



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BYK-DR-2014-0002

**KÖPEK VİSCERAL LEİSHMANİASİSİNDE IL-6, TNF- α ,
DHEA VE KORTİZOL DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sema ERTUĞ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

AYDIN-2014

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BYK-DR-2014-0002**

**KÖPEK VİSCERAL LEİSHMANİASİSİNDE IL-6, TNF- α ,
DHEA VE KORTİZOL DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sema ERTUĞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

AYDIN-2014

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

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sema ERTUĞ tarafından hazırlanan “Köpek Visceral Leishmaniasisinde Il-6, TNF- α , DHEA ve Kortizol Düzeylerinin Araştırılması” başlıklı tez, //2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi : _____

İmzası:

.....

.....

.....

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

Unvanı, Adı Soyadı
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Güzel DİŞÇİGİL

ÖNSÖZ

Leishmania infeksiyonu tropikal ve subtropikal iklime sahip olan ülkelerde görülmektedir. *L.infantum* ve *L.chagasi*'nin neden olduğu zoonotik visceral leishmaniasis (VL) insanlarda oluşan leishmaniasisinin %20'sini oluşturmaktadır (yılda 100.000 vaka). Köpeklerin visceral leishmaniasiste doğal rezervuar olduğu insanların ise rastlantısal olarak infekte oldukları bilinmektedir. İnfekte köpeklerin tedaviye yanıtının düşük olması nedeniyle günümüzde köpek leishmaniasis (KanL)'inin önlenmesinde ümit veren en önemli yaklaşımın immunoprofilaksi olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı günümüzde KanL'deki immun yanıtın araştırılması yönündeki çalışmalar önem kazanmıştır. KanL'de immun yanıtın düzenlenmesinde T lenfositlerin ve sitokinlerin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen "Köpek visceral leishmaniasisinde IL-6, TNF- α , DHEA ve kortizol düzeylerinin araştırılması" isimli bu tez çalışması için Adnan Menderes Üniversitesi 02/09/2009 tarihli Hayvan Etik Kurulundan izin alınmıştır (No:2009/51). Veteriner Hekimler tarafından çalışmaya katılmayı kabul eden köpek sahiplerine, çalışma hakkında bilgilendirilmiş olur metni okutulup, köpeklerin sosyodemografik özelliklerini sorgulayan anket formu doldurulmuş ve izin alınmıştır. Çalışma grubu olarak leishmaniasis şüphesiyle, soğuk zincir kurallarına uygun olarak veteriner hekimler tarafından Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen köpek serumları dahil edilmiş ve IFA testi ile 20'si *Leishmania* seropozitif ve 20'si *Leishmania* seronegatif olarak değerlendirilen 2-4 yaşlarında toplam 40 adet erkek köpek serumu immunolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanılmıştır. Bu çalışma grubundaki serolojik sonuçlar immunokromatografik bir yöntemle tekrar değerlendirilmiştir. KanL'inden korunmada önemli olduğu bilinen Th1 hücrelerinden salınan TNF- α ve infeksiyonun oluşmasına ve ilerlemesine neden olan Th2 hücrelerinden salınan IL-6 düzeyleri toplam 40 köpek serumunda araştırılmıştır. Ayrıca serumda dihidroksiepiandrosteron (DHEA) miktarının azalması, Th1/Th2 dengesini etkileyerek immun yanıtın hastalığın ilerlemesine neden olan Th2 yanıtına doğru yönelmesine yol açmaktadır. Yapılan literatür araştırılmasında insanlarda görülen leishmaniasisinde kortizol ve DHEA ile leishmaniasisin ilişkisini değerlendiren az sayıda yayın bulunmasına karşılık köpeklerdeki kortizol ve DHEA düzeyleri

ile leishmaniasis ilişkisini araştıran yayın bulunamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda köpeklerdeki DHEA ve kortizol serum düzeyleri ölçölerek leishmaniasisle birlikteliği irdelenecektir. KanL'e karşı gelişen immun yanıtta ki mekanizmalar ve etkileyen faktörler hakkındaki bilgilerin artmasının, ileride immunoterapinin tedavi seçenekleri arasında yer almasına ve *Leishmania*'ya karşı aşı geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayacağı düşünölmektedir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
EKLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Tarihçe.	1
1.2. Taksonomi	1
1.3. Morfoloji	2
1.3.1. Amastigot	3
1.3.2. Promastigot	3
1.4. Yaşam döngüsü.....	3
1.5. Epidemiyoloji	5
1.6. KanL tanı yöntemleri	5
1.6.1. Yöntemler.....	6
1.6.1.1. Direkt yöntemler	6
1.6.1.2. İndirekt yöntemler	6
1.7. Klinik bulgular	7
1.8. KanL tedavisi	8
1.9. Köpeklerin KanL'den korunması	9
1. 10. Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α)	10
1. 11. İnterlökin-6 (IL-6)	11
1. 12. Kortizol	11
1.13. Dihidroksiepiandrosteron (DHEA)	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Çalışma için ön hazırlıklar	13
2.2. Materyal toplanması ve örneklerin hazırlanması	13
2.3. IFAT	13

2.3.1. Gereç ve kimyasalların hazırlanması	13
2.3.2. Testin Yapılışı	15
2.3.3. Sonuçların yorumlanması ve değerlendirilmesi	16
2.4. Hızlı Tanı Testi (HTT) immunokromotografik testler	16
2.4.1. Testin yapılışı	16
2.4.2. Sonuçların yorumlanması ve değerlendirilmesi	16
2.5. IL-6 düzeyinin tayini	16
2.5.1. Test içerisindeki solüsyonların hazırlanması	16
2.5.2. Testin yapılışı	17
2.5.3. IL -6 düzeyinin belirlenmesi	17
2.6. TNF- α düzeyinin tayini	17
2.6.1. Test içerisindeki solüsyonların hazırlanması	18
2.6.2. Testin yapılışı	18
2.6.3. TNF- α düzeyinin belirlenmesi	18
2.7. Kortizol düzeyinin belirlenmesi	19
2.7.1. Testte kullanılan reaktifler	19
2.7.2. Testin yapılışı	19
2.8. DHEA-S düzeyinin ölçülmesi	19
2.8.1. Testte kullanılan reaktifler	20
2.8.2. Testin yapılışı	20
2.9. İstatistiksel analizler	20
3. BULGULAR	21
3.1. <i>Leishmania</i> IFAT sonuçları	21
3.2. <i>Leishmania</i> Hızlı Tanı Test sonuçları	21
3.3. Biyokimyasal analizler	22
3.3.1. Serum IL-6 düzeyleri	22
3.3.2. Serum TNF- α düzeyleri	25
3.3.3. Serum kortizol düzeyleri	27
3.3.4. Serum DHEA-S düzeyleri	28
3.3.5. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklerde görülen semptomların analizi	30
4. TARTIŞMA	33
5. SONUÇ	44

ÖZET	45
SUMMARY	47
6. KAYNAKÇA	49
ÖZGEÇMİŞ	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

4-PL:	Four Parameter Logistic Curve
ACTH:	Adrenokortikotropik Hormon
ADH:	Antidiüretik Hormon
Con-A	Konkovalan-A
CT:	Kortikosteron
DAT:	Direkt Aglütinasyon Testi
DHEA:	Dihidroksiepiandrosteron
DHEA-S:	Dihidroksiepiandrosteron-sülfat
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA:	Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi (Enzyme Linked Immunoabsorbent Asssay)
FML:	Fucose Mannose Ligand
FSH:	Folükül Stimülan Hormon
HPA:	Hipotalamik Pitüiter Adrenal
HTT:	Hızlı Tanı Testi
IFAT:	İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN- γ	İnterferon-gama
IL	İnterlökin
KanL:	Kanin Leishmaniasis
kDa:	Kilodalton
KL:	Kutanöz Leishmaniasis
L:	<i>Leishmania</i>
LPS:	Lipopolisakkarit
MKL:	Mukokutanöz Leishmaniasis
MÖ:	Milattan Önce
mRNA:	Mesajcı Ribonükleik Asit
NK:	Doğal Öldürücü Hücreler
NNN:	Novy-MacNeal-Nicolle Besiyeri
OIE:	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü

(devam)

PBS:	Fosfat Buffer Salin
PCR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction)
PMBC:	Periferik Kan Mononükleer Hücre (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PTH:	Paratiroid Hormon
R ² :	Belirleme katsayısı (Mean coefficients of determination)
RAI:	Radyoimmün Test
SLA:	Çözülebilir <i>Leishmania</i> Antijen (Soluble <i>Leishmania</i> antigen)
T ₃ :	Triiyodotironin
TNFR:	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
TNF- α :	Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TSH:	Tiroid Stimulan Hormon
VL:	Visceral Leishmaniasis
WB:	Western Blotting

ÇİZELGELER

	Sayfa
	No
Çizelge 3.1. <i>Leishmania</i> seropozitif 20 köpeğin IFAT sonuçları.....	21
Çizelge 3.2. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait IL-6 konsantrasyon düzeyleri	23
Çizelge 3.3. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait TNF- α konsantrasyon düzeyleri	25
Çizelge 3.4. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait Kortizol düzeyleri	27
Çizelge 3.5. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait DHEA-S düzeyleri	29
Çizelge 3.6. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklerde görülen semptomlar	31
Çizelge 3.7. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif erkek köpeklerde görülen semptomlar, yaşları, IFAT titreleri, serum IL-6, TNF α , DHEA-S ve kortizol sonuçları	32

ŞEKİLLER

	Sayfa
	No
Şekil 3.1. HTT test sonuçları.....	22
Şekil 3.2. “PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan IL-6 standart eğrisi	24
Şekil 3.3. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama IL-6 değerleri	24
Şekil. 3.4. “PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan TNF- α standart eğrisi	26
Şekil 3. 5. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama TNF- α değerleri	26
Şekil 3.6. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama kortizol değerleri	28
Şekil 3.7. <i>Leishmania</i> seropozitif ve <i>Leishmania</i> seronegatif köpeklere ait minimum, maximum ve ortalama DHEA-S değerleri	30

EKLER

Sayfa

No

Ek 1. Anket formu	63
-------------------------	----

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe

Leishmaniasis ile ilgili en eski kayıtlara M.Ö. 7. yüzyıla ait Babil Tabletlerinde hastalığın kutanöz formundaki lezyonlardan bahsedildiği bildirilmektedir. İbni Sina gibi bazı Türk bilginleri tarafından 10. yüzyılda deri lezyonu üzerine araştırmalar yapılmıştır. Onbeş ve onaltıncı yüzyıllarda Hindistan'da visceral leishmaniasis (VL) tanımlanmış ve hastalığa Kala-azar (Kara ateş) adı verilmiştir. Alexander Russell tarafından 1756 yılında Türk bir hastada ilk kez deri lezyonunun ayrıntılı bir tanımı yapılmıştır. Amerika kıtasında yaşayan İnkalar arasında kutanöz leishmaniasis (KL) veya mukokutanöz leishmaniasis (MKL); "Vadi hastalığı", "Beyaz Lepra" ve "Ant Dağları Hastalığı" gibi isimlerle adlandırılmıştır. Kala-azar etkeni olarak *L. donovani*'nin keşfi 1900 yılında William Leishman tarafından Hindistan'ın Dum Dum bölgesinde ateş şikayeti olan bir hastanın dalağında yapılan yaymalarla gerçekleştirilmiştir. Aynı yıllarda Charles Donovan, bir dalak biyopsisinden yaptığı yaymada benzer bir paraziti bildirmiştir. Leishman ve Donovan'ın keşifleri sonucu Kala-azar, sıtma benzeri bir hastalık olarak tanımlanmış; nükseden, zayıflatan, karaciğer ve dalak büyümesine neden olan bu hastalığın ticaret yollarıyla kıtalar arasında yayıldığı bildirilmiştir. 1924 yılında Hindistan'da kum sineklerinin dağılımıyla Kala-azar görülmesi arasında bir ilişki olduğu ortaya konulmuş ancak bilimsel olarak vektörün kum sinekleri olduğu 1939 yılında Smith, Haldar ve Ahmed'in araştırmalarıyla ortaya konulmuştur. Araştırmacılar hamsterları kum sineklerine sokturarak enfekte etmeyi başarmışlardır. 1941 yılında Adler ve Ber adlı araştırmacılar *Leishmania major* (*L. major*) ile enfekte *P. papatasi* ile gönüllüleri sokturulmuş ve insana bulaş şeklini ortaya koymuştur (Gibson 1983, Özbek ve Özensoy Töz 2007).

1.2. Taksonomi

Günümüze kadar tanımlanan 30 *Leishmania* türünden 21 tanesinin insanda enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir. Köpeklerde klinik enfeksiyon oluşturan türlerin en sık *L. infantum* olmak üzere *L. chagasi*, *L. tropica* ve *L. peruviana* olduğu bildirilmiştir. *Leishmania* türlerinin morfolojik olarak ayrımı mümkün olmamakta ancak izoenzim analizi, moleküler yöntemler ve monoklonal antikorla tür ayrımı yapılabilmektedir.

Leishmania türlerinin sistematikteki yeri aşağıdaki şekilde bildirilmiştir (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

- Kingdom: Protista
- Subkingdom: Protozoa
- Phylum : Sarcomastigophora
- Subphylum: Mastigophora
- Class: Zoomastigophora
- Order : Kinetoplastida
- Family : Trypanosomatidae
- Genus: *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Phytomonas*
- Genus: *Leishmania*
- Subgenus: *Leishmania*
- Species: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. enrietti*)
- Subgenus: *Viannia*
- Species: *Leishmania braziliensis* kompleksi (*L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*, *L. peruviana*), *Leishmania guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamenensis*, *L. shawi*), *Leishmania lainsoni*, *Leishmania naiffi*.

1.3. Morfoloji

Leishmania türlerinin yaşam döngülerinde omurgalı konaklarda görülen “amastigot” ve vektörde görülen “promastigot” olmak üzere morfolojik olarak ayırt edilebilen iki form yer almaktadır. Her iki formun benzer özellikleri bulunmaktadır. Örneğin; her ikisinde de nükleus yuvarlak veya oval şekilli olup kinetoplast nükleustan daha koyu boyanır ve oval veya çubuk şeklinde görülmektedir. Ayrıca her iki form da basit ikiye bölünme (binary fusion) ile çoğalmaktadır, bölünme kinetoplasttan başlamakta ve bunu sırasıyla nükleus ve sitoplazma izlemektedir.

1.3.1 Amastigot

Bu form omurgalı konaklarda parçalı çekirdekli lökositler, monositler ve endotel hücreleri içinde görülen hareketsiz form olarak tanımlanmaktadır. 2.5-6.8 µm boyutlarında olan amastigotları kamçısız olarak tanımlamanın doğru olmadığı, çünkü kamçı kökünün (blefaroplast) bulunduğu ancak dışarı doğru çıkmadığından ışık mikroskopunda görülmesinin mümkün olmadığı bildirilmiştir. Önceleri “Leishman-Donovan Cismi” olarak da adlandırılan amastigotların sitoplazmasında arka uca yakın bir nükleus ve bununla bitişik kinetoplast bulunmaktadır. Bu yapılara ek olarak sitoplazmasında vakuoller, tek bir mitokondri, golgi cismi ve çok sayıda lizozom yer almaktadır. Bu yapılar parazitin beslenmesine ve enzim aktivitelerinin gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

1.3.2 Promastigot

Promastigot formu hastalığın vektörü olan kum sineklerinin bağırsaklarında ve NNN gibi besiyerlerinde gözlenen hücre-dışı, hareketli formlar olarak tanımlanmaktadır. 15-20 µm boyunda ve 1.5-5 µm genişliğinde olabilen promastigotlar, amastigotlardan farklı olarak 27°C’de çoğalmaktadır. Bu formun ön ucundan çıkan 18-20 µm boyunda serbest hareket edebilen bir kamçısı ve kamçı kökünün yanında yer alan 9 çift periferik ve bir çift merkezi liften oluşan bir aksonemi bulunmaktadır. Kamçının bağlantı noktasında “kamçı paketi” adı verilen bir çukurluk görülmektedir. Ön uçta bulunan kinetoplast at nalı şeklindedir, merkezi bir nükleus ve nükleus membranında da porlar bulunmaktadır. Sitoplazmada bu yapılara ek olarak golgi cismi ve endoplazmik retikulum yer almaktadır (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

1.4. Yaşam Döngüsü

Leishmania türlerinin hayat döngüsü vektörleri olan *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi vektör ile omurgalı konak arasında gerçekleşmektedir. Köpekler klinik olarak hastalığa yakalanmalarının yanı sıra insan dahil birçok memeli türü için leishmaniasisin rezervuar konağı olarak bilinmektedir. Araştırmalarda günümüze kadar tanımlanan toplam 500 tatarcık türünden 30 tanesinin *Leishmania* türlerine vektörlük yapabildiği bildirilmiştir (Argaw ve Postigo 2014).

Vektör tatarcık türleri enfekte konaktan kan emerken makrofajlarla birlikte içinde bulunan amastigot formlarını da almaktadır. Emilen kan vektörün orta midesinde “peritrofik membran” denilen sindirimi sağlayan bir membran ile sarılmakta ve bu aşamada amastigotların bir kısmı sindirilmekte geriye kalanların vücudu uzamakta ve kamçı gelişerek prosiklik promastigot formuna dönüşmektedir. Bu formlar *Leishmania* türüne göre vektörün sindirim kanalının farklı bölgelerinde yerleşmekte ve yine türe bağlı olarak farklı sürelerde gelişimlerini tamamlamaktadır. Peritrofik membran içerisinde çoğalan parazitler salgıladıkları enzimlerle membranın ön kısmını eriterek torasik mideye geçmekte ve bu şekilde gelişen ilk promastigotlara “nektomonad” adı verilmektedir. Midenin torasik kısmının ön ucunda bulunan kapağa geldiklerinde kamçıları kullanarak bağırsak epiteline tutunmakta ve bu form da “haptamonad” olarak adlandırılmaktadır. Sonraki dönemlerde promastigotlar midenin ön tarafına göç ederek özafagus ve farinkse tutunmakta ve çoğalarak lümeni tıkamaktadır. Promastigotlar zaman zaman buradan ayrılarak ağız parçalarına gitmekte ancak bu aşamada promastigotlar çoğalmamaktadır. Omurgalılar için enfektif olan bu son dönem promastigot şekline “metasiklik promastigot” adı verilmektedir. Vektör tatarcıklar kan emerken 500-1000 arasında promastigot ile konağı enfekte etmektedir. Ayrıca kan emme sırasında salgıladıkları tükürük salgısının anti-koagülan içerikli olduğu ve parazitin konakta yerleşmesinde hayati rol oynadığı bildirilmiştir (Gillespie ve ark 2000, Özbel ve Özensoy Töz 2007). Deriden giren promastigotların bir kısmı enfeksiyonun ilk saatlerinde kompleman sistemiyle etkisiz hale getirilmekte diğerleri ise mononükleer fagositik hücreler (makrofaj, monosit, langerhans hücreleri vb.) tarafından fagosite edilmektedir. Fagositik vakuol içinde kamçılarını kaybeden promastigotlar amastigota dönüşmekte ve çoğalmaya başlamaktadır. Amastigot sayısı artınca hücre parçalanmakta ve amastigotlar dağılıp yeni makrofajları enfekte edebilmektedir. Enfeksiyonun sonraki aşamaları etkenin türüne göre büyük oranda farklılık göstermektedir. *L. tropica* türünde olduğu gibi deride sınırlı kalabilmekte veya *L. infantum* da olduğu gibi iç organlara göç ederek bu organlarda değişik patolojiler oluşturabilmektedir. Amastigotların yayılması enfekte makrofajın hareketiyle olmaktadır. Bu göç konağın immun sistemiyle yakından ilişkili olup bazı durumlarda etkenin visserotropizm/dermatropizm karakterine bağlı olarak olağan dışı yerleşimler görülebilmektedir.

1.5. Epidemiyoloji

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından leishmaniasisin (KL, MKL ve VL) 88 ülkeden 350 milyon kişiyi etkileyen küresel bir halk sağlığı problemi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca VL olgularının %90'ından fazlasının Bangladeş, Brezilya, Etiyopya, Hindistan ve Sudan kaynaklı olduğu bilinmektedir. KL olgularında ise en fazla bildirim Afganistan, Cezayir, Brezilya, Kolombiya, İran, Pakistan, Peru, Suudi Arabistan ve Suriye'den geldiği rapor edilmiştir. Leishmaniasis de ölüm oranı %10 olarak bildirilmiş ve her yıl 20.000 ile 40.000 insanın bu hastalık nedeniyle hayatını kaybettiği öngörülmüştür (Alvar ve ark 2012).

Türkiye'de VL olguları özellikle Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde, KL ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde görülmekle birlikte her bölgeden olgular bildirilmiştir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1997-2000 yılları arasında toplam 161 VL olgusu ve her yıl 40 yeni VL olgusu bildirilmektedir (Ok ve ark 2002). Ülkemizde sıklıkla VL etkeninin *L. infantum* olduğu ve doğadaki rezervuarlığını da köpeklerin yaptığı epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır. Ayrıca ülkemizde *P. neglectus*, *P. syriacus* ve *P. tobbi* vektörlüğü kesin olarak gösterilen kum sineği türleri olarak bildirilmiştir (Ertabaklar ve ark 2001, Ok ve ark 2002, Özbel ve ark 2002, Özensoy Töz ve ark 2002).

Köpeklerin leishmaniasisde rezervuar konak olduğunun anlaşılmasından sonra özellikle endemik bölgelerde seropozitiflik oranını saptamak amacıyla çok sayıda serolojik çalışma yapılmıştır. Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde Kanin leishmaniasis (KanL) prevalansının %2 ile %40 arasında değiştiği, Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise KanL görülme sıklığının %3 ile %45 arasında değiştiği bildirilmiştir (Balcıoğlu ve ark 2009).

1.6. KanL Tanı Yöntemleri

Genel olarak KanL tanısında kullanılan yöntemlerle insanlarda VL ve KL tanısında kullanılan yöntemlerin birbirinden çok farklı olmadığı görülmektedir. Her ikisinde de uygun tanı için klinik tablo, biyokimya sonuçları ve endemik bölgelere seyahat gibi bulguların birlikte değerlendirilmesinin gerektiği bildirilmiştir (Alvar ve ark 2004).

1.6.1. Yöntemler

1.6.1.1. Direkt yöntemler

Biyopsi örneklerinden (genelde popliteal lenf nodları veya kemik iliği) veya kültürden hazırlanan yaymalarda parazitin gösterilmesi esasına dayanan yöntemlerdir. Örnek alma işlemleri invaziv olduğu için genel bir kural olarak asemptomatik köpeklerde parazitin gösterilmesi için uygulanması önerilmemektedir. Alınan biyopsi örnekleri Giemsa veya Romanovsky boyaları ile boyanarak incelenebileceği gibi NNN kültürü yapıldıktan sonra da aynı boyalar kullanılabilir. Pozitif kültürlerde promastigotlar bir haftalık kültürlerde gözlenebileceği gibi sonraki pasajlarda da ortaya çıkabilmektedir. Kültürler ancak dört pasaj sonra negatif olarak değerlendirilmektedir. Yapılan çalışmalarda kemik iliği yaymalarının (%60-75) lenf nodundan hazırlananlara (%40-50) göre daha duyarlı olduğu bildirilmiştir, ancak yaymalarda parazitin görülebilme ihtimali parazit yüküne bağlı olarak değişmektedir. Her ne kadar kültür yöntemi duyarlılığı %20'ye yakın oranda artırsa da yöntemin dezavantajları tanı süresini uzatması, besiyerinin kontamine olma ihtimalinin yüksek olması ve en önemlisi vahşi-tip suşların kültüre adaptasyonunda yaşanan sorunlar olduğu bildirilmiştir. Bu nedenlerle besiyerleri birincil tanı yöntemi olarak kullanılmamakla olup epidemiyolojik araştırmalarda faydalı bir yöntem olarak bildirilmiştir (Özbel ve Özensoy Töz 2007).

Deri biyopsi örnekleri de tanıda kullanılabilir ancak lezyonda çok sayıda inflamatuvar hücre bulunması ve kültürün kontamine olma ihtimalinin yüksek olması tanıyı zorlaştırmaktadır. Deney hayvanlarına inokülasyonun mikroskopik inceleme yapma olanağı yoksa tercih edilmesi gerektiği bildirilmiştir. İnoküle edilen hayvanların iki ay sonra öldürülmesi ve dalaklarının incelenmesinin gerektiği bildirilmiştir. KanL tanısında ksenodiagnosis çok nadir kullanılan bir yöntem olup ancak iyi yetiştirilmiş kum sineklerine sahip özel laboratuvarlarda yapılabileceği bildirilmiştir (Alvar ve ark 2004).

1.6.1.2. İndirekt Yöntemler

KanL tanısında kullanılacak başta immunohistokimyasal boyalar (immunoperoksidaz) ve direkt immüno Floresan olmak üzere çok sayıda indirekt yöntem bildirilmiştir. Ancak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi gösterdiği yüksek duyarlılık (%89-100) ile diğer indirekt tanı yöntemlerinden daha ön plana çıkmaktadır. Parazitin genomik veya kinetoplast DNA'sını çoğaltmaya yönelik geliştirilen PCR

yöntemleri kan, gözyaşı, lenf nodu, nazal/oral sürüntü ve kemik iliği materyallerine uygulanabilmektedir (Ferreira ve ark 2013, Toz ve ark 2013). İnvaziv yolla alınmasına gerek olmayan örneklerde çalışılması moleküler amplifikasyon tekniklerinin avantajı olarak sıralanmaktadır (Solano-Gallego ve ark 2001, Lachaud ve ark 2002).

Köpeklerde *L. infantum* infeksiyonunda hümorale immün yanıt sonucu oluşan özgül IgG antikor yanıtının yüksek olmasından dolayı, hastalığın tanısında serolojik testler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu testlerin sayısı fazla olmakla birlikte en önemlileri indirekt floresan antikor testi (IFAT), direkt aglütinasyon testi (DAT), ELISA, dot-ELISA, Western Blotting (WB) ve immünokromatografik hızlı tanı testleri olarak bildirilmiştir. Bu tekniklerde parazitin tamamının veya çözülebilen ekstraktlarının antijen olarak kullanılması standardizasyonu zorlaştırmaktadır. Genel olarak parazitin bir bütün olarak kullanıldığı tekniklerle daha güvenilir sonuçlara ulaşıldığı bildirilmektedir. IFAT tüm serolojik teknikler arasında altın standart olarak kabul edilmekte ve veterinerler arasında sıklıkla tercih edilmektedir. Klinik açısından düşünüldüğünde oldukça yararlı olan bu yöntemin KanL'nin endemik olduğu bölgelerde infeksiyon oranının olduğundan daha yüksek bildirilmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu durumun önlenmesi için PCR, deri testleri gibi bazı tekniklerin uygulanması gerektiği bildirilmiştir (Abranches ve ark 1991). WB tekniği IFAT ve ELISA'dan daha duyarlı olmasına karşın antijen elde etmede standardizasyonun olmaması nedeniyle KanL tanısında öncelikle tercih edilecek bir yöntem olmadığı bildirilmiştir (Alvar ve ark 2004). Geleneksel serolojik yöntemlerde kullanılan ham *Leishmania* antijenlerinin yerine histon H2A, H3 veya ısı şok proteinleri Hsp83 gibi rekombinant antijenlerin kullanılmasının yöntemlerin duyarlılığını artırdığı ifade edilmektedir (Soto ve ark 1996, Angel ve ark 1996).

1.7. Klinik bulgular

KanL tüm organ ve dokuları etkileyebilen non-spesifik kliniğe sahip sistemik bir enfeksiyon hastalığı olup inkübasyon süresi çok uzun olabilmektedir. Hastalıkta görülen klinik bulgular ve patolojik anomaliler: sistemik, kutanöz, oküler ve diğerleri olarak sınıflandırılabilir. Enfekte köpeklerde başta dermatit olmak üzere kutanöz lezyonların en yaygın gözlenen belirti olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte kutanöz lezyonların olmadığı sadece diğer belirtilerin görüldüğü olgularda bildirilmiştir (Ciaramella ve ark 1997). Sistemik belirtiler: yaygın lenfadenomegali, vücut ağırlığı kaybı,

azalmış ya da artmış iştah, uyuşukluk, splenomegali, poliüri, polidipsi, ateş, kusma, ishal (kronik kolit dahil) olarak sıralanmaktadır (Solano-Gallego ve ark 2011). Hastalığın ilerlemesi sonucu gelişen kronik böbrek yetmezliği KanL'ye bağlı ölümlerin en önemli nedeni olarak bilinmektedir. Ayrıca, enfekte köpeklerde renal patolojilerin yüksek oranda görüldüğü ancak renal azoteminin yaygın görülen bir laboratuvar bulgusu olmadığı gözlenmiştir (Costa ve ark 2003). KanL'de gözlenen patolojik bulgular incelendiğinde en yaygın görülenlerin makrofajik inflamasyon (granülomatöz), nötrofilik-makrofajik iltihap (pyogranülomatöz), lenfoplasmositik inflamasyon ve lenfoid organlarda reaktif hiperplazi olduğu bildirilmiştir (Pena ve ark 2008, Mylonakis ve ark 2005). Ancak bulguların tamamına yakınının non-spesifik olması hastalığın kliniğe bağlı ayırıcı tanısını imkansız hale getirmektedir (Solano-Gallego ve ark 2011).

1.8. KanL tedavisi

Araştırmacılar iki durumda KanL tedavisine başlanmasını önermektedir. Bunlardan ilki kemik iliği/lenf nodu biyopsi veya aspiratlarında amastigotların görülmesi diğeri de serolojisi açıkça pozitif olan ve klinik bulguların uyumlu olması durumu olarak bildirilmiştir. Tedaviye başlamadan önce köpeğin durumu (vücut sıcaklığı, kilosu, semptomları, dalak büyüklüğü, biyokimyasal parametreleri vb.) hakkında bilgi sahibi olunması önerilmektedir. Ayrıca, tedavi süresince hepatik, kardiyak ve renal fonksiyonlarının takip edilmesi gerekmektedir. Genelde tedaviye verilen yanıtın hızlı olduğu; birkaç günde ateşin düştüğü, kilo artışının gözlemlendiği, kan tablosunun normale döndüğü, kutanöz lezyonların azaldığı ve köpeğin genel durumunun düzeldiği bildirilmiştir (Alvar ve ark 2004). Genel olarak KanL'li köpeklerin büyük bir kısmının tedavinin birinci ayında iyileşmeye başladığı bildirilmiş olsa da bazı olgularda klinik olarak iyileşme çok daha uzun zaman alabilmektedir (Torres ve ark 2011, Manna ve ark 2009). Yukarıda sayılan gelişmeler gözlenmiyorsa ilaca direnç veya başka infeksiyonların göz önüne alınması gerektiği bildirilmektedir.

Tedavi sonrası parazitolojik, klinik ve biyokimyasal testlerin yeniden yapılması ve olası bir relapsa karşı köpeklerin periyodik olarak muayene edilmesi önerilmektedir. Beş değerlikli antimon bileşiklerinin insan enfeksiyonlarında olduğu gibi KanL tedavisinde de ilk olarak tercih edilmesi önerilmektedir. İkincil olarak da amphotericin B, pentamidin, paramomisin ve diğer ilaçlar KanL tedavisinde kullanılmaktadır (Alvar ve ark 2004).

Avrupa ülkelerinin çoğunda veteriner kullanım için tescillenmiş olan meglumine antimoniate veya miltefosine'in allopurinol ile kombine edilerek kullanılması tavsiye edilmektedir. Farklı tedavi yöntemleri ve ilaç denemeleri deneysel olarak başarıyla uygulansa da rutin tedavi de kullanılması henüz önerilmemektedir (Solano-Gallego ve ark 2009).

1.9. Köpeklerin KanL'den Korunması

Günümüzde köpekleri KanL'den korumak için tercih edilen en temel yaklaşımın sentetik pyrethroid, permethrin, veya deltamethrin emdirilerek vektöre karşı repellent etki gösteren tasma gibi veteriner ürünlerinin kullanılması olarak bildirilmektedir. Bu yöntemin etkinliği hem deneysel hem de saha çalışmalarında gösterilmiştir (Miro ve ark 2007, Otranto ve ark 2007). Bu ürünlerin enfekte olan veya olmayan köpeklerde kum sineklerinin ısırma ihtimalini azalttığı bildirilmiştir (Gavgani ve ark 2002). Deltamethrinli tasmalarda ilaç depolanmış halde bulunmakta ve derinin lipid tabakasına salınarak köpeklerde 6 ayı aşkın süre %80 oranında koruma sağlamaktadır (Killick-Kendrick ve ark 1997). Köpekleri kum sinekleri tarafından ısırılmadan korumanın bir diğer yolu da kum sineklerinin doğada aktif olduğu dönemlerde köpekleri kapalı ortamlarda tutmaktır. Ayrıca ağaç kovukları ve taş oyukları gibi kum sineklerinin üremesine uygun alanların ortadan kaldırılması ve ev içi insektisit kullanılması korunmada faydalı olabilecek uygulamalar olarak bildirilmiştir. İnsektisitlerin doğru kullanılmasının köpekleri enfeksiyondan korumada hayati öneme sahip olduğu bildirilmiştir. Hem veterinerler hem de köpek sahiplerinin mutlaka üretici firmanın direktifleri doğrultusunda bu insektisitleri kullanması gerekmektedir. Ayrıca eğitim çalışmalarıyla Akdeniz havzasında doğru insektisitlerin doğru sezonda (Nisan-Kasım) kullanılmasının köpeklerin korunmasında hayati öneme sahip olduğu ifade edilmektedir (Solano-Gallego ve ark 2009). Köpeklerde leishmaniasis aşılı geliştirilmekte olup bunlardan pürifiye *Leishmania* fraksiyon aşılı (fucose mannose ligand (FML) vb.) en çok gelecek vadeden aşı adayları olarak bildirilmiştir (Palatnik ve ark 2008). Günümüzde KanL için ticari aşılı bulunmakla birlikte yapılan çalışmalarda bu aşılı yan etkileri konusunda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Yan etkilerin daha çok aşılıların adjuvanlarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Fernandes ve ark 2014). "Leishmune aşılı" lisanslı üretilen ilk KanL aşılı olup *L. donovani* FML antijeni içermektedir (Nogueira ve ark 2005). Köpekleri leishmaniasisten korumak için etkili bir aşılılama ve uzun süre etkili insektisit uygulamasının bir arada yapılması en uygun seçenek

olarak görülmektedir. Bu şekilde kum sinekleri insektisitlerle köpeklerden uzaklaştırılmakta etkilenmeyenlerin de enfeksiyon oluşturmaları engellenebilmektedir (Miro ve ark 2008).

10. Tümör Nekrozis Faktör (TNF- α)

Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve beta (TNF- β) olmak üzere klasik olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunları yöneten genler 6 numaralı kromozom üzerinde bulunmaktadır. Kaşektin veya kaşeksin olarak da bilinen TNF- α , 51kDa ağırlığında, pleiotropik fonksiyona sahip bir inflamatuvar sitokin olup TNF/TNFR (Tümör Nekrozis Faktör Reseptör) üst ailesi içerisinde yer almaktadır. TNF- α ; doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminde, hücre regülasyonunda, inflamasyonda, ateş oluşumunda, kaşeksi gelişiminde ve apoptoz süreçlerinde önemli rol oynamaktadır (Balkwill 2006, Camcıoğlu ve Deniz 2007). TNF- α ilk kez Carswell ve ark (1975) tarafından endotoksine maruz bırakılan farelerin serumunda keşfedilmiş ve tümörde nekroz yapma yeteneğinden dolayı bu isim verilmiştir. Birçok hücre ve doku tipinde geniş bir spektrumda biyolojik aktivite gösterebilen TNF- α 'nın, hücre proliferasyonunu tetikleyici ve engelleyici etkisi olduğu gibi kendini regüle de edebilen bir protein olduğu bildirilmiştir. Örnek olarak TNF- α inflamasyon sırasında nötrofil proliferasyonunu tetiklerken TNF-R55 reseptörüne bağlandığında nötrofil apoptozunu başlatmaktadır (Murray ve ark 1997). Başta makrofajlar ve lenfositler olmak üzere birçok hücre türü (monositler, fibroblast, astrositler, endotel hücreleri, nötrofiller ve NK-hücreleri) TNF- α salgılamaktadır. Salgılanmasını uyaran maddelerin başında gram-negatif bakterilerin ürettiği lipopolisakkaritler gelmektedir. Bunun yanı sıra gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısal bileşenlerinden peptidoglikan ve teikoik asitler, kapsül antijenleri ve ekzotoksinler, mantarların hücre duvarı antijenleri, viral ve paraziter antijenlerin de TNF sentezini başlatabildiği bildirilmiştir. TNF- β ise T lenfositleri (özellikle Th1) ve Epstein-Barr virusu bağlanmış B lenfositleri tarafından salınmaktadır (Işık ve ark 2008). TNF- α damar geçirgenliğini artırarak bu yolla enfeksiyon alanına makrofaj ve nötrofil göçünü sağlayan bir akut faz proteini olarak da bilinmektedir. Makrofajlar tarafından salgılanan TNF- α kan pıhtılaşmasını sağlayarak enfeksiyonun kontrol altına alınmasına yardımcı olmaktadır. TNF- α olmadan gram (-) bakteri ile infekte edilmiş farelerde septik şok görüldüğü bildirilmiştir (Spooner ve ark 1992).

1. 11. İnterlökin 6 (IL-6)

Makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar ve T hücrelerinden salınan IL-6; fibrinojen, CRP, C3 gibi akut faz proteinlerinin sentezi ve antikor yapan B lenfositlerin proliferasyonunda rol oynamaktadır. Molekül ağırlığı 22-30 kDa olan IL-6 pleiotropik fonksiyona sahip olup B lenfositlerin plasmositlere farklılaşmasını tetiklemektedir. (Camcıoğlu ve Deniz 2007, Işık ve ark 2008). İnsan monosit hücre serisinde ve farelerde yapılan araştırmalarla IL-6'nın TNF- α ve IL-1,3 salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu verilerin sonucunda da IL-6 proinflamatuvar sitokin olarak tanımlanmıştır (Schindler ve ark 1990).

1.12. Kortizol

İnsan adrenal korteksinden salgılanan steroid hormonlar; glukokortikoidler, mineralokortikoidler ve adrenal androjenler olmak üzere üç grupta toplanmaktadır. Kolesterol beş sınıf steroid hormonlarının öncül maddesi olup bunlar glukokortikoidler, mineralokortikoidler (örneğin aldosteron) ve cinsiyet hormonları olan androjenler, östrojenler ve progestinler olarak adlandırılmaktadır. Kortizol, böbreküstü bezi korteksinde sentezlenen ve buradan salınan en önemli glukokortikoid olup hedef hücreye girdikten sonra reseptörüyle hormon-reseptör kompleksini oluşturarak nükleusa girmekte ve DNA'ya bağlanmaktadır. Bazı genleri aktive ederek transkripsiyonlarını başlatmakta ve hormonun etkisinden sorumlu olan proteinlerin sentezi bu yolla başlamaktadır. Kortizol bir çok doku ve organda fizyolojik etki gösteren bir hormon olup temelde iki grup etki göstermektedir: Fizyolojik seviyede salınan kortizol kan şekerinin ve kan basıncının dengede kalmasında etkili olurken yüksek miktarda (farmakolojik seviyede) verildiğinde anti-inflamatuvar etki ve genel bir rahatlama durumu oluşturmaktadır. Kortizolün iskelet kasında proteinlerin amino asitlere parçalanmasını ve glutamin formasyonunu artırmakta, glikoz tüketimini azaltmakta, karaciğerde glukoneogenezin ilerlemesini uyarmakta, adipoz dokuda lipolitik hormona duyarlılığını artırmaktadır. Bu mekanizmalarla kan şekerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Newsholme ve Leech 2011).

Glukokortikoidler veya kortikosteroidler (sentetik kortizol-benzeri ürünler), immunsupresif ve anti-inflamatuvar etkileri nedeniyle deri hastalıkları (psoriasis), inflamatuvar hastalıklar (astım, ülseratif kolit, artrit vb.) ve bazı kanser tiplerinin (lösemi ve lenfoma) tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak bu tedavilerde osteoporoz, diyabet, deride

incelme, obezite gibi yan etkilerin gelişebildiği bildirilmiştir. Pentoksifilin TNF- α üretimini *in-vivo* ve *in-vitro* koşullarda inhibe ettiği bildirilmektedir. Bu ilacın tek başına veya başka ilaçlarla kombine olarak kullanılmasının *Toxoplasma* ve *L.infantum* enfeksiyonunu seyri farelerde değiştirdiği belirtilmektedir (Schacke ve ark 2002).

1.13. Dihidroksiepiandrosteron (DHEA)

DHEA ve bunun sülfat formu olan analogu DHEAS, adrenal korteksten ve sinir sisteminden sentezlenmektedir. DHEAS insanlarda en fazla bulunan steroid hormon olup serumdaki konsantrasyonunun DHEA'dan 250-500 kat, testosterondan 100-500 kat ve estradiolden 1000-10000 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Tchernof ve Labrie 2004). DHEAS temelde bir prekürsör molekül olup periferik dokularda (veya adrenal kortekste) enzimatik reaksiyonlarla sülfat kaldırılarak DHEA'ya dönüşmektedir. Oluşan DHEA ise tekrar birtakım reaksiyonlarla östrojenik veya androjenik hormonlara dönüşmektedir. Diğer adrenal korteks hormonlarında olduğu gibi ikisinin de sentezi ACTH tarafından stimüle edilmektedir. Doğumdan sonraki beş yıllık süreçte DHEA'ların vücuttaki seviyesi azalmakta ve sonrasında cinsel olgunluğun başlamasına kadar artmaktadır. 20-30 yaşlarında en yüksek seviyeye ulaşan hormon seviyesinin 70-80 yaşlarında %20-30 oranında azaldığı bildirilmiştir (Krobath ve ark 1999). Yaşla birlikte hormon seviyesinin azalması nedeniyle bu hormonların yaşlanmaya karşı tedavide kullanılabileceği öne sürülmektedir. DHEA'ların seviyesinin düşük olması birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir: duygusal stres, romatoid hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve osteoporoz (Thijs ve ark 2003, Chen ve Parker 2004). Ayrıca tip II diyabette, obezitede, kadınlardaki hirsutizmde ve uzun süreli fiziksel strese ise bu hormonların seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Krobath ve ark 1999).

DHEA'ların bazı kanser türlerinden, kalp hastalıklarından korunmada etkili olduğu, hafızayı güçlendirdiği, kadınlarda osteoporoz riskini azalttığı, diyabet, depresyon, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda koruyucu olduğu bildirilmektedir (Wolkowitz ve ark 1999). Ayrıca DHEA'lar lupus gibi bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (van Vollenhoven ve ark 1998). Bir çalışmada immün sistemi baskılanmış farelerdeki *Cryptosporidium* enfeksiyonunun DHEA tedavisiyle başarıyla tedavi edildiği bildirilmiştir (Rasmussen ve ark 1993).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışma İçin Ön Hazırlıklar

Çalışma için Adnan Menderes Üniversitesi 02/09/2009 tarihli Hayvan etik kurulundan izin alınmıştır (No:2009/51). Veteriner Hekimler tarafından çalışmaya katılmayı kabul eden köpek sahiplerine, çalışma hakkında bilgilendirilmiş olur metni okutulup, köpeklerin sosyodemografik özelliklerini sorgulayan anket formu doldurulmuş ve izin alınmıştır.

2.2. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmaya, Kuşadası ve Bodrum ilçelerinden leishmaniasis şüphesiyle, soğuk zincir kurallarına uygun olarak veteriner hekimler tarafından Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen köpek serumları dahil edilmiştir. Bu serumlar testler çalışılincaya kadar laboratuvarında -20⁰C'de saklandı. IFA testi ile 20 adet *Leishmania* seropozitif ve 20 adet *Leishmania* seronegatif olarak değerlendirilen 2-4 yaşlarında toplam 40 adet erkek köpek serumu immunolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanıldı.

2.3. IFAT

2.3.1. Gereç ve Kimyasalların Hazırlanması

Lamların Hazırlanması

Laboratuvarında 75 mm uzunluğunda, 25 mm eninde 0,12 mm kalınlığındaki lamların üzerine elmas kalemle her bir sırada altı olmak üzere iki sıra toplam 12 adet yuvarlak çizilerek testin uygulanacağı alanlar belirlendi. Ayrıca lamların sol üst köşelerine elmas kalemle küçük bir işaret konuldu.

Antijen Hazırlanması

Leishmaniasis'li köpeğin lenf nodundan alınan biyopsi materyali steril ortamda NNN besiyerine ekildi. Bu besiyeri, 26⁰C'de inkübe edildi. Promastigotların üremesi

gerçekleştikten sonra santrifüjlenen besiyeri 4-5 kez PBS ile yıkandı. Promastigotlar mikroskopta 10'luk objektifte yeterli sayıda olacak şekilde daha önceden hazırlanmış IFAT lamalarına yayıldı, kurutuldu ve bu lamalar kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklandı.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS): pH: 7.2

NaCl: 170 g

Na_2HPO_4 : 5.72 g

K_2HPO_4 : 24 g

Bu maddeler bir litrelik bir balon içine konuldu ve üzeri bir litre olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Daha sonra pH: 7,2'ye ayarlandı ve bu solüsyon kullanılıncaya kadar buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Kaplama Solüsyonu (Gliserin Tampon)

Gliserin tampon, beş hacim PBS içine bir hacim saf gliserin karıştırılarak hazırlandı. Bu karışım ağzı kapalı şişelerde bir ay saklanabilmektedir.

Fluoresan Konjuge

Bu çalışmada tavşandan elde edilen antiimmunglobulin G konjuge kullanıldı. (Cappel Fluorescein –Conjugated Rabbit IgG Fraction To Dog IgG Whole Molecule, MP Biomedicals Inc., Germany.) Konjugenin optimal sulandırımı kataloglarında belirtilmiş olmasına karşın yeni çalışılan konjugenin, teste başlamadan optimal konsantrasyonları bilinen pozitif ve negatif serumlar kullanılarak belirlenmiştir (1/150).

Pozitif ve Negatif kontrol serumları

Önceden çalışılarak negatif ve hangi sulandırımarda pozitif değerler verdiği bilinen serumlar, kontrol serumları olarak kullanıldı.

Test İçin Gerekli Diğer Malzemeler

İnkubasyon işlemlerinde yararlanılan 37°C 'lik etüv, nemli ortam için kullanılacak kapaklı küvetler, lamaları yıkama kapları (şale), lam taşıyıcılar, pipetler ve serum sulandırımalarının yapılacağı sulandırma tüpleri veya plaklardır.

2.3.2. Testin Yapılışı

1. Önce sulandırma plaklarının kenarlarına serumların sıra numaraları yazıldı (1,2,3,4 gibi). Bu plakların ilk çukurlarına 150 µl, ikinci çukurlarına 150 µl, üçüncü, dördüncü ve beşinci çukurlarına 50 µl PBS çoklu pipet yardımı ile eklendi.
2. Sulandırım plağının ilk çukurlarına sırasıyla 10 µl köpek serumları eklenip karıştırıldı.
3. Serum koyma işlemi bittikten sonra çoklu pipet yardımı ile ilk çukurdaki karışımdan 50 µl ikinci çukura aktarıldı. Bu çukurdaki PBS ile aktarılan sıvı, burada iyice karıştırılıp ikinci çukurdaki karışımdan üçüncü çukurlara 50 µl sıvı aktarıldı. Üçüncü çukurdan alınan 50 µl sıvı, dördüncü çukurlara aktarıldı ve dördüncü çukurdaki sıvı ile iyice karışması sağlandı.
4. Serum sulandırılmaları bitirildikten sonra örnek sayısı için gerekli sayıda uygun antijen kaplı lam, buzdolabından çıkarıldı. Lamlar daha önceden dibine ıslak kurutma kağıdı konulmuş kapaklı küvet içindeki lam tutucuların üzerine yerleştirildi. Lamları yerleştirirken antijen kaplı kısımların üst tarafa gelmesine dikkat edildi.
5. 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 oranlarında sulandırılan örneklerden her biri lam üzerindeki antijenle kaplı çukurlara 10 µl damlatıldı. Sonra kapaklı küvetlerde 37°C 'de 30 dakika etüvde bekletildi.
6. Etüvden çıkan lamlar birbirine yapışmayacak şekilde PBS dolu şalede üç kez 5'er dakika yıkandı.
7. Lamlar oda ısısında dik olarak kurutma kağıdı üzerine konuldu ve kurumaya bırakıldı.
8. Kuruyan lamlar kapaklı küvetler içindeki sehpanın üzerine antijen üste gelecek şekilde dizildi.
9. Konjuge dilüsyonu her lam için ortalama 150 µl PBS ve bir µl konjuge olarak hazırlandı. Hazırlanan konjuge sulandırımından her çukura yaklaşık 15-20 µl konuldu.
10. Konjuge damlatılmış lamlar küvetin kapağı kapatılarak (küvetin dibindeki kağıdın ıslak olmasına özen gösterilerek) 37°C'lik etüve yerleştirildi ve 30 dakika bekletildi.
11. Etüvden çıkarılan lamlar üç kez 5 dakika PBS'li şalede yıkandı.
12. Lamların üzerine kurumadan gliserin tampon karışımından iki üç damla damlatılıp lamelle üzeri kapatıldı.
13. Lamlar floresan mikroskopta 490 nm dalga boyundaki eksitasyon filtresi ile 20'lik oküler kullanılarak incelendi.

2.3.3. Sonuçların Yorumlanması ve Değerlendirilmesi

Çalışmada 1/64 ve üzeri titreler pozitif olarak değerlendirildi.

2.4. Hızlı Tanı Testi (HTT) Immunokromotografik Testler

Köpek serum örneklerine hızlı tanı testi kit protokolüne göre yapıldı. SD BİOLINE Leishmania Ab , Standard diagnostics inc firmasına ait şeritler kullanıldı.

2.4.1. Testin Yapılışı

1. Tüm serumlar ve tampon solüsyon +4°C 'den ya da -20°C'den çıkarılıp, oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi.
2. şerit ambalajından çıkarılıp, düz bir zemine yerleştirildi.
3. Ok ile gösterilen bölgenin altına yani şeridin ped kısmına 20µl serum damlatıldı.
4. Serum üstüne tampon solüsyonundan üç damla (150µl) ilave edildi.
5. Yaklaşık 10 dakika içinde sonuçlar okundu.

2.4.2. Sonuçların Yorumlanması ve Değerlendirilmesi

Çalışmada hem kontrol çizgisinin hem de pozitif çizgisinin görölmesi serumun pozitif, sadece kontrol çizgisinin görölmesi ise negatif olarak değerlendirildi.

2.5. IL-6 Düzeyinin Tayini

Köpek serumlarında IL-6 düzeyi ticari bir kit (Canine IL-6 Quantikine® ELISA R&D Systems Ltd.,Minneapolis,USA) ile ölçüldü.

2.5.1. Test İçerisindeki Solüsyonların Hazırlanması

1. Canine IL-6 Kit Kontrol'ü bir mL distile su ile sulandırıldı.
2. Bir plak için 25 mL Wash Buffer Concentrate' e 600 mL distile/deiyonize su ekleyerek 625 mL'ye sulandırıldı.
3. Substrate solüsyonu: Color Reagents A ve B testten en fazla 15 dakika önce eşit hacimde ışıktan uzak tutularak karıştırıldı.

4. "Canine IL-6 Standard"a 5 mL "Calibrator Diluent RD5T" eklendi ve sonuçta 2000 pg/mL stok elde edildi.
5. Tüplere 300 µL "Calibrator Diluent RD5T" dağıtıldı. Standarttan (2000 pg/mL) 200 uL alarak 6 tüp dilüsyon yapıldı. (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31,8 pg/mL)
6. Bir tüpte de "Calibrator Diluent RD5T" boş kontrol olarak (0 pg/mL) kullanıldı.

2.5.2. Testin Yapılışı

1. Kit içeriği oda sıcaklığına getirildi. Standartlar, kontroller, örnekler hazırlandı.
2. Kuyucuklara 50 µL "Assay Diluent RD1-75" dağıtıldı.
3. Kuyucuklara 100 µL standart, kontrol ve örneklerden konulup plak yapışkan bant ile kapatıp iki saat oda sıcaklığında (0.12'' orbit) orbital mikropate shaker'da (500±50 rpm) bekletildi.
4. Kuyucuklar 400 µL Wash Buffer ile beş kere yıkanıp kuyucuklarda sıvı kalmaması sağlandı.
5. Her bir kuyucuğa 200 µL canine IL-6 konjugate eklenip, yeni bir yapışkan bant ile kapatılıp, iki saat oda sıcaklığında (0.12'' orbit) orbital mikropate shaker'da (500±50 rpm) bekletildi.
6. Dördüncü adımdaki yıkama işlemi tekrarlandı.
7. Her bir kuyucuğa 120 µL substrat solüsyon eklenip, karanlıkta tezgahın üstünde 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
8. Her bir kuyucuğa 120 µL stop solüsyon eklendi.
9. En geç 30 dk içinde mikropate ELISA okuyucusunda 450 nm'de okutuldu.

2.5.3. IL -6 Düzeyinin Belirlenmesi

Köpeklerde serum IL-6 konsantrasyonları <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay> sitesinde Four Parameter Logistic Curve (4-PL) analizi ile belirlendi. Bu analiz ile standart eğriler çizilerek hesaplamalar yapıldı.

2.6. TNF- α Düzeyinin Tayini

Köpek serumlarında TNF- α düzeyi ticari bir kit olan (Canine TNF- α Quantikine® ELISA R&D Systems Ltd., Minneapolis, USA) ile ölçüldü.

2.6.1. Test içerisindeki solüsyonların hazırlanması

1. Canine TNF- α Kit kontrol'ü bir mL distile su ile sulandırıldı.
2. Bir plak için 25 mL Wash Buffer Concentrate' e 600 mL distile/deiyonize su ekleyerek 625 mL'ye sulandırıldı.
3. Substrate solüsyonu: Color Reagents A ve B testten en fazla 15 dakika önce eşit hacimde karıştırılıp ışıktan uzak tutuldu.
4. "Canine TNF- α Standard"a 2 mL "Calibrator Diluent RD5-17" eklendi ve sonuçta 500 pg/mL stok elde edildi.
5. Tüplere 200 μ L "Calibrator Diluent RD5-17" dağıtıldı. Standarttan (2000 pg/mL) 200 μ L alarak 6 tüp dilüsyon yapıldı. (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 pg/mL)
6. Bir tüpte de "Calibrator Diluent RD5T" boş kontrol olarak (0 pg/mL) kullanıldı.

2.6.2. Testin yapılışı

1. Kit içeriği oda sıcaklığına getirildi. Standartlar, kontroller, örnekler hazırlandı.
2. Kuyucuklara 50 μ L "Assay Diluent RD1-38" dağıtıldı.
3. Kuyucuklara 50 μ L standart, kontrol ve örneklerden konulup plak yapışkan bant ile kapatıp iki saat oda sıcaklığında bekletildi.
4. 400 μ L Wash Buffer ile beş kere yıkayıp kuyucuklarda sıvı kalmaması sağlandı.
5. Her bir kuyucuğa 100 μ L canine TNF- α Conjugate eklenip, yeni bir yapışkan bant ile kapatılıp, iki saat oda sıcaklığında bekletildi.
6. Dördüncü adımdaki yıkama işlemi tekrarlandı.
7. Her bir kuyucuğa 100 μ L substrat solüsyon eklenip, karanlıkta tezgahın üstünde 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
8. Her bir kuyucuğa 100 μ L stop solüsyonu eklendi.
9. En geç 30 dk içinde mikropate ELISA okuyucusunda 450 nm'de okutuldu

2.6.3. TNF- α düzeyinin belirlenmesi

Köpeklerde serum TNF- α konsantrasyonları <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay> sitesinde Four Parameter Logistic Curve (4-PL) analizi ile belirlendi. Bu analiz ile standart eğriler çizilerek hesaplamalar yapıldı.

2.7. Kortizol düzeyinin belirlenmesi

Köpek serumlarında kortizol düzeyi ticari bir kit (8D15 Cortisol reagent kit, Architect Systems Ltd., Abbott Park, USA) ile ölçüldü.

2.7.1 Testte kullanılan reaktifler

Architect cortisol reagent kit

Mikropartiküller: Bir şişe (6.6 ml/270 ml) protein stabilizatörüyle Tris/BIS-TRIS tamponu içerisinde anti-kortizol kaplı mikropartiküller.

Konjuge: Bir şişe (her biri 5.9 ml/26.3 ml) sürfaktan stabilizatörüyle sitrat tamponu içerisinde kortizol akridinium etiketli konjuge

Diğer reaktifler

Pre-trigger Solüsyonu: Pre-trigger Solüsyonu %1.32(w/v) hidrojen peroksit içermektedir.

Trigger Solüsyonu: Trigger Solüsyonu 0.35 M sodyum hidroksit içermektedir.

Wash Buffer: Wash Buffer fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir.

2.7.2. Testin yapılışı

1. Architect cortisol reaktif kiti sisteme yüklemeye önce mikropartiküllerin karışması için mikropartikül şişesi karıştırıldı.
2. Gereken bütün reaktiflerin bulunduğundan emin olunduktan sonra Architect cortisol reaktif kiti sisteme yüklendi ve cihaza test komutları verildi.
3. Minimum örnek kabı hacmi, sistem tarafından hesaplandı.
4. Kalibratör ve kontroller hazırlanarak örnekler yüklendi ve cihaz çalıştırıldı.

2.8. DHEA-S düzeyinin ölçülmesi

Köpek serumlarında DHEA-S düzeyi ticari bir kit (8K21 DHEA-S reagent kit, Architect Systems Ltd., Abbott Park, USA) ile ölçüldü.

2.8.1. Testte kullanılan reaktifler

Architect DHEA-S reagent kit

Mikropartiküller: Bir ya da dört şişe (her biri 6.6 ml) Tris tamponu içerisinde anti-DHEA-S kaplı mikropartiküller.

Konjuge: Bir ya da dört şişe (her biri 5.9 ml) protein stabilizatörüyle MES tamponu içerisinde DHEA-S akridinium etiketli konjuge

Assay Dilüent: Bir ya da dört şişe (her biri 10.0 ml) protein stabilizatörüyle MES tamponu içerisinde DHEA-S tetkik dilüenti

Diğer reaktifler

Pre-trigger Solüsyonu: Pre-trigger Solüsyonu %1.32(w/v) hidrojen peroksit içermektedir.

Trigger Solüsyonu: Trigger Solüsyonu 0.35 M sodyum hidroksit içermektedir.

Wash Buffer: Wash Buffer fosfat tamponlu tuz çözeltisi içermektedir.

2.8.2. Testin yapılışı

Architect DHEA-S reaktif kiti sisteme yüklemeyden önce mikropartiküllerin karışması için mikropartikül şişesi karıştırıldı.

Gereken bütün reaktiflerin bulunduğundan emin olunduktan sonra Architect cortisol reaktif kiti sisteme yüklendi ve cihaza test komutları verildi.

Minimum örnek kabı hacmi, sistem tarafından hesaplandı.

Kalibratör ve kontroller hazırlanarak örnekler yüklendi ve cihaz çalıştırıldı

2.9. İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 14 Standart Version Copyright © Spss Inc.) hazır paket programı kullanıldı. Kontrol ve deney grubunun serum IL-6, TNF- α , kortizol ve DHEA-S düzeylerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi, gruplar semptomlar açısından karşılaştırılırken de Ki-kare testi kullanılmıştır. P değeri 0.05 den küçük olan parametreler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Leishmania* IFAT sonuçları

IFAT ile çalışılarak *Leishmania* seropozitifliği saptanan 20 köpek serumunun IFAT titre sonuçları Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. *Leishmania* seropozitif 20 köpeğin IFAT sonuçları

	Serum Sayısı	Titreler
	1	1/64
	3	1/128
	8	1/256
	8	1/512
Toplam	20	

3.2. Hızlı Tanı Test sonuçları

HTT ile IFAT seropozitif olarak saptanan köpek serumlarının tamamında bant saptanmıştır. Seronegatif 20 köpek serumunda ise HTT ile bant saptanamamıştır. *Leishmania* seropozitifliği saptanan bazı köpek serumlarına ait sonuçlar Şekil 3.1 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. HTT test sonuçları

3.3. Biyokimyasal Analizler

Çalışma kapsamındaki 20 *Leishmania* seropozitif (yaş ort $2,95 \pm 0,94$) ve 20 *Leishmania* seronegatif (yaş ort $2,83 \pm 0,93$) erkek köpeğin yaşları, IFAT titreleri, serum IL-6, $TNF\alpha$, DHEA-S ve kortizol sonuçları ve köpeklerde görülen klinik bulgular Çizelge 3.7’de gösterilmiştir.

3.3.1. Serum IL-6 düzeyleri

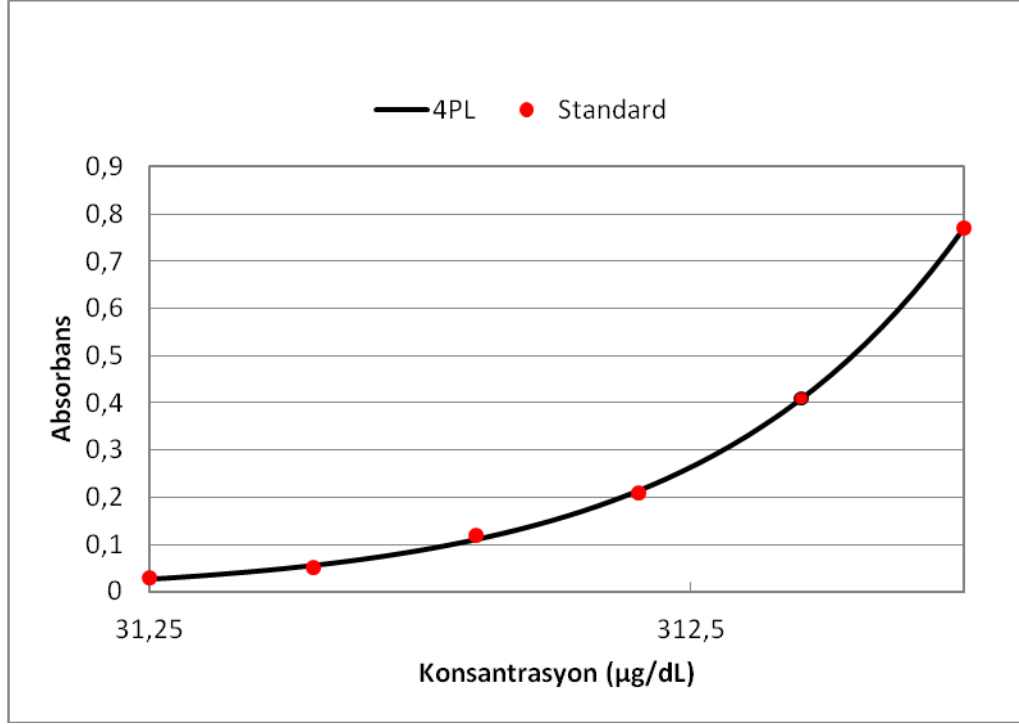
Köpeklere ait IL-6 konsantrasyon düzeyleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. “4 parameter-logistic (PL) curve analysis” kullanılarak oluşturulan IL-6 standart eğrisi Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Leishmaniasisli ve kontrol grubu köpeklerin serum IL-6 seviyeleri sırasıyla 33,72 pg/ml ve 13,43 pg/ml olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 3.3).

Çizelge 3.2. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpek serumlarına ait IL-6 düzeyleri

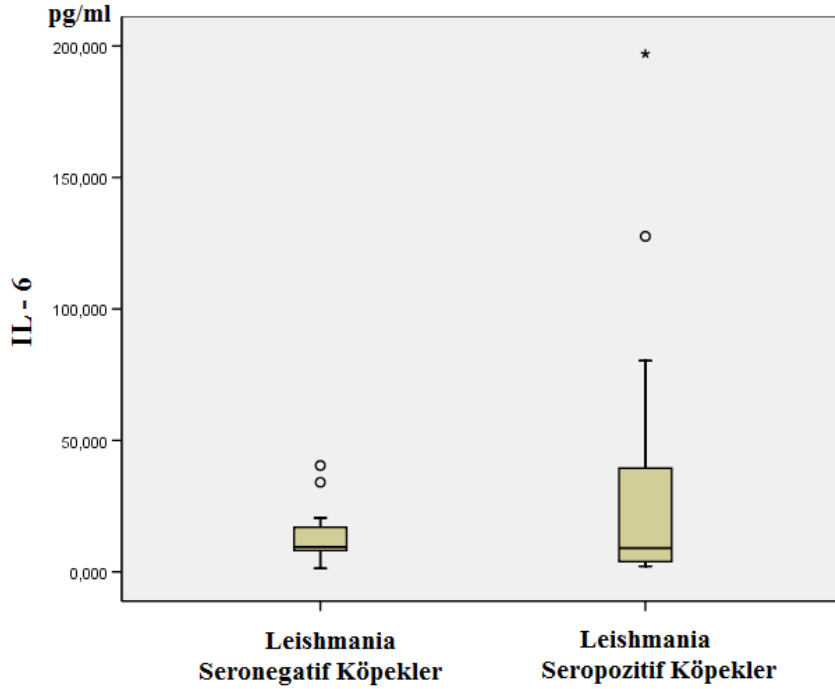
Örnekler	Konsantrasyon (pg/ml)	Örnekler	Konsantrasyon (pg/ml)
VL1	80,260	K1	20,520
VL2	8,603	K2	9,565
VL3	3,932	K3	10,530
VL4	2,158	K4	9,565
VL5	3,932	K5	10,530
VL6	3,932	K6	7,649
VL7	16,470	K7	40,470
VL8	3,932	K8	17,480
VL9	3,036	K9	4,844
VL10	4,844	K10*	.
VL11	55,690	K11	34,070
VL12	9,565	K12	6,704
VL13	127,600	K13	9,565
VL14	33,010	K14	20,520
VL15	3,932	K15	6,704
VL16	5,769	K16	16,470
VL17	197,000	K17	9,565
VL18	45,860	K18	10,530
VL19	33,010	K19	8,603
VL20	31,950	K20	1,307
Ortalama	33,72 pg/ml	Ortalama	13,43 pg/ml

* 4PL analizi ile hesaplanabilen sınırların dışında olduğu için hesaplanamadı.

VL: Visceral leishmaniasis, **K:** Kontrol



Şekil 3.2. “4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan IL-6 standart eğrisi.
($R^2=0,999$), R^2 : Belirleme katsayısı



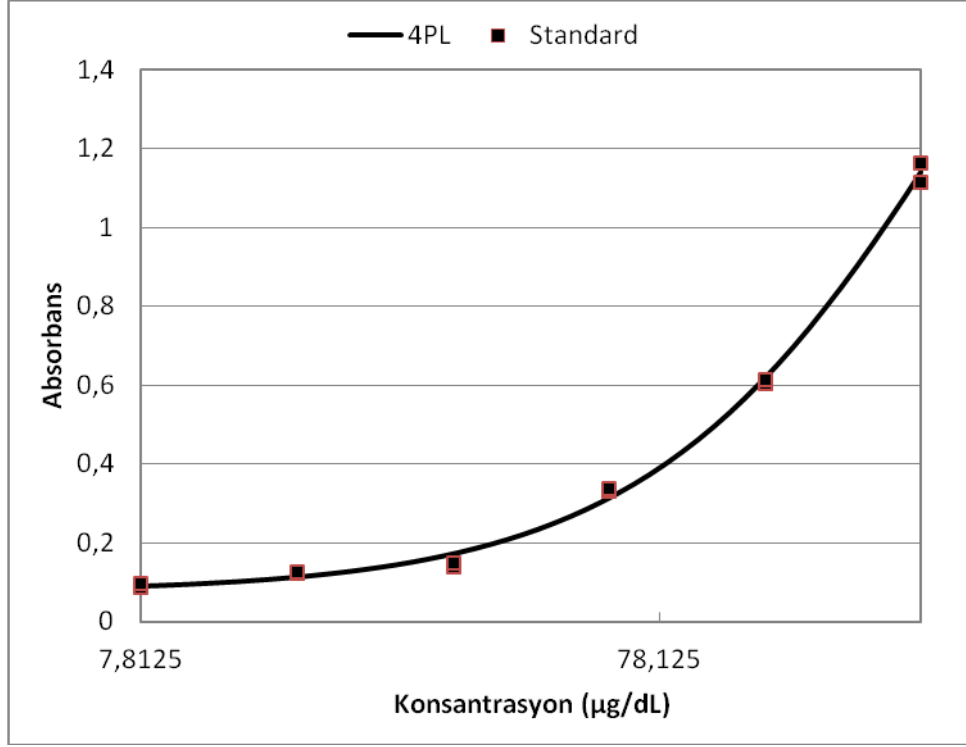
Şekil 3.3. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama IL-6 değerleri ($p=0,091$). ° ve * ortalamanın dışında tutulan değerler

3.3.2. Serum TNF- α düzeyleri

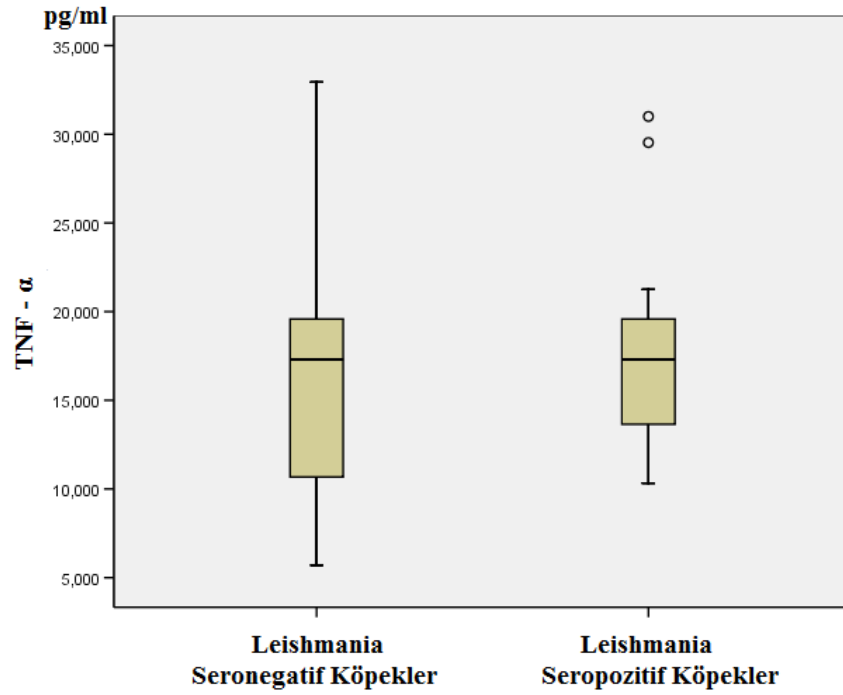
Köpek serumlarındaki TNF- α konsantrasyon düzeyleri Çizelge 3.3’de verilmiştir. 4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan TNF- α standart eğrisi Şekil 3.4’de gösterilmiştir. *Leishmania* ile enfekte olan köpeklerde serum TNF- α seviyeleri 17,32 pg/ml kontrol grubu köpeklerde 16,59 pg/ml olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 3.5).

Çizelge 3.3. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpek serumlarına ait TNF- α konsantrasyon düzeyleri

Örnekler	Konsantrasyon (pg/ml)	Örnekler	Konsantrasyon (pg/ml)
VL1	20,700	K1	29,040
VL2	17,300	K2	15,510
VL3	17,880	K3	20,150
VL4	18,460	K4	17,880
VL5	13,650	K5	9,618
VL6	17,300	K6	18,460
VL7	13,650	K7	11,020
VL8	11,020	K8	10,330
VL9	17,300	K9	24,450
VL10	18,460	K10	5,704
VL11	10,330	K11	12,360
VL12	21,250	K12	9,618
VL13	14,900	K13	5,704
VL14	31,000	K14	32,940
VL15	14,900	K15	23,400
VL16	16,110	K16	19,020
VL17	11,020	K17	17,880
VL18	20,700	K18	19,020
VL19	11,020	K19	13,010
VL20	29,530	K20	16,710
Ortalama	17,32 pg/ml	Ortalama	16,59 pg/ml



Şekil 3.4. “4 PL curve analysis” kullanılarak oluşturulan TNF- α standart eğrisi ($R^2=0,997$).



Şekil 3.5. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama TNF- α değerleri ($p=0,722$).

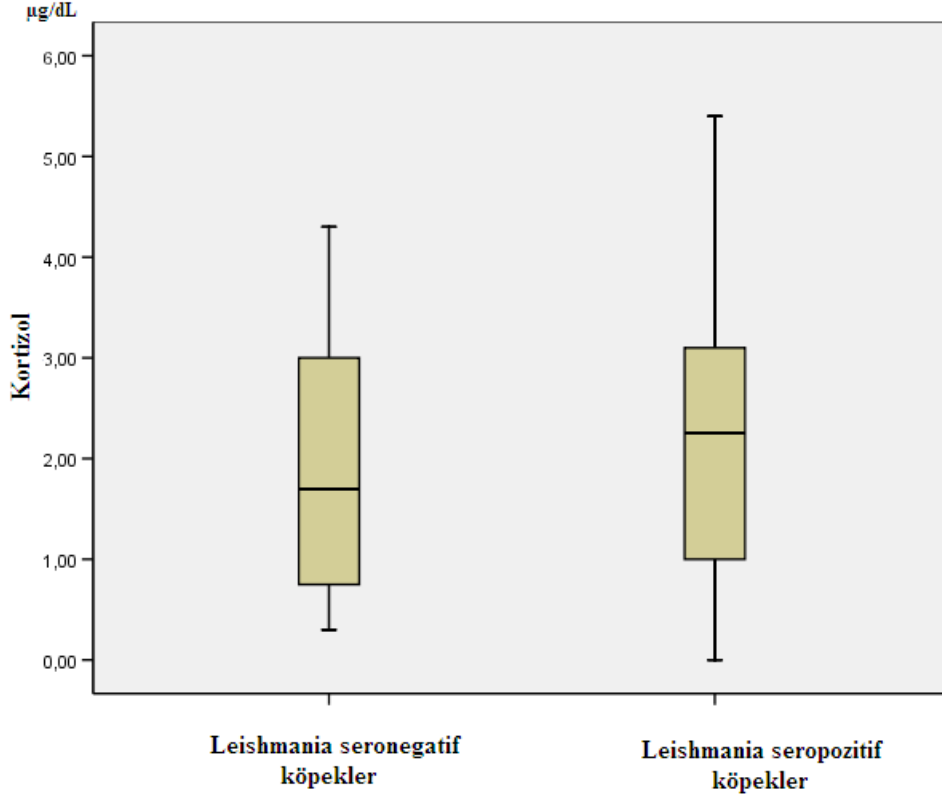
° :ortalamanın dışında tutulan değerler.

3.3.3. Serum kortizol düzeyleri

Köpeklere serumlarındaki kortizol konsantrasyonları Çizelge 3.4’de verilmiştir. *Leishmania* seropozitif köpekler ve kontrol grubu köpeklerin kortizol seviyeleri (ortalama) sırasıyla 2,21 µg/dL ve 1,94 µg/dL olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 3.6).

Çizelge 3.4. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait kortizol düzeyleri

Örnekler	Konsantrasyon (mg/dl)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/dl)
VL1	,00	K1	1,90
VL2	3,20	K2	,50
VL3	,90	K3	,60
VL4	2,60	K4	1,50
VL5	3,40	K5	1,70
VL6	1,10	K6	3,00
VL7	,30	K7	,90
VL8	3,60	K8	,30
VL9	,70	K9	1,70
VL10	,80	K10	,60
VL11	4,90	K11	3,00
VL12	5,40	K12	4,00
VL13	1,40	K13	1,70
VL14	1,70	K14	2,10
VL15	2,40	K15	3,90
VL16	2,70	K16	,90
VL17	1,60	K17	2,10
VL18	2,40	K18	4,30
VL19	2,10	K19	3,70
VL20	3,00	K20	,50
Ortalama	2,21 µg/dL	Ortalama	1,94 µg/dL



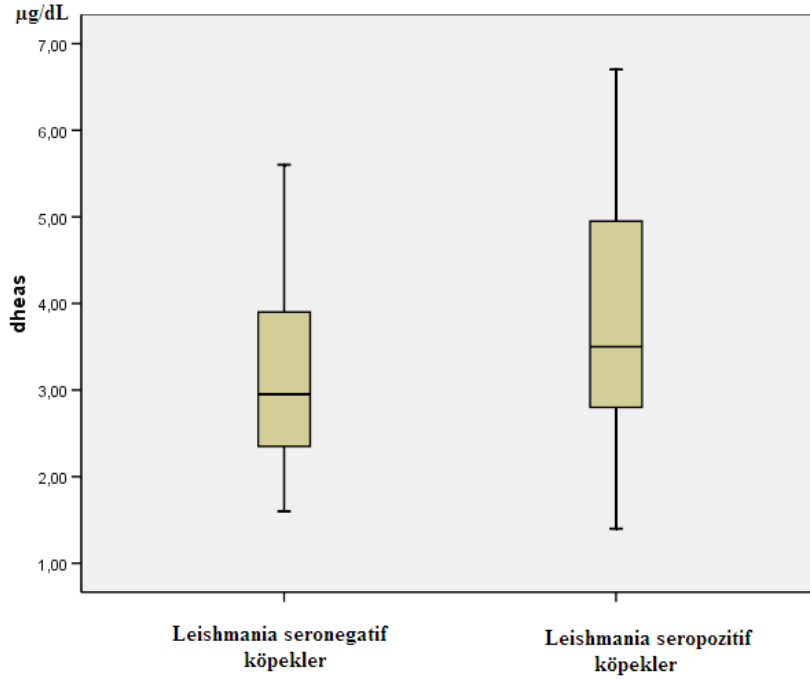
Şekil 3.6. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait minimum, maksimum ve ortalama kortizol değerleri (p=0.546)

3.3.4. Serum DHEA-S düzeyleri

Köpek serumlarındaki DHEA-S konsantrasyonları Çizelge 3.5’de verilmiştir. *Leishmania* seropozitif köpeklerin serum DHEA-S değerleri 3,95 µg/dL iken seronegatif köpeklerin 3,23 µg/dL olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 3.7).

Çizelge 3.5. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait DHEA-S düzeyleri

Örnekler	Konsantrasyon (mg/dl)	Örnekler	Konsantrasyon (mg/dl)
VL1	5,90	K1	3,20
VL2	5,10	K2	3,70
VL3	2,80	K3	1,60
VL4	1,40	K4	2,70
VL5	4,80	K5	2,00
VL6	4,50	K6	2,90
VL7	3,10	K7	2,10
VL8	3,10	K8	5,10
VL9	3,20	K9	2,00
VL10	2,60	K10	3,90
VL11	3,30	K11	2,10
VL12	6,20	K12	2,80
VL13	3,70	K13	3,90
VL14	4,10	K14	2,60
VL15	4,60	K15	3,90
VL16	5,90	K16	5,60
VL17	6,70	K17	5,30
VL18	2,80	K18	2,80
VL19	2,80	K19	3,00
VL20	2,50	K20	3,50
Ortalama	3,95 µg/dL	Ortalama	3,23 µg/dL



Şekil 3.7. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklere ait minimum, maximum ve ortalama DHEA-S değerleri (p=0.088).

3.3.5. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklerde görülen semptomların analizi

Leishmania seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklerde görülen semptomların sonuçları ve ki kare testi ile karşılaştırılması Çizelge 3.6'da gösterilmiştir. Buna göre semptomlardan ateş ve halsizlik iki grup arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur (p<0.05). IFAT ile belirlenen 18 seronegatif köpeklerin iki tanesinin semptomlarına ulaşılammıştır.

Çizelge 3.6. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif köpeklerde gözlenen semptomlar

Semptomlar	IFAT Pozitif	IFAT Negatif	P value
Kilo Kaybı			
Evet	12 (%70)	9 (%50)	0.745
Hayır	8 (%30)	9 (%50)	
Ateş			
Evet	10 (%50)	2 (%11,1)	0.015*
Hayır	10 (%50)	16 (%88,9)	
Halsizlik			
Evet	15 (%75)	6 (%33,3)	0.021*
Hayır	5 (%25)	12 (%66,6)	
Tırnaklarda uzama ve şekil bozukluğu			
Evet	9 (%45)	5 (%27,7)	0.328
Hayır	11 (%55)	13 (%72,3)	
Tüy dökülmesi			
Evet	14 (%70)	12 (%66,6)	1,000
Hayır	6 (%30)	6 (%33,3)	
Deride yara veya ülser			
Evet	11 (%55)	11 (%61,1)	0.752
Hayır	9 (%45)	7 (%39,9)	
Splenomegali			
Evet	3 (% 15)	0 (% 0)	0.232
Hayır	17 (% 75)	18 (% 100)	
Hepatomegali			
Evet	3 (%15)	1 (% 5,5)	0.606
Hayır	17 (%75)	17 (%94,5)	
Lenfadenopati			
Evet	6 (% 30)	4 (%22,2)	0.719
Hayır	14 (% 70)	14 (%77,8)	
Diğer Semptomlar			
Evet	9 (% 45)	3 (% 16,6)	0.086
Hayır	11 (% 55)	15 (% 83,4)	

*p<0.05

Çizelge 3.7. *Leishmania* seropozitif ve *Leishmania* seronegatif erkek köpeklerde saptanan semptomlar, yaşları, IFAT titreleri, serum IL-6, TNF α , DHEA-S ve kortizol sonuçları

	Yaş	IFAT titre	TNF- α	IL-6	Kortizol	DHEAS	Kilo kaybı	Ateş	Halsizlik	Tırn. Uzm.	Tüy dökülmesi	Yara,ülser	Splenomegali	Hepatomegali	Lenfadenopati	Diğer
K1	4	-	29,0	0,5	1,9	3,2	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
K2	4	-	15,5	9,5	,5	3,7	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
K3	3	-	20,1	10,5	,6	1,6
K4	1	-	17,8	9,5	1,5	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K5	1	-	9,6	10,5	1,7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K6	4	-	18,4	7,6	3,0	2,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K7	3	-	11,0	40,4	,9	2,1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
K8	3	-	10,3	17,4	,3	5,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K9	2	-	24,4	4,8	1,7	2,0	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
K10	2	-	5,7	-	,6	3,9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
K11	3	-	12,3	34,0	3,0	2,1	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
K12	3	-	9,6	6,7	4,0	2,8	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
K13	4	-	5,7	9,5	1,7	3,9	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
K14	4	-	32,9	20,5	2,1	2,6	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
K15	2	-	23,4	6,7	3,9	3,9	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
K16	3	-	19,0	16,4	,9	5,6	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
K17	3	-	17,8	9,5	2,1	5,3
K18	3	-	19,0	10,5	4,3	2,8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
K19	2	-	13,0	8,6	3,7	3,0	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
K20	3	-	16,7	1,3	,5	3,5	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Ortalama	2,83		16,5	13,4	1,9	3,2										
VL1	1	1/256	20,7	80,2	,0	5,9	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
VL2	4	1/128	17,3	8,6	3,2	5,1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
VL3	2	1/256	17,8	3,9	0,9	2,8	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
VL4	2	1/256	18,4	2,1	2,6	1,4	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
VL5	3	1/128	13,6	3,9	3,4	4,8	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
VL6	2	1/512	17,3	3,9	1,1	4,5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
VL7	3	1/64	13,6	16,4	,3	3,1	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
VL8	2	1/256	11,0	3,9	3,6	3,1	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
VL9	4	1/512	17,3	3,0	,7	3,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VL10	3	1/512	18,4	4,8	,8	2,6	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
VL11	2	1/256	10,3	55,6	4,9	3,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VL12	4	1/128	21,2	9,5	5,4	6,2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
VL13	3	1/512	14,9	127	1,4	3,7	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
VL14	3	1/512	31,0	33,0	1,7	4,1	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
VL15	3	1/512	14,9	3,9	2,4	4,6	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
VL16	4	1/256	16,1	5,7	2,7	5,9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VL17	4	1/256	11,0	197	1,6	6,7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
VL18	2	1/512	20,7	45,8	2,4	2,8	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
VL19	4	1/256	11,0	33,0	2,1	2,8	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
VL20	4	1/512	29,5	31,9	3,0	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ortalama	2,95		17,3	33,7	2,2	3,9										

4. TARTIŞMA

Leishmaniasis, zorunlu hücre içi paraziti olan *Leishmania* cinsi parazitlerin neden olduğu zoonotik bir infeksiyon hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Parazitin doğal bulaş şekli Eski Dünya ülkelerinde *Phlebotomus*, Yeni Dünya ülkelerinde *Lutzomyia* cinsi kum sinekleriyle gerçekleşmektedir. Hastalık parazitin yerleşim yerine göre sınıflandırılmakta olup visceral, kutanöz ve mukokutanöz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Hastalığın gelişiminde etken olan parazit türü ve konağın immün sistemi önemli rol oynamaktadır (Roberts 2006). Hastalığın en ağır seyreden formu olan VL'de başta dalak ve karaciğer olmak üzere iç organlarda infeksiyon gelişmekte ve tedavi edilmez ise ölümlerle sonuçlanabilmektedir (Mauel 2002).

Leishmaniasis hem halk sağlığı hem de veterinerlik alanında önem taşıyan önemli bir hastalık olup DSÖ verilerine göre VL dört kıtada, 88'den fazla ülkede endemiktir. Ayrıca, her yıl 1.5-2 milyon insanın infekte olduğu ve toplamda 350 milyon insanın risk altında olduğu bildirilmiştir (Diniz ve ark 2008). *L.infantum* ve *L.chagasi*'nin etken olduğu zoonotik VL insanlarda görülen leishmaniasis olgularının %20'sini oluşturmaktadır (yılda 100.000 vaka) (Dye 1996). *L. infantum*, Akdeniz ülkelerinde, Orta Doğu'da, Pakistan ve Brezilya'da görülmekte olup zoonotik karaktere sahiptir. Ayrıca bu tür için evcil köpeklerin rezervuar konak olduğu kanıtlanmıştır (Courtenay ve ark 2002). Ülkemizde VL olgularının çoğu Ege ve Akdeniz Bölgelerinde KL olguları ise Güneydoğu Anadolu'da sık görülmektedir (Ok ve ark 2002). Ülkemizde yapılan araştırmalarda köpeklerde KanL seropozitifliğinin %3 ile %45 arasında değiştiği bildirilmiştir (Balcıoğlu ve ark 2009). Voyvoda ve ark (2004), ELISA ve IFAT yöntemleriyle Kuşadası ve Selçuk ilçelerinde barınaklardaki köpeklerde anti-*Leishmania* antikollarını araştırmış ve 158 köpeğin 5'inde (%3.2) seropozitiflik tespit etmişlerdir. Balcıoğlu ve ark (2009) Antalya'da 176 köpeğin 14'ünde (%7.9) IFAT yöntemiyle seropozitiflik tespit etmiş ayrıca 24 (%13.6) köpekte de sınır değerde seropozitiflik görüldüğünü bildirmişlerdir. Ege Bölgesinin kıyı kesimlerinde Atasoy ve ark (2010) tarafından yapılan çalışmada 300 sokak köpeği incelenmiş ve IFAT ile 27'sinde (%9) *Leishmania* seropozitifliği saptanmıştır. Karabük'te 25 köpekte yapılan bir çalışmada leishmaniasis seropozitifliği %8 olarak bulunmuştur (Özbel ve ark 2002). Bursa'da Coşkun ve ark (1997) tarafından yapılan çalışmada köpeklerin %4.3'ünde IFAT

ile seropozitiflik saptandığı bildirilmiştir. Kocaeli’de bir erkek çocuğa VL tanısı konması üzerine bölgedeki 65 köpekten serum örneği elde edilerek IFAT ve ELISA ile çalışılmış, sonuçta 2 (%3.7) köpekte seropozitiflik saptanmıştır (Tamer ve ark 2008). Urla’da yapılan bir çalışmada klinik olarak VL şüpheli köpeklerde seropozitifliğin %27 olduğu bildirilmiştir. İçen ve ark (2010) Diyarbakır’da yaptıkları çalışmada IFAT ile inceledikleri köpek serumlarının tamamının *Leishmania* seronegatif olduğunu bildirmişlerdir.

KanL, çok farklı semptomlar gösterebilen multisistemik bir hastalık olup bazı köpeklerde infeksiyonunun çok uzun süre asemptomatik kalabileceği bildirilmiştir. Hastalığın inkübasyon süresinin 2-8 ay olduğu bildirilmekle birlikte bazı araştırmacılar 15 aya kadar hatta 5-7 yıla kadar uzadığını rapor etmişlerdir (Alvar ve ark 2004). Köpeklerde en yaygın görülen semptomların deride lezyonlar, genel durumun kötüleşmesi, kas atrofisi ve lenfadenomegali olduğu bildirilmiştir (Baneth ve ark 2008, Solano-Gallego ve ark 2011). Deri lezyonlarının ardından en sık gözlenen semptomların kilo kaybı ve aktivite azalması olduğu bildirilmiştir (İça 2004). Benzer şekilde diğer bir araştırmada da en sık gözlenen gözlenen semptomların zayıflama, iştahsızlık, durgunluk, kaslarda zayıflık, hepatomegali, tırnaklarda uzama ve deformasyon, deri lezyonları ve lenfadenopati olduğu bildirilmiştir (Abranches ve ark 1991). Semiao-Santos ve ark (1995), leishmaniasisli 93 köpekte semptomları araştırmış ve %93.5’inde lenfadenopati, %58’inde deri lezyonları, %26’sında kilo kaybı gözlemlemiştir. Balcıoğlu ve ark (2009), 24 seropozitif köpeğin ikisinde (%14.2) zayıflama, alopesi, tırnak uzaması, burun çevresinde yara gibi semptomların görüldüğünü bildirmiştir. Tamer ve ark (2008), IFAT seropozitif olan ve lenf bezi aspirasyon yayması da pozitif olan bir köpekte deri lezyonları ve lenfadenopati bulgularına rastladıklarını bildirmişlerdir. Durgut ve ark (2012), *Leishmania* infeksiyonu saptadıkları 10 köpeğin 9’unda deri lezyonu, 8’inde kilo kaybı, 7’sinde konjunktivit, 6’sında alopesi, 6’sında kepeklenme, 5’sinde tırnaklarda uzama, 4’ünde lenfadenopati, üçünde güçsüzlük, üçünde iştahsızlık, ikisinde epistaksis görüldüğünü belirtmişlerdir. Aynı çalışmada seronegatif köpeklerde herhangi bir semptom rastlanmamıştır. Chargui ve ark (2009) da IFAT pozitif köpeklerin %50’sinde herhangi bir semptom görülmediğini ifade etmişlerdir. Gönül ve ark (2002), leishmaniasisli bir köpek olgusunda zayıflama, vücudun farklı yerlerinde tekrarlayan yaralar, gözlerde çapaklanma, salivasyonda artış, polidipsi ve poliürinin yanısıra hayvanda durgunluk gözlendiğini bildirmiştir. Gazyağcı ve ark (2008), veteriner kliniğine kronik deri lezyonları ve burun kanaması şikayetleriyle getirilen 8 yaşındaki erkek Alman çoban köpeğinde IFAT ile *Leishmania* seropozitifliği (1/256)

tespit etmiş ve köpeğin muayenesinde vücut sıcaklığında artış, tırnak uzaması ve deformasyon görüldüğünü bildirmişlerdir. Çalışmamızda IFAT seropozitif köpeklerde en sık bildirilen semptomlar sırasıyla: halsizlik (%75), tüy dökülmesi (%70), kilo kaybı (%70), deride yara ve ülserler (%55), ateş (%50), tırnaklarda uzama ve şekil bozukluğu (%45), lenfadenopati (%30), splenomegali (%15) ve hepatomegali (%15) olarak sıralanmaktadır. Çalışmamızda seropozitif ve negatif köpekler semptomlar yönünden karşılaştırıldığında ateş ve halsizliğin gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.021$). Ayrıca infekte köpeklerin yaklaşık üçte birinde ateş görüldüğü bildirmiştir (Petersen ve Barr 2009). Çalışmamızda ise her iki köpekten birinde ateş bulunmaktadır.

Leishmania ile infekte köpeklerde klinik bulgular hastalığa işaret edebilmekte ancak tanının laboratuvar bulgularıyla kesinleştirilmesi gerekmektedir. Tanıda kullanılan yöntemler üç ana gruba ayrılmaktadır: Birincisi parazitin amastigot formunun doku, kan ve/veya kemik iliği örneklerinde boyama yöntemleriyle gösterilmesiyle gerçekleştirilen parazitolojik yöntemlerdir. İkincisi IFAT, ELISA, DAT, rK39 gibi immunokromatografik yöntemlerle ve Western blot gibi testlerin kullanılmasıyla *Leishmania*'ya özgü antikorların tespit etmeyi hedefleyen serolojik testlerdir. Son olarak da konak dokusunda parazitin DNA'sını bulmayı amaçlayan moleküler yöntemler (PCR) tanıda kullanılmaktadır (Gültekin ve ark 2003, Ferroglia ve ark 2007, İça ve ark 2008).

IFAT epidemiyolojik araştırmalarda ve klinikte tanı koyabilmek amacıyla en sık tercih edilen yöntemlerden biri olarak ifade edilmektedir (Ferroglia ve ark 2007). IFAT'ın %100'e yakın duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olup Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) tarafından referans serolojik test olarak kabul edilmektedir (Mancianti ve ark 1995). IFAT'ın kullanıldığı çalışmalarda testin eşik değeri (cut-off) çalışmalar arasında farklılık göstermektedir Genelde $<1:40$ titreleri negatif ve $\geq 1:160$ titreler pozitif, arada kalan titreler "şüpheli" olarak değerlendirilmektedir (Ferroglia ve ark 2002). Brezilya'da yapılan üç ayrı çalışmada yasal olarak önerilen 1:40 titre üzeri sonuçlar pozitif olarak kabul edilmiştir (Ashford ve ark 1998, Palatnik-de-Sousa ve ark 2001). IFAT sonuçları değerlendirilirken her zaman çalışmanın yapıldığı laboratuvarında daha önceden belirlenen eşik değerinin kullanılması önerilmekte ve cut-off değerinin dört katı titrelerin "yüksek pozitif" olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Castagnaro ve ark 2014). Camargo ve ark (2010), çalışmalarında 100'ü KanL endemik bölgeden ve 100'ü de non-endemik bölgeden kan

örnekleri toplamış, tanıda kullanılan IFAT, ELISA, parazitolojik yöntemler ve PCR yöntemini karşılaştırmış ve çalışmada IFAT ve PCR'ın duyarlılığı %100 ELISA'nın duyarlılığı %99 olarak bildirilmiştir. Ayrıca yöntemlerin özgüllükleri de sırasıyla %97.7, %93.3 ve % 91.1 olarak bildirilmiştir. Tunus'da yapılan bir çalışmada 67 köpekte KanL yaygınlığı IFAT, kültür ve PCR yöntemleri ile araştırılmış, IFAT ile örneklerin %12'si pozitif bulunurken, kültür yöntemiyle örneklerin %4.5'inde promastigotların çoğaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte en fazla pozitiflik PCR ile (%20.9) elde edilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde PCR yönteminin diğer yöntemlerden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Chargui ve ark 2009). IFAT laboratuvarımızda KanL tanısında 10 yıla yakındır rutin olarak kullanılmakta ve 1/64 ve üzeri titreler pozitif olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada da aynı test titre değerleri (1/64 ve üzeri) pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız HTT, rekombinant *Leishmania* rK-39 antijeni emdirilmiş stripler ile kandaki anti-*Leishmania* antikorlarını tespit etmektedir. Bu test *Leishmania* türlerinden üç tanesini (*L. donovani*, *L. infantum* ve *L. chagasi*) tespit edebilmektedir. Ancak, testin köpeklerde *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis*, *Toxoplasma gondii* ve *Babesia canis* ile çapraz reaksiyon verebildiği bildirilmiştir (Sharma ve ark 2009). Çalışmalarda testin duyarlılığının %67 ile %100 ve özgüllüğünün %93 ile %100 arasında değiştiği bildirilmektedir (Chappuis ve ark 2003, Otranto ve ark 2004, Metler ve ark 2005). Sundar ve ark (1998) tarafından VL hastalarında testin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak rapor edilmiştir. Maia ve ark (2012), rK39 HTT'nin IFAT ve ELISA'dan hem daha duyarlı hem de daha özgül bir test olduğunu bildirmiştir. Alborzi ve ark (2006), insanlarda VL tanısında HTT'nin duyarlılığının %82.4, özgüllüğünün %100 olduğu ve bu çalışma da IFAT'ın duyarlılığı %100, özgüllüğü %92.7 olarak bildirilmiştir. Bu sonuçlara göre IFAT uygulayamayan laboratuvarlar için HTT'nin uygun bir seçenek olabileceği ifade edilmiştir. HTT'nin avantajlarının maliyetinin düşük olması, cihaz gerektirmemesi ve deneyimli personele ihtiyaç duyulmaması olarak sıralanabileceği ileri sürülmüştür (Sharma ve ark 2009). HTT'nin bir diğer avantajının da testin asemptomatik bireylerin tespitine olanak sağlayarak infeksiyonun latent evresindeki bireylerde tedavilerin planlanabileceği olarak ifade edilmektedir (Singh ve ark 2002). Mettler ve ark (2005) tarafından bu testin semptomlu veya semptomsuz köpeklerde KanL tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir. Quinnell ve ark (2013), rK39 HTT ile ilgili literatürdeki yayınların meta-analizini yaparak testin köpeklerde *Leishmania* infeksiyonunu

belirlemedeki duyarlılığını araştırmışlar ve araştırmacılar yöntemin veteriner kliniklerinde tanı amaçlı kullanmaya uygun olduğunu ancak kontrol programlarının uygulanması için yetersiz olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda IFAT ile seropozitiflik saptanan köpek serumlarının tamamı HTT ile pozitif, seronegatif saptananlar ise HTT ile negatif bulunmuş ve IFAT testi ile HTT testinin % 100 oranında uyuştuğu belirlenmiştir.

Reimers ve ark (1981) tarafından köpeklerde serum kortizol düzeyini belirlemek için ticari bir radyoimmün test (RIA) geliştirilerek validasyonu yapılmış ve bu tarihten itibaren kortizol tayininde bu testin “altın standart” olarak kabul edildiği bildirilmiştir. Bu yöntemin diğerlerine göre dezavantajları; radyoaktif maddelerin yarılanma ömürlerinin kısa olması, çalışan kişiler için radyasyon tehlikesi ve atıkların imha edilmesinde karşılaşılan zorluklar olarak ifade edilmektedir. Sonraki yıllarda RIA'ya alternatif olabilecek fluorometrik, kemilüminesan, enzim immünoassay, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve diyaliz (serbest kortizol) gibi bazı yöntemler geliştirilerek bu yöntemlerin validasyonlarının yapıldığı belirtilmektedir (Reimers ve ark 1996, Jerico ve ark 2002). Bu yöntemlerden herhangi biri kullanılacağı zaman validasyonun (duyarlılık, özgüllük ve kesinlik) değerlendirilmesinin gerektiği bildirilmiştir (Reimers ve ark 1981). Serum kortizol tayininde radyoaktif olmayan yöntemlerin ticari olarak üretilmesinden sonra yöntem validasyonlarının daha da önemli hale geldiği ifade edilmektedir. Ticari olarak üretilen ELISA kitleri kortizol seviyesinin belirlenmesinde kullanılmakta olup bu kitlerin avantajlarının özgüllüklerinin mükemmelere yakın olması, enzim-konjuge kompleksinin stabilitesi, kullanılan kimyasalların toksik olmaması olarak bildirilmektedir. Ayrıca, biyotin-avidin sisteminin kullanıldığı bazı testlerde duyarlılığın RIA testlerine yakın olduğu bildirilmiştir (Ginel ve ark 1998). Reimers ve ark (1981), evcil hayvanlarda serum kortizol seviyelerinin insanlardan daha düşük olması nedeniyle insan örnekleri için geliştirilen ticari ELISA kitlerinin hayvanlara uygulanmadan önce validasyonun yapılması gerektiğini bildirmiştir. Çalışmamızda kortizol ve DHES düzeyleri kemilüminesan mikropartikül yöntemle ölçülmüştür. Bu test Üniversite hastanemizde insan serumlarında kortizol ve DHES düzeylerinin tayininde validasyonu yapılarak rutin olarak güvenle kullanılmaktadır. Ancak köpek serumları için bu testlerin validasyonu yapılamamıştır.

Köpeklerde kortizol sürekli sentezlenen bir hormon olup bir köpekte bazal kortizol seviyesi farklı araştırmacılar tarafından değişik birimler kullanılarak belirtilmektedir.

Feldman ve Nelson (2003), 1–5 ng/ml, Miller ve ark (2013), 1.5-6 µg/dL arasında değiştiğini ifade etmektedirler. Rosado ve ark (2011), köpeklerde agresiflik ve hormon ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında kontrol grubunda kortizol konsantrasyonunu 10,6 ng/ml olarak bildirmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu köpeklerde kortizol seviyesi 1.94 µg/dL olarak saptanmıştır.

Sistemik ve yaygın inflamatuvar yanıtı olan VL’de hastalar uzun süreli strese maruz kalmakta olup bu durum kronik VL hastalarında anemi, hepatosplenomegali, kilo kaybı, malnutrisyon ve ateş gibi belirtilerin görülmesinin nedeni olarak gösterilmektedir. Uzun süreli stres durumlarında hormon seviyelerinde değişiklik olduğu bildirilmektedir. Bu durumda kortizol düzeyinin arttığı, tritropin salınımının inhibe olduğu, T3 ve T4 düzeylerinin düştüğü ifade edilmektedir (Helmreich ve ark 2005). İnfeksiyon hastalıklarında nöroendokrin ve immün yolaklar birlikte hareket ederek konağın immün yanıtının oluşmasına neden olduğu bilinmektedir. İnfeksiyonlar gibi vücutta stres oluşturan uyaranlara cevap olarak görülen temel endokrin reaksiyon hipotalamik-pitüiter-adrenal (HPA) eksenin uyarılması olup sitokin seviyelerindeki değişiklikler HPA eksenini baskılayarak veya tetikleyerek etki gösterdiği bildirilmektedir (Perez ve ark 2009). Kortizol HPA eksenin temel bileşeni olup strese karşı immün yanıtta baskılayıcı fonksiyonu ile kilit rol oynayarak sistemik infeksiyonlarda plazma kortizol seviyesine bağlı olarak hastalığın şiddetinin arttığı ifade edilmektedir. Serbest kortizol dolaşımdaki tüm kortizolün %6-20’sini oluşturmakta olup sepsis durumunda dolaşım ve metabolizma üzerinde hayat kurtarıcı etkiye sahip olduğu beirtilmektedir (Torpy ve Ho 2007).

Verde ve ark (2011) çalışmalarında 72 VL hastası ve 20 kişilik kontrol grubunun aldesteron, adrenokortikotropik hormon (ACTH), kortizol, paratiroid hormon (PTH), tiroit stimulan hormon (TSH), triiyodotironin (T₃), serbest tiroksin (T₄) ve testosteron değerlerini kemilüminesan yöntemle araştırmışlar ve araştırma sonucunda plazma ACTH ve kortizol düzeyinin VL hastalarında yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca PTH, testosteron ve üriner aldesteron atılımının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu rapor edilmiş olup antidiüretik hormon (ADH), TSH ve folikül stimulan hormon (FSH)ların gruplar arasında farklılık göstermediği bildirilmiştir. Verde ve ark (2011) çalışmalarında hastaların %45.8’inde primer adrenal yetmezlik (düşük aldosteron/renin oranı), %69.4’ünde düşük aldosteron/renin oranı, %61.1’inde düşük üriner aldosteron atılımı ve %68’inde düşük

transtubular potasyum gradiyenti görülmüş ve hastaların tamamında normal plazma ADH düzeyi, hiponatremi ve yüksek üriner osmolalite tespit edildiği bildirilmiştir.

Bir diğer adrenal korteks hormonu olan DHEA cinsiyet hormonlarının öncüsü olup dolaşımında genelde sülfat formunda bulunmakta ve kortizolün immün sistemdeki olumsuz etkisini dengelediği ifade edilmektedir (Philips ve ark 2010). Dihidroepiandrosteron bazı infeksiyon ve otoimmün hastalıklarda immün yanıtın düzenlenmesinde çok önemli görev almaktadır. Düşük seviyedeki DHEA Th1/Th2 dengesini etkileyerek immün yanıtın hastalığın ilerlemesine neden olan Th2 yanıtına doğru yönelmesine yol açmaktadır (Cuttolo 1997, Giltay ve ark 2000). DHEA serum seviyesinin HIV ve tüberküloz infeksiyonunda düşmesi Th1 hücre yanıtının Th2 hücrelerine doğru yönelerek Th2 hücrelerinden salınan sitokinlerin artmasına neden olduğu bildirilmektedir (Clerici ve ark 2000, Hernandez-Pando ve ark 1998). DHEA'nun insan IL-6 gene promotorunu direkt olarak baskılayarak PBMC'inden in vitro olarak IL-6 üretimini inhibe ettiği bildirilmektedir (Keller ve ark 1996). Perez ve ark (2011), *T.cruzi* infeksiyonuna genç farelerin erişkinlere göre daha duyarlı olduğunu gözlemlemiş ve araştırmacılar genç farelerde paraziteminin, kortikosteron (CT) düzeyinin ve CT/DHEA-s oranının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, yetersiz DHEA üretiminin insanlarda oluşan diffüz leishmaniasis hastalığının uzamasına neden olabileceği düşünülen bir çalışmada, diffüz leishmaniasisli hastalarda DHEA ve kortizol seviyeleri düşük bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda IL-6 seviyesi yüksek IFN- γ seviyesi ise düşük olarak saptanmıştır. Spesifik tedaviye ilaveten DHEA ve kortizolün diffüz leishmaniasisli insanlarda tedaviyi desteklemek üzere verilmesinin immün yanıtın Th1 yanıtına doğru yönelerek parazitin elimine edebileceği ifade edilmektedir (Galindo-Sevilla ve ark 2007). Yapılan literatür araştırılmasında insan leishmaniasisinde kortizol ve DHEA ile leishmaniasisin ilişkisini değerlendiren az sayıda yayın bulunmasına karşılık köpeklerdeki kortizol ve DHEA düzeyleri ile leishmaniasis ilişkisini araştıran yayın bulunamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda köpeklerdeki DHEA ve kortizol serum düzeyleri ölçülerek leishmaniasisle birlikteliği incelenmiştir.

Hennesy ve ark (1997), kortizol seviyesinin cinsiyete ve yaşa bağlı olarak değişiklik gösterdiğini ifade etmektedirler. Mongilo ve ark (2014), erişkin erkek köpeklerde kortizol ve DHEA miktarının dişi köpeklerden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Rosado ve ark (2011) da DHEA seviyesinin erkeklerde daha yüksek olduğunu (90,9ng/ml) belirtmişlerdir. Bu nedenlerden dolayı yaş ve cinsiyete bağlanabilecek hormonal

değişimlerden etkilenmemek amacıyla çalışma grubu olarak 2-4 yaş arasındaki erkek köpekler çalışmaya dahil edilmiştir

Cinsiyet ve yaşın leishmaniasis gelişiminde önemli bir faktör olduğu hem erkek hem de kadın cinsiyet hormonlarının Th1-Th2 dengesini etkilediği bildirilmiştir (Roberts ve ark 1996). Genel olarak *Leishmania* infeksiyonlarında erkeklerin daha güçlü hücresel bağışıklık (Th1) yanıtı gösterirken kadınların daha güçlü humoral yanıt gösterdiği ifade edilmektedir. Bu nedenle erkeklerin infeksiyona karşı daha dirençli olduğu düşünülmektedir. Bazı epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda da infeksiyonun dişilerde daha ağır seyrettiği bildirilmiştir. Erkek B10/129 ve DBA/2 farelerin *L. major*'un etken olduğu KL'ye daha dirençli olduğu rapor edilirken insanlar arasında kadınlarda *L.tropica*'nın neden olduğu infeksiyonların daha yaygın görüldüğü rapor edilmektedir (Roberts ve ark 2001). Gebelikte artan östrojen seviyesinin immün yanıtı Th2 yönünde değiştirdiği ve dişi farelerde *L. major* infeksiyonlarına duyarlılığın artırdığı bildirilmiştir (Krishnan ve ark 1996). Zaffaroni ve ark (1999), erkek köpeklerde *L. infantum* infeksiyonunun daha sık görüldüğünü bildirilmişlerdir. Ayrıca deneysel çalışmalarda erkek BALB/c ve DBA/2 farelerin *L. major* infeksiyonuna dişilerden daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Mock ve Nacy 1988). Dişi DBA/2 farelerin *L.mexicana*'nın etken olduğu hastalığın kutanöz formuna erkeklerden daha dirençli olduğu ifade edilmiştir. Farelerde görülen bu direncin nedeni gonadektomi ve hormon transplant deneyleriyle araştırılmış ve kısmen östrojen bağımlı olduğu bulunmuş ve dişilerde IFN- γ ve Th1 yanıtla ilişkilendirilmiştir (Alexander 1988). Bu nedenlerden dolayı yaş ve cinsiyete bağlanabilecek değişimlerden etkilenmemek amacıyla çalışma grubu olarak 2-4 yaş arasındaki erkek köpekler çalışmaya dahil edilmiştir.

Sitokinler, immün sistem hücrelerinin veya infeksiyona karşı oluşan yangı hücrelerinin etkinliklerini arttıran, azaltan veya düzenleyen uyarılmış olan lenfositler, monositler, makrofajlar ile immün sisteme bağlı diğer bazı hücrelerde sentez edilen ve salındıklarında organizmada sistemik ve hücresel etkileri olan biyolojik düzenleyicilerdir. Hücre yüzeylerine sitokinlerin kendilerine özel reseptörlerle bağlandıkları ve hücre içine sinyal gönderdikleri bilinmektedir (Özcel 2007, Sacu 2008). Deneysel olarak infekte edilen köpeklerle ilgili yapılan çalışmalarda immün yanıtın düzenlenmesinde T lenfositlerin ve sitokinlerin önemli rolleri olduğu belirlenmiştir (Pinelli ve ark 1994, Pinelli ve ark 1995). T helper hücrelerinin alt grupları olan Th1 ve Th2 hücrelerinin birbirlerinden farklı olarak

değişik sitokinlerin salınmasından sorumlu oldukları bilinmektedir (Mosmann ve Moore 1991). Farelerin leishmaniasiste model olarak kullanıldığı çalışmalarda Th1 yanıtının korunmada önemli olduğu buna karşılık Th2 yanıtının enfeksiyona konak duyarlılığında rol oynadığı bildirilmektedir (Reiner ve Locksley 1995, Fowell ve ark 1998).

KanL dirençli olgularda aktive olan Th1 hücrelerinden interferon gama (IFN- γ) ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin 2 (IL-2) salınımının olduğu bildirilmektedir (Barbieri 2006). *L.major* ile enfekte edilen fare model üzerinde yapılan çalışmalarda Th1 hücreleri ve onlarla ilgili sitokinlerden IFN- γ ve TNF- α lezyonların iyileşmesinden sorumlu olduğu gözlenmiştir (Boom ve ark 1990). Leishmaniasisli asemptomatik köpeklerin uzun süre takip edildikleri ve bu süre içinde semptomların saptanmadığı bir çalışmada çalışmaya alındıkları sırada köpeklerde Th1 hücreleri tarafından salınan IL-2, INF- γ ve IL-18' in yüksek olduğu ve bu IL'lerin hastalığın ilerlemesine engel oldukları ifade edilmektedir (Manna ve ark 2006).

Esas olarak mononükleer fagositler tarafından sentezlenen TNF- α bir sitokin olmakla beraber antijenle uyarılan T, NK ve mast hücreleri tarafından da sentezlendiği bilinmektedir. Makrofajlardan sentezlenmesinde en önemli uyarının lipopolisakkarit (LPS) olduğu, T ve NK hücrelerinden IFN- γ sentezleyerek TNF- α miktarını artırdığı ifade edilmektedir. TNF- α 'nın temel işlevinin enfeksiyon bölgesine nötrofil ve monosit göçünün uyarılması, endotelial hücrelerden ve makrofajlardan kemokin salınımını artırması olarak belirtilmektedir. Ağır enfeksiyonlarda TNF- α sentezi büyük oranda artarak ateş, karaciğerden akut faz proteinlerinin sentezi ve kaşeksi gibi sistemik belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. TNF- α , düşük konsantrasyonlarda lökositler ve endotelde akut inflamasyonu indüklediği, orta konsantrasyonlarda sistemik etkilerin ortaya çıkmasına neden olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda ise septik şokla birlikte patolojik anomalilere neden olduğu bilinmektedir (Camcıoğlu ve Deniz 2007). VL'li hastalarda görülen halsizlik, kilo kaybı ve aneminin TNF- α ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir. Chamizo ve ark (2005), sağlıklı köpeklerden ve *L.infantum* ile enfekte ettikleri asemptomatik köpeklerden periferik kan mononükleer hücre (PMBC)leri izole etmiş ve sitokin ekspresyon düzeylerini araştırmış, asemptomatik grupta TNF- α düzeyinin kontrol grubundan farklı olmadığını ancak izole edilen PMBC'lerin çözülebilen *Leishmania* antijen (SLA)iyle uyarıldığında IL-6, TNF- α gen ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca asemptomatik köpeklerde tüm sitokinler değerlendirildiğinde hem Th1 hem de Th2

(IL-6 vb.) sitokinlerin ekspresyonunun gözlemlendiğini ancak IL-2 ve IFN- γ (Th1 yanıt)'nın spesifik olarak yükseldiğini ve buna bağlı hücrel immün yanıtın koruyucu rolü olduğunu öne sürmüşlerdir. de Lima ve ark (2007), hem sağlıklı kontrol grubu köpeklerde hem de leishmaniasisli köpeklerin serumlarında TNF- α düzeyini araştırmış ve IL-6'dan farklı olarak TNF- α 'nın köpeklerin çok az bir kısmında yükseldiğini ve aktif hastalıkla ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada aktif hastalıklı 16 köpekten sadece 7'sinde ve kontrol grubundaki 16 köpekten 14'ünde TNF- α konsantrasyonunun uygulanan ELISA testi ile tespit edilebilir sınırlar içinde olduğu bildirilmiştir (de Lima ve ark 2007). Köpeklerin tamamında TNF- α aktivitesinin artmaması ve köpeklerde TNF- α düzeyinin düşük olmasının nedeni olarak bu sitokinin etkisinin hedef hücrenin membran-bağlı reseptörleriyle etkileşimine bağlı olması nedeniyle olabileceği ve bu reseptörlerin TNF- α 'dan daha uzun yarılanma ömrüne sahip olduğu ve bu nedenle direkt TNF- α 'yı belirlemek yerine bu reseptörleri belirlenmenin daha iyi bir marker olacağı düşünülmektedir (de Lima ve ark 2007). Benzer şekilde Pinelli ve ark (1994), da VL semptomlu köpeklerden izole ettikleri PBMC süpernatantlarını Con-A ile uyarmış ve kontrol grubu köpeklere göre TNF- α aktivitesinin düştüğünü göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada 6 semptomlu köpeğin üçünde TNF- α aktivitesinin tamamen baskılandığı rapor edilmiştir. Cenini ve ark (1993) serum TNF- α ve IL-6 konsantrasyonlarının aktif hastalıklı insanlarda daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ancak van Der Poll ve ark (1995) ise TNF- α 'nın hastaların sadece küçük bir kısmında yükseldiğini ve hastalıkla ilişkili olmadığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde Caldas ve ark (2005) da hastalarda TNF- α düzeyinin çok düşük olduğunu rapor etmişlerdir. TNF- α ile ilgili bu farklılığın nedeninin bu sitokinin kararsız yapısının olabileceği bildirilmiştir (de Lima ve ark 2007). Barral-Netto ve ark (1991) insanlarda aktif VL'li 28 hastanın 24'ünde TNF- α düzeyinin yüksek olduğunu ve tedavi sonrası hızla düştüğünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu nedenle TNF- α 'nın tedavinin etkinliğinin takibinde bir marker olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Tumang ve ark (1994) *L. donovani* ile deneysel olarak enfekte edilen farelerin karaciğer hücrelerinde TNF- α düzeyinin kontrol grubuna göre çalışmanın sekizinci haftasında 5.5 kat arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda *Leishmania* seropozitif köpeklerde serum TNF- α seviyeleri 17,32 pg/ml, kontrol grubu köpeklerde 16,59 pg/ml olarak ölçülmüş (p=0.722) ve her iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır.

IL-6, hepatositlerde akut-faz protein sentezini uyararak, B hücre farklılaşmasında ve T hücre aktivasyonunda rol oynayan multifaktöryel bir sitokin olarak bilinmektedir.

Memelilerde IL-6'nın hem Th1 hem de Th2 immun yanıtta rol aldığı ifade edilmektedir (Dalrymple ve ark 1995). Köpeklerde *Leishmania* infeksiyonunda salgılanan IL-6'nın hangi hücrelerden kaynaklandığı tam olarak bilinmemekle birlikte insanlarda ve köpeklerde yapılan çalışmalarda PBMC'lerin *Leishmania* (bütün olarak veya SLA ile) ile inkübe edildiğinde IL-6 sentezlediği bildirilmiştir (Cenini ve ark 1993, Akuffo ve Britton 1992, Pinelli ve ark 1994). VL patofizyolojisinde IL-6'nın rolü tam olarak bilinmemekle birlikte akut faz proteinlerinin senteziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (de Lima 2007). Bir çalışmada VL'li köpeklerde akut faz proteinlerinin konsantrasyonun kontrol grubundaki köpeklerden anlamlı ölçüde yüksek olduğu ve semptomatik köpeklerde de C-reaktif proteinin asemptomatiklere göre yüksek olduğu bildirilmiştir (Martinez-Subiela ve ark 2003). de Lima ve ark (2007) leishmaniasisli köpeklerde serum IL-6 düzeyinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek olduğu ve IL-6'nın hastalığın şiddetiyle ilişkili olabileceğini bildirilmişlerdir. Cenini ve ark (1993), insandan elde edilen PBMC'lerin *Leishmania* antijenleriyle uyarıldığında IL-6 üretiminin arttığını saptamışlardır. Bu bulguyu destekleyen şekilde VL hastalarında antimon tedavisi sonrası IL-6 düzeyinde düşüş gözlenmiş ve araştırmacılar serum IL-6 seviyesinin tedavinin takibinde yararlı bir gösterge olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (van Der Pool ve ark 1995). VL hastalarında PBMC'lerin canlı veya ölü *Leishmania* ile inkübe edildiğinde çok yüksek miktarda IL-6 ürettiği bildirilmiştir (Akuffo ve Britton 1992). Pinelli ve ark (1994), SLA ile uyarılan semptomatik köpeklerden izole edilen PBMC'lerde IL-6 düzeyinin sağlıklı kontrollerden farklı olmadığını belirtmişlerdir. *Leishmania* seropozitif köpeklerde serum IL-6 düzeyleri 33,72 pg/ml seronegatiflerde 13,43 pg/ml olarak ölçülmüş ve her iki grup arasında istatistiksel ($p=0.091$) olarak anlamlı bir fark saptanamasa da, seropozitif köpek serumlarında IL-6 düzeyinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir.

5. SONUÇ

KanL seroloji tanısında HTT'nin IFAT ile %100 uyumlu olduğu bulunmuştur.

Seropozitif köpeklerde en sık bildirilen semptomların sırasıyla: halsizlik (%75), tüy dökülmesi (%70) ve kilo kaybı (%70) olduğu belirlenmiştir.

İki gruptaki köpekler semptomlar yönünden karşılaştırıldığında ateş ve halsizliğin gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.021$) bulunmuştur.

Serum IL-6 düzeyleri *Leishmania* seropozitif köpeklerde 33,72 pg/ml, seronegatiflerde ise 13,43 pg/ml ($p=0.091$) olarak saptanmıştır.

Serum TNF- α seviyeleri *Leishmania* seropozitif köpeklerde 17,32 pg/ml, seronegatiflerde ise 16,59 pg/ml ($p=0.722$) olarak saptanmıştır.

Serum kortizol seviyeleri *Leishmania* seropozitif köpeklerde 2,21 $\mu\text{g/dL}$, seronegatiflerde 1,94 $\mu\text{g/dL}$ ($p=0.546$) olarak saptanmıştır.

Serum DHEA-S seviyeleri *Leishmania* seropozitif köpeklerde 3,95 $\mu\text{g/dL}$, seronegatiflerde 3,23 $\mu\text{g/dL}$ ($p=0.088$) olarak saptanmıştır.

ÖZET

Köpeklerin visceral leishmaniasiste doğal rezervuar olduğu insanların ise rastlantısal olarak infekte oldukları bilinmektedir. İnfekte köpeklerin tedaviye yanıtlarının düşük olması nedeniyle günümüzde köpek leishmaniasis (KanL)'inin önlenmesinde ümit veren en önemli yaklaşımın immunoprolaksi olduğu ifade edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı günümüzde KanL'deki immun yanıtın araştırılması yönündeki çalışmalar önem kazanmıştır.

Leishmaniasis şüphesiyle Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarı'na gönderilen köpek serumlarından IFA testi ile 20'si *Leishmania* seropozitif ve 20'si *Leishmania* seronegatif olarak değerlendirilen 2-4 yaşlarında toplam 40 adet erkek köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Köpeklerin demografik özellikleri ile klinik bulguları bir anketle değerlendirmiştir. Çalışma grubundaki serumların tamamında immunokromatografik (HTT) yöntem ile de parazite özgü antikorlar araştırmıştır. Ayrıca serumlarda IL-6, TNF- α , DHEA ve kortizol seviyeleri ticari kitlelerle ölçülmüştür. Sonuçlar ki-kare test ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

HTT ile IFA testinde seropozitif olarak saptanan köpek serumlarının tamamında bant saptanmıştır. Seronegatif 20 köpek serumunda ise HTT ile bant saptanamamıştır. Çalışmamızda seropozitif köpeklerde en sık bildirilen semptomlar sırasıyla: halsizlik (%75), tüy dökülmesi (%70), kilo kaybı (%70) olarak sıralanmaktadır. İki gruptaki köpekler semptomlar yönünden karşılaştırıldığında ateş ve halsizliğin gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla $p=0.015$, $p=0.021$). *Leishmania* seropozitif köpeklerde serum TNF- α seviyeleri 17,32 pg/ml, kontrol grubu köpeklerde 16,59 pg/ml ($p=0.722$), seropozitif köpeklerin serum IL-6 seviyeleri 33,72 pg/ml, seronegatiflerin 13,43 pg/ml ($p=0.091$), *Leishmania* seropozitif köpekler ve kontrol grubu köpeklerin kortizol seviyeleri sırasıyla 2,21 $\mu\text{g/dL}$ ve 1,94 $\mu\text{g/dL}$ ($p=0.546$), *Leishmania* seropozitif köpeklerin serum DHEA-S değerleri 3,95 $\mu\text{g/dL}$ iken seronegatif köpeklerin 3,23 $\mu\text{g/dL}$ ($p=0.088$) olarak bulunmuştur.

KanL'e karşı gelişen immun yanıtta mekanizmalar ve etkileyen faktörler hakkındaki bilgilerin artmasının, ileride geliştirilecek immunoterapi araştırmaları için gerekli bilgi birikimine ve *Leishmania*'ya karşı aşı çalışmalarına önemli katkılar sağlayacağı düşünölmektedir.

Anahtar kelimeler: DHEA, IL-6, kortizol, köpek, TNF- α , visceral leishmaniasis

SUMMARY

Dogs are considered as the main reservoirs of visceral leishmaniasis and it was known that humans could be infected with the parasite accidentally. It was commonly stated that the most promising approach in the battle against the canL (canine leishmaniasis) was immunoprophylaxis because of the low response to treatment among dogs. Therefore, the studies in the field of immunology have gained much importance, recently.

Totally 40 serum specimens from dogs with suspected *Leishmania* infection, ages varied between 2 and four, 20 were IFA seropositive and 20 were IFA seronegative, were included in the present study at Faculty of Medicine, Department of Parasitology. The demographic and clinical properties of dogs were analysed with a survey. In the study group, antibodies specific to parasite were determined with an immunochromatographic test (rapid test). Additionally, the serum levels of IL-6, TNF- α , DHEA and cortisol were determined with commercially available kits. The findings were evaluated with chi-square by comparing groups.

Positive bands were detected with rapid test with the serum samples of all IFA seropositive dogs. Moreover, all IFA seronegative dogs gave negative reaction with rapid test. The most common symptoms among the dogs were: weakness (75%), alopecia (70%) and weight loss (70%), respectively. It was found that the frequency of weakness and fever were statistically different between groups ($p=0.015$, $p=0.021$, respectively).

The mean serum TNF- α level for seropositive dogs was 17,32 pg/ml and 16,59 pg/ml for seronegative dogs ($p=0.722$), the mean serum IL-6 level for seropositive dogs was 33,72 pg/ml and 13,43 pg/ml for seronegative dogs ($p=0.091$). Additionally, the mean serum cortisol level of seropositive and seronegative dogs were 2,21 $\mu\text{g/dL}$ and 1,94 $\mu\text{g/dL}$, respectively ($p=0.546$), it was found that while the mean serum DHEA-S level of seropositive dogs were 3,95 $\mu\text{g/dL}$ the mean value was 3,23 $\mu\text{g/dL}$ for seronegative dogs ($p=0.088$).

It was thought that the improvement of knowledge about the immune mechanisms and affecting factors would be helpful to forthcoming researches on immunotherapy of canL and the quality of available vaccines against *Leishmania*.

Keywords: canine, cortisol, DHEA, IL-6, TNF- α , visceral Leishmaniasis

6. KAYNAKÇA

- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology* 1991;77:557–561.
- Akuffo HO, Britton SF. Contribution of non-Leishmania-specific immunity to resistance to Leishmania infection in humans. *Clinical and Experimental Immunology* 1992;87:58–64.
- Alborzi A, Rasouli M, Nademi Z, Kadivar MR, Pourabba B. Evaluation of rK39 strip test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in infants La Revue de Santé de la Méditerranée orientale. *Eastern Mediterranean Health Journal* 2006;12(3-4):294-299.
- Alexander J. Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology* 1988;96:297–302.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis Advances in *Parasitology* 2004;57:1–88.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7(5): 35671.
- Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heatshock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Tropica* 1996;62:45–56.
- Argaw DD, Postigo J. Leishmaniasis, <http://www.who.int/leishmaniasis/en>. Erişim Tarihi: 08 şubat 2014.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998;59(1):53-57.
- Atasoy A, Paşa S, Toy SÖ, Ertabaklar H. Seroprevalence of canine visceral leishmaniasis around the Aegean coast of Turkey. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 2010;16(1):1-6.

Balcıoğlu İC, Ertabaklar H, Paşa S, Özbel Y, Özensoy TS. Antalya ili ve ilçelerindeki dört köpek barınağında leishmaniasis seroprevalansının araştırılması. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2009;33(1):4-7.

Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. Cancer and Metastasis Reviews 2006;25(3):409-416.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends in Parasitology 2008;324-330.

Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunology 2006;28(7):329-337.

Barral-Netto M, Badaró R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaró F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E, Falcoff R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases 1991;163(4):853-857.

Boom WH, Liebster L, Abbas AK, Titus RG. Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: Correlation with disease progression or resolution. Infection and Immunity 1990;58: 3863–3870.

Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, Van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A. Balance of IL-10 and Interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. British Medical Journal Infectious Diseases 2005;19:113–117.

Camargo JB, Langoni H, Troncarelli MZ, Machado JG, Lucheis SB, Padovani CR. Performance of IFAT, ELISA, direct parasitological examination and PCR on lymph node aspirates for canine visceral leishmaniasis diagnosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2010;16(3):414-420.

Camcıoğlu Y, Deniz G. Doğal Bağışıklık. In: Abbas AK, Lichtman AH. (Eds). Temel İmmünoloji: İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları 7. Baskı. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2007. p.34-36.

Carswell E, Old L, Kassel R, Green N, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Science 1975;72(9):3666-3670.

Castagnaro M, Crotti A, Fondati A, Gradoni L, Lubas G, Maroli M, Oliva G, Paltrinieri S, Soleno-Gallego L, Roura X, Zatelli A, Zini E. Canine leishmaniasis working group. Canine leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. http://www.gruppoleishmania.org/files/veterinaria_2007_eng.pdf. Erişim Tarihi: 01.08.2014.

Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy *Journal of Infectious Diseases* 1993;168:986–993.

Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005;103(1-2):67-75.

Chappuis F, Rijal S, Singh R, Acharya P, Karki BM, Das ML. Prospective evaluation and comparison of the direct agglutination test and an rK39-antigen-based dipstick test for the diagnosis of suspected kala-azar in Nepal. *Tropical Medicine International Health* 2003;8:277-285.

Chargui N, Haouas N, Gorcii M, Lahmar S, Guesmi M, Ben Abdelhafidh A, Mezhoud H, Babba H. Use of PCR, IFAT and in vitro culture in the detection of *Leishmania infantum* infection in dogs and evaluation of the prevalence of canine leishmaniasis in a low endemic area in Tunisia. *Parasite* 2009;16(1):65-69.

Chen CC, Parker CR Jr. Adrenal androgens and the immune system. *Seminars in Reproductive Medicine* 2004;22(4):369-377.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 1997;141(21):539-543.

Clerici M, Galli M, Bosis S, Gervasoni C, Moroni M, Norbiato G. Immunoendocrinologic abnormalities in human immunodeficiency virus infection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;917:956–961.

Coşkun Ş, Batmaz H, Levent A, Yılmaz F. Türkiye'nin batısında köpeklerde *Leishmania* spp. infeksiyonunun seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997;21:287-291.

- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* 2003;40(6):677-684.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Dye C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology* 2002;125(5):407.
- Cuttolo M. Do sex hormones modulate the synovial macrophages in rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997;56:281–283.
- Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S, Lee F, Murray R. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infection and Immunity* 1995;63(6):2262-2268.
- de Lima VM, Peiro JR, de Oliveira Vasconcelos R. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;115(1-2):189-193.
- Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RM, Abreu-Silva AL, Santos RL. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2008;2(1):24-33.
- Durgut R, Dalkilinç D, Güzel M. Evaluation of the serum lipid profiles in dogs with symptomatic Visceral Leishmaniasis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2012;18(4):585-588.
- Dye C. The logic of visceral leishmaniasis control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1996;55:125–130.
- Ertabaklar H, Özensoy Töz S, Şakru N, Keleş E, Özbel Y. Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visseral leishmaniosisin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2001;25(2):128-131.
- Feldman EC, Nelson RW. Canine hyperadrenocorticism cushings syndrome. 2nd Ed. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia: WB Saunders Co; 2004. p. 258-260.

Fernandes CB, Junior JT, 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.

Ferreira Sde A, Almeida GG, Silva Sde O, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013;7(4):e2150.

Ferroglio E, Trisciuglio A, Gastaldo S, Mignone W, Dele Piane M. Comparison of ELISA IFAT and Western blot for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog. *Parassitologia* 2002;44 (suppl):64.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology* 2007;144(1-2):162-166.

Fowell DJ, Bix M, Shinkai K, Lacy D, Locksley RM. Disease susceptibility and development of the cytokine repertoire in the murine *Leishmania major* model. *European Cytokine Network* 1998;9:102–106.

Galindo-Sevilla N, Soto N, Mancilla J, Cerbulo A, Zambrano E, Chavira R, Huerto J. Low serum levels of dehydroepiandrosterone and cortisol in human diffuse cutaneous leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007;76(3):566-572.

Gavvani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR: Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 2002;360(9330):374-379.

Gazyacı S, Gazyacı AN, Kılıç S, Çelebi B, Özal N. Amasya ilinde bir köpekte visceral leishmaniasis. *Kocatepe Veterinary Journal* 2008;1:69-71.

Gibson ME. The identification of kala-azar and the discovery of *Leishmania donovani*. *Medical History* 1983;27(2):203–213.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 2000;22:319–331.

Giltay EJ, Fonk JCM, von Blomberg BME, Drexhage HA, Schalkwijk C, Gooren LJG. In vivo effects of sex steroids on Lymphocyte responsiveness and Immunoglobulin levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000;85:1648–1657.

Ginel PJ, Pérez-Rico A, Moreno P, Lucena R. Validation of a commercially available enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) for the determination of cortisol in canine plasma samples. *Veterinary Research Communications* 1998;22(3):179-185.

Gönül R, Arun SS, Dodurka T, Handemir E. Bir köpekte *Leishmania infantum* olgusu. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 2002;26:689-694.

Gültekin B, Ertuğ S, Eren H, Karagenç T, Turgay N, Doyuran ES. Aydın ili Ketendere köyünde visseral leishmaniasis epidemiyolojisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2003;27(2):102-105.

Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology* 2005;81:183–192.

Hennessy MB, Davis HN, Williams MT, Mellott C, Douglas CW. Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Department of Psychology* 1997;(62):485–490.

Hernandez-Pando R, Streber ML, Orozco H, Arriaga K, Pavon L, Marti O, Lightman SL, Rook GAW. Emergent immunoregulatory properties of combined glucocorticoid and anti-glucocorticoid steroids in a model of tuberculosis. *Quarterly Journal of Medicine* 1998;91:755–766.

İça A. Köpeklerde leishmaniasis. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2004;1(2):119-124.

İça A, İnci A, Yıldırım A, Atalay Ö, Düzlü Ö. Kayseri ve civarında köpeklerde leishmaniasisin nested-PCR ile araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008;32(3):187-191.

İçen HÇ, Babür C, Bademkiran S, Celebi B, Simşek A, Ozyurtlu N, Özkan A.T. Diyarbakır bölgesindeki sahipsiz köpeklerde toxoplasmosis, leishmaniasis ve listeriosisın seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2010;34(1):6-10.

Işık G, Demirezen S, Beksaç MS. Tümör nekroz faktör ve servikal kanser bağlantısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* 2008;1(2):55-61.

Jerico MM, Mendonca BB, Otsuka M, Maganin-Junior A, Larsson CE. Non-radiometric immunoassays [fluoroimmunoassay (FIA) and fluorometric enzyme immunoassay (FEIA)] with radioimmunoassay (RIA) for evaluation of adrenal function in normal and hypercortisolemic dogs. *Ciencia Rural* 2002;32:259–262.

Keller ET, Chang C, Ershler WB. Inhibition of NF kappa B activity through maintenance of IkappaB alpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271: 26267–26275.

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology* 1997;11(2):105-111.

Krishnan L, Guilbert LJ, Russell AS, Wegmann TG, Mosmann TR, Belosevic M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *The Journal of Immunology* 1996;156:644–652.

Krobath PD, Salek FS, Pittenger AL, Fabian TJ, Frye RF. DHEA and DHEA-S: A review. *Journal of Clinical Pharmacology* 1999;39:327-348.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002;125:197–207.

Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CM, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012;6(1):1484.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 1995;59:13-21.

Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2006;142:271–280.

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. *Veterinary Journal* 2009;182(3):441-445.

Martinez-Subiela S, Bernal LJ, Ceron JJ. Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *American Journal of Veterinary Research* 2003;64:1021–1026.

Mauel J. Vaccination against *Leishmania* infections. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine Metabolic Disorders* 2002;2:201-226.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43:5515-5519.

Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 7th ed. Missouri: Saunders; 2013. p.520-521.

Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis– new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitology* 2008;24(8):371-377.

Miro G, Galvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology* 2007;143(3-4):375-379.

Mock BA, Nancy CA. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania* major systemic infections. *Infection and Immunity* 1988;56:3316–3319.

Mongillo P, Prana E, Gabai G, Bertotto D, Marinelli L. Effect of age and sex on plasma cortisol and dehydroepiandrosterone concentrations in the dog (*Canis familiaris*). *Research in Veterinary Science* 2014;96(1):33-38.

Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunology Today* 1991;12:49–53.

Murray J, Barbara J, Dunkley S, Lopez A, Van Ostade X, Condliffe I, Haslett C, Chilvers E. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirements for tnf-r55 and tnf-r75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood* 1997; 90(7):2772-2783.

Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Clinical Pathology* 2005;34(3):243-247.

Newsholme E, Leech A. Cortisol. In: *Functional Biochemistry in Health and Disease*. Chichester: Wiley Blackwell Yayınları; 2011. p.255.

Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB, Luvizotto MC. Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 2005;23(40):4805-4810.

Ok UZ, Balcıoğlu IC, Taylan Özkan A, Özensoy S, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica* 2002;84:43-48.

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

Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D. Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology* 2007;144(3-4):270-278.

Özbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Babaoğlu A, Özensoy Töz S, Babaloğlu N. Batı Karadeniz Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis Odağı. *Karabük. Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2002;26(4):362-366.

Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmaniosis. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M. (Eds). *Tıbbi Parazit Hastalıkları*. 1. Baskı. İzmir: Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri; 2007. p.198-241.

Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E, *Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları No:21., Meta Basım, İzmir 2007.

Özensoy Töz S, Korkmaz M, Balcıoğlu C, Özbel Y, Ertabaklar H, Rastgeldi S. Karaburun ve Urla bölgesinde zoonotik visseral Leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2002;26(3):243-269.

Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, Rodrigues MM, Soares I, Borja-Cabrera GP. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Review of Vaccines* 2008;7(6):833-851.

Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, Mayrink W, Genaro O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001;65(5):510-517.

Pena MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG, Dubielzig RR. Histopathological features of ocular leishmaniasis in the dog. *Journal of Comparative Pathology* 2008;138(1):32-39.

Pérez AR, Bottasso O, Savino W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. *Neuroimmunomodulation* 2009;16(2):96-105.

Pérez AR, Bertoya AA, Revelli S, García F. A high corticosterone/DHEA-s ratio in young rats infected with *Trypanosoma cruzi* is associated with increased susceptibility. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2011;106(4):416-423.

Petersen CA, Barr SC. Canine Leishmaniasis in North America: emerging or newly recognized? *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 2009;39(6):1065-1074.

Phillips AC, Carroll D, Gale CR, Lord JM, Arlt W, Batty GD. Cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate, their ratio and all-cause and cause-specific mortality in the Vietnam Experience Study. *European Journal of Endocrinology* 2010;163:285–292.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenber J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity* 1994;62:229–235.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VPMG, Gebhard D, del Real G, Ruitenber EJ. *Leishmania infantum* specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *European Journal of Immunology* 1995;25:1594–1600.

- Quinnell RJ, Carson C, Reithinger R, Garcez LM, Courtenay O. Evaluation of rK39 rapid diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis longitudinal study and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013;7(1):1992.
- Rasmussen KR, Martin EG, Healey MC. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosuppressed rats infected with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Parasitology* 1993;79(3):364-370.
- Reimers TJ, Cowan RG, Davidson HP. Validation of radioimmunoassay for triiodothyronine, thyroxine, and hydrocortisone (cortisol) in canine, feline, and equine sera. *American Journal of Veterinary Research* 1981;42:2016–2021.
- Reimers TJ, Salerno VJ, Lamb SV. Validation and application of solid-phase chemiluminescent immunoassays for diagnosis of endocrine diseases in animals. *Comparative Haematology International* 1996;6:170–175.
- Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual Review of Immunology* 1995;13:151–177.
- Roberts CW, Satoskar A, Alexander J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology* 1996;12:382–388.
- Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 2001;14(3):476–488.
- Roberts MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *British Medical Bulletin* 2006;(75-76):115–130.
- Rosado B, Garcia-Belenguer S, Leon M, Chacon G, Villegas A, Palacio J. Effect of fluoxetine on blood concentrations of serotonin, cortisol and dehydroepiandrosterone in canine aggression. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2011;34(5):430-436.
- Sacu D. Deneysel olarak fibrosarkoma oluşturulan ratların serumlarında IL-6 ve TNF- α düzeylerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, Türkiye. 2008.
- Schacke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology Therapeutics* 2002;96(1):23-43.

Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990;75(1):40-47.

Semiao-Santos SJ, Harith AE, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmão R. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research* 1995;81:235-239.

Sharma NL, Mahajan VK, Negi AK, Verma GK. The rK39 immunochromatic dipstick testing: a study for K39 seroprevalence in dogs and human leishmaniasis patients for possible animal reservoir of cutaneous and visceral leishmaniasis in endemic focus of Satluj river valley of Himachal Pradesh (India). *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology* 2009;75(1):52-55.

Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting Kala-Azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:568-572.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *Journal of Clinical Microbiology* 2001;39:560–563.

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(1-2):1-18.

Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group. Leish Vet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites Vectors* 2011;4:86.

Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez L, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C. Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 1996;106:454–461.

Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1992;62(1-2):11-17.

Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis *Lancet* 1998;351:563-565.

Tamer GS, Polat E, Töz Özensoy S, Altaş K. Kocaeli Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2008;32(3):183-186.

Tchernof A, Labrie F. Dehydroepiandrosterone, obesity and cardiovascular disease risk A review of human studies. *European Journal of Endocrinology* 2004;151:1-14.

Thijs L, Fagard R, Forette F. Are low dehydroepiandrosterone sulphate levels predictive for cardiovascular diseases? A review of prospective and retrospective studies. *Acta Cardiologica* 2003;58(5):403-410.

Torpy DJ, Ho JT. Value of free cortisol measurement in systemic infection. *Hormone and Metabolic Research* 2007;39(6):439-444.

Torres M, Bardagi M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Veterinary Journal* 2011;188(3):346-351.

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):2205.

Tumang MC, Keogh C, Moldawer LL, Helfgott DC, Teitelbaum R, Hariprashad J, Murray HW. Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 1994;153(2):768-775.

van Der Poll T, Zijlstra EE, Mevissen M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment *Clinical Immunology and Immunopathology* 1995;77:111-114.

van Vollenhoven RF, Morabito LM, Engleman EG, McGuire JL. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone 50 patients treated up to 12 months. *The Journal of Rheumatology* 1998;25(2):285-289.

Verde FA, Lima Verde FA, Neto AS, Almeida PC, Lima Verde EM. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2011; 84(5):668-673.

Voyvoda H, Pasa S, Töz SÖ, Özbel Y, Ertabaklar H. Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile izmir'in selçuk ilçesindeki köpeklerde leishmaniosis ve dirofilariasis'in prevalansı. Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences 2004;28(6):1105-1111.

Wolkowitz OM, Reus VI, Keebler A, Nelson N, Friedland M, Brizendine L, Roberts E. Double-blind treatment of major depression with dehydroepiandrosterone. Am Journal of Psychiatry 1999;156(4):646-649.

Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P, Mignone W. Epidemiological patterns of canine leishmaniosis in Western Liguria (Italy). Veterinary Parasitology 1999;81:11–19.

Ek 1. Anket formu

ANKET FORMU

Köpeğin adı:

Köpeğin yaşı:

Köpeğin cinsiyeti:

Semptom	Var	Yok
Kilo kaybı		
Ateş		
Halsizlik		
Tırnaklarda uzama ve şekil bozukluğu		
Tüy dökülmesi		
Deride yara veya ülser		
Splenomegali		
Hepatomegali		
Lenfadenopati		
Diğer(Yazınız)		

Not : semptomların karşısındaki kutuları (var, yok) bulgularınıza göre lütfen **X** işareti kullanarak doldurunuz.

ÖZGEÇMİŞ

Dr. Sema ERTUĞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı: ERTUĞ

Adı: Sema

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı
AYDIN

GSM: 0/542/6222796

Doğum Yeri: Ankara.

Doğum Tarihi: 5/ 6 /1961

Cinsiyeti: Kadın

Medeni hali: Evli

Kızlık Soyadı: Balkanlı

Eğitim Durumu

<u>Eğitim Kurumu</u>	<u>Yıllar</u>
Ankara Kocatepe ilkokulu	1968-1972
Ankara Kalaba Ortaokulu	1973-1975
Ankara Atatürk Lisesi	1976-1978
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	1979-1984

Çalıştığı Kurumlar

Kurum	Yıllar	Unvan
Rize Merkez Sağlık Ocağı	1984 - 1986	Pratisyen Hekim
Kocaeli Gölçük Merkez Sağlık Ocağı	1986 - 1995	Pratisyen Hekim
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	1995 - 1999	Araştırma görevlisi
Danimarka Statens Serum Institut Parazitoloji Laboratuvarı	Eylül 1997- Aralık 1997	Ziyaretçi Bilim Adamı
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Ocak 1999- Haziran 2000	Parazitoloji Uzmanı
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi	Temmuz 2000-	Öğretim Görevlisi

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Ocak 2001	
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Ocak 2001- Temmuz 2005	Doçent Doktor
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Ağustos 2005- Temmuz 2006	Doçent Doktor
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı	Temmuz 2006.....	Profesör Doktor
Extremadura Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı İspanya	Mart-Haziran 2007	Erasmus Öğrencisi

Yabancı Dili: İngilizce

1-Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Altıntaş N, Yolaşmaz A, Sakru N, Yazar S, Ertug S, Ozbel Y, 1998. A Sero-epidemiological study of visceral leishmaniasis in İzmir district, Turkey. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 28(2):389-394.
2. Altıntaş N, Ertug S, Yolaşmaz A, Sonmez G, Uysalcı M, Altıntaş N, Kultursay N, Oztekin K, Sendag F, Gürüz Y, Petersen E, 2001. Screening for congenital toxoplasmosis in Turkey. edit:Petersen E, Pollak A, Reiter-Owona I, Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology* 31:115-144.
3. Okyay P, Ertug S, Gultekin B, Onen O, Beser E, 2004. Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample-Turkey. *BMJ Public Health*. 4(1):64.
4. Ertug S, Okyay P, Turkmen M, Yuksel H, 2005. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma* infection among pregnant women in Aydın province, Turkey. *BMC Public Health*. 5(1):66.
5. Ertabaklar H, Oncu S, Ertug S, 2005. A new focus for cutaneous leishmaniasis in the West Coast of Turkey. *Tropical Doctor*. 35(3):189.
6. Oncu S, Oncu S, Okyay P, Ertug S, Sakarya S, 2006. Prevalence and risk factors for HEV infection in pregnant women. *Medical Science Monitor*. 12(1):CR36-39.

7. Okyay P, Ertabaklar H, Savk E, Ertug S, 2006. Prevalence of *Demodex folliculorum* in young adults: relation with sociodemographic /hygienic factors and acne vulgaris. *European Academy of Dermatology and Venereology* 20:474-476.
8. Delibas SB, Ertabaklar H, Ertug S, 2006. Evaluation of antigenic variations between two virulent toxoplasma strains. *J Med Microbiol.* 55:1333-1335.
9. Ertug S, Karakas S, Okyay P, Ergin F, Oncu S, 2007. The effect of *Blastocystis hominis* on the growth status of children. *Medical Science Monitor.* 13(1):CR40-43.
10. Ertabaklar H, Turk M, Dayanir V, Ertug S, Walochnik J, 2007. Acanthamoeba keratitis due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Res.* 100(2):241-6.
11. Akyol A, Bicerol B, Ertug S, Ertabaklar H, Kiylioglu N. 2007. Epilepsy and seropositivity rates of *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Seizure.*16(3):233-7
12. Okyay P, Ertabaklar H, Savk E, Ertug S, 2007. Response to forton. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 21(9):1302.
13. Karadam SY, Ertug S, Ertabaklar H, Okyay P, 2008. The comparison of IgG antibodies specific to *Toxocara spp.* among eosinophilic and non-eosinophilic groups. *New Microbiol.* 31(1):113-6.
14. Yavasoglu I, Kadikoylu G, Uysal H, Ertug S, Bolaman Z, 2008. Is *Blastocystis hominis* a new etiologic factor or a coincidence in iron deficiency anemia? *Eur J Haematol.* 81(1):47-50.
15. Pasa S, Bayramli G, Atasoy A, Karul A, Ertug S, Ozensoy Toz S, 2009. Evaluation of serum cystatin-C in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Res Commun.* 33(6):529-34.
16. Tamer GS, Yolasigmaz A, Ertug S, Altintas N, 2009. The investigation of congenital toxoplasmosis in a tertiary care hospital in Turkey. *Saudi Med J.* 30(5):647-51.
17. Ertuğ S, Ertabaklar H, Yaman Karadam S, Dayanır Y.K., 2010. Kistik ekinokokkozis: Aile Enfeksiyonu. *J Med.Sci.* 30(5).1724-1726.

2- Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1-Kuman HA, Ertuğ S, Özensoy S, Gürüz AY, 1999. Akut toxoplasmosis tanısında yararlanılmak üzere anti-toxoplasmosis IgM antikorlarının çeşitli ticari kitlerle araştırılması ve kitlerin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi.* 23(3):227-232.

- 2- Ertuğ S, Üner A, 1999. *Toxoplasma* antijenik proteinlerinin immun yanıtın oluşmasında ve toxoplasmosis tanısındaki yerleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 23(4):359-366.
- 3-Üner A, Ertuğ S, Yurdagül C, Ertabaklar H, Akısü Ç, 1999. İzmir ve çevresinde insanlarda blastocystosis yaygınlığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 23(3):247-250.
- 4-Aksoy Ü, Ertuğ S, Ak M, 1999. Amoebiasisin tanısında serolojik ve moleküler biyolojik yöntemler. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 23(3):301-308.
- 5-Ertuğ S, Üner A, Aksoy Ü, Gündüz C, Gürüz Y, 2000. Toxoplasmosis tanısında ELISA, IFA ve IHA teknikleri arasındaki uyumun araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(1):4-8.
- 6-Ertuğ S, Üner A, Altıntaş N, Yolasığmaz A, Petersen E, 2000. *Toxoplasma gondii* IgG antikorlarının ELISA ve Western blotting yöntemi ile karşılaştırmalı olarak araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(1):17-21.
- 7-Ertuğ S, Üner A, Altıntaş N, Şakru N, Yazar S, Petersen E, 2000. Toxoplasmosis tanısında ELISA IgG yöntemiyle sınır değerde (borderline) bulunan sonuçların değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(1):9-13.
- 8-Kuman HA, Ertuğ S, Uysalcı M, Dayangaç N, Türk M, Ertabaklar H, Bayram S, Sönmez G, 2000. Türkiye'nin bazı bölgelerinde Sıtma Savaş Birimlerinde çalışanlarda malaria, kisthidatik ve *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan antikorların araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(3):249-254.
- 9-Kuman HA, Ertuğ S, Bayram S, Ertabaklar H, 2000. *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşan antikorların ELISA, IFA ve DA testleri ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(4):333-336.
- 10-Kuman HA, Ertuğ S, Yurdagül C, Ertabaklar H, Dayangaç N, Üner A, 2001. Barsak parazit infeksiyonlarının albendazol ile sağaltımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 25(2):155-158.
- 11-Ertuğ S, Sarı C, Gürel M, Boylu Ş, Çanakalelioğlu L, Şahin B, 2002. Aydın ve çevresinde 1996-2000 yılları arasında cerrahi olarak saptanan kist hidatik olguları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 26(3):254-256.
- 12-Ertuğ S, Aydın N, Gültekin B, Doyuran SE, 2002. Aydın ilindeki Deri leishmaniasisi olgularının retrospektif incelenmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 26(2):140-142.
- 13-Ertuğ S, Aydın N, Gültekin B, Doyuran SE, 2002. 2001 yılında Aydın İl Sağlık Müdürlüğüne ihbar edilen iç organ ve deri leishmaniasis olguları. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 3(1):9-12.

- 14-Eren H, Sarı C, Turgay N, Ertuğ S, 2002. Aydın ilinde sahipli ve sağlıklı köpeklerde *Toxoplasma*'ya özgü IgG antikorlarının İndirekt Fluoresan Testi (IFAT) ile araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 26(4):352-354.
- 15-Uysalcı M, Kuman HA, Üner A, Ertuğ S, 2002. İmmun sistemi baskılanmış sıçanlarda saptanan *Cyclospora sp* tanısında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 26(4):381-387.
- 16-Ertuğ S, Gürel M, Eyigör M, Doyuran ES, 2002. Aydın Yöresinde sıtma olguları *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 3(2):5-8.
- 17-Gültekin B, Eyigör M, Ertuğ S, 2003. Olgu Sunumu:Muğla ilinde saptanan bir yerli kutanöz leishmaniasis olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 27(1):6-8.
- 18-Sarı C, Okyay P, Ertuğ S, 2003. *Toxoplasma*'ya özgü IgG antikorlarının saptanmasında ticari ELISA kiti ile laboratuvarda hazırladığımız ELISA-IFA kitleri arasındaki uyumun ve kit maliyetlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 27(1):1-3.
- 19-Gültekin B, Ertuğ S, Eren H, Karagenç T, Turgay N, Doyuran ES, 2003. Aydın ili Ketendere köyünde visseral leishmaniasis epidemiyolojisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 27(2):102-105.
- 20-Sarı C, Sarı K, Ertuğ S, 2003. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda *Cryptosporidium spp.* ve *Blastocystis hominis* sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 27(3):187-190.
- 21-Gültekin B, Zekioğlu A, Ek OR, Temoçin S, Ertuğ S, 2003. Kapalı Havuzda yüzme sporu yapan çocuklarda bağırsak parazitlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 27(3):207-210.
- 22-Yaman S, Ertabaklar H, Kapdağlı A, Ertuğ S, 2004. 2002 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına toxoplasmosis araştırılması amacıyla başvuran olguların retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(1):1-4.
- 23-Kapdağlı A, Ertabaklar H, Yaman S, Ertuğ S, 2004. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Laboratuvarına 2002 yılında başvuran olgulardaki bağırsak parazitlerinin değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(1):31-34.
- 24-Karataş E, Sarı C, Ertabaklar H, Okyay P, Ertuğ S, 2004. Aydın ilinde üç ilköğretim okulunda *Pediculus capitis* prevalansı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(1):38-41.
- 25-Dayangaç N, Ertuğ S, Korkmaz M, Özensoy S, Özbel Y, 2004. Evaluation of anti-leishmania antibodies in Turkish patients with visceral leishmaniasis using western blot. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(2):69-72.

- 26-Sarı C, Sakarya S, Ertabaklar H, Öncü S, Ertuğ S, 2004. Aydın ilinde 2001-2003 yılları arasında saptanan sıtma olgularının değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(3):119-122.
- 27-Ertabaklar H, Ertuğ S, Kafkas S, Odabaşı AR, Karataş E, 2004. Vajinal akıntılı olgularda *Trichomonas vaginalis* araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 28(4):181-184.
- 28-Ertuğrul MB, Ertabaklar H, Uyar G, Ertuğ S, Sakarya S, 2005. Bir olgu nedeniyle visseral leishmaniasis tanı ve tedavisinin tartışılması. *ANKEM Dergisi*. 19(1):48-51.
- 29-Ertabaklar H, DüNDAR S, Aktunç T, Ertuğ S, 2005. Oküler toxoplasmosis: Olgu sunumu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 29(2):73-75.
- 30-Kozacı DL, Ertuğ S, Kavak T, Okyay P, Chikanza IC, Ertabaklar H, 2005. Kutanöz leishmaniasisli olgularda serum makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MİF) değerlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 29(3): 145-148.
- 31-Gürel FS, Ertuğ S, Okyay P, 2005. Aydın il merkezindeki parklarda *Toxocara spp* yumurta görülme sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 29(3): 177-179.
- 32-Karagenç Tİ, Ertabaklar H, Ulutaş B, Aypak S, Ertuğ S, 2005. Aydın yöresindeki sığırlarda *Toxoplasma gondii*'nin seroprevalansı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 16(1):67-70.
- 33-Ertabaklar H, Yaman S, Ertuğ S, 2006. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Parazitoloji Laboratuvarına gönderilen ev tozlarında akar sıklığının araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 30(1):29-31.
- 34-Yazıcı V, Sırıken F, Ertabaklar H, Ertuğ S, 2007. Aydın İl Merkezindeki Hastanelerde Çalışan Mutfak Personelinde Bağırsak Parazitlerinin Araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 31 (2): 136-138.
- 35-Karadam SY, Ertabaklar H, Ertuğ, 2008. Aydın'da üç farklı kreş ve anasınıfındaki çocuklarda bağırsak parazitlerinin dağılımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 32(3):257-260.
- 36-Sarı C, Ertuğ S, Karadam SY, Özgün H, Karaoğlu AO, Ertabaklar H, 2009. Kistik ekinokokkozis tanısında ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) Indirekt Hemaglutinasyon Test(IHA) ve Indirekt Floresan Antikor Testi (IFAT)'nin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 33(1):73-76.
- 37-Karul A, Ertabaklar H, Karataş E, Ertuğ S, 2009. Serum leptin concentrations in patients with intestinal parasites. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 33(3):207-11.
- 38-Karadam SY, Ertabaklar H, Sarı C, Dayanır Y, Ertuğ S, 2009. Eozinofil sayısı yüksek olanlarda kistik ekinokokkozis araştırılmalı mı? *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 33(3):203-6.

- 39-Ertuğ S, Dost T, Ertabaklar H, Gültekin B, 2009. Blastocystis hominis Enfeksiyonunda Trimetoprim-Sülfametoksazolün etkisi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 33(4):270-272.
- 40-Ertabaklar H, Dayanır V, Apaydın P, Ertuğ S, Walochnik J, 2009. Olgu sunumu: Acanthamoeba Keratiti. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 33(4):283-285.
- 41-Ertabaklar H, Caner A, Döşkaya M, Ova Demirtaş L, Özensoy Töz S, Ertuğ S, Gürüz Y, 2011. Trichomoniasis tanısında polimeraz zincir reaksiyonu ile mikroskopi ve kültür yöntemlerinin karşılaştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 35(1):1-5.
- 42-Karakas S, Özlem S, Metin Tellioglu A, Ertabaklar H, Ertuğ S, 2012. Aydın ilinde Beta Talasemi majörlü olgularda anti-Toxoplasma gondii IgG ve IgM antikörlerinin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 36:3. 133-136.
- 43-Ertabaklar H, Dayanır Y, Ertuğ S, 2012. Aydın ilinin farklı bölgelerinde ultrason ve serolojik yöntemlerle kistik ekinokokkozis araştırılması ve eğitim çalışmaları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 36:3. 142-146.
- 44-Aysul N, Eren H, Gargılı A, Ertabaklar H, Ertuğ S, Şimşek E, Vuruşaner C, 2012. İstanbul İlinde Köpeklerde Zoonotik Visseral Leishmaniasisin Araştırılması. *Animal Health, Prod. and Hyg.* 1: 21-25.
- 45-Ertabaklar H, Ertuğ S, 2014. Çocuklarda sık görülen parazitler. *Clinic Pediatri*. 9(3):22-29.
- 3- *Kitaplarda Bölümler*
- 1-MA Özcel, Üner A, Ertuğ S. 1997. Immunofloresans Yöntemi. Edit. Özcel: MA, Altıntaş N. Parazit Hastalıklarında Tanı, *Türkiye Parazitoloji Derneği*. Yayın No:15. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova-Izmir. 215-259.
- 2-Üner A, Ertuğ S. 1997. Giardiosis'in Epidemiyolojisi Edit: Özcel MA, Üner A. Giardiosis. *Türkiye Parazitoloji Derneği*. Yayın No:14. Ege Üniversitesi Basımevi Bornova-Izmir. 17-37.
- 3-Üner A, Ertuğ S, 1999. Sıtma Vektörleri. Edit: Özcel MA. Sıtma Malaria. *Türkiye Parazitoloji Derneği*. Yayın No:16. Ege Üniversitesi Basımevi. İzmir.75-99.
- 4-Ertuğ S, Dost T, 2005. Nitroimidazol deriveleri. Edit: Akısü Ç, Korkmaz M. Tıbbi Parazitolojide Tedavi. *Türkiye Parazitoloji Derneği*. Yayın No:20. META Basım Bornova-Izmir. 191-203.
- 5-Ertabaklar H, Ertuğ S, 2007, Bölüm II Protozoon Hastalıklarında İmmünite, Trichomoniasis ve İmmunolojisi, Edit:Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, Türkiye Parazitoloji Derneği META Basım Bornova-İzmir. Yayın no:21.82-93.

6-Ertuğ S, Ertabaklar H, 2007, Bölüm II Protozoon Hastalıklarında İmmünite, Giardiosis ve İmmunolojisi, Edit: Özcel MA, Turgay N, İnci A, Köroğlu E, Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, Türkiye Parazitoloji Derneği META Basım Bornova-İzmir. Yayın no:21.64-69.

7-Üner A, Ertuğ S, 2007, Trichinellosis, Edit: Özcel MA, Tıbbi Parazit Hastalıkları Türkiye Parazitoloji Derneği META Basım Bornova-İzmir. Yayın no:22.585-595.

8-Üner A, Ertuğ S, 2007, Çengelli Solucan Hastalıkları (Anclostomosis-Necatoriosis) , Edit: Özcel MA, Tıbbi Parazit Hastalıkları. Türkiye Parazitoloji Derneği META Basım Bornova-İzmir. Yayın no:22.743-754.

9-Ertabaklar H, Ertuğ S, 2009. Parazitlerin Saptanması ve İdentifikasyonu için algoritma. Edit: Başustaoğlu A, Klinik Mikrobiyoloji 9.Baskı. Atlas Kitapçılık Tic.Ltd.Şti. Ankara. 2020-2039.(Çeviri Kitap)

10-Ertuğ S, Bozdoğan B, 2009. Hibridizasyon Yöntemleri. Moleküler Parazitoloji. Edit:Özcel MA,Tanyüksel M,Eren H. Meta Basım, Yayın No:22. İzmir. 255-271.

11-Ertug S, 2011. Hızlı Tanı Testleri. edit:Korkmaz M,Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. Türkiye Parazitoloji Derneği.Yayın No:23. Say 255-258.

12-Ozcel MA, Uner A, Ertug S, 2011. Parazitolojide immunofluoresans. edit:Korkmaz M,Ok ÜZ. Parazitolojide Laboratuvar. Türkiye Parazitoloji Derneği.Yayın No:23. Say 209-218.

13-Ertabaklar H, Ertuğ S. 2014. Edit: Garcia SL, Isenberg HD. Çeviri Baş Editörleri Başustaoğlu A, Yıldırım ŞT, Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı. Parazitlerin Saptanması ve İdentifikasyon Algoritması. Cilt 2.Bölüm 9. 5;1,2,3,4. 3.Baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.(Çeviri Kitap)

4-Uzmanlık tezi:

1-Ertuğ S, 1999. Toxoplasmosis tanısında ELISA sonuçlarının standardizasyonu ve Western blot ile doğrulanması.

5-Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

1-Altıntaş N, Yolasıgımaz A, Sakru N, Yazar S, Ertug S. A sero-epidemiological study of visceral leishmaniosis in Izmir and surrounding areas, Turkey. First World Congress on Leishmaniosis. 5-9 May 1997. İstanbul, Turkey. (Poster)

2-Altıntaş N, Ertug S, Yolasıgımaz A, Sonmez G, Uysalcı M, Kultursay N, Oztekin K, Sendag F, Guruz Y, Altıntaş N, Petersen E. Investigation of congenital toxoplasmosis in Izmir, Turkey. Preliminary study. European Conference on Congenital Toxoplasmosis. June29-July 1 2000. Vienna. (Poster)

- 3-Kuman A, Ertug S, Yurdagul C, Ertabaklar H, Dayangac N, Uner A. Albendazole in the treatment of intestinal parasitosis. VIII European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), July,2000. Poland. (Poster)
- 4-Dayangac N, Ozbel Y, Ertug S, Korkmaz M. Evaluation of anti-*Leishmania* antibodies in patients with visceral leishmaniasis using Western Blot. World Leish 2, May 20-24, 2001. Crete, Greece. (Poster)
- 5-Ertug S, Aydın N, Gultekin B, Doyuran ES. Cutaneous and visceral leishmaniasis in Aydın,Turkey January-November, 2001. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 12-24 April 2002. Milan, Italy. (Poster)
- 6-Ertug S, Karakas S, Okyay P, Ergin F, Oncu S. *Blastocystis hominis* and growth in children. VI International Symposium of Clinical Anatomy. 8-10 October 2004. Varna, Bulgaria. (Poster)
- 7- Ertabaklar H, Oncu S, Ertug S. New focus of cutaneous leishmaniasis in Turkey. IX. European Multicolloquium of Parasitology.18-23 July 2004. Valencia, Spain.
- 8- Kose S, Ertabaklar H, Ozensoy Toz S, Ertug S, Ozbel Y. Detection of *Leishmania* infection in asymptomatic blood donors in Izmir province, Turkey. 3th World Congress on Leishmaniosis.10-15 April 2005. Sicily, Italy. (Poster)
- 9- Ertabaklar H, Karul A, Karatas E, Ertug S. Serum leptin concentrations in patients with intestinal parasite. XXIII.World Congress of Pathology and Laboratory Medicine. 26-30 May 2005. İstanbul, Turkey. (Poster)
- 10-Akyol A, Bicerol B, Ertug S, Ertabaklar H, Kiylioglu N. Comparing seropositivity rates of *Toxocara* and *Toxoplasma* between patients with cryptogenic epilepsy and healthy. 26th International Epilepsy Congress. 28-August-1 September 2005. Paris, France. (Poster)
- 11-Güneş K,Özensoy Töz S, Ertabaklar H, Ertuğ S, Özbel Y, The determination of species and genotypes of *Leishmania* spp. using PCR-RFLP assays in clinical samples of patients and reservoir in Turkey. Xth European Multicolloquium of Parasitology, 24-28 August, 2008. Paris, Fransa,(Sözlü Bildiri)
- 12-Ertabaklar H, Ertuğ S, Okyay P, Karagenç T, Eren H, Özbel Y, An epidemiological survey for human and canine leishmaniasis in Aydın province,Turkey: A pilot study. Xth European Multicolloquium of Parasitology 24-28 August, 2008. Paris, Fransa (Poster).
- 13- Ertug S, Ertabaklar H, Yaman S, Dayanır Y, Cystic echinococcosis: Family infection. 13. Congreso Mundial de Hidatidologia. 9-11 Aralık 2009.s:91. Uruguay. (Poster).

14-Özensoy Töz S, Güneş S, Ertabaklar H, Ertuğ S, Özbel Y, The determination of species and genotypes of leishmania spp using PCR in clinical samples in Turkey. Worldleish 4, 03-07 February 2009, Lucknow, India.(sözlü sunum) s.84.

15-Balcıoğlu IC, Ertabaklar H, Ertuğ S, Paşa S, Ölge KM, Özensoy S, Alkan ZM, Franco A, Cox J, Ready P, Ozbel Y. Spatial and enviromental models for human and canine leshmaniasis in the Aydın mountains in western Turkey EDEN 2010. 10-12 Mayıs Fransa,2010, s:22

16-Seyrek K, Ertabaklar H, Ertuğ S, Bildik A, Kıral F, Akşit H, Boduc E, Gokbulut C, Pasa S, Ozbel Y, Inspite of increased nitric oxide production heat stres protects Leishmania tropica from apoptosis.IV Annual Meeting COST Action BM0802 Life or Death of Protozoan Parasites.January 19-21,2012.Milano,Italy.(Poster)

6-Tez danışmanlığı

1-Kistik ekinokokkozis tanısında ELISA, IHA, IFAT ve Western blot yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. Dr.Cavide SARI, 2003. (Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi)

2-Aydın ilinde eozinofili saptanan olgularda *Fasciola spp*, ve *Toxocara spp*'ye özgü IgG antikorlarının araştırılması. Dr.Senem YAMAN KARADAM, 2005. (Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi)

7- Projeler

Yönetici olarak görev aldığı projeler:

1-Aydın İlinde İnsan ve Köpek Leishmaniasisinin Epidemiyolojisi, Tanı, Tedavi ve Kontrolü. ADÜ Araştırma Fonu, 2002.

2-Kistik Ekinokokkozis Serolojik Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi. ADÜ Araştırma Fonu, 2001. (Tez Projesi)

3-Aydın İlinde Konjenital Toxoplasmosis Prevalansı. ADÜ Araştırma Fonu, 2001.

4-Aydın İlinde Eozinofili Saptanan Olgularda Parazitolojik, Serolojik ve Radyolojik Yöntemler ile Fasciolosis Araştırılması. ADÜ Araştırma Fonu, 2004. (Tez Projesi)

5-Aydın ilinde insandan izole edilen Giardia intestinalis genotiplerinin tanımlanması Sema Ertuğ, Hatice Ertabaklar . ADÜ Araştırma Fonu,2007.

6- Aydın ilinde elde edilen Blastocystis hominis izolatlarının genetik varyasyonlarının araştırılması. Sema Ertuğ, Hatice Ertabaklar, Bülent Bozdoğan, Serçin Özlem. ADÜ Araştırma Fonu, 2012.

7- Dışkıda Giardia intestinalis tanısında üç yöntemin (Mikroskopik İnceleme, Direkt Floresan Antikor Testi, İmmunokromatografik Yöntem) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi Ertuğ S, Yaman Karadam S, ADÜ Araştırma Fonu, 2006.(Tez Projesi)

8-Kistik ekinokokkozis tanısında hızlı tanı testinin uygulanabilirliğinin ve western blotting yöntemi ile karşılaştırılması. ADÜ Araştırma Fonu. 2014. Sema Ertuğ, Hatice Ertabaklar, Erdoğan Malatyalı, Serçin Özlem.

Katılımcı Olarak Görev Aldığı Projeler

1-Aydın İli İlköğretim Öğrencilerinde Barsak Parazitleri Prevalansı İle Risk Faktörlerinin Saptanması. ADÜ Araştırma Fonu, 2001.

2-Aydın İlinde Gebe Kadınlarda *Toxoplasma* Seroprevalansı ve Taniya Yönelik Testlerin Karşılaştırılması. DPT Projesi, 2002.

3-Gebe Kadınlarda toxoplasmosis Tanısına Yönelik Testlerin Birinci Basamak Sağlık Hizmetlerine Entegrasyonu ve Etkinliklerinin Karşılaştırılması. ADÜ Araştırma Fonu, 2002.

4-*Trichomonas vaginalis* Suşlarında Virulans, in vitro Metronidazol Duyarlılığı ve RAPD Yöntemi ile Alt Türlerin Araştırılması. DPT Projesi, 2003.

5- Aydın İlinde İnsan ve Hayvan Sağlığını Tehdit Ederek Ciddi Ekonomik Kayıplara Neden Olan Kist Hidatik ve Fasciolosis'in Epidemiyolojisi, Tanı, Tedavi ve Kontrolü. ADÜ Araştırma Fonu, 2003.

6- *Trichomonas vaginalis* Suşları ITS Bölgelerinin Karşılaştırılarak Tür İçi Farklılıklarının Araştırılması. Hatice Ertabaklar, Sema Ertuğ ADÜ Araştırma Fonu, 2008.

7-*Leishmania tropica* Promastigot ve Amastigotlarının Apoptozisinde Galektin-3 ve Bcl-2'nin Rollerini ile Oksidatif Stresin Etkilerinin Araştırılması. Kamil Seyrek, Hatice Ertabaklar, Ayşegül Bildik, Sema Ertuğ, Cengiz Gökbulut, Funda Kıral, Serdar Paşa, COST projesi, 2010.

8- Kutanöz Leishmaniasisli Olgularda Lezyondan Alınan Yayma Örneğinden PZR-RFLP İle *Leishmania* Türünün Araştırılması Hatice Ertabaklar, Sema Ertuğ, Bülent Bozdoğan, Serçin Özlem. ADÜ Araştırma Fonu, 2012.

9- *Leishmania tropica*nın gren fluorescent protein reporter (GFP) geni ile transfeksiyonu ve in vitro ilaç etkisinin araştırılması modelinde kullanımı. Sema Ertuğ, Hatice Ertabaklar, Erdoğan Malatyalı, Serçin Özlem. ADÜ Araştırma Fonu. 2014.

