



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
VİH-2020- 0005

**VİSCERAL LEİSHMANİASİS'Lİ KÖPEKLERDE DERMAL
LEZYONLARIN BİYOFİZİKSEL MUAYENESİ**

GİZEM GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kerem URAL

AYDIN-2020

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**VİSCERAL LEİSHMANİASİS'Lİ KÖPEKLERDE DERMAL
LEZYONLARIN BİYOFİZİKSEL MUAYENESİ**

GİZEM GÜL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kerem URAL

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yaşam Döngüsü	3
2.2. Dağılım ve Epidemiyoloji	5
2.3. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Anormallikleri	6
2.3.1. Dermatolojik Bulgular	10
2.4. Tanı	12
2.4.1. Moleküler Tanı.....	16
2.4.1.1. Parazit hedefleri	16
2.4.1.2. Numune kaynağı	19
2.4.1.3. POC (Point of care) moleküler testleri.....	19
2.4.2. Serolojik Tanı.....	21
2.4.2.1. Serodiyagnoz için kullanılan antijenler.....	22
2.5. Hastalığın Evrelendirmesi	24
2.5.1. Evre-1 (Hafif Şiddetli Hastalık).....	24
2.5.2. Evre-2 (Orta Şiddetli Hastalık)	24
2.5.3. Evre-3 (Şiddetli Hastalık)	25
2.5.4. Evre-4 (Çok Şiddetli Hastalık).....	26
2.6. Sağaltım ve Prognoz	26
2.7. Deri Muayenesine Ait Fiziksel Biyobelirteçler.....	27
2.7.1. Deri Nemi.....	27

2.7.2. Deri pH.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1.Hayvan Materyali	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Gruplandırma Protokolü.....	29
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri	31
3.2.2.1. İndirekt floresan antikor testi (IFAT).....	32
3.2.2.1.1. Leishmania IgG IFAT içeriği:.....	32
3.2.2.1.2. Test prosedürü ve uygulanması.....	33
3.2.2.1.3. Sonuçların yorumu	34
3.2.2.2. Serum biyokimyasal analizler	34
3.2.2.3. İdrar analizleri	35
3.2.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu	35
3.2.3. Derinin Biyofiziksel Muayenesi	36
3.2.3.1 Hidrasyon	37
3.2.3.2. Elastikiyet.....	38
3.2.3.3. Melanin	39
3.2.3.4. Sıcaklık.....	40
3.2.3.5. pH.....	41
3.2.4. İstatistiksel Analizler.....	42
4.BULGULAR	43
4.1. Sağlıklı ve Evrelendirme Yapılan Olgularda Demografik Bulgular	43
4.2. Dermatolojik Bulgular	44
4.2.1. V.Grup (Sağlıklı- Kontrol).....	44
4.2.2. I.Grup (Evre 1 CVL)	45
4.2.3. II. Grup (Evre 2 CVL).....	46
4.2.4. III. Grup (Evre 3 CVL)	47
4.2.5. IV. Grup (Evre 4 CVL)	48
4.3. Laboratuvar Bulguları	49
4.3.1. IFAT Bulguları.....	49
4.3.2 ELISA ve PZR Bulguları	50
4.3.3 Biyokimyasal Bulgular.....	50
4.3.4. İdrar Analiz Bulguları	51

4.4. Biyofiziksel Muayene Bulguları	51
5.TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	90
ÖZGEÇMİŞ	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
µM	: mikrometre
BALB/c	: fare türü
bp	: Baz çifti
c.u.	: küp
CBC	: Tam kan sayımı
CD21+	: B hücresi reseptörü
CD4+	: Yardımcı T hücreleri
CD8+	: Sitotoksik T hücreleri
cPZR	: Konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CVL	: Canine Visceral Leishmaniasis
DAT	: Doğrudan aglütinasyon testi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etildiamintetraasetik asit
ELISA	: Enzime Bağlı İmmunosorbent Testi
FAST	: Hızlı aglütinasyon taraması testi
gp-63	: Glikoprotein- 63
IFAT	: İmmun Floresan Antikor Testi
Ig A	: İmmunglobulin A
Ig E	: İmmunglobulin E
Ig G	: İmmunglobulin G
Ig G1	: İmmunglobulin G1
Ig G2	: İmmunglobulin G2
IRIS	: Uluslararası Nefroloji Derneği
ITS-1	: İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer)
K₂HPO₄	: Dipotasyum fosfat
kDNA	: Kinetoplast Deoksiribonükleik asit
kg	: Kilogram
<i>L. amazonensis</i>	: <i>Leishmania amazonensis</i>

<i>L. braziliensis</i>	: <i>Leishmania braziliensis</i>
<i>L. donovani</i>	: <i>Leishmania donovani</i>
<i>L. infantum</i>	: <i>Leishmania infantum</i>
<i>L. major</i>	: <i>Leishmania majör</i>
<i>L. tropica</i>	: <i>Leishmania tropica</i>
L150 / L152	: Gen çeşidi
LAMP	: Döngü aracılı izotermal amplifikasyon
Lt	: Litre
MAPIA	: Çoklu antijen baskılayıcı immunoassay
MC1	: DNA primeri
MC2	: DNA primeri
mg/dL	: miligram / desilitre
MHC-II	: Major Doku Uygunluk Kompleksi- II
mL	: mililitre
mM	: Milimetre
N- RAMPI	: Doğal Direnç ile İlişkili Makrofaj Protein
NaCl	: Sodyum klorür
NaH₂PO₄	: Monosodyum fosfat
ng	: Nanogram
PBS	: Fosfat tamponlu salin
pH	: Asitlik ya da bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi
POC	: Hasta başında test (Point of care)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPZR	: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği
rK26	: Rekombinant protein çeşidi
rK39	: Rekombinant protein çeşidi
rKE16	: Rekombinant protein çeşidi
rKOL8	: Rekombinant protein çeşidi
RNA	: Ribonükleik asit
RPA	: Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu
RPA-LF	: Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu Lateral Akış Testi
RV1	: DNA primeri

RV2	: DNA primeri
<i>S. xylosus</i>	: Stafilococcus xylosus
Slc11c1 geni	: Solüt Taşıyıcı Ailesi- Üye 11 geni
spp	: Tür
TEWL	: Transepidermal su kaybı
tRNA	: Ribozomal RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>L. infantum</i> 'un yaşam döngüsü	4
Şekil 2. Kan donörlerinin seçimini tanımlayan algoritma.....	4
Şekil 3. <i>L. infantum</i> enfeksiyonunun klinik belirtileri ve immünolojik özellikleri	5
Şekil 4. CVL ile uyumlu köpeklere tanı yaklaşımı için akış şeması	13
Şekil 5. CVL için en yaygın tanı yöntemleri	14
Şekil 6. CVL için serolojik kalitatif hızlı testlerin yorumlanması.....	14
Şekil 7. Belirsiz CVL olgularında qPZR' in prognostik değeri	18
Şekil 8. qPZR için tercih edilen doku.....	18
Şekil 9. Bu tez kapsamında teşhis yöntemlerine ait algoritma	32
Şekil 10. Sağlıklı ve Leishmaniasis ile enfekte köpeklerde deri pH değerleri	52
Şekil 11. Sağlıklı ve Leishmaniasis ile enfekte köpeklerde deri melanin değerleri	52
Şekil 12. Korneometrik analizlerden melanin ölçümüne ait ısı haritası.....	53
Şekil 13. Korneometrik analizlerden elastikiyet ölçümüne ait ısı haritası	53
Şekil 14. Korneometrik analizlerden sıcaklık ölçümüne ait ısı haritası	54
Şekil 15. Korneometrik analizlerden hidrasyon ölçümüne ait ısı haritası.....	54
Şekil 16. Korneometrik analizlerden pH ölçümüne ait ısı haritası.....	55

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. CVL kutanöz lezyonların farklı şekilleri	8
Resim 2. CVL’ de bulunan bazı klinik bulgular	9
Resim 3. Sitolojinin yorumlanması.....	9
Resim 4. Fizik muayene ve laboratuvar testleri ile klinik sınıflandırma	13
Resim 5. Moleküler tanının diagnostik önemi	20
Resim 6. Spot-Chem EZ sp-4430 biyokimya cihazı	34
Resim 7. PZR için örnek alınması ve görselleştirilmesi	36
Resim 8. PZR aşamaları	36
Resim 9. Callegari Soft Plus Cihazı	37
Resim 10. Callegari Soft Plus Cihazı ile derinin biyofiziksel muayenesi.....	37
Resim 11. Deri hidrasyonunu ölçen probun özellikleri.....	38
Resim 12. Deri elastikiyetini ölçen probun özellikleri.....	39
Resim 13. Deri melanin seviyesini ölçen probun özellikleri.....	40
Resim 14. Deri sıcaklığını ölçen probun özellikleri.....	41
Resim 15. Deri pH’sını ölçen probun özellikleri	42
Resim 16. Sağlıklı-Kontrol grubu (Olgu No 8).....	44
Resim 17. Sağlıklı-Kontrol grubu (Olgu No 6).....	45
Resim 18. Evre I CVL (Olgu No 1)	45
Resim 19. Evre I CVL (Olgu No 6)	46
Resim 20. Evre II CVL (Olgu No 3).....	46
Resim 21. Evre II CVL (Olgu No 6).....	47
Resim 22. Evre III CVL (Olgu No 1).....	47
Resim 23. Evre III CVL (Olgu No 3).....	48
Resim 24. Evre IV CVL (Olgu No 6)	48
Resim 25. Evre IV CVL (Olgu No 7)	49

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. CVL'nin klinik bulguları ve laboratuvar anormallikleri.....	7
Tablo 2. Organlarda veya vücut sıvılarında sitolojik ve histopatolojik bulgular	8
Tablo 3. PZR için kullanılacak dokuların seçimi ve PZR teknikleri.....	15
Tablo 4. cPZR için kullanılan primer sekans dizileri	17
Tablo 5. CVL Evre 1	24
Tablo 6. CVL Evre 2.	25
Tablo 7. CVL Evre 3.	25
Tablo 8. CVL Evre 4.	26
Tablo 9. Leishmaniasis'te evrelendirme.....	30
Tablo 10. Tez çalışmasında izlenen laboratuvar yöntemleri	31
Tablo 11. Leishmaniasis ile enfekte olgulara ait demografik bulgular	43
Tablo 12. Sağlıklı gruba ait demografik bulgular	44
Tablo 13. Çalışmada oluşturulan ilgili gruplara ait IFAT (titrasyon) bulguları.....	50
Tablo 14. ELISA ve deri PZR bulguları.....	50
Tablo 15. Olguların deri pH, hidrasyon, elastikiyet, sıcaklık ve melanin değerleri.....	51

ÖZET

VİSCERAL LEİSHMANİASİS'Lİ KÖPEKLERDE DERMAL LEZYONLARIN BİYOFİZİKSEL MUAYENESİ

Gül G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2020.

Bu tez çalışmasında Leishmaniasisli hayvanlarda derinin korneometrik analizleri yapıp hastalığın deriyi ne oranda etkilediği tespit edilerek uygulanacak sağıltım modülüne ışık tutması amaçlandı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine Canine Visceral Leishmaniasis pozitif (n=28) ve sağılıklı (n=10) olan farklı ırk, yaş ve cinsiyette toplamda 38 köpek çalışma kapsamına alındı. Leishmaniasis tanısında klinik bulgular ile birlikte hızlı test kitleri (ELISA), IFAT ve PZR yöntemleri kullanıldı. Evrelendirme Leishvet grubunun rehber bülteni ile uyumlu olarak idrar protein/ kreatinin ve kan kreatinin düzeyleri dikkate alınarak yapıldı. Çalışmaya alınan CVL'li köpekler 4 farklı gruptan birinde (her grupta n=7) değerlendirildi. Buna göre; I. grup: evre 1 (hafif), II. grup: evre 2 (orta şiddetli), III. grup: evre 3 (şiddetli), IV. grup: evre 4 (çok şiddetli) olarak değerlendirildi. Sağılıklı kontrol grubu (V. grup) ise ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Küçük Hayvan Kliniğine rutin kontrol amaçlı getirilen, klinik ve laboratuvar bulgularında herhangi bir anormallik saptanmayan farklı ırk, yaş ve cinsiyette köpeklerden (n=10) oluştu. Sağılıklı ve hasta hayvanlarda derinin hidrasyonu, elastikiyeti, sıcaklığı ve melanin miktarı ölçülerek biyofiziksel muayene gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri sonucunda sağılıklı köpeklere göre tüm evrelerdeki Leishmaniasis'li köpeklerde pH değerinde azalma belirlenirken ($p<0.001$), melanin değerleri evre I ve III grubu köpeklerde, sağılıklı ile evre II ve IV'teki köpeklere göre yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Hidrasyon, elastikiyet ve sıcaklık parametrelerinde gruplar arası farklılıkların istatistiksel anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak Visceral Leishmaniasis saptanan köpeklerde dermal lezyonların biyofiziksel muayenesinin önem teşkil ettiği ve uygulanacak sağıltım modülüne ışık tutabileceği öne sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: Biyofiziksel muayene, korneometrik analiz, köpekler, leishmaniasis

ABSTRACT

BIOPHYSICAL EXAMINATION OF DERMAL LESIONS IN DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

**Gül G. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Internal
Medicine (Veterinary) Program, Master's Thesis, Aydın, 2020.**

In this study, corneometric analysis of the skin in animals with Leishmaniasis was carried out and the effect of the disease on the skin was determined to shed light on the treatment module to be applied. A total of 38 dogs of different breeds, ages and gender of Canine Visceral Leishmaniasis positive (n = 28) and healthy (n = 10) were included in the study. In the diagnosis of leishmaniasis, rapid test kits (ELISA), IFAT and PCR methods were used together with clinical findings. The staging was performed by considering urine protein / creatinine and blood creatinine levels in accordance with the guidance bulletin of the Leishvet group. The dogs with CVL included in the study were evaluated in one of 4 different groups (n = 7 in each group). According to this; Group I: stage 1 (mild), II. Group: stage 2 (moderate), Group III: stage 3 (severe), IV. group: stage 4 (very severe). Healthy control group (Group V) consisted of dogs of different breeds, ages and gender (n = 10) who were brought to ADU Veterinary Faculty Internal Medicine Department of Small Animal Clinic for routine control. Biophysical examination was performed by measuring the hydration, elasticity, temperature and amount of melanin in healthy and sick animals. As a result of statistical analysis of the data obtained in the dogs with Leishmaniasis in all stages compared to healthy dogs, a decrease in pH was determined (p <0.001), while melanin levels were higher in Stage I and III dogs compared to healthy and Stage II and IV dogs (p <0.01). There was no statistically significant difference between the groups in hydration, elasticity and temperature parameters (p > 0.05). In conclusion, it can be suggested that biophysical examination of dermal lesions is important in dogs with Visceral Leishmaniasis and may shed light on the treatment module to be applied.

Keywords: Biophysical examination, corneometric analysis, dogs, leishmaniasis

1.GİRİŞ

Leishmania infantum'a bağlı Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), insanlar ve köpekler için potansiyel olarak ölümcül olan, insanlara ana enfeksiyon rezervuarını oluşturan önemli bir küresel zoonozdur (Gramiccia ve Gradoni, 2005). CVL, dünyadaki 70'den fazla ülkede endemiktir. Güney Avrupa, Afrika, Asya, Güney ve Orta Amerika bölgelerinde bulunur (Baneth ve ark, 2008) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) de bildirilmiştir (Petersen ve Barr, 2009). Ayrıca, ithal hasta veya enfekte olmuş köpekler endemik olmayan ülkelerde veteriner hekimliği ve halk sağlığı alanında önemli bir risk oluşturmaktadır (Shaw ve ark, 2009).

CVL vakalarının yaklaşık % 80-90'ında deri lezyonları çok yaygındır (Slappendel, 1988; Koutinas ve ark,1999; Solano-Gallego ve ark, 2001). Gerçekte, hastalıklı köpeklerin klinik olarak normal derisinden elde edilen biyopsilerin % 50-100'nde, parazitten etkilenmiş deriye benzer şekilde, parazitin hematojen yayılmasına (Solano-Gallego ve ark, 2004) sekonder olarak mikroskopik lezyonların varlığı göz önüne alındığında, kutanöz tutulum daha da sık görülür (Solano-Gallego ve ark, 2004; Papadogiannakis ve ark, 2005).

CVL, geniş klinik bulgular ve şiddet dereceleri ile kendini gösterir ve bu hastalığın yönetimi konusunda yeterli bilimsel anlaşma yoktur (Baneth ve ark, 2008). LeishVet, Avrupa'daki akademik kurumlardan ve CVL ile ilgili ana klinik ve bilimsel ilgiye sahip Akdeniz havzasından bir grup veteriner bilim insanıdır. LeishVet'in temel amacı, kanıta dayalı literatür ve klinik deneyime dayalı olarak köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonu konusunda en güncel anlayışı temsil edecek konsensüs nerileri geliştirmektir (Baneth ve ark, 2008).

Deri bir hayvan ve dış vre arasında fizyolojik bir bariyer görevi görmektedir. Derinin bariyer fonksiyonlarını ve biyofiziksel özelliklerini değerlendirmek için çeşitli biyofiziksel parametreler ölçülmektedir, bunlardan bir tanesi su kaybının kontrolüdür (Oh ve Oh, 2009; 2010). Sadece su kaybı değil aynı zamanda derinin hidrasyonu ve deri pH'sı da derinin bu önemli karmaşık bariyer fonksiyonunu etkileyen faktörlerin değerli göstergelerini sağlamaktadır (Oh ve Oh, 2009; 2010). Hidrasyon durumu, su kaybı, pH ve bunları etkileyen faktörlerin bilinmesi, sadece bariyer fonksiyonundaki fizyolojik değişikliklerin anlaşılması için değil, aynı zamanda deri hastalıklarında su kaybının etkisinin yorumlanması için de önem teşkil etmektedir (Oh ve Oh, 2009; 2010).

Bu tez çalışmasında Leishmaniasis'li hayvanlarda derinin korneometrik analizleri yapıp hastalığın deriyi ne oranda etkilediği tespit edilerek uygulanacak sağaltım modülüne ışık tutması amaçlanmıştır. Çalışma sonuçları ile hastalığın prognozunu değerlendirilmesi ve sağaltım monitorizasyonunda kullanılabilir önemli bulgulara ulaşılabilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

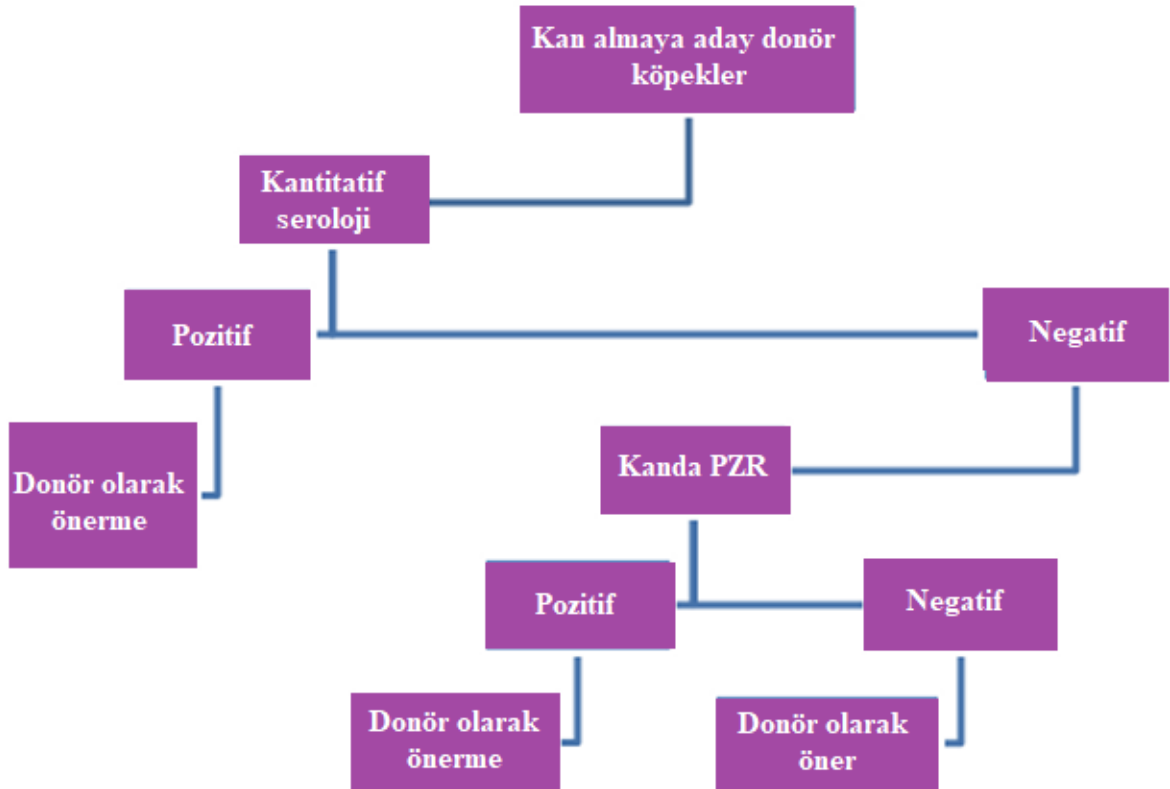
2.1. Yaşam Döngüsü

Leishmania yaşam evresini iki konakçıda, flagella enfekte promastigot formunu ileten bir kum sineği vektörünü ve hücre içi amastigot formunun geliştiği ve çoğaldığı bir memelide tamamlar (Şekil 1). Kum sinekleri, Leishmania'nın biyolojik bulaşmasına uyarlanmış tek eklembacaklılardır. *L. infantum*'u barındıran nispeten düşük orandaki kum sinekleri (%0.5-3) endemik bölgelerde enfeksiyonun korunması için yeterlidir. Kum sineği olmadan da bulaşma tanımlanmıştır, ancak leishmaniasis'in doğal seyri ve epidemiyolojisindeki rolleri belirsizliğini korumaktadır (Şekil 1). Kum sineği olmadan meydana gelen bulaşmada enfeksiyonun taşıyıcıları olan donörlerden (De Freitas ve ark, 2006; Tabar ve ark, 2008) transfüze edilmiş kan ürünleri (Owens ve ark, 2001), dikey (Rosypal ve ark, 2005; Pangrazio ve ark, 2009; Boggiatto ve ark, 2011) ve veneral iletim (Silva ve ark, 2009) bulunmaktadır. Leishmaniasis enfeksiyonunun önlenmesi için köpek kan donörlerinin yeterli seçimi büyük önem taşımaktadır ve verici seçimi ile ilgili öneriler Şekil 2'de grafiksel olarak özetlenmektedir.

Şüpheli ve henüz kanıtlanmamış iletim şekilleri şunlardır: ABD'de (Duprey ve ark, 2000; 2003) ya da Avrupa'daki (Chamaille ve ark, 2010) damızlık köpek kulübelerinde tarif edildiği gibi, görünür vektörlerin yokluğunda endemik olmayan bölgelerdeki otoktonun CVL klinik vakalarının (Shaw ve ark, 2009) varlığını açıklayabilen ısırık ya da yaralar yoluyla doğrudan köpekten köpeğe geçişi ve artropodlar (kene/pire) aracılığıyla bulaşmadır (Coutinho ve ark, 2005; Coutinho ve Linardi, 2007; Dantas-Torres ve ark, 2010; Paz ve ark, 2010a; 2010b; Dantas-Torres, 2011; Dantas-Torres ve ark, 2011).



Şekil 1. *L. infantum*'un yaşam döngüsü (Solano-Gallego ve ark, 2011).



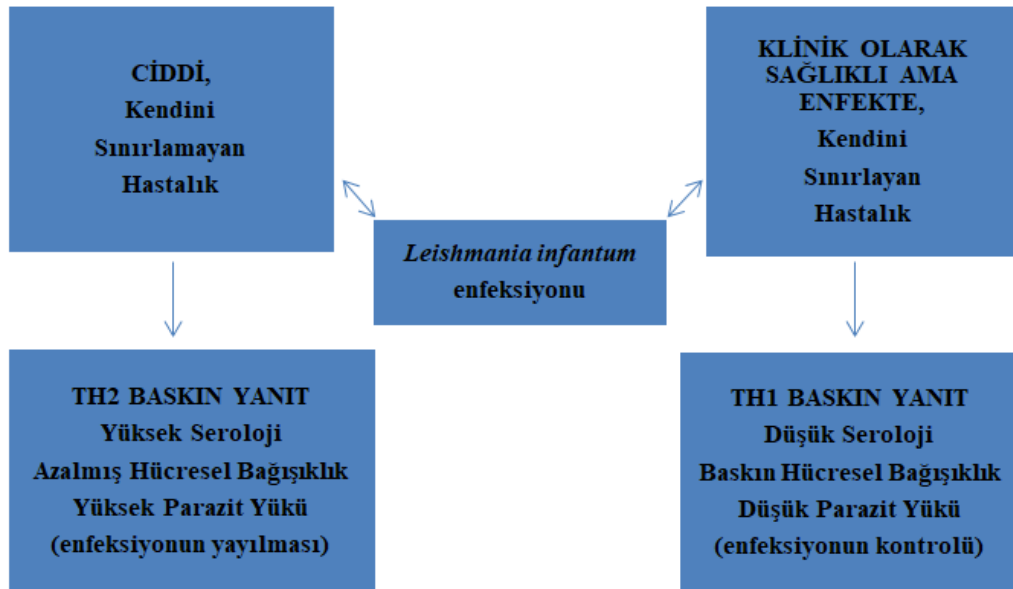
Şekil 2. Kan donörlerinin seçimini tanımlayan algoritma (Solano-Gallega ve ark, 2011).

2.2. Dağılım ve Epidemiyoloji

Sosyoekonomik ve olası iklim faktörleri Avrupa'da CVL'in dağılımında değişikliklere yol açmıştır. *L. infantum* enfeksiyonu kuzeye doğru, kuzey İtalya'daki (Maroli ve ark, 2008) Alplerin eteklerine ve Fransa'daki (Chamaille ve ark, 2010) Pirenelere ve kuzey İspanya'ya (Amusatogui ve ark, 2004) kadar yayılmıştır. Güney Avrupa'ya seyahat eden veya CVL'nin endemik olduğu bölgelerden gelen refakatçi hayvanlar olarak ithal edilen çok sayıda köpek, Birleşik Krallık (Shaw ve ark, 2009) ve Almanya (Men ve ark, 2010) gibi endemik olmayan ülkelerde rapor edilen klinik vaka sayısını artırmıştır.

L. infantum sıklıkla sinsi ve kronik bir hastalık şeklinde karşımıza çıkmaktadır (Peters ve Sacks; 2006). CVL yüksek oranda subklinik seyrederek. (Solano-Gallego ve ark, 2001; Baneth ve ark, 2008).

Geniş bir immün sistem yanıtı ve klinik belirtiler *L. infantum* enfeksiyonunda tanımlanmıştır (Şekil 3). Köpeklerdeki enfeksiyon subklinik veya kendini sınırlayan bir hastalık olabildiği gibi bazen de ciddi ve ölümcül bir hastalık olarak karşımıza çıkabilir (Solano-Gallego ve ark, 2009). CVL subklinik olarak kalmayabilir immunsupresyon ve eşlik eden hastalık gibi faktörler dengeyi bozup köpeklerde klinik olarak hastalığın ilerlemesine yol açmaktadır (Baneth ve ark, 2008; Solano-Gallego ve ark, 2009).



Şekil 3. *L. infantum* enfeksiyonunun klinik belirtileri ve immünolojik özellikleri (Solano-Gallego ve ark, 2011).

İrk, yaş ve genetik dahil olmak üzere hastalığın gelişimi için birçok predispozan faktör tarif edilmiştir. Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler ve Alman Çoban gibi bazı köpek ırkları hastalığın gelişimine daha duyarlı görünmektedir (Sideris ve ark, 1999; Franca-Silva ve ark, 2003). İbiza Hound gibi diğerleri ise nadiren hastalığın klinik belirtilerini göstermektedir (Solano-Gallego ve ark, 2000). Eskiden N-RAMPI olarak adlandırılan Slc11c1 geni ve MHC II genlerinin belirli alelleri CVL'e karşı duyarlılık ile ilişkilendirilmiştir (Quinnell ve ark, 2003; Sanchez-Robert ve ark, 2008). Hastalığın gelişimi için yaş önemli faktörler arasındadır. Hastalığın dağılımı bimodal olup, 3 yaşından küçük ve 8 yaşından büyük köpeklerde yaygın görüldüğü bildirilmiştir (Abranches ve ark, 1991; Cardoso ve ark, 2004).

2.3. Klinik Bulgular ve Laboratuvar Anormallikleri

CVL potansiyel olarak herhangi bir organ, doku veya vücut sıvısında tutulum gösteren ve spesifik olmayan klinik belirtilerle kendini gösteren sistemik bir hastalıktır. CVL'de bulunan en yaygın klinik bulgular ve klinikopatolojik anormallikler Tablo 1'de listelenmiştir (Ciaramella ve ark, 1997; Koutinas ve ark, 1999; Baneth ve ark, 2008). Deri lezyonları, aralarında en sık görülen bulgudur (Resim 1) ve diğer klinik bulgularla veya klinikopatolojik anormalliklerle birlikte görülebilir. Bununla birlikte, köpekler ana başvuru şikayeti olarak kutanöz lezyonlarla ilişkili olmayan başka klinik belirtilerle de sunulabilir (Resim 2) (Ciaramella ve ark, 1997; Koutinas ve ark, 1999). Böbrek hastalığı, CVL'in tek klinik belirtisi olabilir ve hafif proteinüriden nefrotik sendroma veya son dönem böbrek hastalığına kadar ilerleyebilir. Kronik böbrek yetmezliği, hastalığın ilerlemesinin ve CVL'e bağlı mortalitenin ana nedeninin ciddi bir sonucudur. Enfekte köpeklerde yüksek renal patoloji prevalansına rağmen, (Costa ve ark, 2003; Zatelli ve ark, 2003) renal azotemi nispeten nadir görülen bir laboratuvar bulgusudur. CVL'de sitoloji veya histoloji (Resim 3) ile saptanan yaygın patolojik bulgular (Solano-Gallego ve ark, 2004; Mylonakis ve ark, 2005; Pena ve ark, 2008; Petanides ve ark, 2008) Tablo 2'de listelenmiştir (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Tablo 1. CVL'nin klinik bulguları ve laboratuvar anormallikleri (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik bulgular	Laboratuvar anormallikleri
<u>Genel</u>	<u>Serum proteinleri ve elektroforetogram</u>
Generalize lenfadenopati	Hiperglobulinemi
Letarji	Poliklonal beta ve / veya gammaglobulinemi
Splenomegali	Hipoalbuminemi
Ateş	Albumin / Globulin oranında azalma
Kusma	
Kilo kaybı	
Mukozal membranlarda solgunluk	
Poliüri ve polidipsi	
Diyare (Kronik Kolitis)	
<u>Kutanöz</u>	<u>CBC/Hemostaz</u>
Non-pruritik, alopesi olmayan eksfoliatif dermatitis	Hafif-orta dereceli nonrejeneratif anemi
Eroziv-ülseratif dermatitis	Lökositoz ya da lökopeni
Nodüler dermatitis	Trombositopeni
Püstüler dermatitis	Trombositopati
Papuler dermatitis	Bozulmuş sekonder hemostaz ve fibrinoliz
Onikogrifozis	
<u>Oküler</u>	<u>Biyokimyasal profil / İdrar Tahlili</u>
Blefaritis (eksfoliatif, ülseratif ya da nodüler)	Hafif-şiddetli proteinüri
Konjunktivitis	Renal azotemi
Keratokonjunktivitis	Yüksek karaciğer enzim aktivitesi
Anterior Üveitis	
<u>Diğer</u>	
Epistaksis	
Mukokutanöz ve mukozal ülseratif veya nodüler lezyonlar (oral, genital ve nazal)	
Topallık (poliartritis, osteomyelitis, polimyositis)	
Atrofik myositis	
Vasküler bozukluklar (sistemik vaskülitis, arteriyel tromboembolizm)	



Resim 1. CVL kutanöz lezyonların farklı şekilleri: A) Eksfoliyatif perioküler alopesi ve blefarit; B) Ülseratif nazal mukokutanöz lezyonlar; C) İnguinal bölgede papüler dermatit; D) Burnu çevreleyen nodüler krateriform lezyonlar; E) Ayağın plantar yüzeyinde ülseratif eritematöz lezyonlar; F) Ornielidosis (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Tablo 2. Organlarda veya vücut sıvılarında sitolojik ve histopatolojik bulgular (Solano-Gallego ve ark, 2011)

Organlarda ya da vücut sıvılarında patolojik bulgular

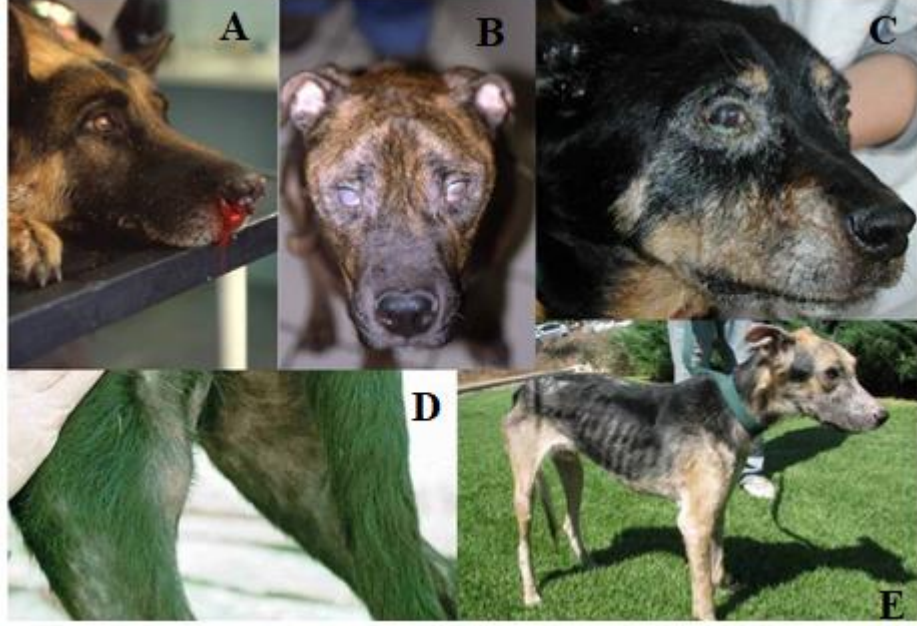
Makrofajik İnflamasyon (Granülositik)

Nötrofilik-Makrofajik İnflamasyon (Pyogranulamatöz)

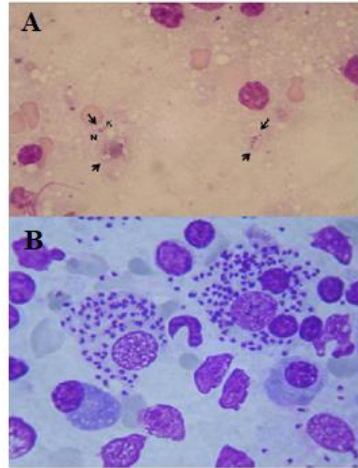
Lenfoplazmitik İnflamasyon

Lenfoid organlarda reaktif hiperplazi

Hücre içi veya hücre dışı *Leishmania amastigotunun* değişken sayılarda bulunması veya bulunmaması



Resim 2. CVL' de bulunan bazı klinik bulgular : A) Epistaksis; B) Bilateral Üveitis ve korneal opasite; C) Pürülan konjunktivit ve blefarit; D) Arka bacakta eksfoliyatif alopesi ve popliteal lenfadenomegali; E) Kaşeksi ve generalize eksfoliyatif alopesi (Solano-Gallego ve ark, 2011)



Resim 3. Sitolojinin yorumlanması: A) Klinik Leishmaniasis'li bir köpekte lenf yumrusu ince iğne aspiratında (x100 Diff-quick b x100 Diff-quick boyama) ekstraselüler amastigot (oklar), çekirdek (N), kinetoplast (K) görülmektedir; B) Klinik Leishmaniasis'li bir köpekte lenf yumrusu ince iğne aspiratında (x100 Giemsa boyama) yüksek sayıda hücre içi ve hücre dışı amastigot görülmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2011).

2.3.1. Dermatolojik Bulgular

Genel olarak simetrik bir dağılımı olan yaygın, multifokal diffüz eksofoliyatif dermatit, CVL'li (Kontos ve Koutinas, 1993; Koutinas ve ark, 2001) köpeklerin % 53-73'ünde mevcuttur ve klinik olarak hipotrikosis-alopesi, eritem ve hiperpigmenti olan veya olmayan pul ve kserozis ile karakterize edilir (Papadogiannakis ve ark,2005). Histopatolojik incelemede perivasküler, intersitisyel, nodüler ve / veya periadneksal olabilen ve pannikulusa kadar uzanabilen granüloamatöz veya pyogranüloamatöz inflamasyon vardır (Scott ve ark, 2001; Ferrer, 2002; Papadogiannakis ve ark, 2005; Saridomichelakis ve ark, 2007). Epidermisin ortokeratotik hiperkeratozu ve kıl folikülleri yaygındır; aynı, makroskopik lezyonların patogeneze önemli ölçüde katkıda bulunabilen sebasöz adenit için de geçerlidir (Scott ve ark, 2001; Papadogiannakis ve ark, 2005). Bu klinik form, etkili bir lokal immün yanıtı, epidermal Langerhans hücrelerinin aktivasyonu, MHC-II moleküllerinin keratinositler üzerinde yukarı regülasyonu, CD8+ ile dermal infiltrasyon ve CD4+ hücrelerinin daha az sayıda olması, CD21+ hücrelerinin varlığı ve nispeten düşük bir parazit yükü ile ilişkilendirilmiştir (Fondevila ve ark, 1997; Papadogiannakis ve ark, 2005). Sebasöz bez enflamatuvar infiltratın, CD4+ hücrelerinin CD8+ üzerinde baskın olduğu, CD21+ hücrelerinin daha az sayıda olduğu ve immünohistokimya ile amastigotların görüntülenemeyeceği, komşu dermisinkinden farklıdır (Papadogiannakis ve ark, 2005).

Kutanöz ülserler (vakaların% 15-40'ı) genellikle kulak kepçesi, basınç noktaları, bacaklar ve mukokütan eklemlerin kenarları üzerinde görülür ve lokal travma ve/veya vasküler hasara atfedilir (Kontos ve Koutinas, 1993; Ciaramella ve ark, 1997; Fondevilla ve ark, 1997; Slappendel ve Ferrer, 1998; Koutinas ve ark, 1999; Ciaremella ve Corona, 2003). Nodüler formu (vakaların %2-9'u) genellikle düşük epidermal MHC-II molekülleri ekspresyonu, dermal infiltratta az sayıda T hücresi ve yüksek bir parazit yükü ile karakterize edilir, bu da konağın artan duyarlılığını gösterir (Slappendel, 1988; Koutinas ve ark, 1993; Fondevila ve ark, 1997). Bunun tersi de önerilmiştir (Blavier ve ark, 2001). Konfüzyon ortaya çıkmış olabilir çünkü nodüller, özellikle başın üzerindeyken, parazit inokülasyonu alanını da temsil edebilir ve bu nedenle hastalığın nodüler şekliyle aynı olmayabilir (Saridomichelakis, 2009). İnokülasyon sahasındaki lezyonlar, bulaşma periyodunun sona ermesinden sonra ortaya çıkabilir ve parazitler, ilişkili granüloamatöz inflamatuvar reaksiyonda bulunmaz (Ferrer, 1999; 2002; Blavier ve ark, 2001). Papüler dermatit aynı zamanda parazit inokülasyonunun çoklu bölgelerine de tekabül edebilir ve nispeten düşük lokal parazit yüküne, pozitif leishmanin deri testine, düşük antikor titrelerine ve tedaviye yeterli cevaba

dayanarak bildirilen az sayıda köpekte dirençle bağlantılıdır (Ordeix ve ark, 2005). Bu aynı zamanda bu yazarın deneyimi olmuştur, tek fark lezyonlardaki parazit sayısının her zaman düşük olamayacağıdır.

CVL'in diğer daha az yaygın veya daha az iyi karakterize edilmiş kutanöz bulguları arasında steril püstüler dermatit, lokal alopesi (genellikle göz çevresinde), burun depigmentasyonu, burun ve ayak tabanı hiperkeratozu (ikincisi lokalize bir ekfoliyatif dermatit formunu temsil edebilir), onikogrifozis (likenoid mononükleer dermatiti ile ilişkili ancak ağır lokal parazit yüküyle ilişkili değildir), steril granülom/pyogranüloma benzeri lezyonlar, renal veya uterus tutulumu eşlik etmeyen nodüler dermatofibroz, yalamaya bağlı oluşan granüloma benzeyen lezyonlar, hemorajik lezyonlar (vaskülite bağlı), yüzeysel ve / veya derin piyoderma, artmış *Malassezia spp.* popülasyonu yer almaktadır (Koutinas ve ark, 1992; Blavier ve ark, 2001; Naranjo ve ark, 2005; Torent ve ark, 2005; Saridomichelakis ve ark, 2007; Cafarchia ve ark, 2008; Pena ve ark, 2008).

Epidemiyolojik açıdan bakıldığında deri parazitin enfekte olmamış kum sineklerine iletilmesinden ve böylece yaşam döngüsünün tamamlanmasından sorumludur. Kum sinekleri konakçının epidermis ve dermisine 0,26-0,32 mm'lik bir derinliğe kadar nüfuz eder ve kan damarlarından direkt olarak yırtılmadan veya beslenmeden bir beslenme havuzu yaratırlar. Beslenme havuzundan kan (yaklaşık 0,3-0,5 µl) ve doku sıvısı alırlar (Lewis, 1987; Rutledge ve ark, 2002; Saridomichelakis ve ark, 2007). Daha sonra, kum sinekleri üst dermiste ve / veya köpeğin kan dolaşımında bulunan parazitlerden enfekte olabilmektedir. Kum sineği enfeksiyonu oluşturmak için gereken amastigotların kesin sayısı bilinmese de, muhtemelen nispeten düşüktür (Molina ve ark, 1994; Cruz ve ark, 2002) ve köpek dermisinde ve/veya periferik kandaki parazit yüküyle bulaşma olasılığının artabileceğini düşünmek mantıklıdır.

Enfekte köpeklerin periferik kanındaki parazitlerin sayısı muhtemelen düşüktür; sporadik olgularda kan yaymalarında görülebilmelerine rağmen (Longstaffe ve ark, 1983; Levy ve ark, 2006; Santos ve ark, 2006) 87 kan filmi incelendiğinde bulunmamıştır (Abranches ve ark, 1991). Bununla birlikte, kan kültürü önemli sayıda asemptomatik enfekte köpekte ve CVL'li köpeklerde başarılı olmuştur (Fisa ve ark, 2001; De feritas ve ark, 2006) ve en enfekte köpeklerde periferik kan PZR pozitifdir (Ferrer, 1999; Reale ve ark, 1999; Fisa ve ark, 2001; Francino ve ark, 2006; Manna ve ark, 2006; Franceschi ve ark, 2007).

Asemptomatik enfekte köpeklerde kutanöz parazitik yük genellikle CVL'li köpeklere göre daha düşüktür (Solano-Gallego ve ark, 2004; Giunchetti ve ark, 2006; Michalsky ve ark, 2007). Parazitler hem normal görünümlü hem de lezyonlu deride bulunur (Papadogiannakis ve ark, 2005) ve immünohistokimya veya immünofloresan kullanarak, vakaların %70-

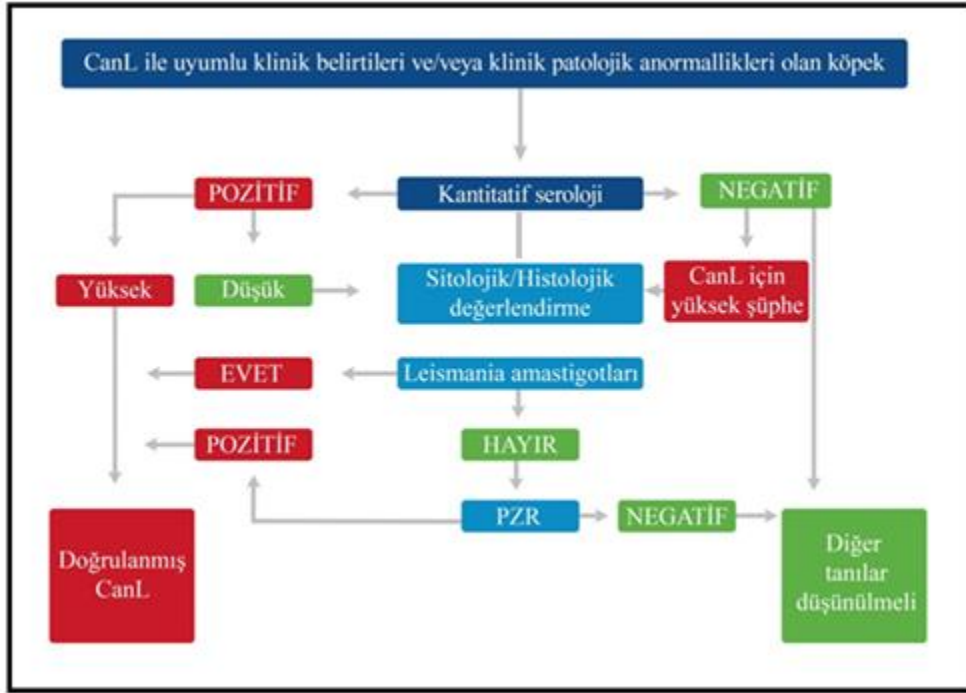
100'ünde ağız derisi dermisinde (kum sinekleri için tercihlil beslenme alanı) görselleştirilebilir (Solano-Gallego ve ark, 2004; Saridomichelakis ve ark, 2007).

Direkt ksenodiyagnoz (enfekte köpeklerden laboratuvar kum sineğinin beslenmesi, ardından vektörde *Leishmania promastigot*larının saptanması), konakçının enfeksiyöz potansiyelini incelemek için muhtemelen en uygun yöntemdir. Genel olarak %3-100 oranında kum sinekleri enfekte olanlarla beslendiğinde paraziti elde eder ve enfekte köpeklerin %16-88'i vektöre *Leishmania* organizmalarını iletme yeteneğine sahiptir (Miles ve ark, 1999; Guarga ve ark, 2002; Da Costa-Val ve ark, 2007; Michalsky ve ark, 2007; Giunchetti ve ark, 2008). Daha da önemlisi, bazı çalışmalarda, seropozitif köpekler arasında enfekte olmuş köpeklerin yanı sıra enfeksiyöz köpeklerin yüzdesinin, polisemptomatik köpeklerle karşılaştırıldığında asemptomatik ve oligosemptomatik olarak önemli ölçüde düşük olduğu ve periferik kandaki T hücre sayısı ile negatif korelasyonlu olduğu bulunmuştur (Guarga ve ark, 2000; Travi ve ark, 2001; Da Costa-Val ve ark, 2007; Michalsky ve ark, 2007). Bu nedenle, bir köpeğin bulaşma döngüsündeki bulaşıcı potansiyeli ve epidemiyolojik önemi, CVL'e olan duyarlılığı ile doğrudan ilişkili görünmektedir. Bununla birlikte, seronegatif asemptomatik enfekte köpeklerin (serolojik yöntemle ve kullanılan kesim değerine bağlı olarak) endemik bölgelerde yaşayan (Leontides ve ark, 2002) köpeklerin çoğunluğuna karşılık gelebilecek epidemiyolojik rolü, ilgili ksenodiagnoz çalışmalarının yetersizliği nedeniyle belirsizliğini korumaktadır.

2.4. Tanı

Klinik spektrumun geniş olması ve en az bir tam kan sayımı (CBC), biyokimyasal profil ve idrar analizine dayanan klinikopatolojik anormalliklerin aralığı geniş ve non-spesifik olabildiği için CVL tanısı karmaşıktır. Bu hastalığın şüphesini değerlendirirken, her hasta için tam bir klinikopatolojik tanı yaklaşımının uyarlanması gerekmektedir. Ek olarak, leishmaniosisli köpekler, diğer vektör kaynaklı hastalıklar ile birlikte enfekte olabilir veya diğer eşlik eden enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan hastalıklardan muzdarip olabilir bu da ayırıcı tanıları daha karmaşık ve çeşitli hale getirir. Bu nedenle, klinikopatolojik sorun listesine dayanarak, her hasta için ayırıcı tanı ve spesifik bir tanı yaklaşımı yapılmalıdır (Şekil 4). Fizik muayene ve laboratuvar testleri ile klinik sınıflandırma Resim 4' te gösterilmiştir. Köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonu saptanması için farklı spesifik tanısal yöntemler tanımlanmıştır (Şekil 5). Geçerli tanı testlerinin % 100 duyarlılık ve özgüllüğü olmamasına

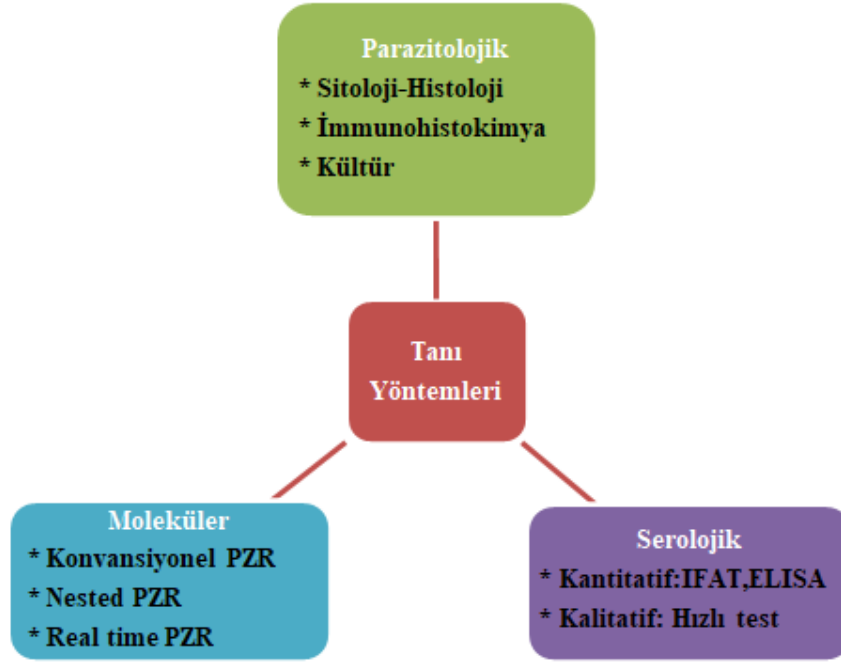
rağmen *L. infantum* enfeksiyonu saptanması için önem teşkil etmektedir.(Solano-Gallego ve ark, 2009).



Şekil 4. CVL ile uyumlu köpeklere tanı yaklaşımı için akış şeması (Solano-Gallego ve ark, 2011)

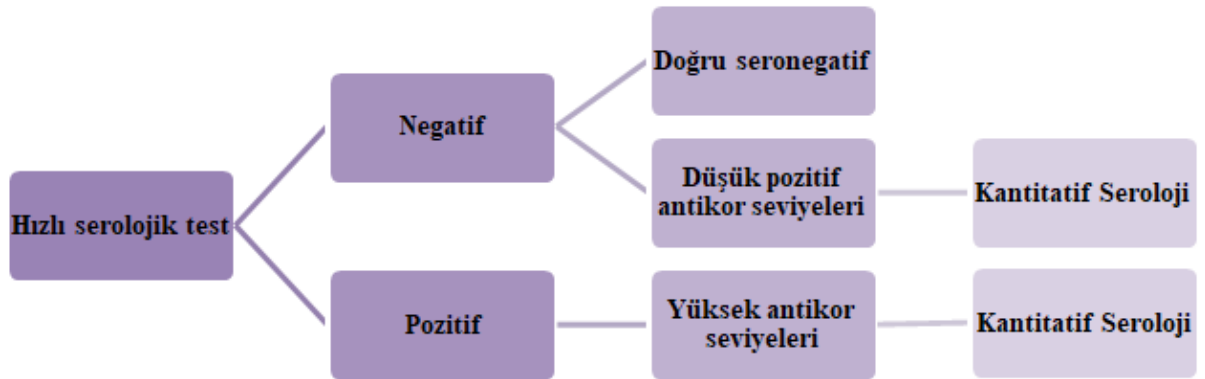


Resim 4. Fizik muayene ve laboratuvar testleri ile klinik sınıflandırma A: klinik olarak sağlıklı enfekte; B: Hasta



Şekil 5. CVL için en yaygın tanı yöntemleri (Solano-Gallego ve ark, 2011).

CVL'nin teşhisi tercihen immüno Floresan antikor testi (IFAT) ve enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) gibi kantitatif serolojik teknikler kullanılarak spesifik serum antikorlarının (IgG) saptanmasıyla yapılabilir. İmmünokromatografi temelli analizlerin kullanımı kolaydır ve yerinde hızlı kalitatif sonuçlar sağlar, ancak bunların performansı hala optimal değildir (Mohebalı ve ark, 2004; Mettler ve ark, 2005; Ferroglio ve ark, 2007). Serolojik kalitatif hızlı testlerin yorumu Şekil 6' da açıklanmıştır.



Şekil 6. CVL için serolojik kalitatif hızlı testlerin yorumlanması (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Numuneleri kantitatif serolojik testler yapan bir laboratuvara göndermek önemlidir, IFAT veya ELISA testleri antikor seviyesinin belirlenmesini sağlamaktadır (Solano-Gallego ve ark, 2009). PZR, dokulardan, kandan, vücut sıvılarından veya hatta histopatolojik örneklerden elde edilen DNA üzerinde gerçekleştirilebilir. *L. infantum*'un PZR ile saptanması için dokuların farklı duyarlılıkları (Solano-Gallego ve ark, 2007; 2009; Maia ve ark, 2009) ve PZR tekniklerinin değişken sensitiviteyi Tablo 3'te listelenmiştir. Kinetoplast DNA'sının (kDNA) saptanmasına dayanan analizler, enfekte olmuş dokularda doğrudan tespit için en hassas analiz gibi görünmektedir (Maia ve Campino, 2008; Miro ve ark, 2008). Gerçek zamanlı PZR, Leishmania'nın nicelleştirilmesine izin verir enfekte köpeklerin dokularındaki parazit yükü, tedavi sırasında tanı ve takip için yararlıdır (Pennisi ve ark, 2005; Manna ve ark, 2008). PZR ile sağlanan bilgilerin, klinikopatolojik ve serolojik değerlendirmelerden elde edilen verilerden ayrılmaması gerektiğini vurgulamak önemlidir.

Tablo 3. PZR için kullanılacak dokuların seçimi ve PZR teknikleri (Solano-Gallego ve ark, 2011).

PZR için kullanılabilir teknik ve örnekler

Daha hassas	
Örnekler	Teknikler
<ul style="list-style-type: none"> • Kemik iliği • Lenf Nodu • Dalak • Deri • Konjunktiva 	<p>Gerçek zamanlı PZR</p>
Az hassas	
Örnekler	Teknikler
<ul style="list-style-type: none"> • Kan • Buffy coat (beyaz kan hücreleri) • İdrar 	<p>Nested PZR; Konvansiyonel PZR</p>

Yüksek düzeyde antikorlar, köpeklerde, leishmaniasis ile uyumlu klinik belirtiler ve / veya klinikopatolojik anormalliklere sahip CVL tanısını doğrulamaktadır (Reis ve ark, 2006). Bununla birlikte, düşük bir antikor seviyesinin varlığı, mutlaka hastalığın göstergesi değildir ve klinik leishmaniosis'i onaylamak veya dışlamak için daha fazla çalışma gereklidir (Solano-Gallego ve ark, 2009). Endemik bir bölgeye seyahat eden endemik olmayan bir bölgede yaşayan hasta veya sağlıklı köpekler için tanı yaklaşımı, endemik alana maruz kalmanın başlamasından üç ay sonra kantitatif serolojiyi içermelidir.

2.4.1. Moleküler Tanı

Moleküler testlerin analitik duyarlılığı 0,001 ile 0,1 arasında parazit / reaksiyon tespit edilebilmektedir (Francino ve ark, 2006; Carson ve ark, 2010). Bununla birlikte, farklı enfeksiyon aşamalarında gerçek tanılabilirliğin belirlenmesi, farklı çalışmalarda kullanılan nispeten heterojen klinik kriterler nedeniyle sorunlu olabilmektedir.

Kılavuzlar oluşturulmadan önce (Solano-Gallego ve ark, 2009), oligosemptomatik veya CVL belirtileri ve semptomlarının sayısına göre polisemptomatik hayvanlar, çalışmalar arasında farklılık göstererek karşılaştırmalarını zorlaştırabilmektedir.

2.4.1.1. Parazit hedefleri

Leishmania kinetoplast DNA'sında (kDNA) bulunan DNA mini halkaları (dairesel plazmid türevleri) bu moleküler hedefi, Leishmania türlerini tespit etmeyi amaçlayan moleküler testlerin çoğunluğunun temelini oluşturmuştur, ancak ITS-1 (Internal Transcribed Spacer-1) 18S r RNA ve glikoprotein-63 (gp-63) gibi diğer hedefler kullanılmıştır (Rodger ve ark, 1990; Guerbouj ve ark, 2014). Moleküler testlerin duyarlılığı olarak % 95 ila % 100 arasındadır (Strauss-Ayali ve ark, 2004; Moreira ve ark, 2007; Carson ve ark, 2010; Mohammadiha ve ark, 2013). Çoğu rapor kDNA bazlı konvensiyonel PZR (cPZR) 'nin polisemptomatik köpeklerin kan örneklerinde % 89 ile % 100 arasında bir duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir (Lachaud ve ark, 2002; Manna ve ark, 2004; Carson ve ark, 2010).

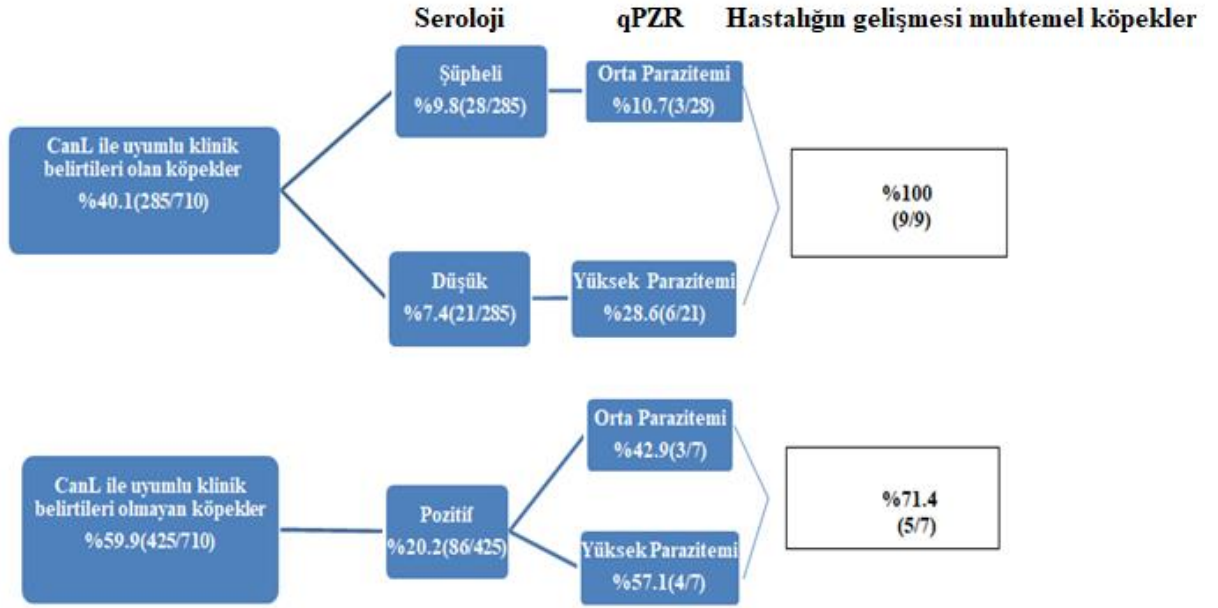
Konvensiyonel PZR oligonükleotit primerlerle aranan genomun belli bir kısmını çoğaltmaya yaramaktadır (Reis ve ark, 2013). 100 ile 1000 kopya arasında hedef DNA yapıldığı için duyarlılığı yüksektir. Özgüllük hedef DNA'ya primer dizaynına ve testin

optimizasyonuna bağlıdır. PZR L150 / L152 primerleri, 120 bp'lik bir fragman olan *Leishmania* kDNA mini halkasının dağılmış bölgesini büyütme için kullanılmıştır (Degraeve ve ark, 1994). cPZR için kullanılan primer sekans dizileri Tablo 4'te gösterilmiştir (Reis ve ark, 2013). PZR amplifikasyonları, 6 dakika süreyle 96 °C'de ilk denatürasyon, ardından 93 °C'de 30 sn'de 30 döngü, 64 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye ve son olarak 72 °C'de 7 dakikanın tamamlanmasından sonra DNA polimeraz enziminin tamamlayıcı DNA zincirini uzatması ile sağlanmaktadır (Reis ve ark, 2013).

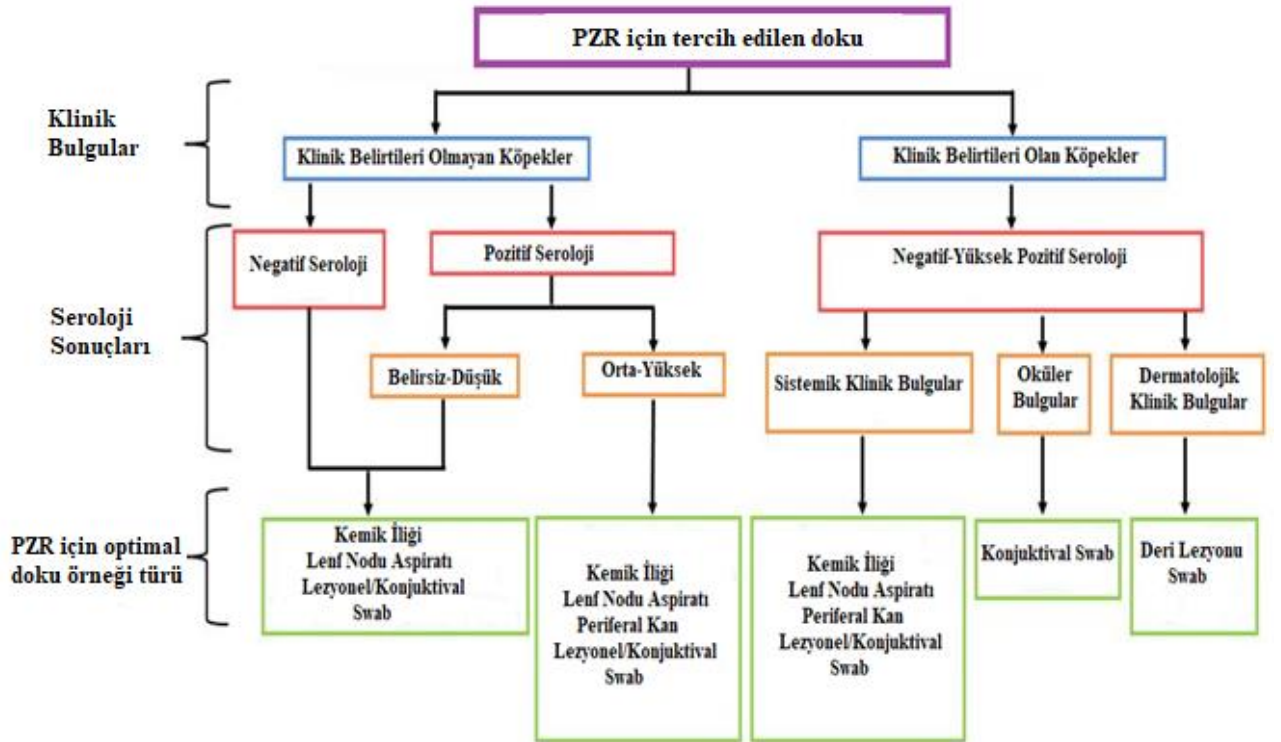
Tablo 4. cPZR için kullanılan primer sekans dizileri (Reis ve ark, 2013).

Metod	Hedef	Primer sekans (5'-3')	Sonuç (bp)
cPZR	L150/L152	İleriye doğru: GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA Terse doğru: (G/C) (G/C) (G/C)(A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C	120

Bununla birlikte, yöntem asemptomatik köpeklerde uygulandığında duyarlılık azalmaktadır (örneğin, döngü aracılı amplifikasyon [LAMP], PZR) (Francino ve ark, 2006; Gao ve ark, 2015). Real-time kantitatif PZR (qPZR) artık yüksek duyarlılığı nedeniyle en güvenilir tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir (Carson ve ark, 2010). Belirsiz CVL olgularında qPZR'ın prognostik değeri Şekil 7'de gösterilmiştir (Martínez ve ark, 2011). Aynı köpek örneklerinde değerlendirilen farklı moleküler testler (n = 67 .köpek) qPZR'ın(% 91) nested kDNA cPZR (% 72), nested ITS-1 PZR (% 54)'dan daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Carson ve ark, 2010). Ayrıca, kemik iliğinin değerlendirmeleri, qPZR'ın 0.2 parazit / mL tespit ettiğini, cPZR'nin sadece > 30 parazit / mL içeren örnekler olduğunda pozitif sonuç verdiğini göstermiştir (Francino ve ark, 2006). qPZR için tercih edilebilecek dokular Şekil 8'de gösterilmiştir. Hızlı, düşük maliyetli bir qPZR tahlili daha önce yayınlanmış bir PZR yöntemine dayanarak, reaksiyon hacimlerini ve DNA amplifikasyon süresini azaltarak optimize edilmiştir (Francino ve ark, 2006). Test, *L. infantum* veya *L. braziliensis*'i yüksek hassasiyetle güçlendirmiştir (0.002 parazit / reaksiyon) (Dantas-Torres ve ark, 2017). qPZR için tercih edilebilecek dokular Şekil 8'de gösterilmiştir (Martínez ve ark, 2011).



Şekil 7. Belirsiz CVL olgularında qPZR' ın prognostik değeri (Martínez ve ark, 2011)



Şekil 8. qPZR için tercih edilen doku (Martínez ve ark, 2011)

2.4.1.2. Numune kaynağı

Numune kaynağının, enfekte köpekleri tanımlamak için moleküler testlerin kapasitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Kemik iliği ve lenf nodu örnekleri klinik durumdan bağımsız olarak diğer bölgelere kıyasla en fazla pozitif sonuç vermektedir (Lombardo ve ark, 2012; Almeida ve ark, 2013). Konjunktiva, oral mukoza veya burundan alınan swab örnekleri daha az invaziv ve hassas tanı yöntemleri olmakla birlikte kandan daha yüksek parazit yükleri olan örnekler sağlamaktadır (Strauss-Ayali ve ark, 2004; Leite ve ark, 2010; Lombardo ve ark, 2012; Aschar ve ark, 2016). ITS-1 cPZR veya kDNA PZR hibridizasyonunun kullanılması, doğal olarak enfekte olmuş köpeklerin % 91 ila % 92'sinin konjunktival numunelerde pozitif olduğunu göstermiştir (Strauss-Ayali ve ark, 2004; de Almeida Ferreira ve ark, 2008).

2.4.1.3. POC (Point of care) moleküler testleri

POC metotları, testleri yapmak için karmaşık ekipman veya yüksek seviyede uzmanlık gerektirmeyen, sabit sıcaklıklarda DNA'yı büyütebilen polimerazları kullanmaktadır. LAMP (döngü aracılı izotermal amplifikasyon) (Eiken Chemical Company, Tokyo, Japonya) iplikçik yer değiştirme aktivitesine sahip bir DNA polimeraz ve altı farklı DNA bölgesini tanıyan dört primer kullanır, bu da onu oldukça spesifik kılmaktadır (Mori ve Notomi, 2009). Bu yöntem daha önce % 90.7 ila % 96.4 duyarlılık ve % 98.5 ila % 100 özgüllükleri olan Viseral Leishmaniasis hastalarının kanında (*Leishmania donovani*) değerlendirilmiştir (Khan ve ark, 2012; Verma ve ark, 2013). Çin'de bazı araştırmacılar, konjunktival örneklerde LAMP kullanımını, cPZR'ye (% 58.6) benzer olan ve her iki mikroskopiden (% 10.8) veya ELISA ile pozitif olan köpeklerin oranından (% 40.5) önemli ölçüde daha yüksek olan % 61 enfekte olmuş köpekleri tanımlamıştır (Gao ve ark, 2015). Bununla birlikte, Çin'de izole edilmiş bir *L. infantum* suşundan tasarlanan bu kDNA primerleri, diğer ülkelerde suş amplifiye edilemediğinden elde edilememiştir. Bu suşların standart yöntemler kullanılarak daha fazla tiplendirilmesi hala gerekmektedir.

Çoklu patojenleri teşhis etmek için başka bir izotermal moleküler yöntem, rekombinaz polimeraz amplifikasyonuna (RPA; TwistDx, UK) dayanmaktadır. RPA karışımı tek iplikçikli DNA bağlayıcı protein ve iplikçik, yer değiştiren polimeraz olmak üzere üç çekirdek protein içermektedir. Spesifik ileri ve geri primerler ile kombinasyon halinde, tespit edilecek patojene

bağlı olarak 24°C ila 45°C ve 15 ila 60 dakikalık inkübasyon süreleri arasındaki sabit sıcaklıklarda DNA amplifikasyonunu mümkün kılmaktadır (Daher ve ark, 2016). Amplifikasyon ürünleri lateral bir akış şeridinde çıplak gözle okunabilmektedir.

CVL için bir RPA-lateral akış testi (RPA-LF), yakın zamanda *L. infantum* kDNA minikülleri hedefleyen primerlere ve problara dayanarak geliştirilmiştir (Castellanos-Gonzalez ve ark, 2015). Bu kalitatif test, 40 dakika boyunca 42°C'de gerçekleştirilir ve daha sonra bir yanak akış şeridi (Milenia Hybridetect, TwistDX veya UStar Biotechnologies, Hangzhou, Çin) olarak okunmaktadır. Ayrıca qPZR'a benzer analitik duyarlılığa sahiptir ve mL başına 40 parazit tespit edebilmektedir. RPA-LF, semptomatik köpeklerin oral mukozasında *L. infantum* tespit etmiştir. Arjantin'de endemik bir bölgeden klinik olarak normal olan 30 köpekten yapılan taramada, hayvanların % 50'sinin, RPA-LF tarafından belirlenen şekilde subklinik olarak enfekte olduğu tespit edilmiş olup % 13.3'ü, rekombinant kinesin-39 (rK39) testi kullanılarak serolojik olarak pozitif bulunmuştur (Castellanos-Gonzalez ve ark, 2015). Diğer patojenler için geliştirilen LAMP ve RPA kantitatif teşhis yöntemleri, POC testleri olarak uygulanamaz, çünkü nispeten eğitilmiş personel ve maliyetli ekipman gerektirmektedir (Cai ve ark, 2008; Fang ve ark, 2010; Lucchi ve ark, 2010; Xia ve ark, 2014). Resim 5'teki olgunun hızlı test kiti negatif fakat POC moleküler testinin pozitif çıkması moleküler tanının diagnostik önemini ortaya koymaktadır.



Resim 5. Moleküler tanının diagnostik önemi A: Hızlı test kiti negatif; B: POC testi pozitif; C: CVL ile enfekte olgu

2.4.2. Serolojik Tanı

Parazit antijenlerine serokonversiyon efektif bir flebotomin ısırığından sonra bir ay kadar erken bir süreçte olabilmektedir (Moreno ve Alvar, 2002). Aktif CVL genellikle tüm sınıfların önemli antikor titreleriyle ilişkilidir, düşük antikor seviyeleri ise subklinik enfeksiyonların veya maruz kalmış fakat enfekte olmamış köpeklerin karakteristiğidir (Saridomichelakis, 2009). Her ne kadar farklı antikor izotiplerinin kullanımı serolojik değerlendirmeleri geliştirmek için önerilmiş olsa da (Iniesta ve ark, 2005; Day, 2007; de Freitas ve ark, 2012) 134 köpeğin kohortundan elde edilen en son verilerde izotip yanıtının majör prediktif değeri olmadığını göstermektedir (Laranjeira ve ark, 2014). Artan immünoglobulin G2 seviyeleri koruyucu yanıtlarla ilişkilendirilirken, artan IgG1 üretimi kötü prognoz olarak kabul edilmiştir (Iniesta ve ark, 2005). IgE ve IgA daha çok aktif CVL'de saptanmış gibi görünse de, ancak asemptomatik köpeklerde de düşük prediktif değeri bulunmaktadır (Iniesta ve ark, 2005; Reis ve ark, 2006; Rodriguez-Cortes ve ark, 2007).

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda bütün parazitleri, çözünür parazit özütlerini veya ilgilenilen genlerden türetilmiş rekombinant proteinleri içeren serolojik testler kullanılmıştır. İlgili protein epitopları olan kimerik antijenlerin yakın zamandaki gelişimi, bu yöntemin aktif hastalık veya asemptomatik enfeksiyon sırasında spesifik antikorları tespit etme kapasitesini göstermiştir (Mettler ve ark, 2005; Paltrinieri ve ark, 2010).

Doğrudan aglütinasyon testi, tripsinize edilmiş Coomassie mavisi ile boyanmış Leishmania promastigotlarının anti-leishmania antikorları ile aglütinasyonuna dayanmaktadır. Sahada kullanım için geliştirilen ilk serolojik test, kanıtlanmış klinik kesinliği olan basit, ucuz ve güvenilirdir (Sousa ve ark, 2011; Adams ve ark, 2012). Ayrıca, elektrik ekipmanı gerektirmeyen ve 2 yıla kadar raf ömrüne sahip laboratuvarlarda yapılabilmektedir. Doğrudan aglütinasyon testi uzun inkübasyon sürelerine sahiptir ve testi uygulamak uzmanlık gerektirmektedir (Gomez-Ochoa ve ark, 2003; Adams ve ark, 2012). Sırasıyla % 91 -% 100 ve % 72 -% 100 arasında bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir, ancak son nokta titrelerinin öznel olarak okunması, gözlemciler arası uyumsuzluklara neden olmaktadır (Adams ve ark, 2012; Oliveira ve ark, 2016). Bu dezavantajlara rağmen doğrudan aglütinasyon testi genellikle çok sayıda örneğe uygulanan rutin bir serolojik test olarak kabul edilmektedir (Schallig ve ark, 2002). Hızlı aglütinasyon taraması testi (FAST), normal serumların kesim noktasının üzerindeki tek bir serum seyreltmesine dayanan bir doğrudan aglütinasyon testi (DAT) modifikasyonudur. Daha kısa inkübasyon süreleri gerektirir ve büyük köpek popülasyonlarını taramak için optimize edilmiştir (Schallig ve ark, 2002).

Leishmaniasis promastigotlarına karşı immüno Floresan antikor testi (IFAT), CVL tanısı için referans nitel serolojik yöntemdir (Paltrinieri ve ark, 2016). Özel ekipman ve eğitimli personele ihtiyaç duyması nedeniyle, IFAT kullanımını laboratuvar koşullarıyla sınır olmaktadır (Solano-Gallego ve ark, 2014). Semptomatik hayvanlarda özgüllük ve duyarlılık % 100'e yakındır. Bazı önemli sınırlamalar şunlardır; tripanosomlar gibi diğer patojenlerle çapraz reaksiyon gösterebilmesi (Solano-Gallego ve ark, 2014; Paltrinieri ve ark, 2016) ve asemptomatik köpeklerin tanımlanmasında ELISA ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük duyarlılığa sahip olmasıdır (Mettler ve ark, 2005).

ELISA, antijen kaplı mikroplakalar ve antikor yoğunluğunu optik yoğunlukla belirleyen bir spektrofotometre kullanarak çok sayıda numunenin taranmasına izin vermektedir. Mutlak antikor miktar tayini potansiyeli ELISA'yı operatör yanlılığına daha az duyarlı olan güçlü bir araç olarak sunmaktadır. Güçlü yanlarından biri, çoklu antijen kombinasyonlarının kullanılması ve böylece yöntemin duyarlılığını ve / veya özgüllüğünü artırma olasılığının olmasıdır (Soto ve ark, 1998; Santarem ve ark, 2010). Akış sitometrisi, Leishmania yüzey antijenlerine karşı antikorları ölçen ve daha fazla korunan hücre içi yapılara karşı çapraz reaktiviteyi önleyen gelişmekte olan yeni bir teknolojidir (Goetzman,1993). Amastigot veya promastigot kullanarak, bu yöntemin yüksek hassasiyet ve özgüllük seviyelerine ulaştığını ve enfekte olmuş ancak klinik olarak sağlıklı ve hasta köpeklerin serolojik profillerini ayırt ettiği gösterilmiştir (Silvestre ve ark, 2008).

2.4.2.1. Serodiyagnoz için kullanılan antijenler

Ham promastigot antijenlerini kullanan yöntemler, subklinik ve klinik enfeksiyonları saptama konusunda oldukça hassastır, ancak diğer antijenleri kullanan yöntemlerden daha düşük özgüllüğe sahip olduğu bazı çalışmalarda mevcuttur (Gomez-Ochoa ve ark, 2003; Rodriguez-Cortes ve ark, 2010). Aksenik amastigotlardan çözünen antijenler, ham lisatlar olarak kullanıldığında promastigotlara denk olduğu saptanmıştır (Silvestre ve ark, 2008). Rekombinant proteinler, saha teşhisi için iyi aday antijenler olarak kabul edilmektedir, çünkü kolayca adsorbe edilmektedir ve tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir (Pattabhi ve ark, 2010; Santarem ve ark, 2010; Venturin ve ark, 2015; Lauricella ve ark, 2016). Bunlar arasında en başarılı antijen bilimsel ortamdan klinik ortama taşınan rK39 olmuştur. Bu 39 ± amino asit bir kinesin ile ilişkili protein Visceral Leishmania türleri arasında yüksek oranda korunmuştur (Gomez-Ochoa ve ark, 2003; Mettler ve ark, 2005).

Akdeniz havzasında ve Güney Amerika'da bulunan köpek kohortlarında yüksek hassasiyet (%90 ± %100) göstererek aktif CVL'yi tespit edebilme kapasitesine sahiptir (Badaro ve ark, 1996; Ozensoy ve ark, 1998; Rhalem ve ark, 1999; Scalone ve ark, 2002). Buna rağmen, rK39 asemptomatik enfeksiyonları saptamada diğer serolojik yöntemlerden daha az spesifik ve hassastır (Rhalem ve ark, 1999; Santarem ve ark, 2010). İnsan CVL'sine uygulandığında duyarlılık ve özgüllükteki dalgalanmalar da tanımlanmıştır (Bhattacharyya ve ark, 2013).

Brezilya'da, rK39 dipstick testi geleneksel promastigot ELISA ile karşılaştırıldığında daha düşük (%80'den az) özelliğe sahiptir (Reithinger ve ark, 2002). rK39 etkinliğinin endemik bölgelere göre değişkenliği, aktif CVL ve asemptomatik enfeksiyonu değerlendirmek için daha iyi alternatifler aramaya neden olmuştur. Örneğin, rKLO8 ve rK26, CVL'nin tanısal doğruluğunu artırabilen antijenler olarak önerilmiştir (Abad ve ark, 2017). Bu iki antijenin kombinasyonu bireysel duyarlılıklarına ve özgüllüklerine göre daha yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermiştir. Aynı zamanda, asemptomatik enfekte köpeklerin tespit edilmesini geliştirmek için kimerik multiepitoplular proteinler üretilmektedir (Faria ve ark, 2015).

İmmünoproteomik gibi yeni yaklaşımlar, CVL için yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip nitelendirilmemiş bir hipotetik protein tanımlamıştır (Lage ve ark, 2016). Bu hipotetik protein ELISA metodunda kullanılmış olup, *L. infantum* ile enfekte olmuş hasta ve klinik olarak sağlıklı köpeklerin numunelerinde %100 duyarlılık ve özgüllük göstermiştir. Ayrıca, *L. infantum* tarafından salgılanan proteinler veya rekombinant proteinlerin çoklu antijen baskılayıcı immunoassay (MAPIA) teşhisi için antijen kaynakları olarak önerilmiştir (de Oliveira ve ark, 2015; Lima ve ark, 2016; Pinedo-Cancino ve ark, 2016). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, kullanımı ELISA formatına uygulanan *L. infantum*'dan salgılanan antijenler, enfekte olmuş köpeklerin %100'ünü saptamıştır (Pinedo-Cancino ve ark, 2016).

POC serolojik testleri temel olarak kalitatif immünokromatografik testlere dayanmaktadır (Travi ve ark, 2018). Şuanda mevcut olan çoğu ticari kit, rK39, rK26 ve rKE16 gibi birkaç onaylanmış rekombinant antijen kullanmaktadır (da Costa ve ark, 2003; Farahmand ve ark, 2015). Testlerin çoğunda plazma, serum, tam kan veya filtre kağıdına adsorbe edilen kan gibi belirgin biyolojik sıvılar kullanılabilir. Ticari kitlerin özgüllüğü (>%90), oldukça değişken olabilen (%30 ± %90) hassasiyetin aksine, genellikle yüksektir ve hem klinik hem de epidemiyolojik uygulamalar için önem teşkil etmektedir (Reithinger ve ark, 2002; Mettler ve ark, 2005; Laurenti ve ark, 2014; Farahmand ve ark, 2015).

2.5. Hastalığın Evrelendirmesi

2.5.1. Evre-1 (Hafif Şiddetli Hastalık)

Etken ile enfekte olan hayvanlarda lenf yumrularında şişlik, papüler dermatitis gibi hafif klinik belirtiler görülebilmektedir. Genellikle klinikopatolojik bozukluk gözlenmez. Seroloji yapıldığında düşük pozitif veya negatif antikor düzeyi saptanmaktadır (Solano-Gallego ve ark, 2011). Renal profil normaldir (Tablo 5).

Tablo 5. CVL Evre 1 (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik evre	Seroloji (antikor titresi)	Klinik görünüm	Laboratuvar bulguları
Evre I:	Düşük / -	Dermatitis (papüler) Lenf yumrularında şişlik	Çoğunlukla laboratuvar anormallik tespit edilmez. Kreatinin < 1,4 mg/dL Proteinüri yok. İdrar protein/ kreatinin <0,5
IRIS* (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırması)- Kronik Böbrek hastalığının evrelendirilmesi			

2.5.2. Evre-2 (Orta Şiddetli Hastalık)

Etken ile enfekte olan hayvanlarda Evre 1'deki klinik belirtilerden farklı olarak yaygın veya simetrik ekzfoliyatif dermatit, mukokutanöz ülserasyonlar gibi dermatolojik problemler, onikogrifozis iştahsızlık, kilo kaybı, ateş ve burun kanaması gibi bulgular olabilmektedir. Seroloji yapıldığında düşük veya yüksek pozitif antikor düzeyleri saptanmaktadır (Solano-Gallego ve ark, 2011). Non-rejeneratif ılımlı anemi, serum hiperviskozite sendromu, hipalbuminemi, hiperglobulinemi ve hipergamaglobulinemi görülebilmektedir Renal profil normaldir (Tablo 6).

Tablo 6. CVL Evre 2 (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik evre	Seroloji (antikör titresi)	Klinik görünüm	Laboratuvar bulguları
Evre II	Düşük / yüksek	I.evredeki bulgular haricinde ateş, tırnaklarda anormal uzama, zayıflama, dermatitis (eksfoliatif), burun kanaması, ülserasyonlar	Rejeneratif olmayan anemi (hafif) Kanda γ -globulin seviyesinde artış, albümin seviyesinde azalma Kreatinin < 1,4 mg/dL Proteinüri yok. İdrar protein/kreatinin <0,5 ya da 0,5-1
IRIS* (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırması)-			Kronik Böbrek hastalığının
evrelendirilmesi			

2.5.3. Evre-3 (Şiddetli Hastalık)

Etken ile enfekte olan hayvanlarda evre 1 ve 2'deki klinik bulgulardan ayrı olarak immünkompleks lezyonlardan kaynaklanan vaskulit, artrit, üveit ve glomerulonefrit gibi bulgular olabilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2011). Seroloji yapıldığında orta veya yüksek pozitif antikör düzeyleri saptanmaktadır. Non-rejeneratif ılımlı anemi, serum hiperviskozite sendromu, hipoalbuminemi, hiperglobulinemi görülebilmektedir. Kronik böbrek yetmezliği görülmektedir (Tablo 7).

Tablo 7. CVL Evre 3 (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik evre	Seroloji (antikör titresi)	Klinik görünüm	Laboratuvar bulguları
Evre III	Orta / yüksek	I ve II. Evrelerdeki bulgular dahil olmak üzere artrit, immün kompleks reaksiyonu, glomerulonefrit, üveit ve vaskülit	II. evreye ek olarak: IRIS* I. Evre idrar protein/kreatinin >1 ya da IRIS* II. Evre Kreatinin 1,4-2 mg/dL
IRIS* (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırması)-			Kronik Böbrek hastalığının
evrelendirilmesi			

2.5.4. Evre-4 (Çok Şiddetli Hastalık)

Etken ile enfekte olan hayvanlarda evre 3'te belirtilen klinik anormalliklere ek olarak pulmoner tromboemboli, veya nefrotik sendrom ve renal hastalığın son evresi görülmektedir. Seroloji yapıldığında orta veya yüksek pozitif antikor düzeyleri saptanmaktadır. Non-rejeneratif ılımlı anemi, serum hiperviskozite sendromu, hipoalbuminemi, hiperglobulinemi görülebilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2011). Kronik böbrek yetmezliği gözlenmektedir (Tablo 8).

Tablo 8. CVL Evre 4 (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik evre	Seroloji (antikor titresi)	Klinik görünüm	Laboratuvar bulguları
Evre IV	Yüksek	III. evreye ek olarak: nefrotik sendrom, tromboemboli (pulmoner)	II. evreye ek olarak: IRIS* III.Evre Kreatinin 2-5 mg/ dL ya da IRIS* Evre IV Kreatinin >5 mg/dL, idrar protein/ kreatinin >5
IRIS* (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırması)- evrelendirilmesi			Kronik Böbrek hastalığının

2.6. Sağaltım ve Prognoz

Evre-1'de kullanılabilir ilaç seçenekleri arasında allopurinol(tek), domperidon(tek), meglumine antimoniata (tek) veya miltefosine/allopurinol+meglumine antimoniata veya allopurinol+miltefosine kombinasyonları yer almaktadır. Bu evrede prognoz 'iyi' olarak nitelendirilmektedir. (Solano-Gallego ve ark, 2009).

Evre-2'de kullanılabilir ilaç seçenekleri arasında allopurinol+meglumine antimoniata veya allopurinol+miltefosine kombinasyonları yer almaktadır. Bu evrede prognoz 'iyi-şüpheli' olarak nitelendirilmektedir. (Solano-Gallego ve ark, 2009).

Evre-3'te kullanılabilir ilaç seçenekleri arasında allopurinol+ meglumine antimoniata veya allopurinol+miltefosine kombinasyonları yer almaktadır. Kronik böbrek yetmezliği için IRIS algoritmalarının takip edilmesi önem teşkil etmektedir. Bu evrede prognoz 'şüpheli-kötü' olarak nitelendirilmektedir. (Solano-Gallego ve ark, 2009).

Evre-4'te sadece allopurinol kullanılmaktadır ve kronik böbrek yetmezliği için IRIS algoritmalarının takip edilmesi önem teşkil etmektedir. Bu evrede prognoz 'kötü' olarak nitelendirilmektedir. (Solano-Gallego ve ark, 2009).

2.7. Deri Muayenesine Ait Fiziksel Biyobelirteçler

TEWL, deri hidrasyonu ve deri pH'sı, derinin sağlığının bir görüntüsünü sağlamaktadır. Hastalık durumlarında büyük ölçüde değişkenlik göstermektedirler (Oh ve Oh, 2009; 2010). Bu endeksler sadece dış ortam koşullarını değil aynı zamanda deri ısısı, derinin kan akımı, korneosit oluşum derecesi, stratum korneumun lipid içeriği gibi iç deri değişikliklerini de yansıtır. Çeşitli hastalıklar ve deri hastalıkları deri hidrasyon durumunu, TEWL'yi ve deri pH'sını değiştirmiştir; bu da deri bariyer bütünlüğünün korunması ve patojenlere ve çevresel yaralanmalara karşı korunması için önemlidir (Oh ve Oh, 2009; 2010).

2.7.1. Deri Nemi

Su kaybının önlenmesi ve dış çevreden korunmasında önemli bir bariyer olan stratum korneum epidermisin en dış tabakasıdır (Rudikoff, 1998). Stratum korneumun nem içeriği deri sağlığının korunmasında önemli faktörlerden birisi olmaktadır (Boncheva ve ark, 2009). Stratum korneumda suyun birikimi korneositlerdeki doğal nemlendirici faktöre ve transepidermal su kaybına karşı bariyer oluşturan korneositler arasındaki lipidlere bağlıdır (Chang ve ark, 2008). Korneositlerdeki doğal nemlendirici faktörler stratum korneumun kuru ağırlığının yaklaşık %5 ila %30 kadarını oluşturmakta ve stratum korneumun gücü ve elastikiyetinin sağlanmasında önem teşkil etmektedir. Filagrin ve epidermal proteinlerin metabolizması sonucu doğal nemlendirici faktörler meydana gelmekte ve bu faktörlerin içeriği ürokonik asit, üre, laktat, serbest aminoasitler ve 2-pyrolidone-5-karboksilik asitten oluşmaktadır (Rudikoff, 1998; Loden, 2005; Yadav ve ark, 2009).

Stratum korneumun toplam kuru ağırlığının %15 ila 20 kadarını su oluşturmaktadır. Ancak belirtilen bu oran dış ortamın nemlilik derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Wiedersberg ve ark, 2009). Stratum korneumun esnekliğinin devamı için en az %10 kadarının su olması gerektiği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Yadav ve ark, 2009). Deri fonksiyonlarının düzenlenmesinde doğal nemlendirici faktörler, epidermal lipidler

ve su stratum korneumun mekanik ve fiziksel özelliklerini etkileyerek rol oynamaktadır. Stratum korneumun permeabilitesinin bozulması ve hidrasyonunun azalması, esansiyel yağ asitleri yetersizliği ve stres deri hastalıklarının oluşmasına zemin hazırlamaktadır.

2.7.2. Deri pH

İnsanlarda epidermal pH seviyesi 5,2-5,5 (Kim ve ark, 2006) iken pet hayvanlarında 7-7,5 arasındadır (Ruedisueli ve ark, 1998). Tüm türler içinde alkalilik derecesi en fazla olan tür köpeklerdir (Draize ve ark, 1942). X kromozomuna bağlı resesif iktiyozlarda ve otozomal dominantlarda deri yüzey pH'sı normalden farklılık göstermektedir (Bologna ve ark, 2003).

Derinin pH dengesi bozulduğunda epiderminin aşırı kuruması ve aşınmasına bağlı olarak enfeksiyon meydana gelebilmekte bakteriler için uygun üreme alanı oluşabilmektedir. Genel olarak deri kalınlığı köpeklerde daha fazladır fakat bu durumun tam tersine epidermis çok incedir. İnsanlarda epidermis 18 ila 20 hücre tabakası kalınlığında iken köpeklerde bu değer 8-10 hücre tabakası kalınlığındadır (Lloyd ve ark, 1982; Mason ve ark, 1993). Köpeklerde integümenter örtünün rengi, deri fizyolojisi, anatomik bölge, ırk, cinsiyet, coğrafi lokalizasyon ve çevresel iklimik koşullar deri pH'sını etkileyen faktörler arasındadır (Mason, 1993). Deri pH'sının aside doğru kayması mayaların üremesine ortam hazırlamaktadır (Korting ve ark, 1991).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kliniğine getirilen CVL pozitif (n=28) ve sağlıklı (n=10) olan farklı ırk ve cinsiyette toplamda 38 köpek çalışma kapsamına alındı.

15.02.2014 tarihli 28914 sayılı Resmi gazetede yayınlanan Hayvan Deneyleti Etik Kurulu Çalışma Usül ve Esaslarına dair yönetmeliğin 2. Maddesinin (b) bendinde ‘‘Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarında’’ etik kurul onayına gerek olmadığı açık şekilde ifade edildiğinden, bu tez çalışmasında etik kurul onayı bulunmamaktadır. Bu çalışmayı fakültemiz hastanesine getirilen doğal vakalar oluşturmakta olup ayrıca çalışmada aydınlatılmış bilgi onam formu mevcuttur. Bilgi onam formu tezin ekler kısmına eklenmiştir.

3.2. Yöntem

Hızlı test kitleri ile Leishmaniasis olduğu tespit edilen hayvanlarda IFAT için serum örnekleri, PZR için deriden sürüntü örneği alındı. Hasta sahiplerine bilgi onam formu imzalatıldıktan sonra Leishmaniasis’li köpeklerin fiziksel muayeneleri, serum biyokimyasal ve idrar analizleri yapılarak hastalığın evrelendirmesi yapıldı. Sağlıklı (n=10) ve Leishmaniasisli (n=28) köpeklerde derinin biyofiziksel muayenesi yapıldı.

3.2.1. Gruplandırma Protokolü

Klinik belirtiler ışığında CVL şüpheli köpeklerde EDTA’lı kan örneğinden yapılan hızlı test kiti ile Leishmaniasis olduğu tespit edilen hayvanlarda IFAT için serum örnekleri, PZR için deriden sürüntü örneği alındı. Çalışmaya alınan CVL’li köpeklerde evreleme ‘‘LeishVet Çalışma Grubu’’nun önerdiği şekilde yapıldı (Tablo 9). CVL’li köpekler 4 farklı gruptan

birinde (her grupta n=7) değerlendirildi. Buna göre; I. grup: evre 1 (hafif),II. grup: evre 2 (orta şiddetli), III. grup: evre 3 (şiddetli),IV. grup: evre 4 (çok şiddetli) olarak değerlendirildi. Evre 4'e ait 7 olgunun 2'sinde Ehrlichiosis ile koenfekte olduğu tespit edildi. Sağlıklı kontrol grubu (V. grup) ise fakültemiz hayvan hastanesine rutin kontrol amaçlı getirilen, klinik ve laboratuvar bulgularında herhangi bir anormallik saptanmayan farklı ırk, yaş ve cinsiyette köpeklerden (n=10) oluştu.

Tablo 9. Leishmaniasis'te evrelendirme(Solano–Gallego ve ark, 2011).

Klinik evre	Seroloji (antikor titresi)	Klinik görünüm	Laboratuvar Bulguları
Evre I:	Düşük / -	Dermatitis (papüler), Lenf yumrularında büyüme	Çoğunlukla laboratuvar anormallik tespit edilmez. Kreatinin < 1,4 mg/dL Proteinüri yok. İdrar protein/kreatinin <0,5
Evre II	Düşük / yüksek	Ievredeki bulgular haricinde ateş, tırnaklarda anormal uzama, zayıflama, dermatitis (eksfoliatif), burun kanaması, ülserasyonlar	Rejeneratif olmayan anemi (hafif) Kanda γ -globulin seviyesinde artış, albümin seviyesinde azalma Kreatinin < 1,4 mg/dL Proteinüri yok. İdrar protein/kreatinin <0,5 ya da 0,5-1
Evre III	Orta / yüksek	I ve II. Evrelerdeki bulgular dahil olmak üzere artrit, immun kompleks reaksiyonu, glomerülo nefrit, üveit ve vaskülit	II. evreye ek olarak: IRIS* I. Evre idrar protein/kreatinin >1 ya da IRIS* II. Evre Kreatinin 1,4-2 mg/dL
Evre IV	Yüksek	III. evreye ek olarak: nefrotik sendrom, tromboemboli (pulmoner)	II. evreye ek olarak: IRIS* III. Evre Kreatinin 2-5 mg/ dL ya da IRIS* Evre IV Kreatinin >5 mg/dL, idrar protein/ kreatinin >5
IRIS* (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırması)-			Kronik Böbrek hastalığının evrelendirilmesi

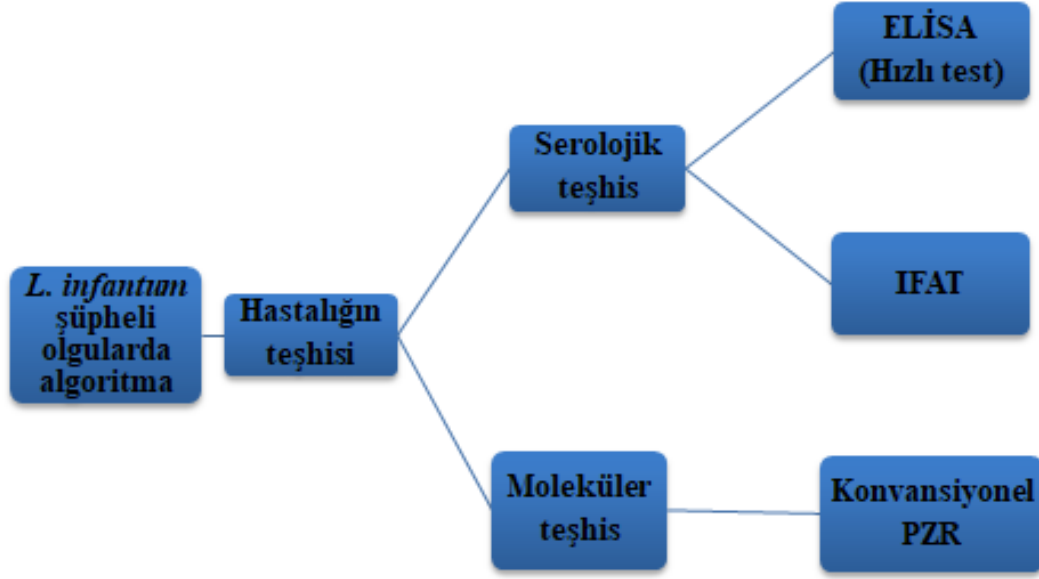
CVL tanısı konulan köpeklerde hastalığın evrelendirmesinin yapılabilmesi amacıyla klinik ve laboratuvar muayeneleri gerçekleştirildi.

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

Serolojik, moleküler, biyokimyasal ve korneometrik analizler gerçekleştirildi (Tablo 10). Leishmaniasis pozitif olan olgularda evrelendirme yapabilmek için kan ve idrar örnekleri alındı. Bu tez kapsamında teşhis yöntemine ait algoritma Şekil 9’da gösterilmiştir.

Tablo 10. Tez çalışmasında izlenen laboratuvar yöntemleri

Örnek	Parametre / ölçü	Yöntem / cihaz
Deri	pH	Callegari soft plus korneometre cihazı
	Hidrasyon	Callegari soft plus korneometre cihazı
	Elastikiyet	Callegari soft plus korneometre cihazı
	Sıcaklık	Callegari soft plus korneometre cihazı
	Melanin	Callegari soft plus korneometre cihazı
Serum	Anti- <i>Leishmania</i> antikor titresi	IFAT / Ticari test kiti
	Kreatinin	Spot- Chem EZ sp-4430 biyokimya cihazı
İdrar	Protein	Kolorimetrik
	Kreatinin	Kolorimetrik
PZR	<i>L. infantum</i> antijenik DNA’sı (deri swab örneği)	Konvansiyonel PZR



Şekil 9. Bu tez kapsamında teşhis yöntemlerine ait algoritma

3.2.2.1. İndirekt floresan antikor testi (IFAT)

Kan örnekleri *Vena saphena parva*'dan alındı. Alınan kanların serumları çıkartıldı ve IFAT yöntemi (Paltrinieri ve ark, 2010; Solano–Gallego ve ark, 2011) ile anti-leishmania antikor titreleri belirlendi.

3.2.2.1.1. Leishmania IgG IFAT içeriği:

PBS 20X:

K_2HPO_4	0.024 kg
NaH_2PO_4	0.00572 kg
NaCl	0.17 kg

Yukarıda belirtilen bileşenler balon jojeye aktarıldıktan sonra saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Daha sonra pH 7.4'e göre düzenlendi.

Kaplama solüsyonu (PBS-gliserol)

Gliserin	0.001 Lt
PBS	0.005 Lt eklendi.

Konjuge: Keçi kanından temin edilen, insan İmmunglobulin G'sine karşı saflaştırılmış floresceinle işaretlenecek olan anti-antikorlar (Fluoline-G) (BioMerieux 75692) incelendi.

Lam: Tüm lamların üzerine elmas kalem ile her bir sıraya 6 yuvarlak denk gelecek biçimde iki sıra yuvarlak çizildi. Antijenle kaplı ön yüzler işaretlenme koşuluyla lamın sol köşesine elmas kalemle işaretleme yapıldı.

Antijen: Promastigotlar bir mikroskopi alanında 500 adet olma koşuluyla lamın üzerindeki yuvarlaklara pipet aracılığıyla yerleştirildikten sonra kurumaya bırakıldı. Daha sonra -20°C 'de kullanılıncaya kadar lam saklama kabında muhafaza edildi.

Pozitif ve negatif kontrol serumları: Testin özgüllüğü dikkate alınarak kaçınıcı sulandırma basamağında pozitif değer verdiği bilinen veya negatif olan daha önceden çalışılan serumlar kullanıldı. IFAT analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.2.2.1.2. Test prosedürü ve uygulanması

Master blokta PBS ile serumlar 1/16 ve 1/64 oranlarında [PBS sırasıyla ilk deliklere 150 μl , ikinci deliklere 150 μl] sulandırıldı. Sırayı takip etme amacıyla pipet uçları tek tek sıra ile boş pipet uç kabına yerleştirildi. Sulandırmalar tamamlandıktan sonra vaka sayısı kadar antijen kaplı lam 20°C 'den çıkartıldı. Kapaklı küvet (dibi ıslak kurutma kâğıdı ile kaplı) içinde lamlar lam tutuculara antijen kaplı kısımlar üst bölgeye gelecek şekilde yerleştirildi. Camlarda sol üst köşelere çizik işaretleri konuldu ve uygun lokalizasyona göre kalemle numaralandırma yapıldı. 1/16 ve 1/64 sulandırma basamakları dikkate alınarak bir lamda 6 vakaya ilişkin analiz gerçekleştirilebileceğinden dolayı gerekli lam sayısı hesaplandı. Lamlardaki antijen kaplı kısımların üzerine ortalama 10 μl sulandırma plağındaki en düşük sulandırmadan başlanarak pipet uçları sırası izlenerek konuldu. İşlem sırasında sulandırmaların birbirine karışmaması ve delik dışına taşırılmamasına dikkat edildi. Daha sonra kapaklı küvet kapatılarak 37°C 'de 1800 saniye etüve kaldırıldı. Lamlar bu süre sonunda etüvden alınarak PBS ile 3'er kez olma kaydıyla 5'er dakika yıkandı. Lamlar oda sıcaklığında kurutma kâğıdı üzerine dik olarak yerleştirilip kuruması için beklendi. Kuruduktan sonra antijen üstte kalacak şekilde kapaklı küvetin içerisindeki sehpaye dizildi. Konjuge sulandırması yapıldıktan sonra ne kadar kuyucuk kullanılacaksa sayısı kadar konjuge miktarı belirlendi. Her kuyucuğa 10 μl konjuge sulandırıldı. Gereken toplam kuyucuk sayısı 10 kontrol 28 enfekte hayvan için 76'dır. Bunun için $76 \times 10 \mu\text{l} = 760 \mu\text{l}$ konjuge hazırlandı.

Çalışma sulandırması 1/300 olduğundan 760 µl PBS içine yaklaşık olarak 2,8 µl stok konjuge eklendi. Oda sıcaklığında hazırlanan konjuge seri olarak kayba uğrayacağından (deliklere 10 µl eklenmesi yeterli olacaktır) kullanımından hemen sonra buzdolabına koyuldu. Bu işlemlerden sonra kapaklı küvet kapatılıp 1800 saniye 37 °C etüve kaldırıldı. Daha sonra lamalar 3'er defa 300 saniye PBS ile yıkandı. Kuruma gerçekleşmeden lamlara hızlı bir şekilde PBS-gliserin 2-3 damla eklenip üzerine lamel kapatıldı. Son olarak lamalar mavi ışıkta floresans mikroskofta değerlendirmeye tabi tutuldu.

3.2.2.1.3. Sonuçların yorumu

Mikroskofta floresans veren numuneye ait en yüksek dilüsyon antikor titresi olarak değerlendirildi. Titre 1/64 ve üzeri ise bu serum örnekleri CVL pozitif olarak değerlendirildi (Abranches ve ark, 1991; Töz ve ark, 2005). Soluk ya da hiç yeşil sarı floresans görülmemesi negatif, parlak yeşil sarı floresans pozitif olarak yorumlandı.

3.2.2.2. Serum biyokimyasal analizler

Serum tüplerine alınan kan örneklerinin santrifüj ile serumları çıkarıldıktan sonra Spot-Chem EZ sp-4430 biyokimya cihazı ile gerekli biyokimyasal tetkikler gerçekleştirildi (Resim 6). Sonuçlar paralelinde CVL evrelemesi yapıldı.



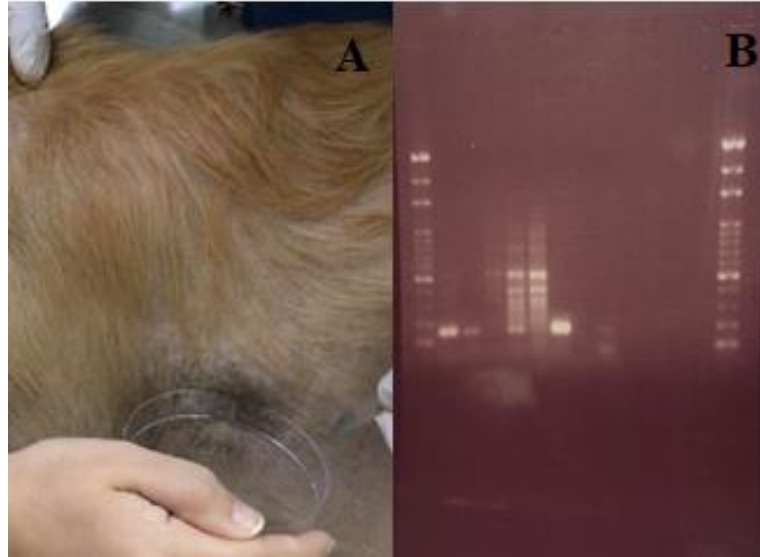
Resim 6. Spot-Chem EZ sp-4430 biyokimya cihazı

3.2.2.3. İdrar analizleri

Kateterle veya gönüllü olarak idrar alımından sonra protein ve kreatinin değerleri ölçümü gerçekleştirildi. İdrar protein/kreatinin oranı hesaplandı. Sonuçlar paralelinde CVL evrelemesi yapıldı.

3.2.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu

DNA ekstraksiyon işlemi için deriden sürüntü örneği alındı (Resim 8). Bu işlem için Promega Wizard Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (Madison, WI, ABD) kullanılarak DNA elde edildi. Ekstre edilen DNA, 100 µl tamponda tekrar askıya alınıp -20°C'de saklandı. Leishmania türüne ait parazitlere özgü (*L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. tropica* ve *L. donovani*) DNA örneği, RV1 (5'-CTT TTC TGG TCC CGC GGG TAG G-3') / RV2 (5'-CCA CCT GGC CTA TTT TAC AC-3') primerleri kullanılarak 145 bp bölgesini kDNA'yı büyütmek için kullanıldı (Fichoux ve ark, 1999; Gao ve ark, 2015). Leishmania türüne ait parazitlere özgü PZR'dan sonra, bütün pozitif örnekler Leishmania türlerini belirlemek için MC1 ve MC2 primerleri kullanılarak ikinci PZR yöntemiyle analiz edildi. MC1 (5'-GTT AGC CGA TGG TGG TCT TG-3') ve MC2 (5'-CAC CCA TTT TTC CGA TTT TG-3') primerleri, 447 bp'lik bir *L. donovani/infantum* kompleksi kDNA bölgesini güçlendirdi. PZR reaksiyonu, her bir primerden 25 µM (RV1 / RV2) ve 2 µl şablon DNA (10-20 ng DNA), 10 mM Tris-HCl, (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, her bir deoksिनükleotit trifosfatın 200 uM'si, 1.5 birim Taq DNA polimeraz (Solis BioDyne) içeren toplam 50 ul hacminde gerçekleştirildi. Reaksiyonlar bir otomatik termal döngüleyicide (Applied Biosystems, Veriti™) gerçekleştirildi ve 95°C'de 12 dakika boyunca bir ilk denatürasyon basamağı, ardından 35 kez denatürasyon (50 saniye için 94°C), primer kaynaşma (50 saniye için 57°C) ve uzama (30 saniye için 72°C) aşamalarından oluştu. 10 dakika 72°C'de son bir uzatma yapıldı ve örnekler 4°C'de tutuldu. 10 µl PZR ürünü, 100°C'de 1 saat süreyle Tris-asetat-EDTA tamponunda 10 µl/ml %1.5 agaroz jeli üzerinde elektroforezlendi ve UV ışığı altında görselleştirildi (Resim 7). PZR yöntemine ait aşamalar Resim 8'de gösterildi. PZR analizleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.



Resim 7. PZR için örnek alınması ve görselleştirilmesi: A) PZR yöntemi için deriden alınan örnek B) PZR ürününün UV ışık altında görselleştirilmesi



Resim 8. PZR aşamaları

3.2.3. Derinin Biyofiziksel Muayenesi

Sağlıklı ve hasta hayvanlarda derinin hidrasyonu, elastikiyeti, sıcaklığı ve melanin miktarı Callegari Soft Plus cihazı ile ölçüldü (Resim 9). Dermatolojik bulgular kaydedilerek istatistiksel değerlendirmeye tabi tutuldu (Resim 10).



Resim 9. Callegari Soft Plus Cihazı

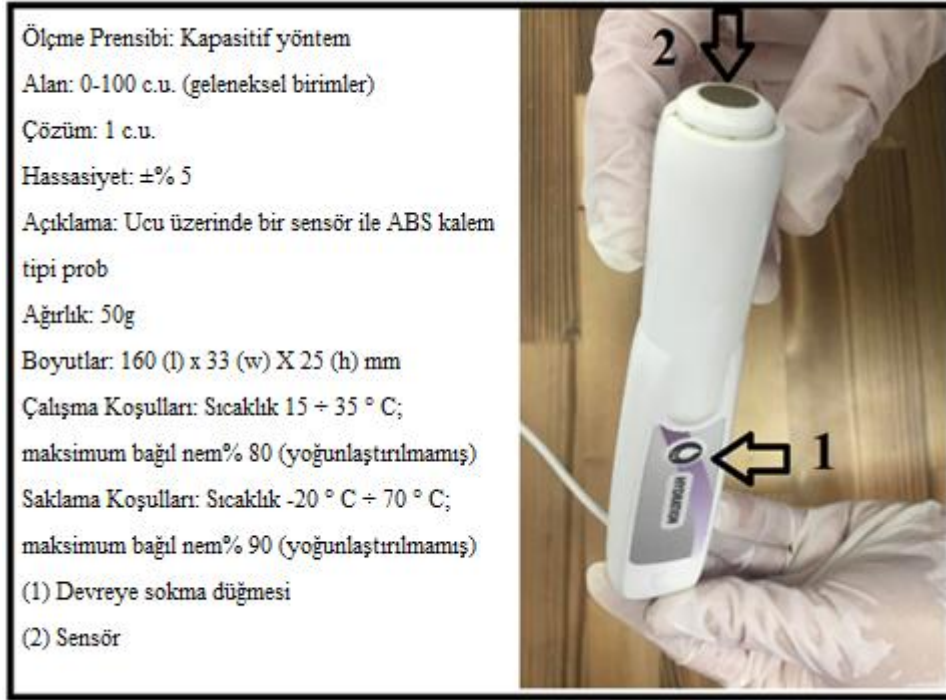


Resim 10. Callegari Soft Plus Cihazı ile derinin biyofiziksel muayenesi

3.2.3.1 Hidrasyon

Çift uygulamalı [1] devreye sokma düğmesi (butonu) ile 2) sensör bulunan] probun 'ON' düğmesine basıldıktan sonra deriye yerleştirildi. Tüm sensörün deri ile temas halinde olduğundan emin olundu. Ölçüm bitene kadar basınç sabiti sensörün uç kısmında korundu ve ucun probun içine doğru hareket etmesini sağlamak için aşağı doğru basıldı. Ölçümün

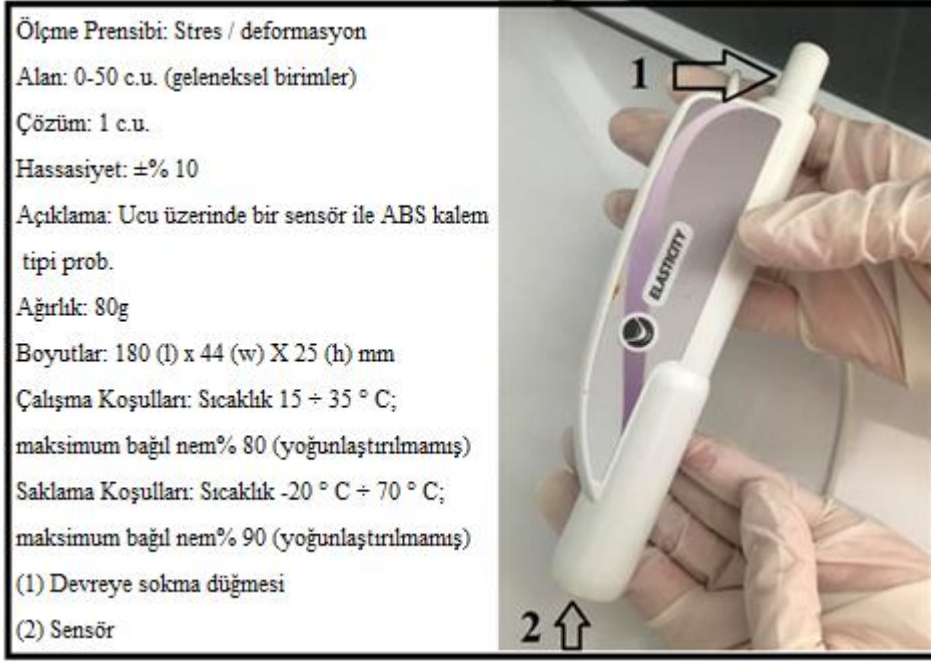
tamamlandığına dair cihazdan gelen uyarı sesi ile prob deriden çekilip bir sonraki aşamaya geçildi. Proba ait özellikler Resim 11 'de gösterildi.



Resim 11. Deri hidrasyonunu ölçen probun özellikleri

3.2.3.2. Elastikiyet

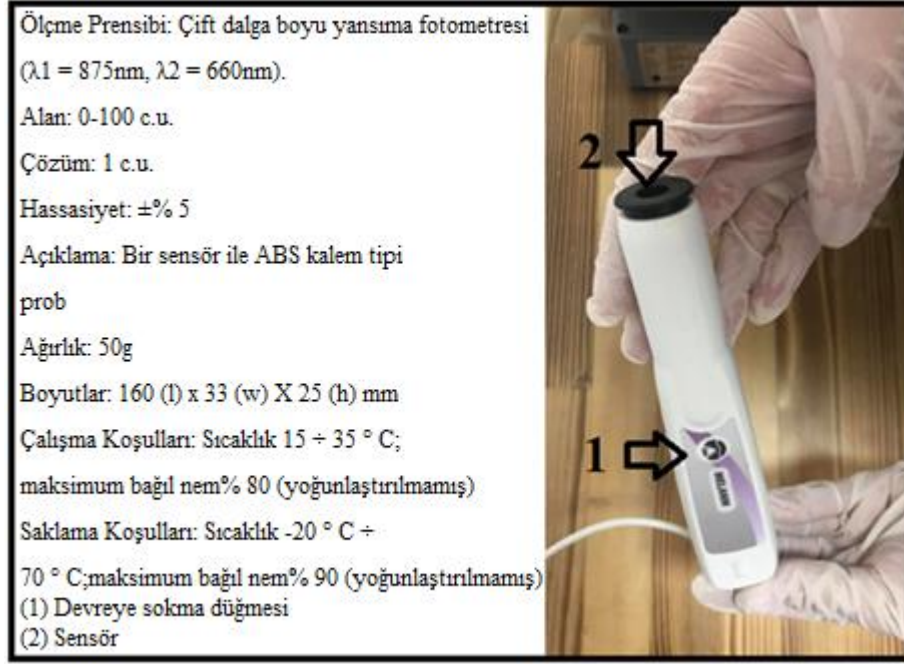
Çift uygulamalı [1] devreye sokma düğmesi (butonu) ile 2) sensör bulunan] prob deriye sabit bir pozisyonda dik açıda yerleştirildikten sonra pistonu basıldı. Ölçümün tamamlandığına dair cihazdan gelen uyarı sesi ile prob deriden çekilip bir sonraki aşamaya geçildi. Proba ait özellikler Resim 12' de gösterildi.



Resim 12. Deri elastikiyetini ölçen probun özellikleri

3.2.3.3. Melanin

Çift uygulamalı [1) devreye sokma düğmesi (butonu) ile 2) sensör bulunan] prob deriye dik açıda yerleştirildikten sonra probun ucu ölçüm tamamlanıncaya kadar basıncı sabit tutmak için uygun şekilde bastırıldı. "ON" düğmesine basıldı ve ölçüm tamamlandı. Prob'a ait özellikler Resim 13' te gösterildi.



Resim 13. Deri melanin seviyesini ölçen probun özellikleri

3.2.3.4. Sıcaklık

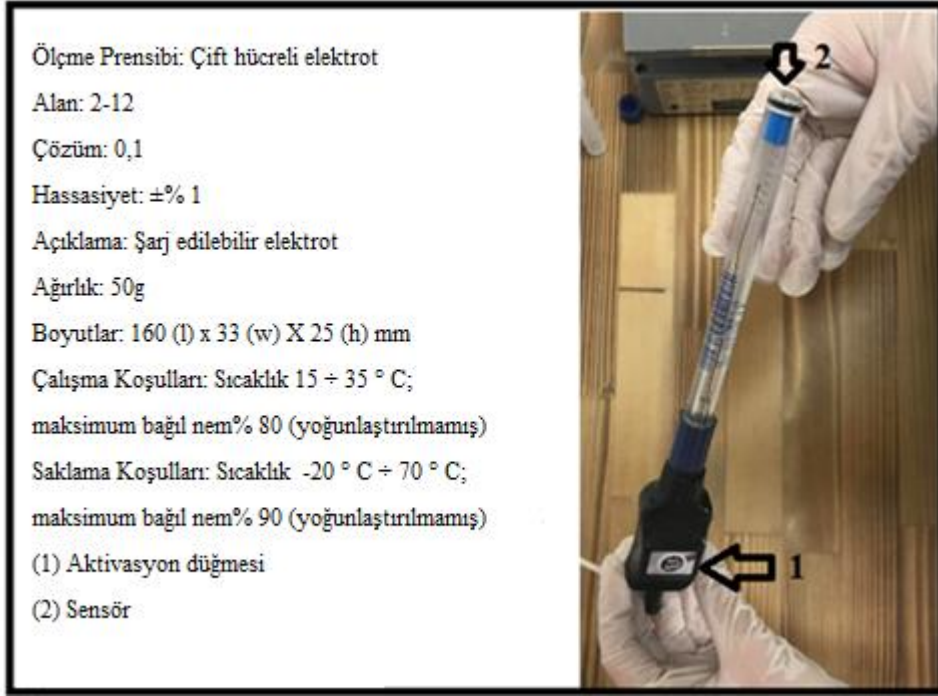
Çift uygulamalı [1) devreye sokma düğmesi (butonu) ile 2) sensör bulunan] prob ölçüm yapılacak deriye mesafeyi ayarlamak için düğmeye 'ON' konumunda basıldı. Mesafe ayarlandıktan sonra kapağın iki kırmızı ışığı ölçülecek olan deri alanında net bir şekilde görülene kadar 'ON' düğmesine basıldı. Prob ölçüm tamamlanana kadar sabit tutuldu ve 'ON' düğmesine 2 saniye kadar basılı tutularak bırakıldı. Bir sonraki aşamaya geçildi. Prob'a ait özellikler Resim 14'te gösterildi.



Resim 14. Deri sıcaklığını ölçen probun özellikleri

3.2.3.5. pH

Çift uygulamalı [1] devreye sokma düğmesi (butonu) ile 2) sensör bulunan] prob depolama sıvısından çıkarıldı ve ölçüm yapılmadan önce distile suyla durulandı. Daha sonra deri üzerine yerleştirildi ve 'AÇIK' düğmesine basılı tutuldu. Ölçümün tamamlandığına dair korneometre cihazından gelen uyarı sesiyle prob deri üzerinden çekildi. Prob depolama sıvısına yerleştirilmeden önce distile suyla yıkandı ve ölçüm tamamlandı. Prob'a ait özellikler Resim 15' te gösterildi.



Resim 15. Deri pH'sını ölçen probun özellikleri

3.2.4. İstatistiksel Analizler

Araştırma verilerinin istatistiksel analizleri istatistiksel bir yazılım paketi (SPSS 22.0, SPSS Inc, Chicago, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Deri hidrasyon, elastikiyet, melanin, sıcaklık ve pH ölçümlerine ait elde edilen verilerin normalitesi Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve verilerin normal dağılmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle sağlıklı ve CVL'li köpeklere ait veriler non-parametrik Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılmıştır. Parametrelere ilgili verilerin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değerleri tablolarda sunulmuştur. $p < 0.05$ olasılık değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık belirlenen parametrelere ait veriler sütun ve ısı haritası grafikleriyle sunulmuştur.

4.BULGULAR

4.1. Sağlıklı ve Evrelendirme Yapılan Olgularda Demografik Bulgular

Leishmaniasis ile enfekte olgular idrar protein/kreatinin ve serum biyokimyasal analizlere göre evrelendirilip gruplara ayrıldı. Evre 1, evre 2, evre 3 ve evre 4'e ilişkin demografik bulgular Tablo 11'de gösterildi. Sağlıklı gruba ait demografik bulgular ise Tablo 12'de gösterildi.

Tablo 11. Leishmaniasis ile enfekte olgulara ait demografik bulgular

Grup	Olgu	Cinsiyet	İrk	Yaş (yıl)
Evre I	1	Erkek	Golden Retriever	9
	2	Erkek	Av Köpeği	3
	3	Erkek	Melez	6
	4	Dişi	Spaniel Cooker	4
	5	Dişi	Melez	3
	6	Erkek	Dogo Argentino	6
	7	Dişi	Melez	7
Evre II	1	Erkek	Melez	4,5
	2	Dişi	Kangal	8
	3	Dişi	French Bulldog	1,5
	4	Dişi	Melez	5
	5	Erkek	Melez	3
	6	Erkek	Melez	6
	7	Erkek	Dogo Argentino	2
Evre III	1	Erkek	Av Köpeği	6
	2	Dişi	Boxer	7
	3	Erkek	Golden Retriever	5
	4	Dişi	Husky	8
	5	Erkek	Husky	4
	6	Dişi	Melez	10
	7	Dişi	Terrier	12
Evre IV	1	Erkek	Golden Retriever	8
	2	Erkek	Kangal	5
	3	Dişi	Chow Chow	2
	4	Erkek	Golden Retriever	5
	5	Erkek	Golden Retriever	5
	6	Erkek	Boxer	5
	7	Dişi	Pitbull	5

Tablo 12. Sağlıklı gruba ait demografik bulgular

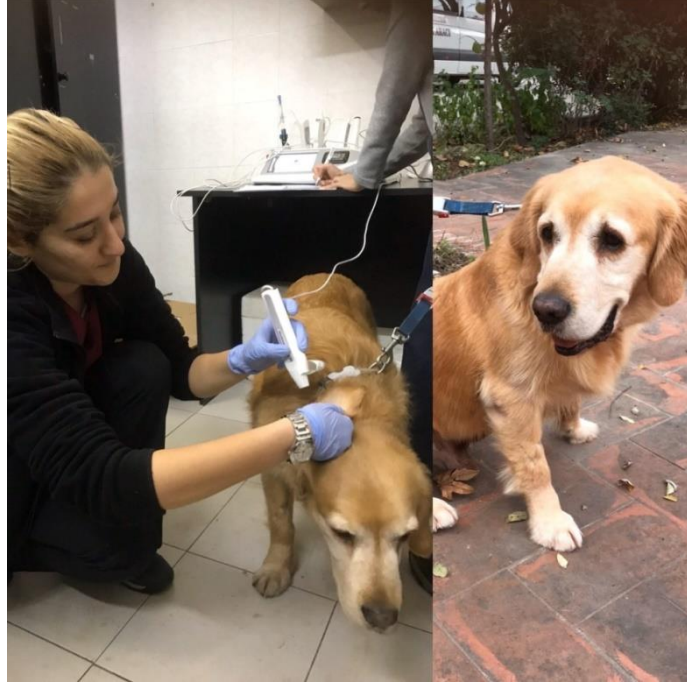
Grup	Olgu	Cinsiyet	İrk	Yaş (yıl)
Sağlıklı	1	Dişi	Av Köpeği	8
	2	Dişi	Rottweiler	5
	3	Erkek	Pomerinian	1
	4	Dişi	Golden Retriever	3
	5	Erkek	Melez	3
	6	Dişi	Golden Retriever	2
	7	Erkek	Dogo Argentino	2,5
	8	Dişi	Kangal	1,5
	9	Erkek	Melez	1,5
	10	Erkek	Pug	2

4.2. Dermatolojik Bulgular

4.2.1. V.Grup (Sağlıklı- Kontrol)



Resim 16. Sağlıklı-Kontrol grubu (Olgu No 8)



Resim 17. Sağlıklı-Kontrol grubu (Olgu No 6)

4.2.2. I. Grup (Evre 1 CVL)

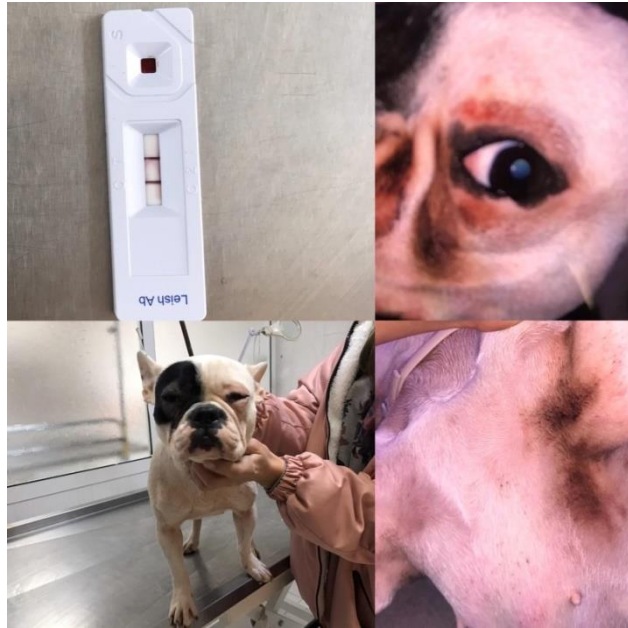


Resim 18. Evre I CVL (Olgu No 1)



Resim 19. Evre I CVL (Olgu No 6)

4.2.3. II. Grup (Evre 2 CVL)



Resim 20. Evre II CVL (Olgu No 3)



Resim 21. Evre II CVL (Olgu No 6)

4.2.4. III. Grup (Evre 3 CVL)



Resim 22. Evre III CVL (Olgu No 1)

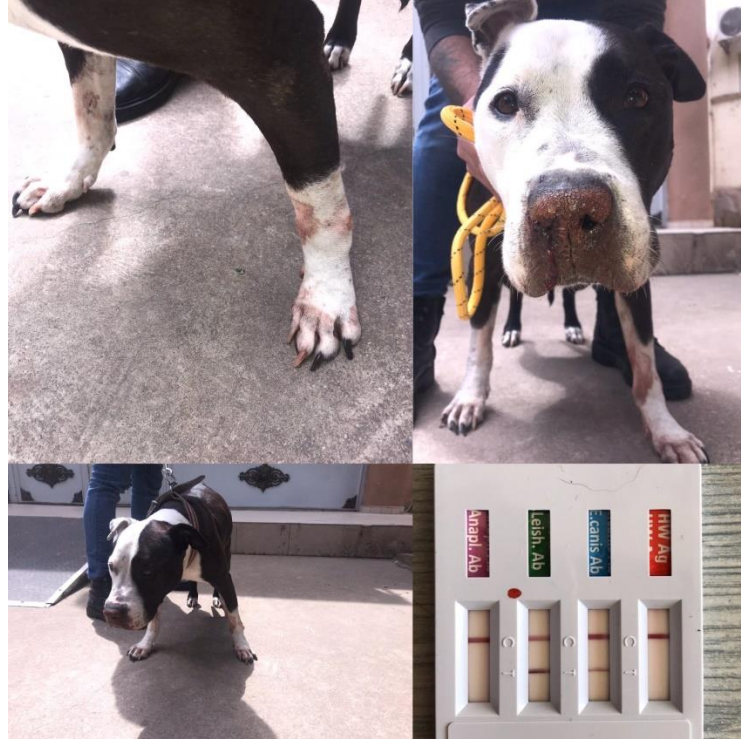


Resim 23. Evre III CVL (Olgu No 3)

4.2.5. IV. Grup (Evre 4 CVL)



Resim 24. Evre IV CVL (Olgu No 6)



Resim 25. Evre IV CVL (Olgu No 7)

4.3. Laboratuvar Bulguları

4.3.1. IFAT Bulguları

Leishmaniasis hastalığına karşı üretilen Ig G antikor titresine ilişkin tez çalışmasında oluşturulan gruplara ait IFAT analiz (titrasyon) sonuçları Tablo 13'te gösterildi. Sağlıklı (kontrol) grubunda Ig G antikor titresine ait veriye rastlanmadı. Evre I'e ait olguların hepsinde titre düzeyleri 1/64 saptanırken, evre II'ye ait olguların 5'inde 1/128 2'sinde 1/256 titre düzeyleri, evre III'e ait olguların 2'sinde 1/256 5'inde 1/512 titre düzeyleri, evre IV' e ait olguların 5'inde 1/2048 2'sinde 1/4096 titre düzeylerine rastlandı.

Tablo 13. Çalışmada oluşturulan ilgili gruplara ait IFAT (titrasyon) bulguları

Grup	IFAT (Titre düzeyleri)						
	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Evre I	7	-	-	-	-	-	-
Evre II	-	5	2	-	-	-	-
Evre III	-	-	2	5	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	-	5	2
Sağlıklı	-	-	-	-	-	-	-

4.3.2 ELISA ve PZR Bulguları

ELISA ve deri PZR bulguları Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14. ELISA ve deri PZR bulguları

Evre	I							II							III							IV						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Olgu																												
Deri PZR	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
ELISA (hızlı test kiti)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.3.3 Biyokimyasal Bulgular

Leishmaniasis hastalığını evrelendirmeye yönelik serum kreatinin parametrelerine bakıldı. Kreatinin düzeyleri (minimum-maksimum) evre I’de 0,3-1,4 mg/dL; evre II’de 0,6-1,3 mg/ dL; evre III’de 1,6-2,0 mg/dL; evre IV’de ise 2,1-4,3 mg/dL olarak belirlendi.

4.3.4. İdrar Analiz Bulguları

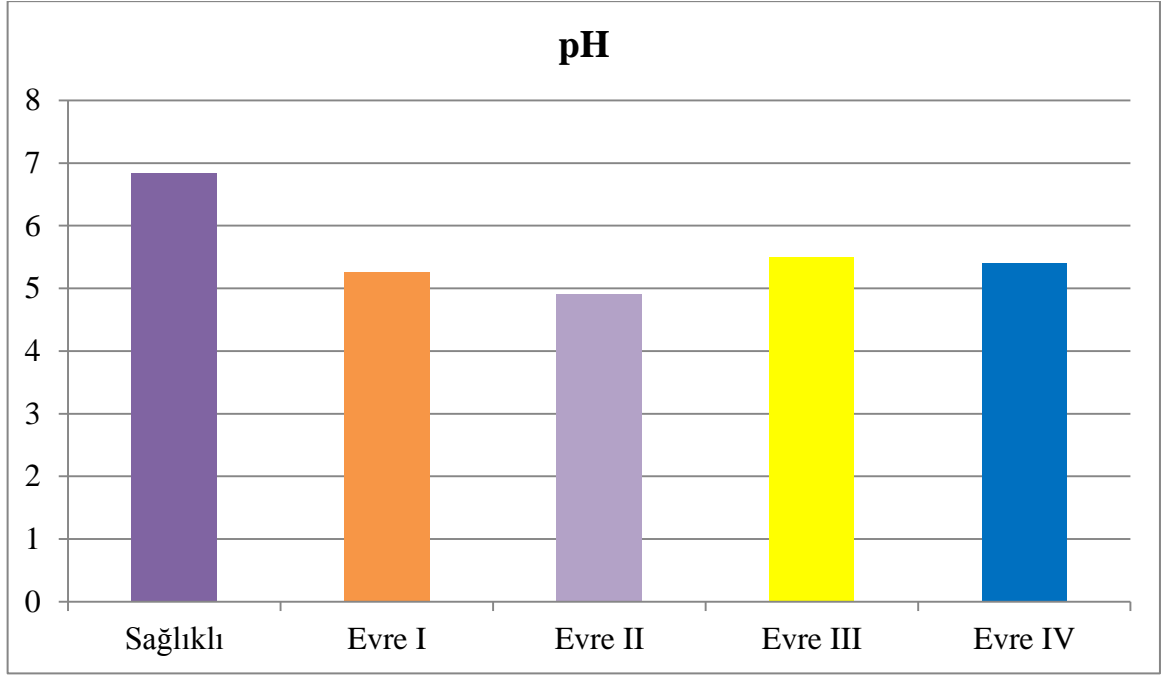
İdrarda protein/kreatinin oranı grup bazında değerlendirildiğinde evre I (<0.5), evre II (4 olguda <0.5, diğer 3 olguda 0.5-1 arası), evre III (≥ 1 , evre 2 kronik böbrek yetmezliği ile uyumlu), evre IV (≥ 5 , nefrotik sendrom ile uyumlu) farklı verilerle karşılaştıldı. Leishvet grubunun rehber bülteni ile uyumlu olarak idrar protein/kreatinin oranları görüldü (Solano-Gallego ve ark, 2011).

4.4 Biyofiziksel Muayene Bulguları

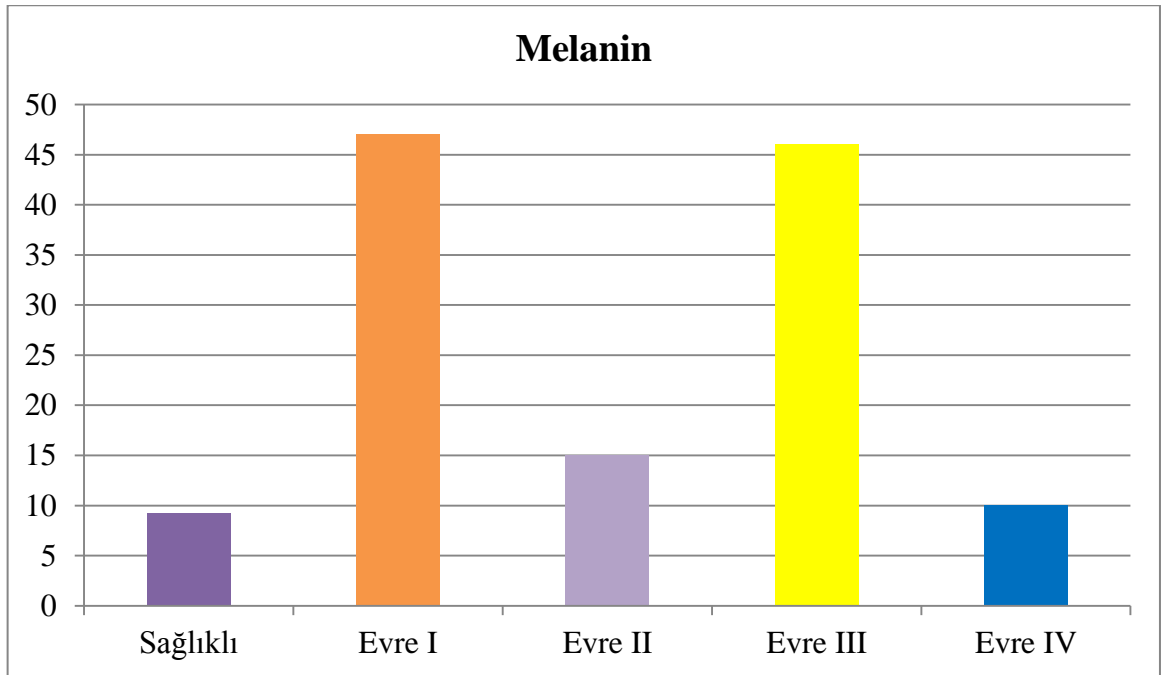
Sağlıklı ve Leishmaniasis'in farklı evrelerinde olduğu belirlenen köpeklerde deri pH, hidrasyon, elastikiyet, sıcaklık ve melanin parametrelerinin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değerleri Tablo 15'te sunulmuştur. Sağlıklı köpeklere göre tüm evrelerdeki Leishmaniasis'li köpeklerde pH değerinde azalma belirlenmiştir ($p < 0.001$, Şekil 10). Melanin değerleri evre I ve III grubu köpeklerde, sağlıklı ile evre II ve IV'teki köpeklere göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$, Şekil 11). Hidrasyon, elastikiyet ve sıcaklık parametrelerinde gruplar arası farklılıkların istatistiksel anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Korneometrik analizlerde melanin, elastikiyet, sıcaklık, hidrasyon, pH ölçümlerine ait ısı haritaları sırasıyla Şekil 12, Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tablo 15. Olguların deri pH, hidrasyon, elastikiyet, sıcaklık ve melanin değerleri

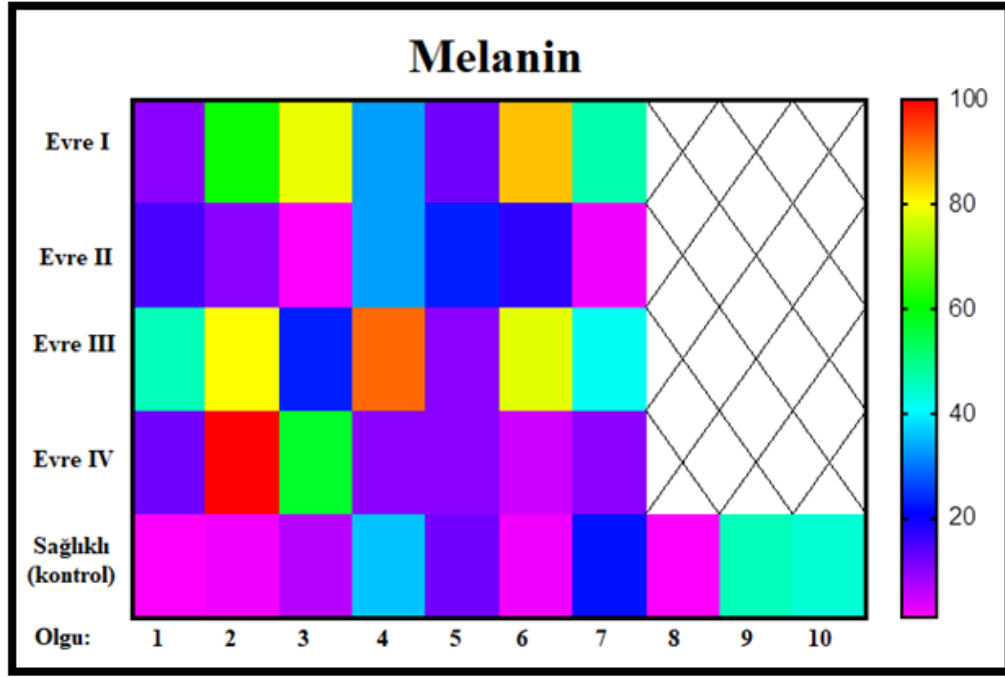
Parametreler	Sağlıklı (n=10)	Evre I (n=7)	Evre II (n=7)	Evre III (n=7)	Evre IV (n=7)	p
pH ($-\log H^+$)	6,83 (6,53-6,90)	5,25 (4,70-5,60)	4,90 (4,70-5,40)	5,50 (5,10-5,70)	5,40 (4,75-5,50)	0,000
Hidrasyon	23,8 (18,7-51,8)	27,5 (5,5-49)	15,5 (4-24,5)	26,7 (15,7-54,5)	18,7 (10,5-26,2)	0,285
Elastikiyet	49,5 (48,7-49,5)	49,5 (48,7-50)	49,7 (48,2-50)	49,5 (48-49,75)	48,2 (47-48,7)	0,263
Sıcaklık (°C)	33,1 (31,5-35,1)	33,7 (32,5-35,1)	33,2 (32,4-34,6)	33,0 (32-33,5)	33,5 (33,2-34)	0,801
Melanin	9,2 (1,7 - 38)	47 (12 - 78,5)	15 (2 - 23)	46 (23 - 80,3)	10 (10-57)	0,034



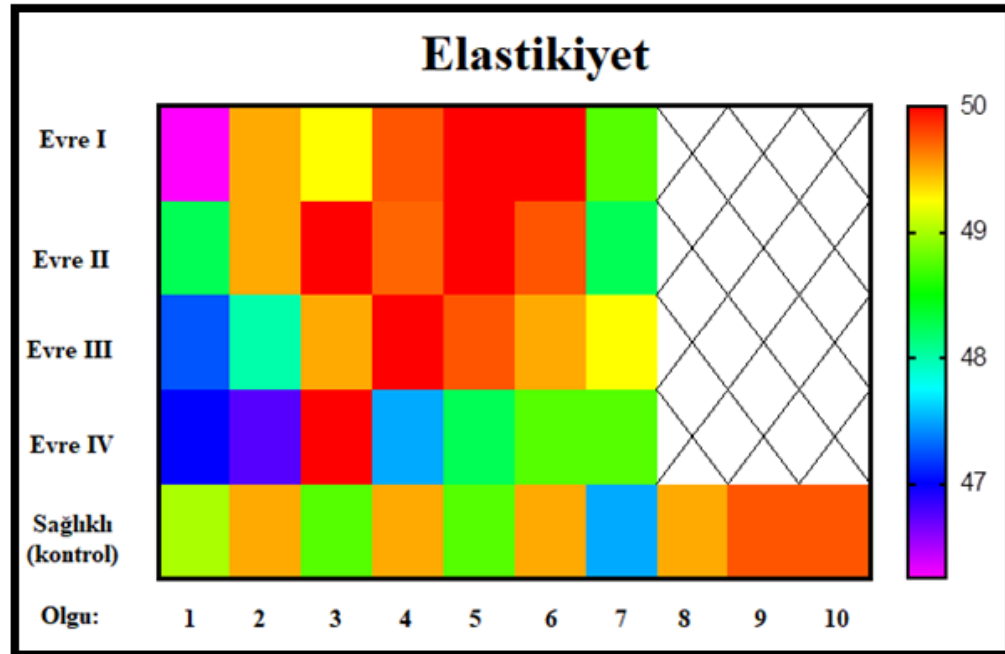
Şekil 10. Sağlıklı ve Leishmaniasis ile enfekte köpeklerde deri pH değerleri



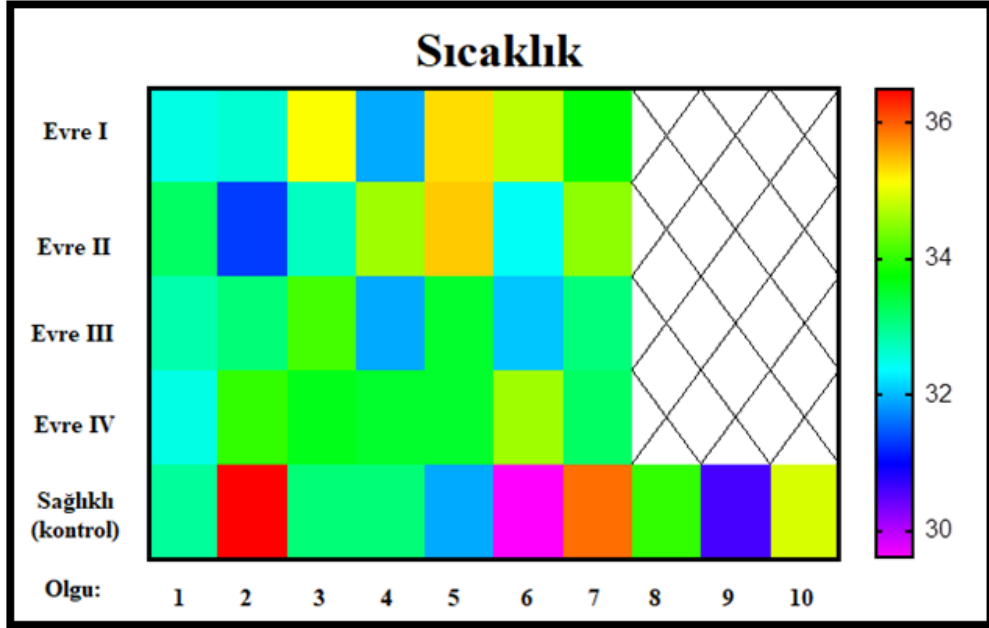
Şekil 11. Sağlıklı ve Leishmaniasis ile enfekte köpeklerde deri melanin değerleri



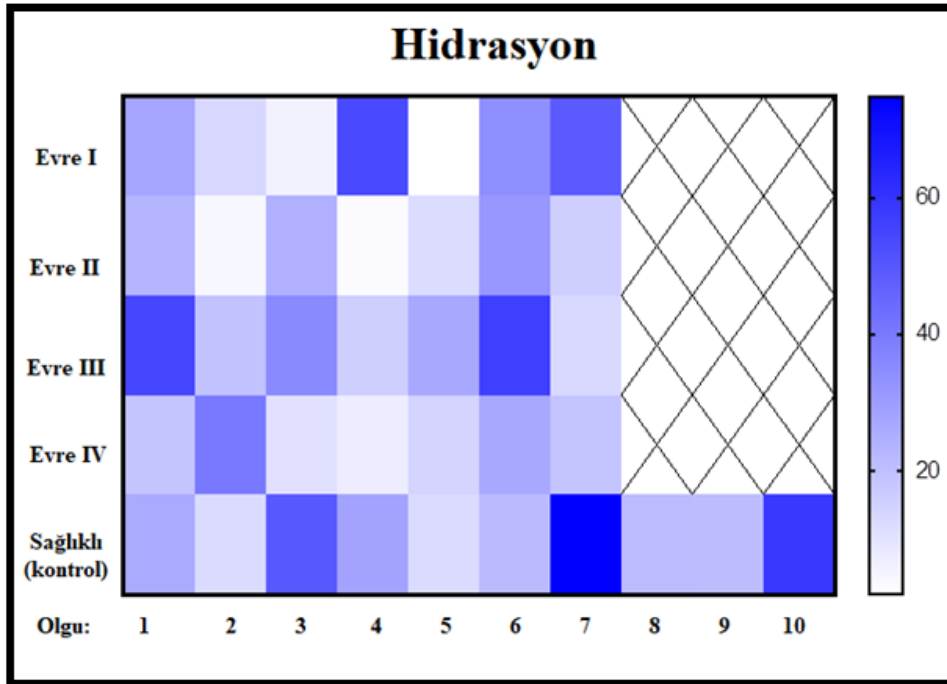
Şekil 12. Korneometrik analizlerden melanin ölçümüne ait ısı haritası



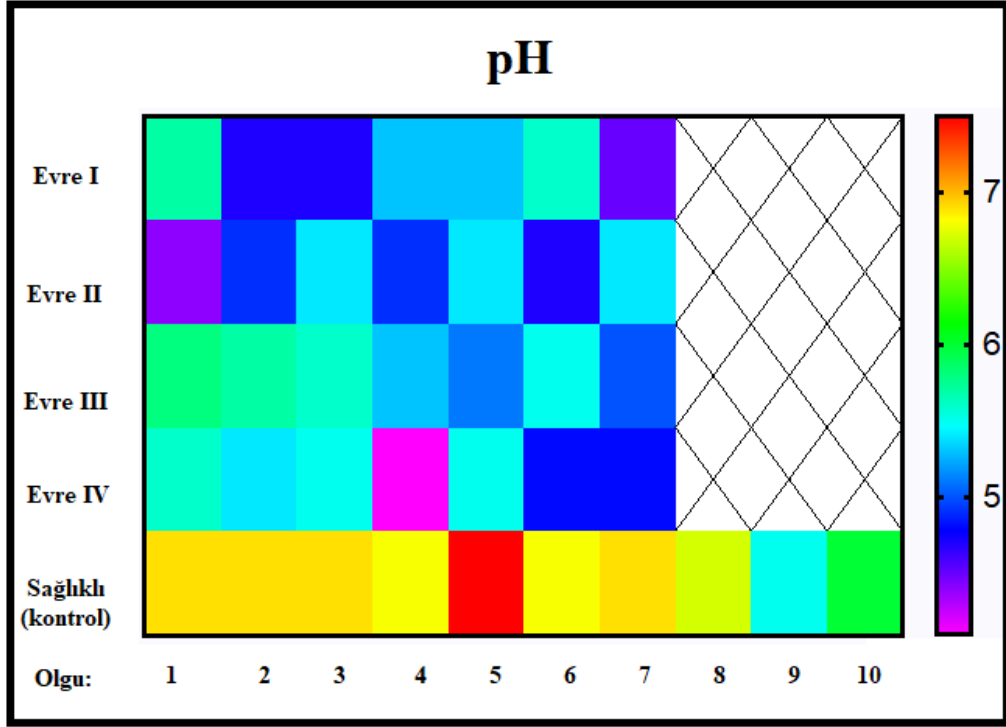
Şekil 13. Korneometrik analizlerden elastikiyet ölçümüne ait ısı haritası



Şekil 14. Korneometrik analizlerden sıcaklık ölçümüne ait ısı haritası



Şekil 15. Korneometrik analizlerden hidrasyon ölçümüne ait ısı haritası



Şekil 16. Korneometrik analizlerden pH ölçümüne ait ısı haritası

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda Ege Bölgesinde endemik sayılabilecek bir etken olan CVL çalışıldı. Toplamda 28 adet hasta ve klinik bulgu gösteren köpeğe önce hızlı test kitleri (ELISA) ardından deriden alınan sürüntü örneğinde PZR çalışıldı. Hasta köpeklerin tamamında hızlı test kiti ile ELISA pozitiflik saptanırken evre I'de hiçbir olguda PZR pozitiflik belirlenemedi. Evre II ve III'te 7'şer olgudan 4'ünde evre IV'te ise olguların 6'sında PZR pozitifliği belirlendi. Farklı yollarla noninvaziv şekilde CVL ile enfekte hayvanlardan PZR analizleri için örnekleme yapılabileceği (de Almeida Ferreira ve ark, 2013; Reis ve ark, 2013) bildirimleri göz önünde bulundurulursa çalışmamızda teşhise yönelik önemli bir avantaj sağlayan PZR örnekleme ileriki çalışmalar için anahtar rol sağlayabilir. Bunu destekler mahiyette bu tez çalışması tersinden okunursa ELISA pozitif bulgu vermeyen yani antikor teşhis edilemeyen mamafih yüksek CVL şüphesi bulunan hayvanlarda (Solano- Gallego ve ark, 2011) noninvaziv mukokutanöz sürüntü örneklerinin PZR yoklaması teşhise yönelik yarar sağlayabilir.

İnsanlarda deri bariyer bütünlüğünün gerek klinik tabanlı araştırmalarda gerekse klinik bazlı muayenede değerlendirilmesine yönelik noninvaziv teknikler kullanılmaktadır. Bu alanda öne çıkan değerlendirme parametrelerinden bir tanesi de TEWL'dir. Toplam kutanöz sıvı kaybının (pasif ter bezi aktivitesi; ter bezleri tarafından sekrete edilerek evapore olan sudan farklıdır) belirlenmesi için perkutanöz dışa yönelik sıvı difüzyonu olarak tabir edilen TEWL (Batt ve Fairhurst, 1986; Cobiella ve ark, 2019) günümüzde gerek insan gerekse hayvanlarda klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. Atopik bireylerde artmış olan TEWL i) azalmış deri bütünlüğü, ii) azalmış seramid seviyeleri ile iii) düşük su kapasitansı gibi sebeplerle ilişkilendirilerek deride kurumaya neden olmaktadır (Di Nardo ve ark, 1998). *L. donovani* ile makrofajlar arasındaki başlangıç etkileşimi lipid yığınları olarak adlandırılan membran platformlarının oluşumuna neden olmakta bu da parazitin konakçı hücrelerine geçişini kolaylaştırmaktadır (Majumder ve ark, 2012). 2012 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada *Leishmania* türlerince uyarılan bifazik seramid rejenerasyonu ispatlanmış, elde edilen sonuçlar *L. donovani*'ye bağlı olarak oluşturulan hastalık tablosunda seramidlerin rolünü ispatlar nitelikte olup anti-leishmanial stratejilerin geliştirilmesinde rol teşkil edebileceği bildirilmektedir (Majumder ve ark, 2012). Anılan seramid tabakası açısından atopik dermatitis ile leishmaniasis'e bağlı deri hastalıkları arasında bir ilişki olabileceği öne

sürülebilir. Bunu destekler mahiyette leishmaniasis'ten etkilenen deride TEWL'de artışa eşlik eden epidermal ve dermal yapısal değişiklikler atopik dermatitis'e benzer şekilde leishmaniasis'te de hastalık aktivitesine bağlı olarak deri bariyer fizyolojisinin fonksiyonlarının ve geçirgenliğinin değişebileceğini göstermektedir (Majumder ve ark, 2012; Van Bocxlaer ve ark, 2016).

Köpeklerde deri bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesinde yine TEWL geniş çapta ilgi uyandırmaktadır (Santoro ve ark, 2015). Son sözü edilen bu parametre gerek derinin seramid içeriği gerekse deri bütünlüğü ile ters korelasyona sahiptir (Shimada ve ark, 2008;2009; Bradley ve ark, 2016). Tüm bunların dışında TEWL yüksek değişkenlik ve klinik bulgularla uyumsuz öneme sahip olabilmektedir (Lau- Gillard ve ark, 2010; Santoro ve ark, 2015). Köpeklerde kapalı çember instrmanı olan VapoMeter ile gerçekleştirilen bir çalışmada bu parametrenin tekrarlanabilirliği ölçülmüştür (Lau- Gillard ve ark, 2010). Ancak anatomik lokalizasyondan bir başka lokalizasyona ve günden güne değişken olabileceği için bu parametrenin klinik çalışmalarda kullanımı soru işareti yaratmaktadır (Lau- Gillard ve ark, 2010, Cobiella ve ark, 2019). Yine de TEWL atopik dermatitli köpeklerde deri bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesine yönelik altın standart özellik taşımaktadır (Santoro ve ark, 2015, Cobiella ve ark, 2019). Bunların dışında, bizim çalışmamıza da konu olduğu üzere, kutanöz pH ile stratum korneum hidrasyonu köpeklerde deri bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesine yönelik alternatif parametrelerdir. İnsanlarda deri pH'sı stratum korneum hidrasyonu ve TEWL ile atopik çocuklarda deri absorbansı perkutanöz alerjen penetrasyonunu belirlemede kullanılan parametrelerdir (Takami ve ark, 2012). Bizim çalışmamızda Veteriner İç Hastalıkları alanına yönelik ilk kez CVL'de deri bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesinde Callegari soft plus (İtalya, Türkiye Distribitörü RDA grup) korneometre cihazı kullanılmış olup stratum korneum hidrasyonu ile kutanöz pH ölçülmüştür.

Leishmania ile enfekte farelerde yapılan bir çalışmada epidermal bariyer hasarı ve ilaçların deriye nüfuz edişi araştırılmıştır (Van Bocxlaer ve ark, 2016). İlgili çalışmada immunohistokimyasal analizlerle ispatlandığı üzere yangı hücrelerinin epidermal ve dermal katmanlara geçişi ile birlikte yapısal değişiklikler, TEWL'de belirgin bir artış ile anti-leishmanial ilaçlardan bupovaquone ve paromomisin de dahil hasta deriye daha yüksek oranda bir geçiş meydana geldiği belirtilmektedir. Aynı çalışmada enfeksiyonun deri pH'sı ile hidrasyon üzerine ölçülebilen bir değişiklik yapmadığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada hidrofilik moleküllerin (paromomisin sülfat ile kafein) daha yüksek bir geçirgenlik sergilediği

buna karşın lipofilik olan moleküllerin (ibuprofen ve buparvaquone) daha az miktarda deriye geçtiği saptanmıştır (Van Bocxlaer ve ark, 2016).

Deri ile temas eden leishmania parazitlerinin enflamasyon ve kemokinlerin salınımla sonuçlandığı bilinmektedir (Beil ve ark, 1992; Ritter ve Körner, 2002). Bu noktadan hareketle meydana gelen ödemin (intersitisyel boşluklarda ilave sıvı toplanması ile oluşan) suda çözünebilen yukarıda da sözü edildiği gibi kafein ve paromomisin gibi moleküllerin daha kolaylıkla deriye penetrasyonu olmaktadır (Van Bocxlaer ve ark, 2016). Leishmania ile enfekte olmuş deriye topikal ilaç dağıtımını etkileyen önemli bir parametre olan cilt bariyer bütünlüğünü karakterize etmek için birkaç yaklaşım kullanılmıştır (Van Bocxlaer ve ark, 2016). Öncelikle deri fizyolojisindeki histopatolojik değişiklikler incelenmiştir. En çok göze çarpan gözlem, bol miktarda enflamatuvar hücrelerin, epidermal ve dermal cilt tabakalarının devamlılığını bozan enfeksiyon bölgesine yerleşmesi olmuştur (Van Bocxlaer ve ark, 2016). Bu, *L. major* enfeksiyonuna oldukça duyarlı olan BALB/c farelerindeki enflamasyonun, enflamasyon, ülserasyon ve nekroz ile karakterize olduğu önceki raporlarına benzerdir (Belkaid ve ark, 1998; Cangussu ve ark, 2009; Corware ve Harris, 2011).

L. major enfeksiyonunun deride disbiyozis ile komorbidite olduğu durumlarda epidermal inflamatuvar cevap araştırılmış ve *S. xylosus* adlı etkenin derideki koruyucu bariyer ortadan kalktığına yangıyı tetiklediği anlaşılmıştır (Gimblet ve ark, 2017). Aynı çalışmada leishmania parazitleriyle enfeksiyon sonrası deride bakteriyel biyoçeşitliliğin azaldığı, insanlara benzer şekilde farelerde de *Stafilococcus spp.* ve *Streptococcus spp.* türlerinin baskın hale geçtiği anlaşılmıştır. Elde edilen sonuçlar *L. major* enfeksiyonunda hastalık aktivitesiyle ilişkili olarak deri mikrobiyotasındaki bozulmanın (disbiyozis) lezyon patolojisine ve dermal selüler cevaba katkıda bulunarak gerek immun gerekse inflamatuvar cevaptan sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Gimblet ve ark, 2017). Kolajen ve epidermal hiperplazinin yoğunluğunun azalmasıyla gösterilen epidermal ve dermal deri tabakalarında bozulma, deri bariyer özelliklerinin azaltılabileceğini, epidermal tabakadaki, proliferasyon ve farklılaşma gibi anormalliklerin deri bariyeri fonksiyonunun bütünlük için gerekli olduğu bilinmektedir (Ekanayake-Mudiyanselage ve ark, 1998). Vücut içerisindeki sıvı hareketinin düzgün bir şekilde kontrolünü sağlayan deriye ait bir biyobelirteç olarak TEWL leishmania ile enfekte deride iki kat fazla kayba uğramaktadır (Van Bocxlaer ve ark, 2016). TEWL'de böyle bir artış, tinea enfeksiyonları ve sedef hastalığı gibi diğer bazı cilt hastalıklarında da gözlenmiştir (Motta ve ark, 1994; Tomita ve ark, 2005; Jensen ve ark, 2007). Elde edilen bulgular TEWL'deki değişim ile birlikte leishmania'da bariyer fonksiyonlarının azaldığını göstermekte (Van Bocxlaer ve ark, 2016), yine gerek insan gerekse farelerde ispatlandığı

üzere deride azalan bakteriyel biyoçeşitliliğin hastalık şiddetiyle doğru orantılı olarak patojen *Stafilococcus spp.* ve *Streptococcus spp.*'lerin çoğaldığını göstermektedir (Gimblet ve ark, 2017). Disbiyotik farelerde kontrol grubuna göre dermatolojik lezyon şiddetinin (artmış olan deri ülserasyonu) daha yüksek olması *L. major* enfeksiyonu sonrası lezyon gelişiminin deri mikrobiyotası ile doğru orantılı olduğunu göstermektedir (Gimblet ve ark, 2017). Netice itibarıyla *L. major* enfeksiyonunun deride antimikrobiyal peptid ekspresyonunu değiştirdiği (Gimblet ve ark, 2017) ve katherisidin tip antimikrobiyal peptid eksikliği bulunan farelerde *L. amazonensis* ile enfeksiyona duyarlılığın arttığı tespit edilmiştir (Kulkarni ve ark, 2006). Deride meydana gelen disbiyozis bariyer defekti, epidermal bariyere penetre olan stafilokokal türler, deride artmış olan sitokin ekspresyonu (Nakatsuji ve ark, 2016), nötrofiller ve interlökin 1 beta oluşumu (Voronov ve ark, 2010; Fernández- Figueroa ve ark, 2012; Gonzales- Lombana ve ark, 2013; Novais ve ark, 2015; Charmoy ve ark, 2016) bütünüyle leishmaniasis'in deri bariyer bütünlüğünü bozmasıyla sonuçlanmaktadır. Bizim çalışmamızda kapasitif yöntem ile ölçüm sonrası sağlıklı köpeklerde hidrasyon değerleri sağlıklı köpeklerde 18,7-51,8 c.u. iken evre I-IV sırası ile 5,5-49, 4-24,5, 15,7-54,5 ve 10,5-26,2 c.u. değerleri ile karşılaştırılmıştır. Leishmania lezyonunda sıvı birikmesine rağmen, cilt yüzeyinin enfekte olmamış cilt ile karşılaştırıldığında daha fazla hidrate olmadığı anlaşılmaktadır (Van Bocxlaer ve ark, 2016). Çalışmamızda sağlıklı köpeklere oranla leishmania ile enfekte köpeklerde hidrasyon açısından istatistiksel anlamda belirgin farkların oluşmaması normal ya da disbiyotik deri ile açıklanabilir. Çalışmamızda bütçe kısıtlılığı nedeniyle mikrobiyota analizleri gerçekleştirilemese de ölçüm yapılan lezyonların lokalize olduğu anatomik bölgelerde derinin normal (öbiyotik) ya da disbiyotik olması hidrasyon değerleri ölçümünü etkileyebilir.

Cobiella ve ark. (2019) sağlıklı ve atopik dermatitli köpeklerde 5 farklı metodoloji ile deri bariyer fonksiyonlarını incelemiştir. 15'er adet sağlıklı ve atopik dermatitli köpekte 4 farklı anatomik lokalizasyonda yapılan değerlendirmede sırası ile inguinal, aksilla, pinna da stratum korneum hidrasyonu (korneometre cihazı ile ölçüm) $23,11 \pm 8,13$, $21,99 \pm 10,11$, $45,86 \pm 10,96$ olarak bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda sağlıklı köpeklerde yine farklı anatomik lokalizasyonlardan yapılan ölçümlerde hidrasyon değerleri sağlıklı köpeklerde [23,8 (18,7-51,8)] iken evre I [27,5 (5,5-49)] evre II [15,5 (4-24,5)], evre III [26,7 (15,7-54,5)] ve evre IV [18,7 (10,5-26,2)]'teki hasta hayvanlarda istatistiksel açıdan farklılık saptanmamıştır. Burada karşılaştırmalı değerlendirmede çalışmalar arası yorum yapmak kolay olmamaktadır. Şöyle ki sağlıklı köpeklerde alezyonel bölgelerden tıraş sonrası yapılacak korneometrik analizler normalden farklı sonuçlar

verebilmektedir. Bizim çalışmamızda sağlıklı köpeklerden yapılan ölçümlerde herhangi bir tıraş uygulamasında bulunulmamış böylelikle ölçümleri etkileyebilecek dış faktörlerden bir kısmı ekarte edilmiştir. Bunun dışında CVL'li köpeklerde lezyonların anatomopatolojik dağılımları farklılık gösterebilmekte unik yani tek tipte ya da tek lokalizasyonda lezyon şekillenmediğinden sonuçlar arası farklılıklar mevcut olabilmektedir. Birkaç örnekle açıklamak gerekirse misalen TEWL açık çember kapalı çember tıraşlama ve hayvanların işbirlikçi olup olmamalarına bağlı olarak değişik sonuçlar vermektedir. (Watson ve ark, 2002). Bizim çalışmamızda her ne kadar TEWL değerlendirilmese de deri pH'sı ölçülmüştür. Deri pH'sının ırk, cinsiyet, gonadlardan üretilen cinsiyet hormonlarının durumu, anatomik bölge, tüylerin rengi, heyecan, muayene zamanı ya da mevsimsel koşullardan etkilenebildiği bildirilmektedir. (Campbell ve ark, 2000; Scott ve ark, 2001). Tüm bunlara rağmen hidrasyon ve pH'nın farklı anatomik bölgelerde ölçümüne dair köpeklerde oldukça sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Bölgesel varyasyonların köpek derisine etkisine ilişkin farklı bilgiler mevcuttur. (Watson ve ark, 2002; Young ve ark, 2002; Hester ve ark, 2004). Bu bağlamda Oh ve Oh (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sağlıklı 5 Beagle köpeğinde (2-4 yaşlı) anestezi öncesi ve sonrası 14 farklı deri bölgesinde deri hidrasyonu ve pH ölçümleri yapılmıştır. Yapılan genel değerlendirmede vücut yüzeyine karşılık gelen derinin alkali pH'da seyrettiği buna karşın kulak, interdigital deri ve ayak tabanlarının nötrden hafif asidik karaktere kadar değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Vücudun alt ve arka tarafları ile kuyruk bölgesi kulak, interdigital bölge ve ayak tabanlarına göre daha alkali karakterde seyretilmektedir (Oh ve Oh, 2009). Aynı çalışmada arka bölge kuyruk ve ayak tabanlarında, kısmen de baş bölgesinde önceki çalışmalarla uyumlu olarak (Watson ve ark, 2002, Yoshihara ve ark, 2007) daha yüksek kutanöz sıvı kaybının belirlenmesi metabolik değişikliklerle kısmen açıklanabilir.

Obligat intrasellüler protozoer bir parazit olan leishmania genusuna ait etmenler tarafından oluşturulan leishmaniasis hastalığı insanlarda kutanöz, mukokutanöz ve visceral tipte sınıflandırılırken köpeklerde CVL olarak değerlendirilmektedir. Farklı dermatolojik bulgulara neden olan CVL köpeklerde insanlara benzer şekilde pigment değişiklikleri ile sonuçlanmaktadır (Kumar, 2015). Leishmaniasis'li insanlarda sağlıklı bireylerden farklı olarak deride karararma (hiperpigmentasyon) veya daha açık renk şekillenmesi (hipopigmentasyon) veya bazen derinin tamamıyla renginin kaybolması (depigmentasyon) ile sonuçlanmaktadır (Kumar, 2015). Deride meydana gelen hiperpigmentasyon, deriye rengini veren melanin pigmentinin artışından kaynaklanmaktadır. Melanosit adı verilen özel hücrelerde mevcut melanin pigmenti kala azarlı ya da visceral leishmaniasis'li insanlarda skar

oluşumuna neden olmaktadır (Kumar, 2015). Kutanöz leishmaniasis'te 2 ila 12 ay arasında spontan bir iyileşmeyi takip eden skar oluşumu ve pigment renk değişikliği mevcuttur (Kumar, 2015). Hastalığın insanlarda özel bir formu olan kala azar, siyah hastalık olarak anılmakta nedeninin deride meydana gelen yoğun hiperpigmentasyon olduğu ve Hintli hastalarda yaygın olarak görüldüğü bildirilmektedir (Kumar, 2015). Kala Azar'da melanositlerin yoğun uyarıma maruz kalması deride şiddetli hiperpigmentasyon ile sonuçlanmakta bazı kala azar'lı insanlarda ise deride ciddi manada pigment değişimi gözlemlenmemektedir. Anılan bu hiperpigmentasyon Sudanlı Kala Azar hastalarında görülmemektedir (Ahmed ve ark, 1988).

Her ne kadar hastalığın morfolojik değerlendirilmesinde pigmentasyonların ölçümü ve belirlenmesi yararlı olsa da leishmaniasis'in bütün formlarında ortak ya da benzer şekilde seyretmemektedir. Bilakis leishmaniasis'in farklı formlarında pigment yoğunluğu farklılık göstermektedir. Hatta leishmaniasis'in aynı formuyla enfekte insanlarda dahi bireyden bireye farklılık gösteren değişik pigmentasyon oluşumları gözlemlenmektedir (Kumar, 2015). Her ne kadar leishmaniasis'te meydana gelen pigmentasyon hakkında yeterli sayıda çalışma ve değerlendirme bulunmasa da histopatolojik olarak yapılan değerlendirmede dermal infiltrat yoğunluğuna bağlı olarak granuloma oluşumu ve bunun da lokal pigment metabolizması ile etkileşime girmesi sorumlu tutulmaktadır (Schallreuter ve ark, 1994). Bu hastalıkla ilişkili olarak öne sürülen hipotezlerden birisi de deride meydana gelen hiperpigmentasyondan sorumlu tutulan adrenokortikotropik hormon seviyelerinin üretimindeki artıştır. İlâveten kortizol seviyelerinde olası bir azalma deride hiperpigmentasyonun kaybolmasına sebep olabilir. Yine de leishmaniasis ve deri pigmentasyonu arasındaki ilişki izahate muhtaçtır (Kumar, 2015). Bizim çalışmamızda sağlıklı ve leishmaniasis'in farklı evrelerinde olduğu belirlenen köpeklerde melanin parametresinin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değerleri Tablo 15'te sunulduğu üzere evre I [47 (12-78,5)] ve III [46 (23-80,3)] grubu köpeklerde, sağlıklı [9,2 (1,7-38)] ile evre II [15 (2-23)] ve IV'teki [10 (10-57)] köpeklere göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). Melanin pigmentasyonundaki bu artış yukarıdaki literatür ışığında açıklanabilir. Evrelere göre melanin pigmentasyonundaki değişim ise sitokin yanıt, iç organ yetmezlikleri, endokrin denge ya da immunsupresyonla ilişkili olabilir. Bağırsaklarda yer alan *Escherichia* türleri ile *Enterococcus* türlerinin serotonin üreterek deri pigmentasyonunda rol oynadığı da göz önünde bulundurulmalıdır (Lee ve ark, 2011; Cryan ve Dinan, 2012). Yine yukarıdaki literatür bilgisi baz alınırca stres koşulları altında salınan kortizolün bağırsak epitelyumunun geçirgenliğini değiştirdiği ve bariyer fonksiyonlarını bozarak bağırsak mikrobiyomunda değişiklik sağladığı bilinmektedir (Cryan ve Dinan, 2012). Bu durum

dolaşımdaki nöroendokrin moleküllerin (triptamin, trimetilamin ve serotonin) seviyelerini değiştirerek deri bariyerini ve derideki enflamasyonu tetiklediği muhakkaktır. Üst satırlarda sözü edildiği üzere evrelerde görülen farklılıklarda kortizol sekresyonu rol oynuyor olabilir (Jin ve ark, 2014; O'Neill ve ark, 2016). Hidrasyon, elastikiyet ve sıcaklık parametrelerinde gruplar arası farklılıkların istatistiksel anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Bu tez kapsamında sağlıklı ve leishmaniasis'in farklı evrelerinde olduğu belirlenen köpeklerde pH parametresinin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değeri Tablo 15'te sunulmuştur. Sağlıklı köpeklere [6,83 (6,53-6,90)] göre evre I [5,25 (4,70-5,60)], evre II [4,90 (4,70-5,40)] evre III [5,50 (5,10-5,70)] ve evre IV' te [5,40 (4,75-5,50)] anlamlı derecede pH değerinde azalma belirlenmiştir ($p<0.001$). Kutanöz pH'nın deri bariyer fonksiyonlarını gösteren önemli bir parametre olduğu yüzyıllardır bilinmekte ancak son yıllarda keratinizasyon ile deskuamasyon da hayati rol oynadığı, normal deri yüzeyel alanında bulunan mikroorganizmaların antimikrobiyal fonksiyonlarının devamlılığının sağlanmasında yine çok önemli ve yadsınamaz rolü olduğu tespit edilmiş, farklı deri hastalıklarında ise asidite ya da alkalitesinin değiştiği saptanmıştır (Matousek ve Campbell, 2002).

Epidermal ve dermal deri katmanlarındaki bozukluk kolajen dansitesinin azalması ve oluşagelen epidermal hiperplazi göstermektedir ki CVL ile ilişkili olarak deri bariyer fonksiyonları etkilenebilmektedir. Deri bariyer fonksiyonlarının ve bütünlüğünün sağlanması için esansiyel role sahip olan proliferasyon ve farklılaşma epidermal katmanda meydana gelen önemli anormallikler arasındadır. (Ekanayake-Mudiyanselage ve ark, 1998).

Köpeklerde kollajenopatiler farklı ırklarda gözükülebilmekte, (Minor ve ark, 1983; Rodriguez ve ark, 1996), özellikle de Ehler-Danlos sendromu ve benzeri hastalıklarda gözlenen spiralleşmiş kollajen filamentlerinin fibrillere agregasyonundaki eksikliklere nedeniyle olmaktadır (Ghadially,1997). Bu tez çalışması kapsamında CVL'li köpeklerde korneometrik analizler doğrultusunda elastikiyet açısından farklılık gözlemlenmemiştir. Şöyle ki sağlıklı ve leishmaniasis'in farklı evrelerinde olduğu belirlenen köpeklerde elastikiyet parametresinin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değeri Tablo 15'te sunulmuştur. Elastikiyet değerleri sağlıklı köpeklerde [49,5 (48,7-49,5)] iken evre I [49,5 (48,7-50)], evre II [49,7 (48,2-50)], evre III [49,5 (48-49,75)] ve evre IV [48,2 (47-48,7)]'teki hasta hayvanlarda istatistiksel açıdan farklılık saptanmamıştır.

Dimorfik bir parazit olan leishmania etkeni promastigot amastigot geçişlerinde özellikle de flagellalı formda (kan emen vektörlerde) 22°C ve civarındaki sıcaklıklarda non flagellalı deri üzerinde gözlemlenen amastigot formlarında 32°C sıcaklık civarında (dermal türlerde), karaciğer ve dalak gibi viseral türlerde ise 37°C ve etrafındaki sıcaklıklarda aktiftir (Akiyama

ve Taylor 1970; Wonde ve Honigberg 1971; Berman ve Neva 1981). Flagellum biyogenezisi (parazitin formunu etkileyen unsur, motilite ve infektivite) ele alındığında leishmania türleri için optimum sıcaklık konusunda, özellikle de dermal leishmaniasis'te bilgi eksikliği mevcuttur (Sutherst, 2004; Quiñonez-Díaz ve ark, 2012). Leishmaniasis'in dermal ekspresyonu göze alındığında 32°C sıcaklıkta lezyonlar tipik karakterde seyrederken, 21-23°C arasında rodent modelinde leishmania türlerin patojenik ekspresyonu tamamlanmaktadır (atipik leishmaniasis; yaş eksfoliatif dermatitis ile alopesi) (Sutherst, 2004; Quiñonez-Díaz ve ark, 2012). Sağlıklı ve leishmaniasis'in farklı evrelerinde olduğu belirlenen köpeklerde sıcaklık parametresinin ortanca (%25'lik ve %75'lik dilim) değeri Tablo 15'te sunulmuştur. Sıcaklık değerleri sağlıklı köpeklerde [33,1 (31,5-35,1)] iken evre I [33,7 (32,5-35,1)], evre II [33,2 (32,4-34,6)], evre III [33,0 (32-33,5)] ve evre IV [33,5 (33,2-34)]'teki hasta hayvanlarda istatistiksel açıdan farklılık saptanmamıştır.

Sonuç olarak CVL ile enfekte köpeklerde epidermal değişkenlerin irdelenmesi; incelenmesine yönelik olarak epidermal hidrasyon, pH, melanin pigmentasyonu, sıcaklık ve elastikiyet tayini ile metodolojik yaklaşılması önerilebilir. Korneometrik analizlerle elde edilecek sonuçların gerek hastalığın teşhis gerek monitörizasyonu filhakika sağaltıma yönelik değerlendirilmesi ile uygulanacak medikal destek yönlendirilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak CVL ile enfekte köpeklerde epidermal değişkenlerin irdelenmesi; incelenmesine yönelik olarak epidermal hidrasyon, pH, melanin pigmentasyonu, sıcaklık ve elastikiyet tayini ile metodolojik yaklaşılması önerilebilir. Korneometrik analizlerle elde edilecek sonuçların gerek hastalığın teşhis gerek monitörizasyonu filhakika sağaltıma yönelik değerlendirilmesi ile uygulanılacak medikal destek yönlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Abad LPM, Almeida CS, Mattos AMM, Mendonça ACP, Alves MJ, Pinheiro AC, Teixeira HC. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica* 2017, 166, 133-138.

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

Adams ER, Jacquet D, Schoone G, Gidwani K, Boelaert M, Cunningham J. Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2012, 6(12), e1946.

Ahmed MA, Suleman SM, Kordofani AA, Mustafa MD. Outbreak of visceral leishmaniasis in the western bank of the White Nile--Sudan, report and clinical study. *East African Medical Journal* 1988, 65(12), 824-828.

Akiyama HJ, Taylor JC. Effect of macrophage engulfment and temperature on the transformation process of *Leishmania donovani*. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 1970, 19(5), 747-754.

Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, da Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagnostic Microbiology And Infectious Disease* 2013, 76(3), 321-324.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavat C, Dedet JP, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 2008, 21(2), 334-359.

Amusatogui I, Sainz A, Aguirre E, Tesouro MA. Seroprevalence of *Leishmania infantum* in northwestern Spain, an area traditionally considered free of leishmaniasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, 1026(1), 154-157.

Aschar M, de Oliveira ETB, Laurenti MD, Marcondes M, Tolezano JE, Hiramoto RM, Da Matta VLR. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 2016, 225, 108-113.

Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, David JR. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 1996, 173(3), 758-761.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* 2008, 24(7), 324-330.

Batt MD, Fairhurst E. Hydration of the stratum corneum. *International Journal of Cosmetic Science* 1986, 8(6), 253-264.

Beil WJ, Meinardus- Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of Leukocyte Biology* 1992, 52(2), 135-142.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* 1998, 188(10), 1941-1953.

Berman JD, Neva FA. Effect of temperature on multiplication of *Leishmania* amastigotes within human monocyte-derived macrophages in vitro. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1981, 30(2), 318-321.

Bhattacharyya T, Boelaert M, Miles MA. Comparison of visceral leishmaniasis diagnostic antigens in African and Asian *Leishmania donovani* reveals extensive diversity and region-specific polymorphisms. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013, 7(2), e2057.

Blavier A, Keroack S, Denerolle PH, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL, Bourdoiseau G. Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* 2001, 162(2), 108-120.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM., Hostetter JM., Mullin K, Petersen CA. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2011, 5(4), e1019.

Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP. *Dermatology* (2nd ed), Mosby, New York, 2003, 531-545.

Boncheva M, De Sterke J, Caspers PJ, Puppels GJ. Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. *Experimental Dermatology* 2009, 18(10), 870-876.

Bradley CW, Morris DO, Rankin SC, Cain CL, Misic AM, Houser T, Grice EA. Longitudinal evaluation of the skin microbiome and association with microenvironment and treatment in canine atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 2016, 136(6), 1182-1190.

Cafarchia C, Gallo S, Danesi, P, Capelli G, Paradies P, Traversa D, Otranto D. Assessing the relationship between *Malassezia* and leishmaniasis in dogs with or without skin lesions. *Acta Tropica* 2008, 107(1), 25-29.

Cai T, Lou G, Yang J, Xu D, Meng Z. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: a new tool for HBV management. *Journal of Clinical Virology* 2008, 41(4), 270-276.

Campbell KL, LaFlamme DP, Harrison J. Seasonal variations in skin surface pH, skin surface hydration and hair epilation of normal dogs in Midwestern United States climate. *Veterinary Dermatology* 2000, 11, 19.

Cangussú SD, Souza CCD, Campos CF, Vieira LQ, Afonso LCC, Arantes RME. Histopathology of *Leishmania major* infection: revisiting *L. major* histopathology in the ear dermis infection model. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009, 104(6), 918-922.

Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M. Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta tropica* 2004, 91(2), 95-100.

Carson C, Quinnell RJ, Holden J, Garcez LM, Deborggraeve S, Courtenay O. Comparison of Leishmania OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine Leishmania infection. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(9), 3325-3330.

Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga OA, Tartaglino L, Gacek R, Temple E, Sparks H, Travi BL. A novel molecular test to diagnose canine visceral leishmaniasis at the point of care. *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene* 2015, 93(5), 970-975.

Chamaillé L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors* 2010, 3(1), 31.

Chang MJ, Huang HC, Chang HC, Chang TM. Cosmetic formulations containing Lithospermum erythrorhizon root extract show moisturizing effects on human skin. *Archives of Dermatological Research* 2008, 300(6), 317-323.

Charmoy M, Hurrell BP, Romano A, Lee SH, Ribeiro- Gomes F, Riteau N, Sacks DL. The Nlrp3 inflammasome, IL- 1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *European Journal of Immunology* 2016, 46(4), 897-911.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian-North American Edition 2003, 25(5), 358-369.

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

Cobiella D, Archer L, Bohannon M, Santoro D. Pilot study using five methods to evaluate skin barrier function in healthy dogs and in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2019, 30(2), 121-e34.

Corware K, Harris D, Teo I, Rogers M, Naresh K, Müller I, Shaunak S. Accelerated healing of cutaneous leishmaniasis in non-healing BALB/c mice using water soluble amphotericin B-polymethacrylic acid. *Biomaterials* 2011, 32(31), 8029-8039.

Costa FAL, Goto H, Saldanha LCB, Silva SMMS, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* 2003, 40(6), 677-684.

Coutinho MTZ, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2005, 128(1-2), 149-155.

Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. *Veterinary Parasitology* 2007, 147(3-4), 320-325.

Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodriguez A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet* 2002, 359(9312), 1124-1125.

Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 2012, 13(10), 701.

Da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2003, 97(6), 678-682.

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MSM, Alexander B, Williams P, Melo MN. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal* 2007, 174(3), 636-643.

Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical Chemistry* 2016, 62(7), 947-958.

Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, da Silva LG, Otranto D, Figueredo LA. Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Molecular and Cellular Probes* 2017, 31, 65-69.

Dantas-Torres F, Latrofa MS, Otranto D. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 2011, 4(1), 56.

Dantas-Torres F, Martins TF, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandão-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Experimental Parasitology* 2010, 125(2), 184-185.

Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends in parasitology* 2011, 27(4), 155-159.

Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology* 2007, 147(1-2), 2-8.

de Almeida Ferreira S, Almeida GG, de Oliveira Silva S, Vogas GP, Fujiwara RT, De Andrade ASR, 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.

de Almeida Ferreira S, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade, ASR. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR–hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2008, 152(3-4), 257-263.

de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology* 2006, 137(1-2), 159-167.

de Freitas JCC, Lopes-Neto BE, de Abreu CRA, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, Nunes-Pinheiro DCS. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2012, 93(2), 705-709.

de Oliveira IQ, Silva RA, Sucupira MV, da Silva ED, Reis AB, Grimaldi G, Veras PST. Multi-antigen print immunoassay (MAPIA)-based evaluation of novel recombinant *Leishmania infantum* antigens for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2015, 8(1), 45.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1994, 89(3), 463-469.

Di Nardo A, Wertz P, Gianneti A, Seidenari S. Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Dermatovenerologica (Stockholm)* 1998, 78, 27-30.

Draize JH. The determination of the pH of the skin of man and common laboratory animals. *Journal of Investigative Dermatology* 1942, 5(2), 77-85.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. *Emerging Infectious Diseases* 2006, 12(3), 440.

Ekanayake-Mudiyanselage S, Jensen JM, Proksch E, Aschauer H, Schmook FP, Meingassner JG. Expression of epidermal keratins and the cornified envelope protein involucrin is influenced by permeability barrier disruption. *Journal of Investigative Dermatology* 1998, 111(3), 517-523.

Fang X, Liu Y, Kong J, Jiang X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Analytical Chemistry* 2010, 82(7), 3002-3006.

Farahmand M, Khalaj V, Mohebbali M, Khalili G, Naderi S, Ghaffarinejad P, Nahrevanian H. Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2015, 48(2), 188-193.

Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015, 9(1), e3429.

Fernández-Figueroa EA, Rangel-Escareño C, Espinosa-Mateos V, Carrillo-Sánchez K, Salaiza-Suazo N, Carrada-Figueroa G, Becker I. Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1 β . *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2012, 6(5), e1533.

Ferrer L. Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: Canine Leishmaniasis: an Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Killick-Kendrick R. (Edt), Hoechst Roussel Vet, Barcelona, Spain, 1999, 6-10.

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

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.

Fichoux, Y, Quaranta JF, Aueuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I., Kubar J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37(6), 1953-1957.

Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portús, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology* 2001, 99(2), 105-111.

Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997, 56(3-4), 319-327.

Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Veterinary Research Communications* 2007, 31(3), 335-341.

Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2006, 137(3-4), 214-221.

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2003, 111(2-3), 161-173.

Gao CH, Ding D, Wang JY, Steverding D, Wang X, Yang YT, Shi F. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. *Parasites & Vectors* 2015, 8(1), 370.

Ghadially FN. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix (4th ed), 2, Butterworth-Heinemann, London, 1997, 1307-1400.

Gimblet C, Meisel JS, Loesche MA, Cole SD, Horwinski J, Novais FO, Carvalho LP. Cutaneous leishmaniasis induces a transmissible dysbiotic skin microbiota that promotes skin inflammation. *Cell Host & Microbe* 2017, 22(1), 13-24.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *Journal of Comparative Pathology* 2006, 135(2-3), 100-107.

Goetzman EA. Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. *Clinical Laboratory Science: Journal of the American Society for Medical Technology* 1993, 6(3), 177-182.

Gomez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, Gascon M, Zarate JJ, Arbea JI, Rodriguez C. Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003, 10(5), 967-968.

Gonzalez-Lombana C, Gimblet C, Bacellar O, Oliveira WW, Passos S, Carvalho LP, Scott P. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS pathogens* 2013, 9(3), e1003243.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal For Parasitology* 2005, 35(11-12), 1169-1180.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, Castillo JA. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Research in Veterinary Science* 2000, 69(3), 249-253.

- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Castillo JA.** Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2002, 88(1-2), 13-20.
- Guebouj S, Djilani F, Bettaieb J, Lambson B, Diouani MF, Salah AB, Guizani I. (2014).** Evaluation of a gp63-PCR Based Assay as a Molecular Diagnosis Tool in Canine Leishmaniasis in Tunisia. *PloS One* 2014, 9(8), e105419.
- Hester SL, Rees CA, Kennis RA, Zoran DL, Bigley KE, Wright AS, Bauer JE.** Evaluation of corneometry (skin hydration) and transepidermal water-loss measurements in two canine breeds. *The Journal of Nutrition* 2004, 134(8), 2110-2113.
- Iniesta L, Gállego M, Portús M.** Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005, 103(1-2), 77-81.
- Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder JM, Kleine M, Neumann C, Brasch J.** Barrier function, epidermal differentiation, and human β -defensin 2 expression in *Tinea Corporis*. *Journal of Investigative Dermatology* 2007, 127(7), 1720-1727.
- Jin UH, Lee SO, Sridharan G, Lee K, Davidson LA, Jayaraman A, Safe S.** Microbiome-derived tryptophan metabolites and their aryl hydrocarbon receptor-dependent agonist and antagonist activities. *Molecular Pharmacology* 2014, 85(5), 777-788.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO.** Adipose Tissue. In: Evans CF, (ed), *Basic Histology* (7th ed), Appleton&Lange, Lebanon, 1992, 126-131.
- Khan MGM, Bhaskar KRH, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D.** Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Leishmania* DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. *Parasites & Vectors* 2012, 5(1), 280.
- Kim MK, Choi SY, Byun HJ, Huh CH, Park KC, Patel RA, Youn SW.** Comparison of sebum secretion, skin type, pH in humans with and without acne. *Archives of Dermatological Research* 2006, 298(3), 113.
- Kontos VJ, Koutinas AF.** Old world canine leishmaniasis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1993, 15, 949-960.

Korting HC, Megele M, Mehringer L, Vieluf D, Zienicke H, Hamm G, Braun, Falco O. Influence of skin cleansing preparation acidity on skin surface properties. *International Journal of Cosmetic Science* 1991, 13(2), 91-102.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1999, 35(5), 376-383.

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2001, 98(4), 247-261.

Koutinas AF, Scott DW, Kontos V, Lekkas S. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Veterinary Dermatology* 1992, 3(3), 121-130.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS. The major surface metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide induced apoptotic killing. *Molecular Microbiology* 2006, 62(5), 1484-1497.

Kumar A. Pigmentation in Leishmaniasis: Common or Different. *Pigmentary Disorders* 2015, 2(180), 2376-0427.

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(3), 197-207.

Lage DP, Martins VT, Duarte MC, Costa LE, Garde E, Dimer LM, Roatt BM. A new *Leishmania*-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* 2016, 115(4), 1649-1658.

Laranjeira DF, Matta VLRD, Tomokane TY, Marcondes M, Corbet CEP, Laurenti MD. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-endemic area. *Revista de Saude Publica* 2014, 48, 563-571.

Lau- Gillard PJ, Hill PB, Chesney CJ, Budleigh C, Immonen A. Evaluation of a hand-held evaporimeter (VapoMeter®) for the measurement of transepidermal water loss in healthy dogs. *Veterinary Dermatology* 2010, 21(2), 136-145.

Laurenti MD, de Santana Leandro Jr MV, Tomokane TY, De Lucca HRL, Aschar M, Souza CSF, da Matta VLR. Comparative evaluation of the DPP® CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2014, 205(3-4), 444-450.

Lauricella MA, Maidana CG, Frias VF, Romagosa CM, Negri V, Benedetti R, Reed SG. An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in latin America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2016, 95(1), 92-98.

Lee HJ, Park MK, Kim SY, Park Choo HY, Lee AY, Lee CH. Serotonin induces melanogenesis via serotonin receptor 2A. *British Journal of Dermatology* 2011, 165(6), 1344-1348.

Leite RS, de Almeida Ferreira S, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade ASR. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Veterinary Parasitology* 2010, 170(3-4), 201-206.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania spp.* infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology* 2002, 109(1-2), 19-27.

Levy E, Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Polizopoulou ZS, Psychogios V, Koutinas AF. Nasal and oral masses in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 2006, 35(1), 115-118.

Lewis DJ. Depth of penetration of vertebrate skin by phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 1987, 81(2), 173-179.

Lima BSS, Fialho Jr LC, Pires SF, Tafuri WL, Andrade HM. Immunoproteomic and bioinformatic approaches to identify secreted *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. infantum* proteins with specific reactivity using canine serum. *Veterinary Parasitology* 2016, 223, 115-119.

- Lloyd DH, Garthwaite G.** Epidermal structure and surface topography of canine skin. *Research in Veterinary Science* 1982, 33(1), 99-104.
- Loden M.** The clinical benefit of moisturizers. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2005, 19(6), 672-688.
- Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L.** Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veterinary Parasitology* 2012, 184(1), 10-17.
- Longstaffe JA, Jefferies AR, Kelly DF, Bedford PGC, Herrtage ME, Darke PGG.** Leishmaniasis in imported dogs in the United Kingdom; a potential human health hazard. *Journal of Small Animal Practice* 1983, 24(1), 23-30.
- Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanyanyi A, Kachur SP, Udhayakumar V.** Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PloS One* 2010, 5(10), e13733.
- Maia C, Campino L.** Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology* 2008, 158(4), 274-287.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L.** Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *The Veterinary Journal* 2009, 179(1), 142-144.
- Majumder S, Dey R, Bhattacharjee S, Rub A, Gupta G, Bhattacharyya Majumdar S, Majumdar S.** Leishmania-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite. *The Journal of Infectious Diseases* 2012, 205(10), 1607-1616.
- Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Gravino AE.** Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2006, 142(3-4), 271-280.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE.** Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal* 2008, 177(2), 279-282.

- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Della Morte R, Gravino AE.** Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2004, 125(3-4), 251-262.
- Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, Gradoni L.** The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine & International Health* 2008, 13(2), 256-264.
- Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L.** Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors* 2011, 4(1), 57.
- Mason IS.** Scanning electron microscopical studies of the living epidermis and stratum corneum in dogs. *Advanced in Veterinary Dermatology* 1993, 2, 131-139.
- Matousek JL, Campbell KL.** A comparative review of cutaneous pH. *Veterinary Dermatology* 2002, 13(6), 293-300.
- Menn B, Lorentz S, Naucke TJ.** Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasites & Vectors* 2010, 3(1), 34.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P.** Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, 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(11), 5515-5519.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha ACVM, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Fortes-Dias CL.** Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Veterinary Parasitology* 2007, 147(1-2), 67-76.
- Miles MA, Vexenat JA, Furtado Campos JH, Fonseca de Castro JA.** Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: Canine leishmaniasis: an Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Killick-Kendrick R. (Edt), Hoechst Roussel Vet, Barcelona, Spain, 1999, 46-53.

Minor RR, Lein DH, Patterson DF, Krook L, Porter TG, Kane AC. Defects in collagen fibrillogenesis causing hyperextensible, fragile skin in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1983, 182(2), 142-148.

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

Mohammadiha A, Moheballi M, Haghghi A, Mahdian R, Abadi AR, Zarei Z, Akhondi B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania infantum* infection in human and dog blood samples. *Experimental Parasitology* 2013, 133(1), 89-94.

Moheballi M, Taran M, Zarei Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology* 2004, 121(3-4), 239-245.

Molina R, Cafiavate C, Cercenado E, Lagunat F, Lopez-Velez R, Alvar J. Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus Perniciosus*. *Aids* 1994, 8(2), 277-278.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Garcia JF, Corbett CEP, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology* 2007, 145(3-4), 245-252.

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

Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2009, 15(2), 62-69.

Motta S, Monti M, Sesana S, Mellesi L, Ghidoni R, Caputo R. Abnormality of water barrier function in psoriasis: role of ceramide fractions. *Archives of Dermatology* 1994, 130(4), 452-456.

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.

Nakatsuji T, Chen TH, Two AM, Chun KA, Narala S, Geha RS, Gallo RL. Staphylococcus aureus exploits epidermal barrier defects in atopic dermatitis to trigger cytokine expression. *Journal of Investigative Dermatology* 2016, 136(11), 2192-2200.

Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Peña T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2005, 133(1), 37-47.

Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P, Beiting DP. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *Journal of Investigative Dermatology* 2015, 135(1), 94-101.

Oh WS, Oh TH. Mapping of the dog skin based on biophysical measurements. *Veterinary Dermatology* 2010, 21(4), 367-372.

Oh WS, Oh TH. Measurement of transepidermal water loss from clipped and unclipped anatomical sites on the dog. *Australian Veterinary Journal* 2009, 87(10), 409-412.

Oliveira E, Saliba JW, Oliveira D, Dias ES, Paz GF. A prototype of the direct agglutination test kit (DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2016, 221, 9-13.

O'Neill CA, Monteleone G, McLaughlin JT, Paus R. The gut- skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *BioEssays* 2016, 38(11), 1167-1176.

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite specific cellular immune responses. *Veterinary Dermatology* 2005, 16(3), 187-191.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English

foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001, 219(8), 1076-1083.

Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, Ozcel MA. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998, 59(3), 363-369.

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

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Zatelli A. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010, 236(11), 1184-1191.

Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TM, Paixão TA, Santos RL. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Veterinary Parasitology* 2009, 165(3-4), 327-331.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005, 104(3-4), 227-237.

Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA, Esfandiari J. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010, 4(9), e822.

Paz GF, Ribeiro MF, de Magalhães DF, Sathler KP, Morais MHF, Fiúza VO, Dias ES. Association between the prevalence of infestation by *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* and the presence of anti-*Leishmania* antibodies: A case-control study in dogs from a Brazilian endemic area. *Preventive Veterinary Medicine* 2010, 97(2), 131-133.

Paz GF, Ribeiro MFB, Michalsky ÉM, da Rocha ACVM, França-Silva JC, Barata RA, Dias ES. Evaluation of the vectorial capacity of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)

in the transmission of canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research* 2010, 106(2), 523.

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

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

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Garipidou VA. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008, 22(4), 866-872.

Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunological Reviews* 2006, 213(1), 159-179.

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

Pinedo-Cancino V, Laurenti MD, Kesper N, Umezawa ES. Evaluation of *Leishmania infantum* excreted-secreted antigens for detection of canine leishmaniasis. *Acta Tropica* 2016, 161, 41-43.

Quinnell RJ, Kenned LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 2003, 55(1), 23-28.

Quiñonez-Díaz L, Mancilla-Ramírez J, Avila-García M, Ortiz-Avalos J, Berron A, González S, Galindo-Sevilla N. Effect of ambient temperature on the clinical manifestations of experimental diffuse cutaneous leishmaniasis in a rodent model. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2012, 12(10), 851-860.

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

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, 112(3-4), 102-116.

Reis LES, Coura-Vital W, Roatt BM, Bouillet LÉM, Ker HG, de Brito RCF, Carneiro CM. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology* 2013, 197(3-4), 498-503.

Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002, 40(7), 2352-2356.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 1999, 81(3), 173-184.

Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 2002, 24(6), 295-301.

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 1990, 71(3), 267-275.

Rodriguez F, Herraes P, Monteros AEDL, Calabuig P, Rodriguez JL. Collagen Dysplasia in a Litter of Garaffiano Shepherd Dogs. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1996, 43(1:10), 509-512.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J. *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, 82(2), 251-256.

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Alberola J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International journal for parasitology* 2007, 37(6), 683-693.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Journal of Parasitology* 2005, 91(4), 970-972.

Rudikoff, D. The effect of dryness on the skin. *Clinics in dermatology* 1998, 16(1), 99-107.

Ruedisueli FL, Eastwood NJ, Gunn NK, Watson TDG. The measurement of skin pH in normal dogs of different breeds The measurement of skin pH in normal dogs of different breeds (pp. 521). Oxford (United Kingdom): Oxford (United Kingdom): Butterworth-Heinemann Ltd.1998.

Rutledge LC, Gupta RK. Moth Flies and Sand Flies (*Psychodidae*). In: Mullen G, Durden L (eds), *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, New York, 2002, 147-161.

Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research* 2008, 39(3), 1.

Santarém N, Silvestre R, Cardoso L, Schallig H, Reed SG, Cordeiro-da-Silva A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48(5), 1866-1874.

Santoro D, Marsella R, Pucheu- Haston CM, Eisenschenk MN, Nuttall T, Bizikova P. Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host–micro- organism interaction. *Veterinary Dermatology* 2015, 26(2), 84-e25.

Santos M, Marcos R, Assunção M, Matos AJ. Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology* 2006, 141(3-4), 340-344.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Olivry T, Dunston SM, Farmaki R, Koutinas CK, Petanides T. Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniasis. *Veterinary dermatology* 2007, 18(4), 227-233.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology* 2009, 20(5:6), 471-489.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Donoghue AR. Evaluation of the Leishmania recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 2002, 104(4), 275-285.

Schallig HDFH, Schoone GJ, Beijer EGM, Kroon CCM, Hommers M, Özbel Y, Da Silva ED. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology* 2002, 109(1-2), 1-8.

Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Gutlich M, Lemke KR, Rodl W, Ziegler I. Regulation of melanin biosynthesis in the human epidermis by tetrahydrobiopterin. *Science* 1994, 263(5152), 1444-1446.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Leishmaniasis. In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. 6 th ed. WB Saunders, Philadelphia, 2001, s 534-538.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Structure and function of the skin. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 6th ed. WB Saunders, Philadelphia, 2001, s 1-54.

Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector?. *Veterinary Parasitology* 2009, 163(4), 281-285.

Shimada K, Yoon JS, Yoshihara T, Iwasaki T, Nishifuji K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2009, 20(5:6), 541-546.

Shimada K, Yoshihara T, Yamamoto M, Konno K, Momoi Y, Nishifuji K, Iwasaki T. Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *Journal of Veterinary Medical Science* 2008, 70(8), 841-843.

Shuster S, Thody AJ. The control and measurement of sebum secretion. *Journal of Investigative Dermatology* 1974, 62(3), 172-190.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology* 1999, 15(3), 271-276.

Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2009, 160(1-2), 55-59.

Silvestre R, Santarém N, Cunha J, Cardoso L, Nieto J, Carrillo E, Cordeiro-da-Silva A. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. *Veterinary Parasitology* 2008, 158(1-2), 23-30.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene CE. (Edt), *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat* (2nd ed), WB. Saunders, Philadelphia, 1998, 450-458.

Slappendel RJ. Prize- winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis: A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 1988, 10(1), 1-16.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *Journal of Comparative Pathology* 2004, 130(1), 7-12.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2009, 165(1-2), 1-18.

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

Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2011, 4(1), 86.

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(2), 560-563.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Arboix M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas: evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology* 2001, 96(4), 265-276.

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

Solano-Gallego L, Villanueva-Saz S, Carbonell M, Trotta M, Furlanello T, Natale A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors* 2014, 7(1), 111.

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

Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, da Silva AC. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Tropica* 2011, 120(1-2), 82-87.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases* 2004, 189(9), 1729-1733.

Sutherst RW. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2004, 17(1), 136-173.

Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruizde Gopegui R. Detection of *Leishmania infantum* by real time PCR in a canine blood bank. *Journal of Small Animal Practice* 2008, 49(7), 325-328.

Takami S, Mochizuki H, Muramatsu R, Hagiwara S, Arakawa H, Uchiyama M. Improvement of out in skin transparency and symptoms by shower therapy in children with atopic dermatitis. *Pediatr Therapeut* 2012, 2, 115.

Tomita Y, Akiyama M, Shimizu H. Stratum corneum hydration and flexibility are useful parameters to indicate clinical severity of congenital ichthyosis. *Experimental Dermatology* 2005, 14(8), 619-624.

Torrent E, Leiva M, Segalés J, Franch J, Peña T, Cabrera B, Pastor J. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 2005, 46(11), 549-552.

Töz SÖ, Özbel Y, Ertabaklar H, Yildizli N, Korkmaz M, Alkan MZ. Comparisons of clinical findings and serological data in the diagnosis of canine leishmaniosis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2005, 29(2), 269-273.

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2018, 12(1), e0006082.

Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C, Osorio Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001, 64(3), 119-124.

Van Bocxlaer K, Yardley V, Murdan S, Croft SL. Drug permeation and barrier damage in Leishmania-infected mouse skin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2016, 71(6), 1578-1585.

Venturin GL, Bragato JP, Silva KLO, de Lima VMF. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniosis. *Parasite Immunology* 2015, 37(12), 670-673.

Verma S, Avishek K, Sharma V, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 2013, 75(4), 390-395.

Voronov E, Dotan S, Gayvoronsky L, White RM, Cohen I, Krelin Y, Apte RN. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *International Immunology* 2010, 22(4), 245-257.

Watson A, Fray T, Clarke S, Yates D, Markwell P. Reliable use of the ServoMed Evaporimeter EP-2™ to assess transepidermal water loss in the canine. *The Journal of Nutrition* 2002, 132(6), 1661-1664.

Web_1. (2019). IRIS staging of chronic renal disease. Erişim adresi: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf Erişim tarihi: 09.02.2020.

Wiedersberg S, Leopold CS, Guy RH. Effects of various vehicles on skin hydration in vivo. *Skin Pharmacology and Physiology* 2009, 22(3), 128-130.

Wonde T, Honigberg BM. Morphology and infectivity of *Leishmania donovani* cultivated in nonliving media at elevated temperatures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1971, 20(6), 828-838.

Xia X, Yu Y, Weidmann M, Pan Y, Yan S, Wang Y. Rapid detection of shrimp white spot syndrome virus by real time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *PLoS One* 2014, 9(8), e104667.

Yadav S, Wickett RR, Pinto NG, Kasting GB, Thiel SW. Comparative thermodynamic and spectroscopic properties of water interaction with human stratum corneum. *Skin Research and Technology* 2009, 15(2), 172-179.

Yoshihara T, Shimada K, Momoi Y, Konno K, Iwasaki T. A new method of measuring the transepidermal water loss (TEWL) of dog skin. *Journal of Veterinary Medical Science* 2007, 69(3), 289-292.

Young LA, Dodge JC, Guest KJ, Cline JL, Kerr WW. Age, breed, sex and period effects on skin biophysical parameters for dogs fed canned dog food. *The Journal of Nutrition* 2002, 132(6), 1695-1697.

Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Guarraci A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research* 2003, 64(5), 558-561.

EKLER

Ek 1 Bilgi Onam Formu



Veteriner Hekim Gizem GÜL Yüksek Lisans Tezi
Visceral Leishmaniasis'li Köpeklerde Dermal Lezyonların Biyofiziksel
Muayenesi
Özel Muayene Formu
BİLGİ ONAM FORMU

Tarih

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kerem URAL'ın yürütücüsü olduğu '*Visceral Leishmaniasis'li Köpeklerde Dermal Lezyonların Biyofiziksel Muayenesi*' başlıklı çalışma için köpeğimden kan, idrar, derin deri kazıntısı vb. örneklerin alınarak laboratuvar analizleri ve biyofiziksel muayene yapılarak korneometrik analizlerin gerçekleştirileceği ve toplanan verilerin bu çalışma dışında başka herhangi bir çalışma için kullanılmayacağı sözlü ve yazılı olarak şahsıma bildirilmiştir.

Hayvan sahibi olarak, köpeğimin yukarıda adı geçen çalışmada yer almasını kabul ediyorum.

ADRES

Hasta Sahibinin Adı Soyadı

İMZA

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜL Gizem
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Muğla / 24.08.1993
E-mail : gzmvet93@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Lise (Okul birinciliği)	Bodrum Kanuni Sultan Süleyman Anadolu Lisesi	2011
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2018
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner)	Devam ediyor

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-2018	Bodrum Belediyesi Geçici Hayvan Bakımevi	Stajyer

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Ayan A, Erdoğan S, Ural K, Erdoğan H, Gül G. Feasibility Of Clear-Up Strips In The Diagnosis Of Demodex And Sarcoptes Mites. *International Journal of Ecosystems and Ecology Science (IJEES)* 2019, 9(4), 641-646.

Ural K, Erdoğan S, Gül G. Generalize demodikozisli köpeklerde deri pH'sı önemli bir biyofiziksel belirteç olabilir mi? *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019, 4(2), 90-94.

Ural K, Gül G, Gültekin M, Erdoğan S, Erdoğan H, Paşa S, Adak Hİ. Baş Boyun bölgesi dermatitli kedilerde korneometrik analizlerle deri hidrasyonunun ölçümü. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019, 4(1), 1-7.

Ural K, Paşa S, Erdoğan H, Gültekin M, Alç Ural D, Erdoğan S, Adak Hİ, Ateş DS, Gül G. House dust mite specific in vitro IgE determination in cats with allergic dermatitis. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2019, 4(1), 14-17.

Ural K, Yağcı BB, Erdoğan H, Paşa S, Gültekin M, Gül G, Türk E. Doğal Peptid Analogu Laktoferrisin B'nin Kaşıntılı Köpeklerde Antipruritik Amaçla Kullanımı ve Epidermal Hidrasyon ile pH Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences* 2019, 10(1), 11-20.

Yalçın E, Ural K, Kurum H, Gül G. Vektör Kaynaklı Zoonozlar. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences-Internal Medicine-Special Topics* 2019, 5(2), 57-64.

2. BİLDİRİLER

Gül G, Ural K (2019). Köpeklerde Atopik Dermatit Tedavisinde Prebiyotik, Probiyotik ve Postbiyotik Kullanımı. 2. Uluslararası 13. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi. (Özet Bildiri/ Poster).

Gül G, Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S, Süer C (2019). Dermatolojik Aciller. 3. Veteriner Tıp Acil&Yoğun Bakım TuVECCA Kongresi. (Özet Bildiri/ Poster).