çalışmada değerlendirilen 131 köpekten dokuz tanesi (%6.87) PZR pozitif bulunmuştur. Bu çalışma neticesinde de hastalık için endemik sayılan Batı Ege Bölgesindeki Muğla ilinde daha doğru epidemiyolojik veriler elde edildiği düşünülmektedir. Bu veriler doğrultusunda Batı Ege Bölgesi'ndeki köpek visseral leishmaniasisin yaygınlığının belirlenmesinde, serolojik testlerin yanlış pozitiflik veya çapraz reaksiyonlar verebileceği göz önüne alınarak, moleküler testlerin kullanımının daha yararlı olacağı kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak, Batı Ege Bölgesi'ndeki köpeklerde gerek daha önceki çalışmalarda gerekse bu çalışma ile belirlenen visseral leishmaniasisin hem insanlarda hem de hayvanlarda ciddi sağlık sorunları oluşturabileceğinden yola çıkılarak, rezervuar olan köpeklerde hastalığın kontrol altına alınmasına yönelik tedbirlerin ortaya konması, vektör olan *Phlebotom*'lar ile mücadele ve kontrol programlarının geliştirilmesi konularının üzerinde daha ciddi durulması gerektiği düşünülmektedir

Örneklemenin yapıldığı bölgelerdeki köpekler sahipli hayvanlar olmasına karşılık bir çoğunda düzenli dış parazit uygulamalarının zamanında ve düzenli yapılmadığı tespit edilmiştir. Hastalığın bölgede endemik olarak bulunmasına karşın köpek sahiplerinin hastalık hakkında hiçbir bilgileri olmadığı da belirlenmiştir. Yeterli kontrol ve koruma tedbirlerinin alınmaması hastalığın bölgedeki hayvanlarda ve insanlarda bulaşma açısından tehlike arz etmeye devam etmesine sebep olmaktadır.

# 

# 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Dünya Sağlık Örgütü tarafından leishmaniasisin kontrolü amacıyla enfekte köpeklerin tespitinin, etkin sağaltım yönteminin ve vektör kontrolü gibi önlemlerin alınmasının gerekli olduğu önemle vurgulanmaktadır. Bu hastalığı kontrol amacıyla öncelikle vektör kontrolü ve daha sonra da rezervuar konakların tespiti gerekmektedir. Ancak vektörlere karşı kullanılan insektisitlerin ve tedavide kullanılan ilaçlara karşı direncin gelişmesi ile beraber özellikle geçtiğimiz on yılda, Batı Avrupa ülkelerinde, artan seyahatler, ekoturizm faaliyeti, askeri operasyonlar ve göçle bağlantılı olarak leishmaniasis vakalarının sayısı artmıştır. Hastalıktan korunmak için ilk strateji vektör kum sineklerinden korunmak olmalıdır. Daha sonra endemik bölgelerde rezervuar konakların varlığını saptamak ve bu konakları kontrol altına almak gerekmektedir. Hastalıktan korunmak için rezarvuar hayvanların *Phlebotomus*‘larla temasının azaltılması ve visseral leishmaniasise karşı aşının veya daha etkili bir sağaltım protokolünün geliştirilmesi gibi alternatif stratejilerin uygulamaya geçirilmesinin gerekli olduğu bilinmektedir.

Veteriner hekimlikte, *Leishmania* *infantum*‘un sebep olduğu visseral leishmaniasis özellikle köpeklerde önem arz etmektedir. Akdeniz ülkelerinde insanlarda görülen visseral leishmaniasisin, doğadaki asıl rezervuarının, evcil ve yabani karnivorlar olduğu, aynı zamanda hastalığın bir bölgede endemik veya sporadik olgularla devam etmesinde bu hayvanların en önemli rolü oynadığı bildirilmiştir. Gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde köpeklerin, insanların en önemli evcil hayvanlarından biri olması, gelişmekte olan ülkelerde başıboş köpek sayısının fazla olması, köpeklerin bu hastalık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada da Muğla yöresinde, veteriner kliniklerine getirilen 69 dişi ve 63 erkek köpekden kan alınmış ve alınan kanlardan serum çıkartılarak, serolojik olarak IFAT testi ile değerlendirilmiştir. Köpeklerden EDTA içeren antikoagulanlı tüplere alınan kanlardan DNA izolasyonu yapılmış ve izole edilen DNA örneklerinde PZR yöntemi ile *Leishmania* *spp*. tespiti yapılmıştır.

131 köpekten alınan serum örneklerinde IFAT ile uygulanması sonucunda 38 köpekte (%29) anti-*Leishmania* antikor titresinin 1:128 ve üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Moleküler değerlendirmede ise 9 köpekte (%6.87) PZR pozitif bulunmuştur. 18 farklı yerleşim alanında toplam 131 köpeğin değerlendirilmesinde KL’in seroprevalansı %37,1 olarak belirlendi.

Bu çalışmadaki sonuçlar benzer çalışmalarda belirlenen sonuçlar ile uyumlu görünmektedir. PZR sonuçları IFAT’a oranla daha düşük bir prevalans göstermiştir. Bu da hastalığın hangi evresinde olduğuna, hastalığı atlatmış olmasından kalma antikor titresine ve köpeklerin immünolojik cevabına göre olan değişimini açıklamaktadır. Ayrıca kan örneklerinde *Leishmania* tespiti kemik iliği, lenf düğümü ve dalak örneklerine göre daha düşük olduğu daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Konjuktival svab örnekleri de alternatif olarak iyi bir sonuç verdiği de gösterilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda Ege bölgesinde *Leishmania* türlerine vektörlük eden *Phlebotomus* ve *Sergentomyia* türlerinin bulunması neticesinde elimizde hiç bir veri bulunmayan Muğla yöresindeki köpeklerin rezervuar rolleri aydınlatılmış olmakla beraber daha fazla çalışmanın yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, Batı Ege Bölgesi'ndeki diğer illerde köpeklerde daha önceki çalışmalarda belirlenen visseral leishmaniasisin hem insanlarda hem de hayvanlarda ciddi sağlık sorunları oluşturabileceğinden yola çıkılarak, Muğla yöresindeki köpeklerde de hastalığın kontrol altına alınmasına yönelik tedbirlerin ortaya konması, vektör olan *Phlebotom*'lar ile mücadele ve kontrol programlarının geliştirilmesi konularının üzerinde daha ciddi durulması gerektiği önerilmektedir.

Sürdürülebilir, etkili gözetim sistemleri ve salgınlar için hazırlık ve müdahale sistemleri dahil olmak üzere güncel yöntemler üretmek ve hastalık kontrol planları yapmak için ulusal leishmaniasis kontrol programlarının teknik ve finansal olarak desteklenmesi gerekmektedir. Hastalık eğilimlerinin izlenmesi ve leishmaniasis'in küresel yükü üzerinde farkındalık ve savunuculuk geliştirilmesine ve sağlık hizmetlerine eşit erişimin sağlanmasına yardımcı olacak kontrol faaliyetlerinin etkisinin değerlendirilmesi üzerinde durulmalıdır.

# 

# KAYNAKLAR

# 

**Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG.** Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology* 1991, 77, 557–561.

**Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J.** Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012, 6: e1946.

**Adler S, Ber M.** The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of Phlebotomus papatasi*. Indian Journal of Medical Research* 1941,29, 803–9.

**Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D.** A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2016,10:e0004349.

**Al-Salem WS, Pigott DM, Subramaniam K, Haines LR, Kelly-Hope L, Molyneux DH, Hay SI, Acosta-Serrano A.** Cutaneous leishmaniasis and conflict in Syria. *Emerging Infectious Diseases* 2016, 22, 931–3.

**Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J.** Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 2012, 7(5), e35671.doi:10.1371/journal.pone.0035671.

**Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J.** Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 2004, 57, 1-88.

**Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB.** On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, baseado n pre- and post- colombian historical source. *Histology Cienc Saude Manguinhos* 2003,10, 852-882.

**Amusategui I, Sainz A, Rodr´ıguez F, Tesouro M.** Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology* 2003,18( 2), 147–156.

**Andrade RA, Silva Araujo MS, Reis AB, Gontijo CM, Vianna LR, Mayrink W, Martins-Filho OA.** Advances in flow cytometric serology for canine visceral leishmaniasis: diagnostic applications when distinct clinical forms, vaccination and other canine pathogens become a challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009, 128,79-86.

**Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ.** Use of PCR–RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2006, 140(3-4), 231-238.

**Anonymous.** Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *The Weekly Epidemiological Record* 2016, 91, 287–96.

**Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, Orlando G, Gramiccia M, Acquaviva V, Foschi A, Corvasce S, Colomba C, Titone L, Parravicini C, Cascio A, Corbellino M.** Is real-time polymerase chain reaction (PCR) more useful than a conventional PCR for the clinical management of leishmaniasis? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2009, 81,46-51.

**Ashford RW.** Speculations on the origins and evolution of Old World *Leishmania* system. In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. *Taxonomie et Phylogenèse*. Application Éco-epidemiologiques. Colloque International du CNRS/INSERM/OMS, 2–6 Julliet 1984. Montpellier: IMEEE; 1986, 257–64.

**Atasoy A, Pasa S, Toz SO, Ertabaklar H.** Seroprevalence of Canine Visceral Leishmaniasis Around the Aegean Cost of Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2010, 16(1), 1-6.

**Azzazy HM, Mansour MM, Kazmierczak SC.** Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine. *Clinical Chemistry* 2006, 52, 1238-1246.

**Bakırcı S, Bilgiç HB, Köse O, Aksulu A, Hacılarlıoğlu S, Erdoğan H, Karagenç T.** Molecular and seroprevalance of canine visceral leishmaniasis in West Anatolia. Turkey. *Turkish* *Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2016, 40, 637-644.

**Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L.** Canine leishmaniosis–new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology* 2008, 24.7,324-330.

**Baneth G.** ‘Overview of Leishmaniosis’ Erişim 12 Aralık, 2019.https://www.msdvetmanual.com/#blogmarks.

**Barbieri CL.** Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 2006, 28, 329–337.

**Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, P Aguiar HP, Dos-Santos WLC, Pontes-De-Carvalho L.** Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2004, 99(2) 195–197.

**Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RG, da Silva ES.** A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2013,195(1-2), 1–13.

**Boelaert M, Sundar S.** Leishmaniasis. In: Farrer J, Hotez P, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ, editors. Manson’s Tropical Infectious Diseases. 23rd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2014, 631–51.

**Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L.** Specific IgG1, and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum-infected treated and untreated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997, 59, 21–30.

**Bray RS, Ashford RW, Bray MA.** The parasite causing cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1973, 67, 345–8.

**Brachelente C, Muller N, Doherr MG, Sattler U, Welle M.** Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Veterinary Pathology* 2005, 42, 166–175.

**Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Khositnithikul R, Naaglor T, Ravel C, El Baidouri F, Leelayoova S.** Autochtonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2012,86,821–4.

**Burillo FL, Perez FMG, Lieza JP, M Fabi CA, Perez F´MG.** Iron status and anemia in canine leishmaniasis, *Revue Medecine Veterinaire* 1994, 145(3), 171–176.

**Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M.** AntiLeishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007, 117, 35-41.

**Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M.** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 2007,5,873- 882.

**Costa MA, Matheson C.** Iachetta L, Llagostera A, Appenzeller O. Ancient leishmaniasis in a highland desert of northern Chile. *PLoS One* 2009,4, e6983.

**Costa CH, Vieira JB.** Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil, *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* 2001,34, 2, 223–228.

**Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, J Shaw J, C Dye.** “Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission, *The Journal of Infectious Diseases* 2002, 186 (9), 1314–1320.

**Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ.** Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014, 8(1).

**Croan DG, Morrison DA, Ellis JT.** Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1997, 89,149–59.

**Cunningham DD.** On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi Boil. *Scientific memoirs by medical officers of the Army of India* 1885,1,21–31.

**Dantas-Torres F.** *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006,101, 117–8.

**Davoust B, Roqueplo C, Parzy D, Watier-Grillot S, Marie JL.** A twenty-year follow-up of canine leishmaniosis in three military kennels in southeastern France, *Parasites & Vectors* 2013, 6( 1), 323.

**De Luna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piantedosi D, Gradoni L, Lucisano A, Persechino.** Decreased lipid fuidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis associated anaemia. *Journal of Comparative Pathology* 2000, 122, ( 2-3), 213–216.

**Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J.** Specific lgG1 and lgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite immunology* 1995, 17(9), 451-458.

**Desbois N, Pratlong F, Quist D, Dedet JP.** *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). *Parasite* 2014, 21, 12.

**Donovan C.** On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British Medical Journal* 1903, 2, 79.

**Du R, Hotez PJ, Al-Salem WS, Acosta-Serrano A.** Old World cutaneous leishmaniasis and refugee crisis in the Middle East and North Africa. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016, 10:e0004545.

**Edrissian G, Rokni MB.** Mohebali M, Nateghpour M, Mowlavi G, Bahadori M. History of medical parasitology and parasitic infections in Iran. *Archives of Iranian Medicine* 2016, 19, 601–7.

**Ertabaklar H, Ozensoy S, Sakru N, Keles E, Ozbel Y.** Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visceral Leishmaniasis’in araştırılması, *Turkish Journal of Parasitology* 2001, 25, 128-131.

**Esch KJ, Petersen CA**. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews* 2013, 26: 58-85.

**Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ.** An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol* 2016.

**Ferreira EDC, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM.** Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting diferent clinical manifestations. *Veterinary Parasitology* 2007, 146(3-4), 235–241.

**Fernandes CB, Junior JTM, de Jesus C, Souza BM, Larangeira DF, Fraga DB, Tavares Veras PS, Barrouin-Melo SM.** Comparison of two commercial vaccines against visceral leishmaniasis in dogs from endemic areas: IgG, and subclasses, parasitism, and parasite transmission by xenodiagnosis, *Vaccine* 2014, 32, 11, 1287–1295.

**Foglia Manzillo V, Di Muccio T, Cappiello S, Scalone A, Paparcone R, Fiorentino E, Gizzarelli M, Gramiccia M, Gradoni L, Oliva G.** Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in na¨ıve dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013, 7, (5), Article ID e2225.

**Fraga DBM, Pacheco LV, Borja LS, Tuy PG, Bastos LA, Solcà Mda S, Amorim LD, Veras PS.** Te rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rK28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2016, 10(1), Article ID e0004333.

**Gad Baneth.** *DVM, PhD, DECVCP, Koret School of Veterinary Medicine, Hebrew University, Rehovot*

**Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA.** Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs, *Revue Scientifque et Technique de l’OIE* 2015, 34( 2), 613–626.

**Giannuzzi AP, Ricciardi M, De Simone A, Gernone F.** Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature, *Journal of Small Animal Practice* 2017, 58( 3),125–138.

**Gibson ME.** The identification of kala azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Medicial Hist*ory 1983,27,203–13.

**Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M, Mancianti F*.*** *Leishmania infantum* infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Medical and Veterinary Entomology* 1987,1,339–342.

**Gultekin B, Ertug S, Eren H, Karagenc T, Turgay N, Doyuran ES.** Aydın Ili Ketendere Köyünde visseral Leishmaniasis epidemiyolojisi, *Turkish Journal of Parasitology* 2003, 27(2), 102–105.

**Gürel MS, Yeşilova Y, Ölgen MK, Özbel Y.** Cutaneous leishmaniasis in Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2012, 36, 121-129.

**Handman E, Bullen DV.** Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in parasitology* 2002, 18(8), 332-334.

**Harkins KM, Schwartz RS, Cartwright RA, Stone AC.** Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. *Infection, Genetics and Evolution* 2016, 38, 101–9.

**Heidarpour M, Soltani S, Mohri M, Khoshnegah J.** Canine visceral leishmaniasis: Relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status,” *Parasitology Research* 2012, 111, 4, 1491–1496.

**Hoare CA.** Early discoveries regarding the parasites of Oriental sore. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1938, 32, 66–92.

**Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L.** “Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis,” *Parasitology* 2017, 144,(1), 95–115.

**Houghton RL, Petrescu M, Benson DR, Skeiky YA, Scalone A, Badaró R, Reed SG, Gradoni L.**  A cloned antigen (recombinant K39) of *Leishmania chagasi* diagnostic for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1 patients and a prognostic indicator for monitoring patients undergoing drug therapy. *The Journal of Infectious Diseases* 1998, 177, 1339- 1344.

**Ikeda Garcia FA, Ciarlini PC, Lopes RS, Marques FJ, Bomfim SRM , de Lima VMF, Marcondes M.** Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2008.

**İça A, Inci A, Yıldırım A, Atalay O, Duzlu O.** Investigation of canine leishmaniosis by Nested-PCR in Kayseri and vicinity. *Türkiye Parasitoloji Dergisi* 2008, 32, 187-191.

**Jain KK.** Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* 2007, 53, 2002-2009.

**Kaye PM, Aebischer T.** Visceral leishmaniasis: Immunology and prospects for a vaccine, *Clinical Microbiology and Infection* 2011, 17(10), 1462–1470.

**Kerr SF.** Palaearctic origin of *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000a, 95, 75–80.

**Kerr SF.** Merkelz R, MacKinnon C. Further support for a Palaearctic origin of Leishmania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000b, 95, 579–81.

**Koutinas AF, CK Koutinas.** Pathologic mechanisms underlying the clinical fndings in canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology* 2014,51, (2), 527–538.

**Kreutzer RD, Corredor A, Grimaldi Jr G, Grogl M, Rowton ED, Young DG, Morales A, McMahon-Pratt D, Guzman H, Tesh RB.** Characterization of *Leishmania columbiensis* sp. n (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasites infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Colombia and Panama. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1991, 44, 662–75.

**Koltaş IS, Eroğlu F, Alabaz D, Uzun D.** The emergence of *Leishmania major* and *Leishmania donovani* in southern Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2014, 108,154-158.

**Laurenti MD, Rossi CN, Matta VL, Tomokane TY, Corbett CE, Secundino NF, Pimenta PF, Marcondes M.** Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Veterinary Parasitology* 2013, 196( 3-4), 296–300.

**Leishman WB.** On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *British medical journal* 1903, 1,1252–4.

**Lainson R, Shaw JJ.** Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniases in Biology and Medicine, Vol. 1. Biology and Epidemiology. London: Academic; 1987, 1–120.

**Lainson R.** The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 2010, 1, 13–32.

**Lewis DJ.** A taxonomic review of the genus Phlebotomus (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Nat His) Entomol* 1982, 45, 121–209.

**Liew FY, O’Donnell CA.** Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* 1993, 32, 161–259.

**Lima WG, Michalick MSM, Melo MND, Tafuri WL, Tafuri WL.** Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes, *Acta Tropica* 2004, 92, (1), 43–53.

**Lindenberg A.** L’ulcère de Bauru ou le bouton d’Orient au Brésil. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 1909, 2,252–4.

**Lopes EG, Seva AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, Ferreira HL, Oliveira TMFS, Bigotto MFD, Galvis-Ovallos F, Galati EAB, Soares RM.** Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of fve seronegative dogs are infected. *Epidemiology and Infection* 2017, 1–9.

**Lühe M.** Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In: Mense C, editor. *Handbuch der Tropenkrankheiten, Band 3. Leipzig: Verlag J.A. Barth*, 1906, 69–268.

**Lysenko AJ.** Distribution of leishmaniasis in the Old World. *Bulletin of the World Health Organization* 1971, 44, 515–20.

**Maia C, Campino L**. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology* 2008, 158, 274-287.

**Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE.** Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Journal of Veterinary Science* 2008,182,441– 445.

**Manson Bahr PEC.** Old World leishmaniasis. In: Cox FEG, editor. The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases. London: The Wellcome Trust; 1996, 206–17.

**Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A.** Leishmaniasis in travellers: a literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2014,12,563–81.

**Mancianti F, M Gramiccia, L Gradoni, S Pieri.** Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of diferent clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 1988, 82(4), 566-567.

**Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L.** Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* 2013, 27, 123–47.

**McGwire BS, Satoskar AR.** Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM* 2014, 107, 7-14.

**McNeil SE.** Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology* 2005, 78, 585-594.

**Miranda S, Martorell S, Costa M, Ferrer L, Ramis A.** Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. *Veterinary Parasitology* 2007,144,251–260.

**Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G.** Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Veterinary Parasitology* 2008,24,371- 377.

**Maurício IL, Stothard JR, Miles MA.** The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today* 2000,16, 188–9.

**Mirò G, Oliva G, Cruz I, Canavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P.** Multi-centre and controller clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology* 2008,19(suppl 1),7–8.

**Momen H, Cupolillo E.** Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2000, 95,583–8.

**Moreno G, Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E.** Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numerique, individualization du complexe Leishmania infantum, corollaires biographique et phyletique, à propos de 146 souches originaires de l’Ancien et du Noveau Monde. In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. Taxonomie et phylogenèse. Application éco-epidemiologiques. Colloque International du CNRS/INSERM/OMS, 2–6 Julliet 1984. Montpellier: IMEEE; 1986, 105–17.

**Müller N, Welle M, Lobsiger L, Stoffel MH, Kühni Boghenbor K, Hilbe M, Gottstein B, Frey CF, Geyer C, von Bomhard W.** Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in Central Europe. *Veterinary Parasitology* 2009,166, 346–51.

**Noli C, Saridomichelakis MN.** An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Journal of Veterinary Science* 2014, 202,425-435.

**Nowak RM.** Walker’s Mammals of the World. 6th ed. Baltimore and London: John Hopkins University Press; 1999.

**Noyes H.** Implication of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1998, 93, 657–61.

**Ok ÜZ, Balcıoğlu IC, Taylan A, Özensoy S, Özbel Y.** 2002. Leishmaniasis in Turkey.

**Oliva G, Nieto J, Foglia Manzillo V, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegand L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Gueguen S, Cañavate C, Gradoni L.** A randomised, double-blind, controlled efcacy trial of the liesp/qa-21 vaccine in na¨ıve dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2014,8, 10.

**Ordeix L, Dalmau A, Osso M, Llull J, Montserrat-Sangra S, Solano-Gallego L.** Histological and parasitological distinctive fndings in clinically-lesioned and normal-looking skin of dogs with diferent clinical stages of leishmaniosis, *Parasites & Vectors* 2017, 10( 1), 121.

**Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O.** Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2004, 42, 2769-2770.

**Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Leone N, de Caprariis D, Chirico J, Spinelli R, Capelli G, Brandonisio O.** Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005,17,32-37.

**Özbel Y, Oskam L, Ozensoy 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.

**Özbel Y, Balcioglu IC, Olgen MK, Simsek FM, Toz SO, Ertabaklar H, Demir S, Alkan MZ.** Spatial distribution of phlebotomine sand flies in the Aydin Mountains and surroundings: the main focus of cutaneous Leishmaniasis in western Turkey, *Journal of Vector Ecology* 2011, 36(1), 99-105.

**Özbel Y.** The infections transmitted by sand flies in Turkey, *Ankara Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013, 60, 225-228.

**Palatnik-de-Sousa CB.** Vaccines for canine leishmaniasis, *Frontiers in Immunology* 2012, 3, 69.

**Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A,** **Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E.** Guidelines for diagnosis and clinical classifcation of leishmaniasis in dogs, *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010, 236 (11), 1184–1191.

**Paltrinieri S, Gradoni L, Roura X, Zatelli A, Zini E.** Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis, *Veterinary Clinical Pathology* 2016, 45( 4), 552– 578.

**Pekağırbaş M.** ‘’Muğla ili ve ilçelerinde bulunan phlebotamine (Diptera:Psychodidae) türleri, popülasyon dinamikleri ve Leishmania türlerinin polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemiyle araştırılması’’. Veteriner Parazitoloji Programı Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2019.

**Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F.** Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications* 2005, 29(suppl 2), 301–303.

**Pietro SD, Francesca Bosco VR, Crino C, Francaviglia F, Giudice E.** Prevalence, type, and prognosis of ocular lesions in shelter and owned-client dogs naturally infected by *Leishmania infantum*,*Veterinary World* 2016,9( 6), 633–637.

**Piscopo TV, Mallia AC.** Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal* 2006,82, 649-657.

**Poinar Jr G.** Palaeomyia burmitis (Phlebotominidae: Diptera), a new genus of Cretaceous sand flies with evidence of blood-sucking habits. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 2004,106, 598–605.

**Poinar Jr G, Poinar R.** Paleoleishmania proterus n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*. 2004, 155, 305–10.

**Poinar Jr G, Poinar R.** Evidence of vector-borne disease of Early Cretaceous reptiles. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2004, 4, 281–4.

**Poinar Jr G.** *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of Paleoleishmania neotropicum sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasit Vectors* 2008, 1:22.

**Porrozzi R, Santos Da Costa MV, Teva A,** **Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G Jr.** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, 14 (5), 544–548.

**Proverbio D.** Te use of two clinical staging systems of canine leishmaniasis in a clinical setting: a critical evaluation. *Journal of Veterinary Clinical Practice and Petcare* 2016,1–3.

**Rassi Y, Kaverizadeh F, Javadian E, Mohebali M.** First report on natural promastigote infection of Phlebotomus caucasicus in a new focus of visceral leishmaniasis in North West of Iran. *Iranian Journal of Public Health* 2004, 33(4), 1-2.

**Ready PD.** Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology* 2014, 6,147-154.

**Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R.** Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis, *Veterinary Parasitology* 2016, 227, 98–114.

**Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R.** Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009,128, 87-95.

**Reis A. B., Martins-Filho O. A., Teixeira-Carvalho A. Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC**, **Giunchetti RC, Genaroe O, Corrêa-Oliveira R.** Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2006, 81(1),68–75.

**Reithinger R, Davies CR.**  Is the domestic dog (Canis familiaris) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1999, 61(4), 530-541.

**Reuss SM, Dunbar MD, Calderwood Mays MB, Owen JL, Mallicote MF, Archer LL, Wellehan Jr JF.** Autochtonous Leishmania siamensis in horse, Florida, USA. *Emerging Infectious Diseases* 2012, 18,1545–7.

**Ribeiro RR, da Silva SM, Fulgêncio Gde O, Michalick MS, Frézard FJ.** Relationship between clinical and pathological ´ signs and severity of canine leishmaniasis, *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 2013, 22(3), 373–378.

**Roberts MT.** Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 2005, 75-76: 115-130.

**Rohousova I, Talmi-Frank D, Kostalova T, Polanska N, Lestinova T.** Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. *Parasites & Vectors* 2015, 8, 360.

**Romero GAS, Boelaert M.**  Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2010, 4, 1, 584.

**Rougier S, Vouldoukis I, Fournell S, Pérès S, Woehrlé F.** Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Veterinary Parasitology* 2008,153,244–254.

**Roura X, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E.** Prognosis and monitoring of leishmaniasis in dogs: A working group report,” *The Veterinary Journal* 2013,198(1), 43–47.

**Russell A.** The Natural History of Aleppo, and Parts Adjacent. London: A. Millar; 1756, 262–6.

**Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O.** Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research* 2008, 39( 3), 36.

**Santarem N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro da Silva A.** Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48, 1866-1874.

**Sbrana S, Marchetti V, Mancianti F, Guidi G, Bennett D.** Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection, *Journal of Small Animal Practice* 2014,55( 6), 309–313.

**Schnur LF.** On the clinical manifestations and parasites of Old World leishmaniasis and *Leishmania tropica* causing visceral leishmaniasis. In: Hart DT, editor: Leishmaniasis: *The Current Status and New Strategies for Control. NATO ASI Series* 1987,171, 939–43.

**Serhat E.** İmmünostimulan Polimerler İle Attenüe Edilmiş Leishmania Parazitlerinin Aşı Olarak Etkinliğinin In Vıtrove In Vıvoincelenmesi, *Yayımlanmamış Doktora Tezi* 2013.

**Shaw J, Pratlong F, Floeter-Winter L, Ishikawa E, El Baidouri F, Ravel C, Dedet JP.** Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni* n.sp. (Kinetoplatida: Trypanosomatidae), the parasite responsible for diffuse cutaneous leishmaniasis in the Dominican Republic. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2015, 93, 552–8.

**Shaw J.** The leishmaniases - survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007, 102, 541–7.

**Sasanelli M, Paradies P, de Caprariis D, Greco B, De Palo P, Palmisano D, Carelli G.** Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Veterinary Research Communications* 2007, 31(suppl 1), 335–338.

**Silva DT, Starke-Buzetti WA, Alves-Martin MF, Paixao Mdos S, Tenorio Mda S, Lopes ML.**  Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *The Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2014, 23, 179-186.

**Silvestre R, Santarem N, Teixeira L, Cunha J, Schallig H, Cordeiro-da-Silva A.** Evaluation of *Leishmania* species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*  2009, 81, 202-208.

**Silvestre R, Santarem N, Cunha J, Cardoso L, Nieto J, Carrillo E, Moreno J, Cordeiro-da-Silva A.** Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Veterinary Parasitology* 2008, 158, 23-30.

**Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G. Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L.** The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 2000, 90(1-2), 37–45.

**Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J.** Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based realtime PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2007, 147(3-4), 315–319.

**Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2009,165, 1-18.

**Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2011, 4, 86.

**Solano-Gallego L, Di Filippo L, Ordeix L, Planellas M, Roura X, Altet L, Martínez-Orellana P, Montserrat S.** “Early reduction of *Leishmania infantum*-specifc antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease,” *Parasites & Vectors* 2016, 9, 235.

**Solano-Gallego L, Cardoso L, Pennisi MG, Petersen C, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** Diagnostic challenges in the era of canine *Leishmania infantum* vaccines. *Trends in parasitology* 2017, 33(9), 706-717.

**Souza AP, Soto M, Costa JM, Boaventura VS, de Oliveira CI, Cristal JR, Barral-Netto M, Barral A.** Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One* 2013, 8, e66110.

**Sousa S, Cardoso L, Reed SG, Reis AB, Martins-Filho OA, Silvestre R, Cordeiro da Silva A.** Development of a fluorescent based immunosensor for the serodiagnosis of canine leishmaniasis combining immunomagnetic separation and flow cytometry. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013, 7: e2371.

**Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S.** Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2011, 105, 1-6.

**Svobodova M, Alten B, Zidkova L, Dvorak V, Hlavackova J, Myskova J, Seblova V, Kasap OE, Belen A, Votypka J, Volf P.**  Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *International Journal for Parasitology* 2009, 39, 251**-**256.

**Sundar S, Rai M.** Advances in the treatment of leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2002, 15, 593–598.

**Sundar S, Singh B.** Understanding Leishmania parasites through proteomics and implications for the clinic. *Expert review of proteomics* 2018, 15(5), 371-390.

**Steverding D.** The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2017,10, 82.

**Swaminath CS, Shortt HE, Anderson LAP.** Transmission of Indian kala-azar to man by the bites of Phlebotomus argentipes, Ann. and Brun. *Indian Journal of Medical Research* 1942, 30, 473–7.

**Tafuri W L, De Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL.** Canine visceral leishmaniosis: A remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil, *Veterinary Parasitology* 2001, 96( 3), 203–212.

**Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E.** Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1993, 68,107–8.

**Toz SO, Korkmaz M, Balcıoglu IC, Ozbel Y, Ertabaklar H.** Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis, *Turkish Journal of Parasitology* 2002, 26(3), 234-238.

**Toz SO, Sakru N, Ertabaklar H, Demir S, Sengul M, Ozbel** **Y.** Serological and entomological survey of zoonotic visceral Leishmaniasis in Denizli Province, Aegean Region, Turkey, *New Microbiologica* 2009, 32, 93-100.

**Toz SO, Culha G, Zeyrek FY, Ertabaklar H, Alkan MZ, Vardarlı AT, Gunduz C, Ozbel Y.** A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey, *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2013, 7(5): e2205.

**Tuon FF, Neto VA, Amato VS.** *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2008;54:158–66.

**Twining W.** Observations on diseases of the spleen particularly on the vascular engorgement of that organ common in Bengal. *Trans Med Phys Soc Bengal* 1827 (3), 351–412.

**Twining W.** Clinical illustrations of the more important disease of Bengal, with the result of an inquiry into their pathology and treatment. *Calcutta: Baptist Mission Press*; 1832, 271–360.

**Vasconcelos TCB, Furtado MC, Belo VS, Morgado FN, Figueiredo FB.** Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution* 2019, 74, 103293.

**Veras PST, Fraga DBM, Solcà MdS, Guedes CES.**  New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment, Dr. David Claborn (Ed.), 2014.

**Voyvoda H, Pasa S, Toz SO, Ozbel Y, Ertabaklar H.** Aydının Bazı İlçe ve Köyleri ile İzmir'in Selçuk İlçesindeki köpeklerde leishmaniosis ve Dirofilariasis'in Prevalansı, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2004, 28, 1105-1111.

**Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME.** Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples*. Journal of Clinical Microbiology* 2011,49, 3892-3904.

**World Health Organization.** Leishmaniasis. *World Health Org Fact Sheet*. 2016, 375.

**World Health Organization**. “Control of the leishmaniasis,” Report of the meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Switzerland, 2010, Vol. 9492010

**Wright JH.** Protozoa in a case of tropical ulcer (“Delhi Sore”). *The Journal of Medical Research* 1903, 10, 472–82.

**Wylie CE, Carbonell-Antonanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L.** A systematic review of the efcacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: Topically applied insecticide treatments and prophylactic medications, *Preventive Veterinary Medicine* 2014, 117(1), 19–27.

**Zeouk I, Et-Touys A, Balouiri M, Fellah H, Lalami AEO, Bekhti K.** Leishmanicidal Activity of Plant Extracts from Sefrou, a Moroccan Focus of Leishmaniasis, against Various *Leishmania* Parasites in the Promastigote Stage. Phytothérapie, 2018.

# 

# EKLER

**Ek 1.** Muğla ilinden toplanan köpek serum ve kan örnekleri (IFAT bulguları, +:1/64 antikor titresi, -: negatif, RV: PZR Sonuçları)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Numara** | **Yaş** | **Cinsiyet** | **Bölge** | **Cins** | **IFAT** | **PCR** |
| 1 | 4 yaş | Dişi | Gökova | Melez | - | - |
| 2 | 2 yaş | Dişi | Marmaris | Boxer | - | - |
| 3 | 2 yaş | Dişi | Datça | Cocker | ++ | - |
| 4 | 7 yaş | Dişi | Akyaka | Melez | ++ | - |
| 5 | 3 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 6 | 10 yaş | Erkek | Muğla | Golden | - | - |
| 7 | 1 yaş | Dişi | Ula | Seter | - | - |
| 8 | 10 yaş | Erkek | Ortaca | Terrier | - | - |
| 9 | 3 yaş | Erkek | Çıtlık | Terrier | + | - |
| 10 | 5 yaş | Erkek | Dalyan | Dogo Arjantino | - | - |
| 11 | 5 yaş | Dişi | Marmaris | Melez | - | - |
| 12 | 2 yaş | Dişi | Şirinköy | Pointer | + | - |
| 13 | 7 yaş | Erkek | Datça | Kangal | + | - |
| 14 | 1.5 yaş | Erkek | Muğla | Labrador | + | - |
| 15 | 12 yaş | Erkek | Ortaca | Terrier | - | + |
| 16 | 7 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 17 | 3 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | + |
| 18 | 14 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 19 | 3 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 20 | 4 yaş | Erkek | Datça | Alman Çoban | + | - |
| 21 | 3 yaş | Erkek | Gökova | Melez | + | + |
| 22 | 7 yaş | Dişi | Muğla | Golden | - | - |
| 23 | 3 yaş | Dişi | Gökova | Melez | ++ | - |
| 24 | 7 yaş | Dişi | Göcek | Melez | + | - |
| 25 | 6 yaş | Erkek | Ataköy | Melez | + | - |
| 26 | 5,5 yaş | Erkek | Marmaris | Melez | + | - |
| 27 | 1 yaş | Erkek | Datça | Melez | - | - |
| 28 | 8 yaş | Dişi | Köyceğiz | Alman Çoban | - | - |
| 29 | 6 yaş | Dişi | Muğla | Rotweiller | - | - |
| 30 | 6 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 31 | 4 yaş | Dişi | Marmaris | Melez | - | - |
| 32 | 1 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 33 | 6 ay | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 34 | 4 yaş | Erkek | Köyceğiz | Dogo Arjantino | +++ | - |
| 35 | 6 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 36 | 4 yaş | Erkek | Marmaris | Melez | - | - |
| 37 | 2 yaş | Erkek | Muğla | Golden | - | - |
| 38 | 7 yaş | Erkek | Yerkesik | Pointer | +++ | - |
| 39 | 2 yaş | Dişi | Gölcük | Barak | +++ | - |
| 40 | 13 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | +++ | - |
| 41 | 3 yaş | Erkek | Akyaka | Husky | - | - |
| 42 | 4 yaş | Dişi | Şirinköy | Terrier | - | - |
| 43 | 4 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | +++ | - |
| 44 | 7 yaş | Dişi | Yatağan | Melez | - | - |
| 45 | 12 yaş | Dişi | Muğla | Labrador | - | - |
| 46 | 4 yaş | Dişi | Köyceğiz | Golden | +++ | - |
| 47 | 4 yaş | Erkek | Akyaka | Golden | - | - |
| 48 | 1.5 yaş | Erkek | Muğla | Pitbull | - | - |
| 49 | 5 yaş | Dişi | Marmaris | Melez | + | - |
| 50 | 6 yaş | Erkek | Gökova | Melez | + | - |
| 51 | 10 yaş | Erkek | Ortaca | Terrier | - | - |
| 52 | 7 yaş | Dişi | Marmaris | Rotweiller | - | - |
| 53 | 7 yaş | Dişi | Akyaka | Dogo Arjantino | - | - |
| 54 | 10 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 55 | 5 yaş | Dişi | Muğla | Terrier | + | - |
| 56 | 2 yaş | Dişi | Akyaka | Golden | - | - |
| 57 | 1 yaş | Dişi | Ören | Melez | - | - |
| 58 | 3 yaş | Dişi | Muğla | Golden | - | - |
| 59 | 4 yaş | Dişi | Muğla | Melez | - | - |
| 60 | 2 yaş | Dişi | Ataköy | Melez | - | - |
| 61 | 7 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 62 | 11 ay | Dişi | Marmaris | Doberman | - | - |
| 63 | 4 yaş | Erkek | Ula | Kopay | ++ | - |
| 64 | 2 yaş | Dişi | Datça | Melez | + | - |
| 65 | 2 yaş | Erkek | Sarıgerme | Dogo Arjantino | - | - |
| 66 | 8 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 67 | 5 yaş | Erkek | Çıtlık | Melez | + | - |
| 68 | 5 yaş | Erkek | Ataköy | Melez | + | - |
| 69 | 1 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 70 | 2 yaş | Erkek | Muğla | Melez | ++ | - |
| 71 | 3 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 72 | 4 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 73 | 8 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | + |
| 74 | 4 yaş | Erkek | Kavaklıdere | Kopay | - | - |
| 75 | 5 yaş | Erkek | Ortaca | Melez | + | - |
| 76 | 3 yaş | Dişi | Ören | Melez | - | - |
| 77 | 4 yaş | Dişi | Dalyan | Alman Çoban | - | - |
| 78 | 10 yaş | Dişi | Ula | Melez | + | - |
| 79 | 1 yaş | Erkek | Muğla | Boxer | - | - |
| 80 | 6 yaş | Dişi | Muğla | Melez | +++ | - |
| 81 | 8 yaş | Erkek | Ortaköy | Alman Çoban | - | - |
| 82 | 6 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 83 | 2 yaş | Dişi | Çıtlık | Melez | - | - |
| 84 | 4 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 85 | 5 yaş | Dişi | Akyaka | Melez | - | - |
| 86 | 4 yaş | Erkek | Muğla | Melez | ++ | - |
| 87 | 8 yaş | Dişi | Muğla | Melez | - | - |
| 88 | 4 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 89 | 10 yaş | Dişi | Muğla | Melez | - | - |
| 90 | 4 yaş | Dişi | Şirinköy | Melez | - | - |
| 91 | 5 yaş | Erkek | Muğla | Terrier | - | - |
| 92 | 3 yaş | Dişi | Gökçe | Seter | - | - |
| 93 | 4 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 94 | 7 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 95 | 3 yaş | Dişi | Ortaca | Pointer | - | - |
| 96 | 8 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 97 | 4.5 yaş | Erkek | Yatağan | Melez | - | - |
| 98 | 4 yaş | Erkek | Muğla | Malaklı | + | - |
| 99 | 2 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 100 | 8 yaş | Dişi | Muğla | Golden | - | - |
| 101 | 3 yaş | Erkek | Muğla | Pointer | - | - |
| 102 | 4 yaş | Dişi | muğla | Melez | ++ | - |
| 103 | 8 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 104 | 6 yaş | Dişi | Muğla | Terrier | - | - |
| 105 | 1 yaş | Erkek | Ula | Melez | + | - |
| 106 | 2 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | + | - |
| 107 | 3 yaş | Erkek | Akyaka | Pointer | - | - |
| 108 | 5 yaş | Erkek | Akyaka | Alman Çoban | + | + |
| 109 | 4 yaş | Erkek | Akyaka | Melez | - | + |
| 110 | 4 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | ++ | - |
| 111 | 2 yaş | Dişi | Muğla | Melez | + | - |
| 112 | 2 yas | Dişi | Ula | Melez | + | - |
| 113 | 2 yas | Erkek | Ula | Seter | - | - |
| 114 | 1 yaş | Erkek | Akyaka | Melez | - | - |
| 115 | 3 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 116 | 5 yaş | Dişi | Gökova | Kangal | + | - |
| 117 | 4 yaş | Dişi | Marmaris | Melez | + | + |
| 118 | 4 yaş | Dişi | Muğla | Alman Çoban | ++ | - |
| 119 | 1 yas | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 120 | 4 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 121 | 1 yaş | Erkek | Muğla | Melez | - | - |
| 122 | 12 yaş | Erkek | Çıtlık | Melez | - | - |
| 123 | 10 yaş | Erkek | Köyceğiz | Melez | ++ | - |
| 124 | 3 yaş | Dişi | Köyceğiz | Melez | - | - |
| 125 | 2 yaş | Erkek | Akyaka | Melez | - | - |
| 126 | 6 yaş | Dişi | Akyaka | Melez | + | - |
| 127 | 7 yaş | Erkek | Ortaca | Melez | - | - |
| 128 | 5 yaş | Dişi | Marmaris | Pointer | - | - |
| 129 | 4 yaş | Erkek | Döğüşbelen | Pointer | - | + |
| 130 | 6 yaş | Erkek | Çıtlık | Melez | - | - |
| 131 | 4 yaş | Erkek | Muğla | Melez | + | + |

# 

## 

## Ek 2. Ticari aşılar ve etkileri

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Aşılar** | **LEISH-TEC(54)** | **CANILEISH(58)** | **LETIFEND(59)** |
|  |  |  |  |
| Aşı Formülasyon | A2+ Saponin | Atılan / Salgılanan Protein + QA21 | Q Chimeric Protein |
| Klinik Belirtilerin Önlenmesinde Etkinlik | %71,0 | %68,40 | %72 |
| Koruma Seviyesi | %96,4 | %92,7 | %98 |
| Semptomların Azaltılması | Evet | Evet | Evet |
| Deneysel Enfeksiyon Sonrası Parazit Yükünün Azaltılması (PCR) | Evet | Evet | Evet |
| IgG2 İfadesi | Evet | Evet | Evet |
| Th1 Hücreleri Aktivasyonu | Belirlenmedi | Evet | Belirlenmedi |
| Stimülasyondan Sonra IFN-g İfadesi | Evet | Evet | Belirlenmedi |
| Leishmanicidal Etkinlik | Belirlenmedi | Evet | Belirlenmedi |
| LST / DTH Enfeksiyon Sonrası | Belirlenmedi | Evet | Evet |

# 

# ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : TOPÇUOĞLU, Ali Dinç

**Uyruk** : TC

**Doğum yeri ve tarihi** : MUĞLA/1990

**Telefon** : 5556111760

**E-mail** : alidinctopcuoglu@gmail.com

**Yabancı Dil** : İngilizce

**EĞİTİM**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Derece** | **Kurum** | **Mezuniyet tarihi** |  |
|  |  |  |  |
| Lisans | Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakultesi | 17.06.2015 |  |
|  |  |  |  |

# 