



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
VİH-DR-2011-0001**

**KÖPEK VİSSERAL LEİSHMANİASİSİN SAĞALTIMINDA
ALLOPURİNOL VE DOMPERİDON’UN
KOMBİNE KULLANIMININ ETKİNLİĞİ**

ABİDİN ATASOY

**DANIŞMAN
Prof. Dr. SERDAR PAŞA**

AYDIN-2011

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

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Abidin ATASOY tarafından hazırlanan “Köpek Visseral Leishmaniasisin Sağaltımında Allopurinol ve Domperidon’un Kombine Kullanımının Etkinliği” başlıklı tez, 21.12.2011 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

<u>Unvan, Adı ve Soyadı :</u>	<u>Üniversitesi :</u>	<u>İmzası :</u>
Prof. Dr. Serdar PAŞA	ADÜ, Veteriner Fakültesi	
Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA	ADÜ, Veteriner Fakültesi	
Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ	EÜ, Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL	EÜ, Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Kerem URAL	ADÜ, Veteriner Fakültesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun..... sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından leishmaniasis'in kontrolü amacıyla enfekte köpeklerin tespiti, etkin sağaltımı ve vektör kontrolü gibi önlemlerin alınmasının gerekli olduğunu önemle vurgulamaktadır. Ancak kullanılan insektisidlere karşı vektörün, sağaltımda kullanılan ilaçlara karşı etkenin direnç kazanması ve ilaçlardan istenilen etkinliğin sağlayamaması nedeniyle ciddi sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Hastalıktan korunmak için köpeklerin *Phlebotomus*'larla temasının azaltılması ve visseral leishmaniasise karşı aşının veya daha etkili bir sağaltım protokolünün geliştirilmesi gibi alternatif stratejilerin uygulamaya geçirilmesinin gerekli olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, KVL'nin sağaltımında parazitin protein sentezlemesini engelleyen allopurinol ile dopamin D2 reseptör antagonisti olan, prolaktin üretimini arttırarak bağışıklık sisteminin hastalığa karşı daha iyi yanıt vermesini sağladığı bildirilen domperidonun kombine kullanımının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile mevcut sağaltım prosedürlerine bir alternatif olarak yan etkisi minimize edilmiş, kısa sürede etkili, maliyeti ucuz bir sağaltım protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır.

Köpek visseral leishmaniasisin sağaltımında allopurinol ve domperidon'un kombine kullanımının etkinliğinin araştırıldığı bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından VTF-10019 kod numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	01
2. GENEL BİLGİLER.....	06
2.1. Etiyoloji.....	06
2.2. Epidemiyoloji.....	09
2.3. Patogenez.....	17
2.3.1. Vektörün Rolü.....	19
2.3.2. Parazit Virülansının Rolü.....	20
2.3.3. Konak Genetiği.....	21
2.3.4. Köpek Leishmaniasisinin İmmunolojisi.....	21
2.3.5. Eşzamanlı Hastalıkların Rolü.....	24
2.4. Klinik Bulgular.....	25
2.5. Laboratuvar Bulguları.....	33
2.6. Tanı.....	36
2.6.1. Direkt Tanı.....	36
2.6.1.1. Mikroskopik Muayene.....	36
2.6.1.2. Histopatolojik Muayene.....	36

2.6.1.3. İmmunohistokimyasal Muayene.....	36
2.6.1.4. Kültür.....	37
2.6.1.5. Laboratuvar Hayvanlarından Parazit İzolasyonu.....	37
2.6.1.6. Ksenodiagnozis.....	38
2.6.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	38
2.6.1.8. Real-Time PZR.....	39
2.6.2. İndirekt Tanı.....	40
2.6.2.1. İndirekt İmmunofluoresan Antikor Testi.....	40
2.6.2.2. Kounterimmunoelktroforezis.....	41
2.6.2.3. İmmunodiffüzyon.....	41
2.6.2.4. Direkt aglütinasyon testi.....	41
2.6.2.5. Enzyme–linked immunosorbent assay.....	42
2.6.2.6. ELISA–rekombinant antijenleri.....	42
2.6.2.7. İmmunokromatografik Hızlı Testler.....	42
2.6.2.8. Western Blotting.....	43
2.6.2.9. Flow Sitometri.....	43
2.6.3. Hücresel Bağışıklıktan Yararlanılarak Yapılan Test.....	43
2.6.3.1. Montenegro Testi.....	43
2.7. Prognoz.....	46
2.8. Sağaltım.....	48
2.9. Korunma.....	53
2.10. Araştırmanın Amacı.....	55
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	56
3.1. Materyal.....	56
3.2. Yöntem.....	57

3.2.1 Hematolojik Değerlendirme.....	57
3.2.2 Biyokimyasal Değerlendirme.....	57
3.2.3. IFAT.....	58
3.2.3.1. IFAT Antijenli Lamların Hazırlanması.....	58
3.2.3.2. IFAT Yöntemi Uygulanması.....	58
3.2.3.2.1. Tampon ve Solüsyonlar.....	58
3.2.3.2.2. Testin uygulanması.....	58
3.2.4. Parazitolojik Muayene.....	59
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	59
3.2.6. Sonuçların Yorumlanması.....	60
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme.....	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	61
4.1. Klinik Muayene Bulguları.....	61
4.2. Laboratuar Bulguları.....	73
4.2.1. Hemogram Bulguları.....	73
4.2.2. Biyokimyasal Bulgular.....	76
4.2.3 Serolojik Bulgular.....	78
4.2.4 Parazitolojik Bulgular.....	83
4.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları.....	86
5. TARTIŞMA.....	88
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	97
ÖZET.....	98
SUMMARY.....	100
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	133

TEŞEKKÜR.....	134
EK 1. Domperidon ve Allopurinolun kombine olarak kullanıldığı sağaltım grubunun zamana göre hematolojik ve biyokimyasal sonuçları.....	135
EK 2. Allopurinolun tek başına kullanıldığı sağaltım grubunun zamana göre hematolojik ve biyokimyasal sonuçları.....	136

SİMGELER VE KISALTMALAR

DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
VL	:	Visseral leishmaniasis
KL	:	Kutenöz leishmaniasis
PKDL	:	Post kala-azar dermal leishmaniasis
DDL	:	Diffuz deri leishmaniasisi
MCL	:	Mukokutanöz leishmaniasis
KVL	:	Köpek visseral leishmaniasis
sCys-C	:	C-Cistatin
Hp	:	Haptoglobin
CRP	:	C-reaktif protein
CP	:	Seruloplazminin
PZR	:	Palimeraz zincir reaksiyonu
IFAT	:	İndirekt immunofluoresan antikör testi
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
LST	:	Leishmanin deri testi
IL	:	İnterlökin
INF	:	İnterferon
TNF	:	Tümör nekrosiz faktör
FML	:	Fucose mannoz ligand
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
WBC	:	Total lökosit sayısı
RBC	:	Eritrosit sayısı
PCV	:	Hematokrit
MCV	:	Ortalama korpüsküler hacim
MCHC	:	Ortalama korpüskuler hemoglobin hacmi
PLT	:	Trombosit sayısı
ALT	:	Alanin amino transferaz
AST	:	Aspartat amino transferaz
TP	:	Total protein
Alb	:	Albumin
$(\bar{x})$	:	Ortalama
$(S\bar{x})$	:	Standart sapma

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. <i>Leishmania</i> türlerinin coğrafik dağılımı ve vektör kum sineği türleri....	07
Çizelge 2.2. Türkiye'nin farklı bölgelerinde <i>L. infantum</i> enfeksiyonunun seroprevalansı.....	15
Çizelge 2.3. KVL'de görülen başlıca klinik bulgular ve görülme sıklığı.....	31
Çizelge 2.4. KVL'de vücut bölgelerine göre klinik bulgular.....	32
Çizelge 2.5. KVL'de başlıca laboratuvar bulguları ve görülme sıklıkları.....	35
Çizelge 2.6. Köpek Visseral leishmaniasisde tanısai yöntemlerin avantaj ve dezavantajları.....	45
Çizelge 2.7. KVL'de seroloji, klinik görünüm, laboratuvar bulguları ve sağaltıma göre klinik evre ve prognoz arasındaki ilişki	47
Çizelge 2.8. KVL'de uygulanan sağaltım protokolleri.....	49
Çizelge 4.1. VL'li köpeklerin tanımlanması, sağaltım öncesi klinik bulguları ve evreleri.....	62
Çizelge 4.2. VL'li köpeklerde domperidon ve allopurinol'ün kombine olarak uygulandığı köpeklerde, sağaltım süresince klinik bulguların takibi.....	66
Çizelge 4.3. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL'li köpeklerde sağaltım süresince klinik bulguların takibi.....	68
Çizelge 4.4. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı VL'li köpeklerde sağaltım sonrası klinik takip ve nüks durumu.....	72
Çizelge 4.5. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL'li köpeklerde sağaltım sonrası klinik takip ve nüks durumu.....	72

Çizelge 4.6. Visseral leishmaniasisli köpeklerde sağaltım öncesi ve sağaltım süresince saptanan kan tablosu sonuçları.....	75
Çizelge 4.7. Visseral leishmaniasisli köpeklerde sağaltım öncesi ve sağaltım süresince saptanan biyokimyasal analiz sonuçları.....	77
Çizelge 4.8. Domperidon ve allopurinol kombine uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince anti- <i>Leishmania</i> antikor titreleri.....	79
Çizelge 4.9. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince anti- <i>Leishmania</i> antikor titreleri.....	80
Çizelge 4.10. Domperidon ve allopurinol kombine uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince parazitolojik bulguları.....	83
Çizelge 4.11. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince parazitolojik bulguları.....	84
Çizelge 4.12. Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası PZR sonuçları.....	86
Çizelge 4.13. Çalışmaya alınan VL’li köpeklerin klinik, serolojik ve parazitolojik bulgularının zaman içerisindeki değişimi.....	87

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1.1. Visseral leishmaniasisde asites.....	3
Resim 1.2. Kutenöz leishmaniasis.....	3
Resim 1.3. Mukokutenöz leishmaniasis.....	3
Resim 1.4. Ege Üniversitesi Parazitoloji ABD’da sağ kolda tespit edilmiş KL lezyonu	5
Resim 1.5. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji ABD’da tespit edilmiş bir VL’li bir çocukta hepatosplenomegali olgusu.....	5
Resim 1.6. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD’da tespit edilmiş bir KVL olgusu	5
Resim 2.1. <i>Leishmania infantum</i> ’un promastigot formu.....	8
Resim 2.2. <i>Leishmania infantum</i> ’un amastigot formu.....	8
Resim 4.1. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı 9 nolu köpekte sağaltım süresince klinik görünüm.....	70
Resim 4.2. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı 1 nolu köpekte sağaltım süresince klinik görünüm.....	71
Resim 4.3. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı 1 ve 9 nolu köpeklerin sağaltım öncesi lenf yumrusu aspiratlarında amastigotların görünümü	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Leishmania</i> parazitinin yaşam döngüsü.....	13
Şekil 2.2. Th1 ve Th2 arasındaki ilişkiler ve sitokinlerin rolü.....	23
Şekil 4.1. <i>Leishmania</i> spp. ile enfekte olduğu saptanan köpeklere genel bakış.....	61
Şekil 4.2. Sağaltım öncesi her iki grupta görülen klinik bulgular.....	64
Şekil 4.3. Domperidon ve allopurinol'ün kombine olarak kullanıldığı gruptaki VL'li köpeklerin bireysel anti- <i>Leishmania</i> antikorlarının zamana göre değişimi.....	81
Şekil 4.4. Allopurinol'ün yalnız başına kullanıldığı gruptaki VL'li köpeklerin bireysel anti- <i>Leishmania</i> antikorlarının zamana göre değişimi.....	82

1. GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* spp. türlerinin meydana getirdiği kendiliğinden iyileşebilen deri formundan, sağaltılamadığı durumlarda ölüme yol açabilen visseral forma kadar geniş bir yerleşim gösterebilen protozoal enfeksiyöz bir hastalıktır (Ciaramella ve ark 1997, Strauss–Ayali ve Baneth 2000, Desjeux 2001, Papadopoulou ve ark 2005, Solano–Gallego ve ark 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1980 yıllarının başından beri önemi vurgulanan leishmaniasis, malaria ve lenfatik filariasis'den sonra 3. vektör kaynaklı en önemli hastalık olarak değerlendirilmektedir. Hastalığın tropikal ve subtropikal 98 ülke veya bölgede 350 milyon insanı tehdit ettiği, dünyada 12 milyon insanın enfekte olduğu, her yıl 1–2 milyon olgunun eklendiği, bunlardan 500.000 insanın visseral leishmaniasise (VL) ve 1,5 milyon insanın da kutanöz leishmaniasise (KL) yakalandığı bildirilmektedir (Desjeux 2004). Visseral leishmaniasisin yılda 59.000 insanın ölümüne (bu oran sadece sıtma tarafından aşılabilmektedir) ve 2.357.000 insanın da sakatlığa mahkum olmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Desjeux 2004). Ayrıca leishmaniasisin kırsal bölgelerde yaşayan insanları etkileyen en önemli enfeksiyöz hastalık olduğu da vurgulanmaktadır (Alvar ve ark 2006).

Leishmania paraziti, Güney Amerika'da ilk kez “Valley sickness” veya “Andean sickness” olarak isimlendirilmiş, ülseratif deri lezyonlarıyla karakterize olan bu hastalığa XV. ve XVI. yüzyıllardan kalma İnca yazıtlarında da değinilmiştir. Cüzzama çok benzemesinden dolayı hastalığa “beyaz cüzzam” adı da verilmiştir. 1882 yılında Clarke, Hindistanlı hekimler tarafından, Sanskritçe “kala azar” adı verilen ve anlamı kara ateş “black fever” olan hastalığın Hindistan'da bazı yerlerde hemen hemen hiç insan bırakmayacak kadar ölümlere sebep olduğunu da bildirmiştir (Unat 1981).

Uzun yıllardır görülen ve nedeni bilinemeyen bu hastalık, XX. yüzyılın başlarında, ölen bir askerin dalağından yapılan preparasyonda ufak oval cisimler görmesiyle Leishman tarafından ortaya konulabilmektedir. Donovan, 1902 yılında kala–azar vakalarında dalaktan hazırladığı yayma preparasyonlarda aynı etkeni görmüş ve bunların Trypanosoma olmadığını vurgulamıştır. 1903 yılında Major Ross bu parazitler için, *Leishmania* cinsini ortaya koymuş ve kala–azar etkenine *Leishmania donovani* ismini vermiştir (Unat 1981,

Kuman ve Altıntaş 1996). 1908’de Nicolle ve Comte, Tunus’da bulduğu küçük kala–azar etkenlerine *L. infantum* adını vererek hastalığı ilk defa tanımlamışlardır (Solano–Gallego ve ark 2009). O zamandan günümüze kadar hastalığı anlamak ve çözümlerini üretmek adına pek çok çalışma yürütülmektedir.

Türkiye’de, insan leishmaniasisin varlığı ilk kez Kristamonas tarafından ortaya koyulmuş ve İlk bildirim İzmir’de 1918 yılında Dr. Hofer Kaller tarafından yapılmıştır. Yapılan incelemeler 1931 yılında İbrahim Osman, 1936 yılında ise Dr. Akil Özden tarafından kala–azar vakalarının varlığının ortaya konulduğunu göstermiştir. Dr. Arif İsmet Çetingel tarafından 1936 yılı ve sonrasında yapılmış olan araştırmalarda hastalığa dikkat çekilmiş ve ülkemizde 1948 yılına kadar yüzden fazla kala–azar vakası belirtilmiştir. Yurdumuzda köpeklerde kala–azar bulunduğuna dair ilk yayın 1946 yılında Dr. Nurettin Onur tarafından bildirilmiştir (Unat 1981, Kuman ve Altıntaş 1996).

İnsan leishmaniasisi, *Leishmania* parazitinin pek çok türü tarafından meydana getirilebilmektedir. İnsanlarda leishmaniasisin klinik görünümü değişkenlik göstermekle birlikte genel olarak VL, KL, post–kala–azar–dermal leishmaniasis (PKDL), diffuz deri leishmaniasis (DDL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MCL) gibi sınıflandırmalar yapılmaktadır (Murray ve ark 2005, Solano–Gallego ve ark 2009). Hastalığın visseral formu; değişken ateş, kontrol edilemeyen kilo kaybı, şipenomegali, hepatomegali (Resim 1.1) ve özellikle çocuklarda şiddetli anemi ile seyreden, sağaltılamadığı durumlarda ölümcül olabilen bir hastalıktır. Kutanöz leishmaniasis ise insanlarda en çok karşılaşılan formdur. Yüz, kol ve bacaklarda sayısı bazen aynı olguda 200’e kadar ulaşabilen ülseratif deri lezyonlarıyla kendini gösterir (Resim 1.2). Lezyonlar sağaltıma alınsalar bile bölgede belirgin bir skar tabakası nedeniyle görülebilen izler kalabilmektedir (www.who.int/leishmaniasis). Diffuz deri leishmaniasisi kronik deri lezyonlarıyla, PKDL formu ise *Leishmania donovani*’nin endemik olduğu bölgelerde visseral leishmaniasis’i atlatan insanlarda hipopigmente makuler, makulopapüler ve nodüler deri lezyonlarıyla karakterizedir (Murray ve ark 2005). MCL ise genellikle total veya parsiyel olarak burun, ağız ve boğaz bölgesinde mukoz membranların tahribatıyla estetik kayıpların olduğu bir form olarak değerlendirilmektedir (Resim 1.3) (Özensoy Töz ve ark 2002, Murray ve ark 2005).



Resim 1.1. Visseral leishmaniasis’de asites
(www.who.int/leishmaniasis)



Resim 1.2. Kutanöz leishmaniasis
(www.who.int/leishmaniasis)



Resim 1.3. Mukokutanöz leishmaniasis
(www.who.int/leishmaniasis)

Veteriner hekimlikte, *Leishmania infantum*'un sebep olduğu visseral leishmaniasis özellikle köpeklerde önem arz etmektedir. Akdeniz  lkelerinde insanlarda görülen visseral leishmaniasisin, doğadaki asıl rezervuarının, evcil ve yabani karnivorlar olduğu, aynı zamanda hastalığın bir bölgede endemik veya sporadik olgularla devam etmesinde bu hayvanların en önemli rolü oynadığı bildirilmiştir (Molano ve ark 2003, Gramiccia ve Gradoni 2005). Gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde köpeklerin, insanların en önemli evcil hayvanlarından biri olması, gelişmekte olan ülkelerde başıboş köpek sayısının fazla olması, köpeklerin bu hastalık açısından ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Enfekte köpeklerin bulunduğu bölgelerde, kedilerde (Martin–Sanchez ve ark 2007, Coelho ve ark 2011), vahşi karnivorlarda (Sobrino ve ark 2008) ve atlarda (Fernandez–Bellon ve ark 2006) VL'nin tespit edildiği de rapor edilmiştir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde, klinik bulgular hastalığın seyrine göre değişim göstermekle birlikte, deri anormallikleri en sık karşılaşılan bulgulardır. Deri lezyonlarının karakteri, hiperkeratoz, depigmentasyon, kepeklenme ve ülseratif deri lezyonlarına kadar değişim gösterebilmektedir (Voyvoda ve ark 2004). Kıl  rt s  ve derideki anormallikler tüm vücutta görülebildiği gibi burun, göz çevresi, kulaklar ve ayaklara da lokalize olabilmektedirler (Pasa ve ark 2005). Kıl  rt s  çoğunlukla bozulmuş, kuru, gevrek bir görünümdedir ve lokal veya yaygın alopesik alanlara da rastlanılabilmektedir. Gelişen dermatitisler mukokutanöz ülserler ve küçük intradermal nodüller şeklinde oluşabilmektedir. Ayrıca tırnaklarda kuruma ve anormal biçimde uzama (onychogryphosis) görülebilmektedir (Voyvoda ve ark 2004, Pasa ve ark 2005).



Resim 1.4. Ege Üniversitesi Parazitoloji ABD’da sağ kolda tespit edilmiş KL lezyonu
(EÜ Parazitoloji ABD arşivi 2005)



Resim 1.5. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji ABD’da tespit edilmiş bir VL’li bir çocukta hepatosplenomegali olgusu
(EÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji ABD arşivi 1999)



Resim 1.6. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD’da tespit edilmiş bir KVL olgusu
(ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD arşivi 2010)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

Leishmania paraziti, *Kinetoplastidae* sırasında, *Trypanosomatidae* ailesine ait olan bir protozoondur. Yaşamını devam ettirebilmesi için kemirgen, köpek veya insan gibi omurgalı ve kum sinekleri gibi omurgasız iki farklı konakçıya ihtiyaç duyması nedeniyle difazik protozoon sınıfında yer almaktadır (Noli 1999, Killick–Kendrick 1999).

Leishmania tür ve alt türlerinin sınıflandırması oldukça karmaşıktır. Başlangıçta morfolojileri, vektör sinekler, lezyonların tipi, serolojik testler ve coğrafik dağılıma bakılarak sınıflandırılmaya çalışılan bu parazitin, bugün izoenzimatik çalışmalar, DNA peptit haritası, monoklonal antikorlar, hücre zarı yapısı analizleri ve yağ asit analizleri gibi daha gelişmiş tekniklerle 22 türü ve alt türünün identifiye edildiği bildirilmiştir (Noli 1999, Molano ve ark 2003).

Köpek visseral leishmaniasise neden olduğu bilinen ve identifiye edilmiş *Leishmania* türlerinin Eski Dünya ülkelerinde *L. infantum* ve *L. tropica*, Yeni Dünya ülkelerinde ise *L. chagasi* olduğu bildirilmiştir (Strauss-Ayali ve Baneth 2000). *Leishmania* türlerinin coğrafik dağılımı ve vektör kum türleri Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Leishmania türlerinin yaşam evrelerinde, vektörde bulunan promastigot, insan ve diğer memelilerde bulunan amastigot olmak üzere iki ayrı form görülür. Vektör olan kum sineklerinde bulunan flagellata (promastigot) formu, 10–15 µm uzunluğunda, 1,5– 2,5 µm genişliğinde mekik şeklinde bir vücuda, 15–28 µm uzunluğunda olan ve parazitin ön ucundan çıkan bir serbest kamçıya sahiptir (Resim 2.1). Aksenik kültürlerde ve omurgasız vektörün sindirim kanalında çoğalmaktadırlar. Konakçıdan beslenme esnasında promastigotlar konakçıya geçer ve kamçılarını kaybederek amastigot formlara dönüşürler. Omurgalı konakçıda bulunan flagellasız olan amastigot formu ise 2–5 µm boyutlarında ve çekirdeğin yanı sıra çubuk biçiminde bir kinetoplast’a sahiptir (Resim 2.2). Amastigot formu genelde canlılığını sürdürebileceği ve çoğalabileceği intraselüler bir pozisyonda, genellikle de makrofajlar içersinde görülür (Noli 1999, Slappendel ve Ferrer 1990).

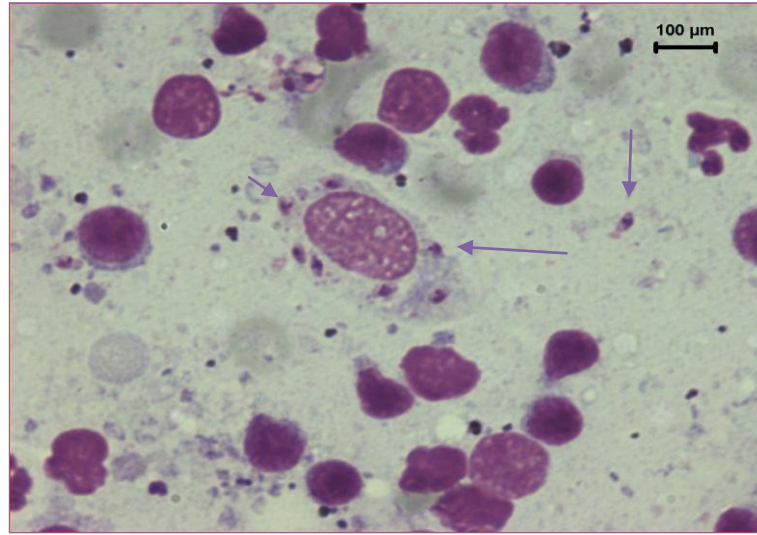
Çizelge 2.1. *Leishmania* türlerinin coğrafik dağılımı ve vektör kum sineği türleri
(Solano–Gallego ve ark 2009)

<i>Leishmania</i> türleri	Coğrafik dağılım	Tespit edilmiş vektör türleri	Şüpheli vektör türleri
<i>L. infantum</i>	Orta Doğu Akdeniz Bölgesi Güney Asya, İran, Ermenistan Afkanistan Orta Asya, Çin	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i> , <i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. langeroni</i> , <i>P. Tobbi</i> <i>P. kandelakii</i> <i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , vb. <i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , vb. <i>P. smirnovi</i> , <i>P.</i> <i>transcaucasicus</i> , <i>P. Longiductus</i>
<i>L. donovani</i>	Orta ve Güney Amerika	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	North Africa	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Orta ve Güney Amerika	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. spinicrassa</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu.</i> <i>umbratilis</i>	<i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu.</i> <i>migonei</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu.</i> <i>paraensis</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. pessoai</i> , vb.
<i>L. peruviana</i>	Peru	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i> , <i>Lu.</i> <i>ayacuchensis</i>	<i>Lu. noguchii</i> , <i>Lu. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	Orta Amerika	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , vb.

Ülkemizde epidemiyolojik çalışmalar sırasında insan ve köpeklerden izole edilen suşlar, Fransa’da Montpellier’de zymodem analizi ile identifiye edilerek *L. infantum* MON–1 olarak tanımlanmış ve moleküler biyolojik araştırmalarda genotipik olarak aynı gruba girdikleri gözlenmiştir (Akman ve ark 2000).



Resim 2.1. *Leishmania infantum*'un promastigot formu
(www.leishmaniasis.info/promastigote_2.htm)



Resim 2.2. *Leishmania infantum*'un amastigot formu
(ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD arşivi 2010)

2.2. Epidemiyoloji

Leishmaniasisin 98 ülkede endemik olarak seyrettiği, günümüzde dünya genelinde 12 milyon insanın enfekte olduğu, her yıl 1–1,5 milyon insanın kutanöz leishmaniasis’e, 500.000 insanın da visseral leishmaniasis’e yakalandığı ve 350 milyon insanın da risk altında bulunduğu Dünya Sağlık Örgütü tarafından rapor edilmiştir (Desjeux 2001, Schallig ve Oskam 2002, Molano ve ark 2003).

Epidemiyolojik olarak Leishmaniasisde zoonotik ve antroponotik olmak üzere iki farklı form görülmektedir. Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen zoonotik formda, dişi kum sinekleri tarafından enfekte edilen köpekler hastalığın asıl rezervuarıdır (Paz ve ark 2010). Ancak son yıllarda özellikle keneler ile pirelerin de vektör olabileceği ve bu ekto-parazitlerin hastalığın bulaşmasında önemli roller üslenebilecekleri vurgulanmıştır (Paz ve ark 2010, Colombo ve ark 2011). Doğu Afrika’da, Bangladeş’de, Hindistan’da görülen antroponotik formda ise, hastalık vektör olan kum sinekleri ile insandan insana bulaşmaktadır (Gallego 2001).

Avrupa’da köpeklerin insanlara göre visseral leishmaniasis’e daha sık yakalandıkları ve hastalığın ana kaynağını oluşturduğu rapor edilmiştir (Ashford ve Bettini 1987). Akdeniz Ülkelerinde KVL’in seroprevalansının % 1,6 ile % 44,9 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Strauss–Ayali ve Baneth 2000, Lachaud ve ark 2002).

Köpeklerde *Leishmania* enfeksiyonunun insidensi ve prevalansı hakkında epidemiyolojik çalışmaların temelini serolojik araştırmalar oluşturmaktadır. Ülkemizde KVL’in epidemiyoloji üzerine yapılan sınırlı sayıdaki çalışma, hastalığın seroprevalansının % 2,58 ile % 28,26 arasında değiştiğini göstermiştir (Voyvoda ve ark 2004, Ertabaklar ve ark 2005, Balcioglu ve ark 2009, Ozensoy Toz ve ark 2009).

Köpek visseral leishmaniasisin oluşumunda uygun bir vektör, enfekte konak, rezervuar, nem, ışık, hava hareketi, beslenme ve konağın bağışıklık reaksiyonu gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (Killick–Kendrick 1999, Strauss–Ayali ve Baneth 2000). Köpek visseral leishmaniasisin vektörü Eski Dünya ülkelerinde *Phlebotomus*, Yeni Dünya ülkelerinde ise *Lutozomyia* cinsi kum sinekleridir ve bilinen 500 *Phlebotomus* türünden sadece 30 tanesinin hastalığın vektörü olduğu bildirilmektedir (Reithinger ve Davies 2002). Türkiye’de ise 18 *Phlebotom* türünün var olduğu ve bunlardan 9 tanesinin leishmaniasisin muhtemel vektörü olabileceği bildirilmektedir (Yaşarol ve Sencer 1964,

Ozbel ve ark 1995, Ok ve ark 2002, Volf ve ark 2002).

Phlebotom'lar deniz seviyesinden 100–800 m yükseklikte ve çoğunlukla kırsal bölgede bulunurlar. Yaşamlarını devam ettirebilen *Phlebotom*'ların, uçuş menzilleri oldukça sınırlı olup, bulunduğu bölge etrafındaki 2,5 km'lik alanı aşamazlar (Strauss–Ayali ve Baneth 2000, Killick–Kendrick 1999). *Phlebotom*'ların en aktif olduğu zaman güneş batımıdır ve nadiren gece de aktivitelerini sürdürebilirler. Bu durum ilkbaharın başlangıcından sonbaharın bitimine kadar sürer. Sıcaklığın 15–28,8 °C, nem oranının ise %50'nin üzerinde olduğu dönemlerde *Phlebotom*'lar aktif olabilmektedirler. Hastalığın bulaşmasında 2–3 mm uzunluğundaki *Phlebotom*'ların dişileri rol oynamaktadırlar. Yumurtalarının gelişimi için gerekli olan proteinleri elde etmek amacıyla, amastigotları taşıyan enfekte omurgalının baş, nasal bölge, kulak kepçesi, inguinal ve perianal bölgeler gibi kılsız bölgelerini tercih ederek kan emme esnasında içinde parazit bulunan makrofajları da alırlar. Amastigotlar makrofajlarla fagozomal vakuoller içerisinde nitrik oksit gibi oksijen metabolitler ile serbest kalarak, parasitoforus vakuolleri içerisinde lizozomal hidrolize uğratılmaya çalışılmasına rağmen non–spesifik defans ile hayatta kalmayı başarırlar. Bu sayede konakçıdan vektör tarafından alınarak bir kısmı sindirilirken diğer bir kısmı türlere özgü olarak sindirim sistemi enzimatik reaksiyonlarından kurtularak, şekil değiştirmeden bölünerek çoğalır ve daha sonra uzun ve zayıf yapıdaki formlara (promastigot) dönüşürler (Alvar ve ark 2004, Bates 2007, Volf ve ark 2008). Ancak bu tür bir sindirim hidrolizine adapte olmuş türlerin, kum sineğinin bulunduğu bölgelerde doğal yollarla bulaşabilecekleri bildirilmektedir (Killick–Kendrick 1999, Volf ve ark 2008, Sharma ve Singh 2009).

Kum sinekleri hastalığın biyolojik olarak bulaşmasında vektörlüğü kanıtlanmış tek artropottur. Bazı türleri sadece bir *Leishmania* türünün vektörü iken, bazılarının hastalığın birkaç türünün bulaşmasına sebep olduğu bilinmektedir (Volf ve ark 2008). Araştırmacılar (Coutinho ve ark 2005, Coutinho ve Linardi 2007) keneler ve pirelerin hastalığın biyolojik siklusuna uygunluk göstermesine rağmen bulaşmada kesin olarak rol oynadıklarıyla ilgili bir kanıt tespit edememişlerdir. Ancak, son yıllarda enfekte köpekler üzerinde bulunan kenelerin ve pirelerin etken ile enfekte oldukları ve 8 ile 10 gün bu enfektif durumlarının devam ettiği belirlenmiştir (Colombo ve ark 2011). Diğer bir çalışmada, deneysel enfekte edilen *Rhiphipicephalus sanguineus* türü kenelerin yumurtalarının 4 ay sonra enfektif olabildiği rapor edilmiştir (Dantas–Tores ve ark 2010). Buna karşın bazı araştırmacılar

(Paz ve ark 2010) enfekte kenelerden yapılan ekimlerde, parazit kültüründe bir gelişmenin olmadığı ve biyolojik siklusuna uygunluğunun daha fazla araştırılmasının gerekliliğini belirtmektedirler. İnsanlarda ve köpeklerde leishmaniasisin bulaşması ve yayılmasında nadir olarak da kongenital bulaşma, kan transfüzyonu, direkt temas, sindirim yolu ve laboratuvar inokülasyonlarının da rol oynadığı rapor edilmiştir (Symmers 1960, Blanc ve Robert 1984, Mancianti ve Sozzi 1995, Riera ve Valladares 1996).

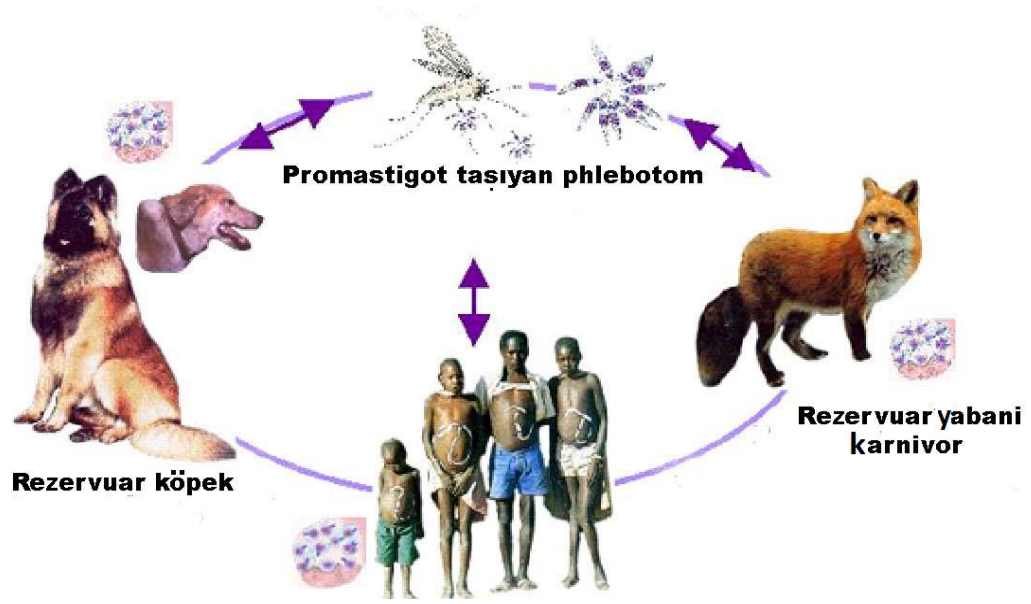
Amerika’da yapılan bir çalışmada, vektörün olmadığı bir bölgede tilkilerden köpeklerle direkt bulaşmanın olduğu ileri sürülmüş; ancak, bu durum deneysel yapılan çalışmalarla ispatlanamamıştır (Duprey ve ark 2006). Hastalığın transplasental yolla bulaşabildiği de ispatlanmıştır (Rosypal ve ark 2005). Silva ve ark (2009) enfekte bir dişi köpekten doğan 2 adet yavru köpeğin karaciğer ve dalaklarında immunohistokimyasal ve Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile hastalığın varlığın ortaya koymuşlar ve endemik bölgelerde transplasental bulaşmanın nasıl bir rol üslendiğinin araştırılması gerekliliğini vurgulamışlardır. Bu bulaşma yolları dışında venereal bulaşmanın da olabildiği rapor edilmiştir (Silva ve ark 2009). Yapılan diğer çalışmalarda bulaşmada enfekte köpek kanı ve ürünlerinin de rol oynadığının unutulmaması gerektiği vurgulanmaktadır (De Freitas ve ark 2006, Tabar ve ark 2008). Söz konusu yollarla bulaşma olmakla birlikte leishmaniasisin doğal gelişiminde ve epidemiyolojisinde, kum sinekleri dışındaki tüm bulaşma yollarının önemli bir role sahip olmadığı, ancak dikkatle araştırılması gerekliliği düşünülmektedir (Baneth ve ark 2008).

Leishmaniasis, dişi kum sineğinin enfekte konağı ısırmasıyla sinek içersinde promastigota dönüşen *Leishmania* türleri tekrar form değiştirerek kısa ve geniş formda orta bağırsağın ön kısmına doğru ilerlerler ve burada farinksi tıkayacak kadar çoğalırlar. Dişi phlebotom tarafından enfekte kanın alınmasından 3–7 gün sonra ilk enfektif olan safhalar hortumda görülür. Enfektif promastigotlar vektör tarafından yine kan emme esnasında yeni omurgalı konağın kanına geçerek konağın çeşitli savunma mekanizmalarına karşı koyarlar. Özellikle komplemanın sitotoksik ve eritici etkisine karşı koyarak ve buna ilaveten savunma mekanizmalarını kendi lehine kullanarak konağın makrofajlarına girerler ve burada amastigot forma dönüşür ve ikiye bölünme ile çoğalırlar (Resim 2.2). Makrofajları patlatarak serbest kalan amastigotlar tekrar başka makrofajları işgal ederek dalak, karaciğer, kemik iliği gibi organlara dağılır ve çeşitli patolojilere sebep olurlar (Slappendel ve Ferrer 1990, Strauss–Ayali ve Baneth 2000). Yapılan çalışmalar *Leishmania* türlerinin

kum sineklerinde trans-overial bir bulaşma meydana getiremediği, sineklerin aktif olmadığı kış aylarında ise konakçının içerisinde yaşamlarını sürdürdüklerini göstermiştir (Bates 2007).

Endemik olmayan bölgelerde de KVL'nin dikkate alınmasının gerektiği vurgulanmaktadır (Shaw ve ark 2003). Özellikle vektör kaynaklı bir hastalık olması endemik olmayan bölgelerde görülen olgular araştırmacıları çoğu zaman yanıltmaktadır. Ancak hastalığın, endemik olan bölgelerde bulunan köpeklerin transportu ve o bölgeye yapılan seyahatler sonucunda da endemik olmayan bölgelere taşınacağını unutmamak gerektiği rapor edilmiştir (Teske ve ark 2002). Bunun yanında kum sineklerinin endemik bölgelerde yayılım içinde bulunduğu ve endemik olmayan bölgelere doğru ilerlediği de düşünülmektedir (Maroli ve ark 2008).

Köpekler, *L. infantum*'un insanlara bulaşmasında en önemli rolü oynamaktadırlar. Bununla birlikte, *L. infantum* ile enfekte köpek sahiplerinin de insanlar için risk oluşturduğu bir çalışmada bildirilmiştir (Gavvani ve ark 2002). Enfekte olan bir köpeğe komşuluk yapma veya onunla aynı evi paylaşmak insan sağlığı açısından bir risk oluşturmaktadır. Ancak Brezilya'da enfekte köpeklerin eliminasyonunun uzun vadede hastalıkla yapılan mücadeleye yardım etmediği, enfekte insan ve köpek sayısını azaltmadığı tespit edilmiştir (Dantas-Torres ve ark 2006, Nunes ve ark 2008).



Şekil 2.1. *Leishmania* parazitinin yaşam döngüsü

(<http://www.who.int/leishmaniasis>)

Köpek visseral leishmaniasisinde evcil köpekler en önemli rezervuar olmasına rağmen, insan, kemirgenler, yabani köpek ve kedilerin de tesadüfen konakçı olabildikleri bildirilmiştir (Koutinas ve ark 1999, Gavgani ve ark 2002, Martinez–Subiela ve ark 2002, Molano ve ark 2003, Mohebalı ve ark 2004). Portekiz, İspanya, İtalya, Fransa, Yunanistan, İsrail, Filistin ve Brezilya’da hastalığın kedilerdeki epidemiyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda, leishmaniasisin kedilerde varlığı rapor edilmiştir (Maia ve ark 2010). Ancak epidemiyolojik çalışmalarda kedilerde enfekte olma oranının köpeklere göre daha düşük olduğu vurgulamaktadır (Duarte ve ark 2010).

Visseral leishmaniasin köpeklerde ırk, cinsiyet ve yaş predispozisyonuna bağlı olmadığı; ancak, kırsal bölgelerde yaşayanlarla, av köpeklerinin hastalığa yakalanma riskinin daha fazla olduğu (Moreno ve Alvar 2002), çok genç ve yaşlı köpeklerde inkübasyon süresinin uzun olmasından dolayı hastalığın daha az görüldüğü bildirilmiştir (Denerolle 1996, Noli 1999, Solano–Gallego ve ark 2009). Visseral leishmaniasis’li köpeklerde hastalığın gerek erkek gerekse dişilerde eşit oranda görüldüğü; ancak, erkek köpeklerin dişilere göre hastalıktan daha çok etkilendiği rapor edilmiştir (Slappendel 1988, Martinez ve Lleret 1992, Denerolle 1996, Ciaramella ve ark 1997, Solano-Gallego ve ark 2009).

Köpeklerde *Leishmania* enfeksiyonunun prevalansı ve insidansı hakkında epidemiyolojik çalışmaların temelini serolojik ve moleküler araştırmalar oluşturmaktadır (Aoun ve ark 2009, Galletti ve ark 2011). Ülkemizde KVL'in epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmalar, hastalığın seroprevalansının % 2,58 ile % 28,26 arasında değiştiğini göstermiştir (Çizelge 2.2). Köpek visseral leishmaniasisinin Kıyı Ege Bölgesinde 2010 yılında yapılan son epidemiyolojik araştırma sonucunda seroprevalansın % 9,0 oranında bulunduğu bildirilmiştir (Atasoy ve ark 2010).

Çizelge 2.2. Türkiye'nin farklı bölgelerinde köpeklerde *L. infantum* enfeksiyonunun seroprevalansı

Araştırmacı(lar)	Yıl	Bölge veya şehir(ler)	İncelenen Köpek sayısı	Prevalans Oranı
Coskun ve ark	1997	Bursa, Muğla, İstanbul	182	% 5,5
Ozensoy ve ark	1998	Manisa/Alaşehir Karabük	494	% 3,6–% 8,7
Ozbel ve ark	2000	Manisa	490	% 3,6–% 19
Ertabaklar ve ark	2001	Muğla Göktepe Köyü	52	% 3,8
Özensoy Töz ve ark	2002	Karaburun ve Urla	55	% 23–% 27
Voyvoda ve ark	2004	Aydın, İzmir/ Selçuk	158	% 3,2
Özensoy ve ark	2005	Kuşadası	253	% 16,6
Ertabaklar ve ark	2005	Çorum	131	% 3,7–% 28,26
Aslantas ve ark	2005	Ankara	116	% 2,58
Dogan ve ark	2006	Bilecik Eskişehir Afyon	111	% 13,51
Ozensoy Toz ve ark	2009	Denizli	140	% 20,7
Balcioglu ve ark	2009	Antalya	176	% 7,95
Atasoy ve ark	2010	Kıyı Ege Bölgesi	300	% 9,0

Avrupa’da ise insanlara göre köpeklerin visseral leishmaniasise daha sık yakalandıkları ve hastalığın ana kaynağı oldukları rapor edilmiştir (Ashford ve Bettini 1987). Akdeniz Ülkelerinde de KVL üzerine yapılan birçok epidemiyolojik araştırmada, hastalığın seroprevalansının % 1,6 ile % 44,9 arasında değiştiği bildirilmiştir (Bettini ve Gradoni 1986, Valladares ve ark 1996, Fernandez–Perez ve ark 1999, Lachaud ve ark 2002).

Semiao–Santos ve ark (1995), Portekiz’de köpeklerde *L. infantum*’un seroprevalansının % 0,7 ile % 8,5 arasında değiştiğini rapor ederken, Cardoso ve ark (2004) Portekiz’in kuzeyinde endemik bir bölgede bu oranın % 20,4 e kadar ulaştığını bildirmişlerdir.

Morena ve Alvar 2002 yılında Fransa’da KVL’in bölgelere göre seroprevalansının % 26,5 olduğu bildirilmiş, Aoun ve ark (2009) ise bu oranın Kuzey Fransa’da % 15 olduğunu rapor etmiştir.

Maroli ve ark (2001) İtalya Santa Anastasya’da 326 köpek üzerinde yaptıkları çalışmada hastalığın seroprevalansının % 40,4 olduğunu, Gambino ve ark (1997) ise Sicilya’da % 44,9, Moreno ve Alvar (2002) İtalya’nın Apulia bölgesinde % 14,5, Tuscany bölgesinde ise % 24 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

İspanya’da KVL’nin seroprevalansının Madrid’de % 5, Priorato bölgesinde ise % 18 bulunmuştur (Moreno ve Alvar 2002). Seroprevalansın Güney İspanya’nın kırsal bölgesinde Nisan ayında % 12, Ekim ayında ise % 18’e kadar yükselebildiği tespit edilmiştir (Acedo–Sanchez ve ark 1998). Couto ve ark (2010) İspanya’da prevalansı 131 sokak köpeğinin değerlendirilmesinde % 5,3 bulunduğunu rapor etmiştir.

Yunanistan’da *L. infantum*’un pek çok bölgede endemik olduğu (Sideris ve ark 1999) ve bazı bölgelerde köpeklerde hastalığın seroprevalansının % 22,4’e kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir (Gallego 2001).

Almanya’da ise köpeklerde *L. infantum* olgularının görüldüğü ve bu olguların hastalığın endemik olarak seyrettiği bölgelere yapılan yolculuklar sonrasında ortaya çıktığı bildirilmiştir (Koehler ve ark 2002).

Tunus, Cezayir ve Malta'da köpeklerde KVL'in varlığı bildirilmiş ve enfeksiyon oranının Tunus'ta % 6 (Ben Sait ve ark 1992), Cezayir' de % 37,5 (Belazzoug 1987) olduğu saptanmıştır.

Köpek visseral leishmaniasisin Türkiye'den Portekiz'e kadar olan Avrupa kıyı bölgelerinde, Kuzey ve Güney Afrika'da, Orta Doğuda, Çin'de endemik olduğu (Santos–Gomes ve ark 2002), ayrıca, İsrail'de % 11,5 (Baneth ve ark 1998) İran'da % 21,6–40,6 (Gavvani ve ark 2002, Mohebbi ve ark 2005), Kıbrıs'da % 10 (Deplazes ve ark 1998) olduğu rapor edilmiştir. Azerbaycan, Türkmenistan, Kazakistan ve Ermenistan gibi ülkelerde de olgulara rastlanıldığı bildirilmiştir (Strelkova ve ark 1993, Gasanzade ve ark 1990). Köpek visseral leishmaniasis ile ilgili sporadik vakalara İsviçre, Hollanda, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada gibi ülkelerde de rastlandığı rapor edilmiştir (Strauss–Ayali ve Baneth 2000).

2.3. Patogenezi

L. infantum ile enfekte köpekler fiziksel muayeneye bulgularına göre genel olarak asemptomatik, oligosemptomatik ve polisemptomatik olarak sınıflandırılmaktadır (Mancianti ve Meciani 1988). Hastalığın farklı görünümde ortaya çıkışı inkübasyon periyodunun değişkenlik göstermesi ve subklinik enfeksiyon oranının yüksek olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Ferrer ve ark 1988, Solano–Gallego ve ark 2001, Baneth ve ark 2008). Ancak, görsel belirtilere dayanan bu sınıflandırma klinikopatolojik anormallikler ve yaygın organ disfonksiyonları nedeniyle çok sınırlı kalmaktadır (Solano–Gallego ve Baneth 2008).

Köpek visseral leishmaniasisinde genel patojenite, parazitin girdiği dokuda makrofajların toplanması, proliferasyonu ve ana dokunun yerini almasıdır. *Leishmania* parazitinin kan monositlerinde, histiositlerde, makrofajlarda, epiteloid hücrelerde, karaciğer Kupffer hücrelerinde, dalakta kırmızı pulpa hücrelerinde, kemik iliğinde, bağırsak duvarının ve lenfoid dokunun mononükleer fagositik hücreleri içerisinde çoğalarak şipenomegali ve hepatomegaliye, kemik iliğinde genellikle hiperplazi ve diseritropoezise, genaralize lenfadenopatiye ve dalaktaki hipertrofiye bağlı olarak ortaya çıkan şipenomegali sonucunda eritrositlerin, granülositlerin ve trombositlerin kısa sürede yıkımına, etkisiz eritropoezis sonucu ciddi pansitopeni tablosunun ortaya çıkabilmesine,

ince bağırsaklarda özellikle Peyer plaklarının etrafında bulunan submukozanın amastigotlu makrofajlarca istilasına bağlı olarak da malabsorpsiyon sonucu diareye sebep olduğu bildirilmektedir (Buracco ve ark 1988, Lappin 1992, Engwerda ve Kaye 2000).

L. infantum, enfekte dişi kum sineğinin köpeğin derisini ısırması sonucu metasiklik promastigotları deri içine verilmesiyle bulaşır (Killick–Kendrick ve Killick–Kendrick 1999, Killick–Kendrick 1999). Parazitin deri immun sistemi ile ilk etkileşimi ve amastigotlar içine geçmesini takiben, amastigotlar enfekte makrofajlar yoluyla bölgesel lenf yumrularına taşınır (Slappendel ve Ferrer 1998, Baneth 2005). Bu noktadan sonra enfeksiyonun ortaya çıkışı, vektör (tekrarlanan enfeksiyöz ısırıklar, kum sineği salyasının deri içine verilmesi), parazitin virulensi ve konak (genetik geçmişi, hücresel ve humoral bağışıklık sisteminin durumu, sitokin durumu, konkurent enfeksiyonlar) gibi bir çok faktöre bağlı olarak değişim gösterdiği bildirilmektedir (Moreno ve Alvar 2002, Baneth 2005, Sanchez–Robert ve ark 2005, Banuls ve ark 2007). Hastalık, lokal olarak deride ve lenf yumrularında elimine edilebilir, sınırlandırılabilir (non–dissemine enfeksiyon) veya asemptomatik enfeksiyon olarak seyredebilir yada bütün vücuda yayılarak dissemine semptomatik enfeksiyon veya dissemine asemptomatik enfeksiyon gibi değişik şekillerle de sonuçlanabilmektedir (Chatterjee ve ark 1999, Nejjar ve ark 2000, Moreno ve Alvar 2002, Baneth 2005, Baneth ve ark 2008).

Enfekte köpekler genel olarak KVL’ye duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmaktadır. Duyarlı köpeklerde, enfeksiyonun başlangıcında parazit sınırsız olarak çoğalarak granülatöz yangısal reaksiyonlara ve immun–mediatör mekanizmaları aracılığıyla multiple organ bozukluklarına yol açarken, dirençli köpeklerde intraselüler *Leishmania* amastigotları etkili olarak öldürülür ve klinik bir tablo ortaya çıkmayabilir (Slappendel ve Ferrer 1998, Baneth 2005). Ancak, bu dirençli köpeklerin bazı durumlarda enfekte olmakla birlikte klinik olarak sağlıklı görülebildikleri, immun sistemlerinin baskılanması nedeniyle tekrar duyarlı hale gelebildikleri bildirilmiştir (Chatterjee ve ark 1999, Travi ve ark 2001, Moreno ve Alvar 2002, Baneth ve ark 2008).

Köpeklerde *Leishmania* enfeksiyonun patogenezi doğal ve deneysel enfekte köpeklerde, enfekte insanların incelenmesi veya laboratuvar hayvanlarının visserotropik *Leishmania* türleriyle enfekte edilmesiyle açıklanmaya çalışılmıştır. Bu tip çalışmaların kendine özgü avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Doğal enfekte köpekler, ortaya konan patogenezi hipotezinin kanıtlanmasında en iyi kanıtları sağlamasına rağmen,

enfeksiyonun zaman içerisinde değişkenlik gösterebilmesi, her köpeğin duyarlılık ve dirençlilik özelliğinin katagorize edilmesinin zorluğu ve eş zamanlı hastalıkların olası etkisi gibi bazı doğal sakıncalar bulunmaktadır. Deneysel enfekte edilen köpeklerde ise bu dezavantajları aşmak daha kolaydır. Ancak bu çalışmalarda, genel olarak konak direncini aşacak dozlarda inokulasyonlar yapılmaktadır. Bunun sonucunda da elde edilecek sonuçlar parazitin enfekte evresine (promastigot veya amastigot), enfeksiyonun ilerleyiş yönüne, inokulasyonun büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir (Slappendel ve Ferrer 1998, Gradoni ve ark 2005, Petanides ve ark 2008).

Köpek visseral leishmaniasisi, insan visseral leishmaniasisi için yararlı bir model olduğu ileri sürülmüştür (Nieto ve ark 1999, Moreno ve Alvar 2002). Ancak, insan immun–komponentleri köpeklerle göre daha dirençli olduğundan, klinik ve patolojik bulgular her zaman benzerlik göstermeyebilir. Eksfoliatif dermatitis köpeklerde görölmesine rağmen insanlarda rapor edilmemiştir. Bu farklılığın patogenetik mekanizmalarından kaynaklı olduğu vurgulanmaktadır (Quinnell ve ark 2001).

2.3.1. Vektörün Rolü

Vektörün rolü hastalık için büyük önem arz etmektedir. Hastalığın kum sinekleri aracılığıyla köpektan köpeğe ve aynı zamanda insandan insana ve köpektan insana bulaşabildiği bildirilmektedir (Killick–Kendrick ve Killick–Kendrick 1999, Killick–Kendrick 1999). Kum sinekleri dışında keneler, sivrisinekler ve pirelerin alternatif vektörler olduğu (Coutinho ve ark 2005), direkt bulaşmanın, vertikal, kan transfüzyonu ve transmissible venereal tümör hücrelerinin implantasyonu sonucunda da olabileceği rapor edilmiştir (Owens ve ark 2001, Rosypal ve ark 2003). Ancak, bu bulaşma yollarının kum sineklerinin hastalığı bulaştırması ile karşılaştırıldığında, epidemiyolojik bir öneminin olmadığı vurgulanmıştır (Killick–Kendrick 1999). Yaklaşık 30 değişik *Phlebotomous* ve *Lutzomyia* cinsi kum sineği türünün hastalığın bulaşmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Killick–Kendrick ve Killick–Kendrick 1999). Erişkin dişi kum sineğinin yılın sıcak mevsimlerinde ve geceleri aktive olduğu, 2–6 haftalık yaşam süreleri içerisinde 1 ile 5 kez kan ile beslendikleri bilinmektedir (Rutledge ve ark 2002). Köpeklerin üzerine geldiklerinde ilk olarak ağız bölgesi, kulak uçları, göz kapakları gibi favori beslenme alanlarına yönelmekte ve epidermise penetre olmakta, ardında da eğer 4–25 gün içerisinde enfekte olmuş iseler beslenme esnasında metasiklik promastigotları konağın süperficial dermisi içerisine enjekte etmektedirler (Killick–Kendrick 2002, Moritz ve ark 2001).

Endemik bölgelerde kum sinekleri için uygun çevresel şartlar ortaya çıktığında, bir köpek bir saat içerisinde 100' den fazla ısırığa maruz kalabilmektedir. Bazı bölgelerde bu ısırıkları oluşturan kum sinekleri içerisinde, enfekte sinek oranının % 10.5'e kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir (Bettini ve ark 1986). Bu kapsamda bir köpeğin bir gece boyunca enfekte ısırık alma ihtimali değerlendirildiğinde, bu ihtimalin geçen yıllar içerisinde günlerce, aylarca devam ettiği dikkate alındığında oldukça yüksek olduğu vurgulanmaktadır (Gradoni 2002). Yüzden 1000'e kadar ulaşabilen bu enfektif ısırıklar sonucunda enjekte edilen promastigotların, hastalık yapabilmeleri için ne kadar sayıda olmaları gerektiği hala tam olarak bilinmemektedir (Overath ve Aebischer 1999). Ne kadar sayıda olurlarsa olsunlar, endemik bölgede yaşayan özellikle gece boyu dışarıda duran köpeklerin sürekli olarak etkenle karşı karşıya kaldıklarının unutulmaması gerektiği rapor edilmiştir (Berrahal ve ark 1996).

2.3.2. Parazit Virölansının Rolü

Promastigotlar, vücuda girmelerinin ardından makrofajlar içerisinde dönüşüme uğrayarak amastigot formuna geçer (Banuls ve ark 2007). Parazit, hücre içerisine girme, yaşamını sürdürebilme ve hücre içerisinde çoğalma gibi çok güçlü mekanizmalara sahiptir ve bu özellikleri sayesinde bağışıklık sistemine karşı koyarak organ ve dokularda patolojilere sebep olurlar (Banuls ve ark 2007). Bu mekanizmaların hem *Leishmania* türlerinde, hem de alt türlerinde farklılık göstermesi sebebiyle insan ve hayvanlarda leishmaniasisin polimorfizmi kısmen açıklanabilmektedir (Sundar ve Rai 2002). İnsanlarda, visseral, kutanöz (lokalize veya yaygın), mukokutanöz ve post-Kala Azar dermal leishmaniasis formları oldukça farklı tür ve alt türler tarafından meydana getirilmektedir (Grimaldi ve Tesh 1993). Bu farklılık köpekler için de geçerlidir. Örneğin *L. braziliensis*, kutanöz veya mukokutanöz hastalık tablosu oluştururken, *L. infantum* visseral leishmaniasise sebep olmaktadır (Koutinas ve ark 1999). Akdeniz ülkelerinde *L. infantum* ile enfekte köpeklerin klinik bulgularıyla, Brezilya'da *L. chagasi*'nin klinik bulgularının birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. Parazitin patojenitesinde pek çok farklılık olmasına rağmen klinik fenotiplerin belirlenmesinde ilave faktörlerin de bulunduğu rapor edilmiştir (Almeida ve ark 2005).

2.3.3. Konak Genetiği

Konağın genetik geçmişi, hastalığa karşı oluşan direnç veya duyarlılık açısından büyük önem arz etmektedir (Ferrer ve ark 2002). Doğal seleksiyona dayanıklı sokak köpekleri ve yerli ırklar endemik bölgelerde diğer köpek ırklarına göre yaşamlarını sürdürebilmekte ve parazite karşı daha etkili immun yanıt verebilmektedirler (Solano–Gallego ve ark 2000). Brezilya köpekleri gibi yerli ırklarda, endemik bölgelerde hastalığın daha az görüldüğü, diğer köpek ırklarına oranla daha düşük *Leishmania*–spesifik IgG antikorlarının bulunduğu rapor edilmiştir (Quinnell ve ark 2003). Boxer, Alman Kurt Köpekleri, Rottweiler gibi köpek ırklarının hastalığa predispoze oldukları, hatta bazılarının genç yaşlarda klinik bulgu gösterdiği rapor edilmiştir (Miranda ve ark 2008). İnsanlarda ve laboratuvar hayvanlarında yapılan genetik çalışmalarda duyarlılığın ve dirençliliğin oldukça karmaşık olduğu ve bu özellikleri kontrol eden 20’den fazla gen bulunduğu rapor edilmiştir (Lipoldova ve Demant 2006).

2.3.4. Köpek Leishmaniasisinin İmmunolojisi

Leishmania paraziti, mononükleer fagositik sistemde bulunan makrofajlar, Kupffer hücreleri gibi pek çok tipte hücreyi, dentritik hücreleri, fibroblastları, endotel hücrelerini, hepatositleri, nötrofilleri, transmissible venereal tümör hücrelerini ve merkezi sinir sistemi de dahil vücutta bulunan tüm organ ve dokuları istila edebilmektedir (Vinuelas ve ark 2001). Parazit, non–fagositik hücrelerde yaşamını sürdürebilmesine rağmen nadiren üretken olabildiği (Rittig ve Bogdan 2000), bu yüzden de özellikle mononükleer fagositik hücrelerden makrofojları konak hücre olarak kullandığı bildirilmektedir (Baneth 2005). Hastalığın oluşabilmesi için parazitin, dermise inokulasyonundan sonra ilk komplement lizisinden kurtulması, fagosit edilmek ve hücre parazitoforus vakuolleri içersinde yerini almak amacıyla makrofajların komplement reseptörlerine yapışması gerektiği vurgulanmaktadır (Lima ve ark 2007). Hastalığın ilerleyişinde makrofajların fonksiyonu, öncelikle paraziti bölgesel lenf yumrularına taşıma, ardından da tüm vücuda yaymadır. Doğal enfeksiyonlarda inokulasyonun ardından hastalığın yayılım hızı bilinmemektedir, ancak, deneysel çalışmalarda intradermal inokülasyonun ardından 96 saat sonra *L. donovani*’nin lenf yumrularında ve dalakta tespit edildiği rapor edilmiştir (Saldarriaga ve ark 2006). Yayılımın gerçekleşip gerçekleşmediği konağın direncine bağlıdır. Duyarlı köpeklerde parazitin yayılımı birkaç saatte gerçekleşirken, dirençli köpeklerde deride veya lokal lenf yumrularında kalabilmektedir (Ferrer 2002). Makrofajların ikinci önemli rolü de

büyük doku uyuşum kompleksi (MHC) (major histocompatibility complex) molekülleri vasıtasıyla T hücrelerine parazit antijenlerini hazırlamasıdır (Ferrer 2002). Sonuç olarak intraselüler parazit ölümü, indüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) ile nitrik oksit (NO) üretimine, yeterli Th1 hücrelerinin yapımını uyaran B7 molekülüne ve uygun sitokin ortamına özellikle interferon-gama'ya (INF-gama) bağlı olarak amastigot apoptozisi ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Pinelli ve ark 1995, Zafra ve ark 2008).

Duyarlı köpek içersinde özellikle B7 molekül salınımı ve NO üretiminde aksamalar olduğu tespit edilmiştir (Vouldoukis ve ark 1996). Bu da parazitin, yaşamını sürdürdüğü hücre içersinde çaprazlama çoğalarak hücrenin patlamasına ve komşu makrofajların enfekte olmasına sebep olmaktadır. Nötrofiller ve eozinofiller gibi diğer fagositik hücrelerin rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, dermatropik veya visserotropik *Leishmania* türleriyle laboratuvar hayvanları üzerine yapılan çalışmalarda, nötrofillerin parazitin inokulasyonun ardından ilk birkaç gün içersinde aktif olduğu, bunun yanında nötrofillerin ve eozinofillerin reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla amastigotların öldürülmesinde görev aldıkları da rapor edilmiştir (Smelt ve ark 2000). Bunun aksine duyarlı köpeklerde nötrofillerin fagositik aktivitesi yükselmesine rağmen hücre içinde amastigotların ölümü gerçekleşmemektedir (Brandonisio ve ark 1996).

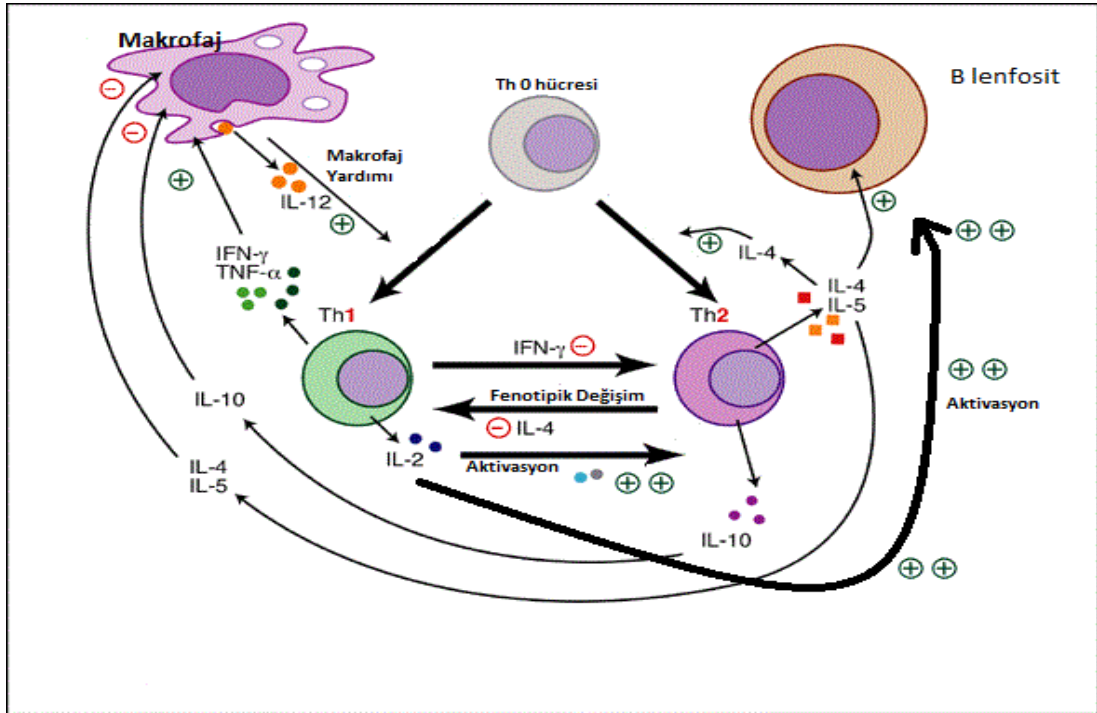
Parazitin dermise inokulasyonundan sonra epidermal kutanöz dendritik hücreler de enfekte olmaktadır (Saint-André Marchal ve ark 1997, Ferrer 2002). Makrofajlar gibi MHC molekülleri sayesinde T hücrelerine antijenlerini sunmakta, sayılarını arttırmakta ve bu sayede hücresel bağışıklık sisteminin major rolünü üslenmekte, morfolojilerinde meydana gelen değişim sayesinde *Leishmania* deri testlerinde pozitif reaksiyon vererek tanıya da yardımcı olmaktadır (Saint-André Marchal ve ark 1997, Ferrer 2002, Sacchi ve ark 2006)

Hücresel bağışıklık sistemi, *Leishmania* gibi intraselüler patojenlere karşı büyük önem arz etmekte (Moreno ve Alvar 2002) ve *Leishmania* deri testleri, lenfosit proliferasyon testleri ve *in vivo* geçikmiş tip hipersensivite reaksiyonları ile ilgili çalışmalar bu sisteme dayandırılmaktadır (Fernandez-Bellon ve ark 2006).

T lenfositler ve onların alt populasyonları immun yanıtta çok büyük rol üslenmektedirler. Duyarlı köpeklerde sirkülasyondaki ve lenf doku ve organlardaki sayıları azaldığı ve hastalığa karşı yanıt veremedikleri ortaya konulmuştur (Martinez-Moreno ve

ark 1995). Pek çok çalışmada CD4+ T-helper (Th) ve CD8+ T lenfositlerin sayılarının yetersizliğinin hastalığın şiddetiyle direkt olarak ilişkili olduğu da vurgulanmaktadır (Alhaidari ve Rivierre 2005). Elde edilen veriler ışığında Th1 and Th2 subpopulasyonlarının karmaşık yapılarına rağmen Th1'in hücresel aktivasyonu ve dirençliliği, Th2'nin ise duyarlılığı sağladığı bilinmektedir.

Deneysel ve doğal enfekte köpeklerde sitokinlerin rolü de pek çok çalışmada değişik hücrelerde, doku ve organlarda (Periferal kan mononükleer hücreleri/lenfositler, kemik iliği, lenf yumruları, dalak, karaciğer, deri) araştırılmış, interlökin-2 (IL-2) ve INF-gama'nın hastalığa karşı oluşan direnci sağladığı, IL-12 ise INF-gama'nın üretimini zenginleştirdiği ortaya konulmuştur (Ramiro ve rak 2003, Dos Santos ve ark 2004). Th1 ve Th2 arasındaki ilişkiler ve sitokinlerin rolü Şekil 2.2'de özetlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 2.2. Th1 ve Th2 arasındaki ilişkiler ve sitokinlerin rolü

İmmun yanıtın güçlü olmasına bağlı olarak parazitin kontrolü sağlanabildiğinde, hastalığın seyri asemptomatik olarak devam edebilmektedir (Belkaid ve ark 2000). Latent olarak hastalığı taşıyan köpekler bölgede hastalığın yayılımına katkıda bulunmakta ve hastalığın bölgelere göre dağılımının değerlendirilmesinde büyük hatalara neden olmaktadır. Elde edilen veriler asemptomatik köpeklerde hastalığın nasıl seyrettiği hakkında yeterli bir bilgi vermemesine rağmen son yıllarda parazit ve konağın arasında kompleks ilişkiler olduğu kanısına varılmıştır (Manna ve ark 2006). Enfeksiyon şiddeti konakçı makrofajlarının amastigotları yok edebilme etkisine bağlı olarak değiştiği vurgulanmakta, bu etkinin de heterojen sitokin takımları arasındaki dengeyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Rhalem ve ark 1999).

2.3.5. Eşzamanlı Hastalıkların Rolü

Köpek visseral leishmaniasisde eşzamanlı, enfeksiyöz hastalıklar (monositik ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis, bartonellosis, hepatozoonosis, dirofilariosis, spirocercosis, demodikosis, sarkoptik uyuz), immün–mediatör hastalıklar (pemfigus foliaceus, sistemik lupus eritematosus), endokrinopatiler (hipotiroidizm) ve çeşitli neoplazilerle (hemanjiosarkoma, lenfoma, miyeloma, histiositoma, transmissible venereal tümör) karşılaşılabileceği rapor edilmiştir (Slappendel ve Ferrer 1998, Levy ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2008, Petanides ve ark 2008).

Endemik bölgelerde sıklıkla görülen ve kronik seyirli olması nedeniyle KVL'ye eşlik eden sporadik hastalıkların olması olağandır. Ancak, KVL tespit edilen yaşlı köpeklerde eşzamanlı bazı hastalıkların seropozitifliğin beklenenden daha yüksek çıkmasına neden olabildiği bildirilmiştir (Gaskin ve ark 2002, Miranda ve ark 2008). Bu durum, köpeklerin bakım besleme koşullarıyla, eşzamanlı hastalıkların ve KVL'nin köpeklerin bağışıklık sistemine etkisi (immunsupresyon) ile açıklanmaya çalışılmıştır (Cringoli ve ark 2002). Bununla birlikte KVL ile enfekte köpeklerde hücrel bağışıklığın şiddetli olarak baskılanmasının eşzamanlı hastalıklara karşı duyarlılığın artmasına ve *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* ve *Demodex canis* gibi latent hastalıkların aktivasyonuna sebep olabileceği de vurgulanmaktadır (Gaskin ve ark 2002). Hipotezler arasında bunun tersinin de düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir (Cringoli ve ark 2002). İmmun kökenli hastalıkların sağaltımı için kullanılan ilaçların da KVL'ye duyarlılığı arttırabildiği bildirilmiştir (Miranda ve ark 2008). Bu nedenden dolayı KVL tespit edilen köpeklerde eşzamanlı hastalıkların klinik bulgular, tanı ve ayırıcı tanı, prognoz ve sağaltım

etkinliğinin kontrolü açısından mutlaka taranması ve dikkate alınması gerekliliği vurgulanmaktadır.

2.4. Klinik Bulgular

Köpek visseral leishmaniasisde pek çok doku ve organda granülamatöz inflamasyon ve/veya immun–mediatör mekanizmalar (otoimmünantikorlar, immun–kompleks birikimi) devreye girmektedir (Ferrer 2002). Hastalıkta görülen her bir klinik bulgu ve laboratuvar anomallikleri bir veya birçok mekanizmanın yansıması olarak ortaya çıkabilmektedir (Koutinas ve ark 1999).

Hastalıkla ilişkili olarak klinik bulgu göstermeyen köpekler asemptomatik, en az iki klinik bulgu gösterenler oligosemptomatik, belirgin üç ya da daha fazla klinik bulguları gösterenler polisemptomatik olarak nitelendirilmektedir (Koutinas ve ark 1999, Saridomichelakis 2009). Son yıllarda ise enfekte köpekler klinik ve laboratuvar bulgularına göre; hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olarak sınıflandırılmaktadır (Solano–Gallego ve ark 2009). Periferik lenfadenopati veya papuler dermatitis gibi klinik bulguların görülebildiği, hemato-biyokimyasal bulgularda çoğu zaman bir anormallik belirlenmeyen, negatif veya düşük antikor titresine sahip visseral leishmaniasisli köpekler hafif olarak (Evre I), evre I’de görülen klinik bulgular yanında eksofoliyatif dermatitis, onychogryphosis, ülserasyonlar, anoreksi, kilo kaybı, ateş ve epistaksis gibi klinik bulguların da görülebildiği, laboratuvar bulgularında hafif düzeyde non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemi belirlenebilen, düşük veya yüksek antikor titresine sahip visseral leishmaniasisli köpekler orta şiddetli (Evre II), evre I, II’de görülen klinik bulgulara ilaveten vaskulitis, artrit, uveitis ve glomerulonefrit gibi immün kompleks lezyonlar tespit edilebildiği, laboratuvar bulgularında non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemiye ilaveten kronik böbrek hastalıklarının laboratuvar bulgularıyla da karşılaşılan (kreatin 1,4-2 mg/dl), orta veya yüksek antikor titresine sahip visseral leishmaniasisli köpekler şiddetli (Evre III), evre I, II, III’de görülen klinik bulgulara ilaveten pulmoner tromboembolizm, nefrotik sendrom, böbrek hastalıklarının son evrelerinin tespit edilebildiği, laboratuvar bulgularında non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemiye ilaveten kronik böbrek hastalıklarının ve nefrotik sendrom bulgularıyla karşılaşıldığı (kreatin 2-5 mg/dl, proteinüri), yüksek antikor

titresi sahip visseral leishmaniasisli köpekler çok şiddetli (Evre IV) olarak sınıflandırılmaktadır (Solano–Gallego ve ark 2009).

Hastalıkta makrofaj, histiosit, lenfosit plazma hücreleri ve bazen de nötrofil ve eozinofillerin katılımıyla oluşan granülamatöz inflamasyon, lenf yumruları, kemik iliği, dalak, bağırsaklar, karaciğer, kemikler, erkek genital sistem ve mukozalarda lezyonlara ve patolojilere sebep olmaktadır (Lamothe ve Poujade 2002). Diğer taraftan immun–mediatör mekanizmalar renal ve hepatik patolojilerde önemli rol üslenmektedir (Poli ve ark 1991).

Visseral leishmaniasisli köpeklerde özellikle çok sayıda makrofajın enfekte olması nedeniyle lenf yumrularının kortikal ve medullar bölgelerinde hipertrofi meydana gelmektedir (Cortada ve ark 2004). Bunun sonucu KVL’de en sık görülen tipik belirtilerden biri periferik lenfadenopati (Cortada ve ark 2004). Bununla birlikte hastalığın ileri aşamalarında özellikle böbrek yetmezlikli köpeklerde, periferik lenf yumruları vücut kondisyon kaybı nedeniyle çoğu zaman normal veya hipoplastik olabilmektedir (Giunchetti ve ark 2008a).

Enfekte köpeklerde klinik bulgular hastalığın seyrine göre değişim göstermekle birlikte, deri anormallikleri en sık karşılaşılan diğer bir bulgudur (Slappendel 1988). Deri lezyonlarına yaygın olarak rastlanmakta ve olguların %80–90’ında görülmektedir (Slappendel 1988, Voyvoda ve ark 2004, Pasa ve ark 2005). Bu lezyonlar genellikle simetrik, multifokal veya diffuz ekzfoliyatif dermatitis şeklinde olmakta (Slappendel 1988) ve klinik olarak da kuru, kepekli, alopesik, eritramatöz veya hiperpigmente olarak görülebilmektedir (Papadogiannakis ve ark 2005). Deri ülserleri ise olguların %15–40’ında görülebilmekte ve genellikle kulak uçlarında, ekstremitelerin sert zeminlerle temas ettiği noktalarda, ayaklarda ve mukokutanöz birleşim noktalarında lokal travmalar ve vasküler hasarlar nedeniyle meydana gelmektedir (Slappendel 1988, Fondevila ve ark 1997). Deri lezyonları nadiren de nodüler tipte olabilmekte ve olguların %2–9’unda karşılaşılmaktadır. Yoğun parazit yükünün, konağın artmış duyarlılığı ile ilişkilendirilmektedir (Kontos ve ark 1993, Fondevila ve ark 1997). Papüller dermatitis lezyonlarına nadiren rastlanmaktadır. Bu lezyonların birden çok kum sineği ısırığına maruz kalmış dirençli köpeklerde veya düşük parazit yükü sebebiyle oluştuğu ve sağaltılabilir olduğu bildirilmektedir (Ordeix ve ark 2005). Köpek visseral leishmaniasisinde, steril pustular dermatitis, genellikle göz çevresinde bulunan lokal alopesi, nazal depigmentasyon, nazal ve taban yastığı hiperkeratozisi, onychogryphosis, steril granüloma–piyogranüloma benzeri lezyonlar,

nodüler dermatofibrosis, acral lick dermatitisi benzeri lezyonlar, vaskulitise bağılı hemarojik lezyonlar, süperfisiyal veya derin piyoderma lezyonları gibi deri lezyonları daha az karşılaşılan ve daha az tanımlanmış diğer deri bulgularıdır (Naranjo ve ark 2005).

Granülamatöz inflamasyonun kemik iliğinde meydana gelmesi, lenfosit ve plazma hücrelerinin sayısını arttırmasına, eritroid ve megakaryositik hipoplazi ve/veya displazisine, miyoloid/eritroid oranı artmasına ve eritrofagositose neden olabilir (Rodes ve ark 1999). Bütün bu değişimlerin çoğu lokal parazit yükü ile ilişkilidir ve gelişen anemi ve trombositopeniyi açıklayabilmektedir (Rodes ve ark 1999).

Abdominal palpasyonda tespit edilememekle birlikte şipenomegali, KVL'in en sık karşılaşılan bulgularındandır (Ciaramella ve Corona 2003). Şipenomegali immun hücrelerin infiltrasyonu ve proliferasyonu ile mikrovasküler yapıdaki değişimleri sonucunda beyaz ve kırmızı pulpada hiperplaziye bağılı olarak gerçekleşmektedir (Ferrer 2002, Ciaramella ve Corona 2003).

Hastalıkta hepatik tutulum oldukça sık karşılaşılan bir durumdur ve tüm mikroskopik incelemelerin tamamına yakınında lezyonlarla karşılaşılmaktadır (Giunchetti ve ark 2008b). Bu tutulumda, sadece makrofajlar enfekte olmamakta, Kupffer hücreleri, bazende hepatositler enfekte olabilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b). Karaciğerde meydana gelen kronik granülamatöz inflamasyon, başlangıçta sinozoidler içersinde kalabilirken, daha sonradan portal bölgeyi de içene alacak şekilde genişleyerek kapsula haline dönebilir veya diffuz bir inflamasyon meydana getirebilir (Giunchetti ve ark 2008b). Histolojik olarak karaciğer incelendiğinde, Kupffer hücrelerinde hipertrofi/hiperplazi, hepatositlerde vakuol dejenerasyonu ve nekrozis, nadiren de amiloidosis görülebilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b). Klinik muayene sonucu çoğu zaman ortaya koyulamayan, post mortem bulgularda belirlenebilen hepatomegalinin, yangısal hücre infiltrasyonu, dayanıklı hücrelerin hiperplazisi/hipertrofisi ve bunlara bağılı olarak oluşan pasif konjesyon sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b). Karaciğer patolojileri, hipoalbuminemi, serum enzim aktivitelerinde artış gibi değişken kliniko-patolojik anormallikler ile kendini gösterirken, nadiren karaciğer yetmezliğiyle de sonuçlanabilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b).

Bağırsak lezyonları, parazitin varlığı ve piyogranülamatöz veya granülamatöz yangısal reaksiyonlar sonucu meydana gelmektedir (Ciaramella ve Corona 2003). Bu reaksiyonlar kronik ince ve/veya kalın bağırsak ishali şeklinde kendini gösterebilir veya klinik olarak latent kalabilirler (Ciaramella ve Corona 2003).

Hastalığın kemik tutulumu parazitin hematolojik yayılımının ardından meydana gelen granülamatöz ostemiyelitis şeklinde tespit edilir (Agut ve ark 2003). Bu yangısal reaksiyon sonucunda oluşan proliferatif ve litik lezyonlar radyolojik olarak görülebilirler (Agut ve ark 2003).

Erkek genital organlarda parazitin meydana getirdiği lezyonların ise parazitin lokalizasyonuna ve yoğunluğuna bağlı olarak değiştiği ve sekonder testikuler dejenerasyon ile lenfoplazmositik intersitisiyal orşitise, histiolimfositik epididimise, penisin granülamatöz yangısına ve histioplazmositik balanopostitise yol açabileceği rapor edilmiştir (Diniz ve ark 2005).

Hastalığın mukozal tutulumuna nadiren rastlanmakta ve nodüler veya ülseratif lezyonlar görülebilmektedir (Lamothe ve Poujade 2002). Enfekte makrofajların göçüyle, lokal minor travmalar sonucu veya enfekte kum sineklerinin yanlışla yenilmesi sonucu meydana geldiği düşünülen bu lezyonların parazitin varlığı sonucu meydana gelen granülamatöz veya piyogranülamatöz yangı nedeniyle de oluştuğu rapor edilmiştir (Lamothe ve Poujade 2002).

Böbrek patolojilerinde, histopatolojik muayeneler sonucunda daha çok membranoproliferatif veya mesangioproliferatif glomerulonefritisin, tubulointersitisiyal nefritisin ve nadiren de amiloidosisin lezyonları görülür (Palacio ve ark 1995). Glomerulde immuno-kompleks birikimi glomerulonefritise neden olmakta, tubulointersitisiyal lezyonların ise hem glomerular patoloji hem de böbrek intersitisiyumunda ve tubular bazal membranlarda immuno-kompleks birikimi sonucunda yangıya bağlı sekonder olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Palacio ve ark 1995). Bu patolojiler proteinüri ve hipertansiyonun sebebi olarak düşünülmekte ve hastalığı en çok ölüme sürükleyen kronik böbrek yetmezliği ve nefrotik sendrom gibi hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Cortadellas ve ark 2008).

Enfekte köpeklerde iskelet kasları yangısı ile sıklıkla karşılaşılmaktadır. Genellikle elektromyografik anormallikler, bazen de serum kreatinin fosfotaz ve laktat dehidrojenaz aktivitelerinde artış eşliğinde muskuler atrofi şeklinde kendini göstermektedir (Koutinas ve ark 1999). Makrofajlar ve miyofibriller içersinde bulunan amastigotlar, immuno–kompleks birikimler ve miyofibrillere karşı gelişen otoantikolar sebebiyle de polimiyozitisin meydana gelebildiği bildirilmiştir (Vamvakidis ve ark 2000).

Eklem lezyonları visseral leishmaniasisli köpeklerde görülebilmekte ve genellikle bilateral simetrik, eroziv veya eroziv olmayan poliartritis ve topallık ile sonuçlanmaktadır (Agut ve ark 2003). Bu lezyonların, granülomatöz yangının synovial enfeksiyona neden olması ve immuno–kompleks birikimler nedeniyle nötrofil infiltrasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (Agut ve ark 2003). Bununla birlikte topallığın nedeninin her zaman oluşan polyartritise bağlamanın yanlış olduğu, bunun olası kemik ve ayak yastığı lezyonları, polimiyozitis ve nöraljiden de olabildiği rapor edilmiştir (Agut ve ark 2003).

Blefaritis, konjunktivitis, keratitis, keratokonjunktivitis sicca, uveitis ve retina ayrımı gibi göz lezyonları neredeyse tüm muayenelerde karşılaşılabilmektedir (Agut ve ark 2003, Naranjo ve ark 2005). Lezyonların altında yatan nedenler, parazitin varlığı nedeniyle meydana gelen granülomatöz yangı, özellikle uveitise sebep olan immuno–kompleks birikimi, keratokonjunktivitisin keratitise neden olması gibi diğer göz yapılarındaki lezyonların göz patolojilerine neden olması, KVL'nin sistemik etkilerinden hipertansiyona bağlı olarak gelişen retinal lezyonlar gibi patogenetik mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır (Agut ve ark 2003, García–Alonso ve ark 1996).

Daha öncede bahsedildiği gibi KVL'de, bazı klinik bulguların patomekanizmaları ve klinikopatolojik bulguları oldukça karmaşıktır ve belirsizliğini korumaktadır. Kilo kaybı özellikle hastalığın uzun süre devam ettiği köpeklerde sıklıkla karşılaşılan bir bulgudur (Slappendel 1988). Bu durum meydana gelen anoreksi ile açıklanmaya çalışılmış, anoreksinin de triptofan gibi esansiyel besin maddelerinin konak ve parazit tarafından kullanılarak tüketilmesi, bağırsak absorpsiyonunda azalma ve renal patolojilerin meydana gelmesiyle oluştuğu bildirilmiştir (Slappendel 1988, Jüttner ve ark 2001). Epistaksis'in, trombositopeni, trombositopati, hyperglobulineminin neden olduğu hyperviskozite, rhinitis, nasal ülserasyon, immuno–kompleks vaskulitise bağlı olarak geliştiği bildirilmektedir (Jüttner ve ark 2001, Petanides ve ark 2008). Myokardiyal lezyonların ise

granüloamatöz yangıya, immun–kompleks birikimine ve sistemik hipertansiyona bağı olarak meydana gelebildiğı bildirilmektedir (Torrent ve ark 2005, Cortadellas ve ark 2006).

Hastalıkta merkezi sinir sistemi bulgularına nadiren rastlanmaktadır. Davranış değışiklikleri, nöbetler, meningitis, spinal hemorajiler gibi merkezi sinir sistemi bulguları görülebilir. Bu bulguların parazitin varlığı nedeniyle oluşan granüloamatöz yangı, vaskulitis ve meninkslerde immun–kompleks birikimi nedeniyle oluştuğı rapor edilmiştir (Guttadauro 2004, Torrent ve ark 2005).

Asites, KVL’li köpeklerde nadiren tespit edilen bir bulgudur (Ciaramella ve ark 1997, Koutinas ve ark 1999, Dantas–Torres ve ark 2006). Asitesli enfekte köpeklerin abdominal sıvılarında amastigotlara rastlanabileceğı vurgulanmaktadır (Dantas–Torres ve ark 2006). Asitesin tam olarak nedeni bilinmemekle birlikte, meydana gelen sistemik vaskulitese bağı olarak şekillenebildiğı bildirilmektedir (Pumarola ve ark 1991).

Köpeklerde sistemik kronik bir hastalığa neden olan KVL’de görülebilen klinik bulgular ve görülme sıklığı Çizelge 2.3, vücut bölgelerine göre klinik bulgular da Çizelge 2.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. KVL’de görülen başlıca klinik bulgular ve görülme sıklıkları
(Ciaramella ve ark 1997^a , Slappendel ve Ferrer 1998^b , Koutinas ve ark 1999^c)

Klinik Bulgular	Görülme sıklığı (%)
Deri lezyonları	81–89 ^{c,b}
Genaralize lenfadenopati	65,2–90 ^{a,b,c}
Solgun muköz membranlar	58 ^c
Oküler bulgular	18 ^a
Kaşeksi	10,1–47,5 ^{a,b,c}
Şiplenomegali	9,5–53,3 ^{a,b,c}
Ateş	4–36 ^{a,b}
Epistaksis	6,3–10 ^{a,c}
Artropatiler	3,2–4 ^{a,c}
Asites	1,3–3 ^{a,c}

Çizelge 2.4. KVL’de vücut bölgelerine göre klinik bulgular (Paltrinieri ve ark 2010)

Vücut Bölgesi	Klinik Bulgular
Genel	Kaşeksi
	Muskuler atrofi
	Letharji
	Solgun Mukoz Memebranlar
	Hafif orta şiddette lenf adenopati
	Epistaksis
	Hepatomegali
	Topallık ve eklem şişkinliği
	Ateş
	Döküntülü Dermatitis (lokal veya generalize)
Kutanöz ve Mukokutanöz	Ülseratif Dermatitis (Travma bölgelerinde, mukokutanöz kavşaklarda, eklem çıkıntılarında)
	Papüller Dermatitis
	Nodüller Dermatitis
	Lupus ve pemfigus benzeri burun lezyonları
	Onychopati
	Nasodigital hiperkeratoz
	Pustuler Dermatitis
	Palpebral Lezyonlar
	Diffuz veya noduler konjuktival lezyonlar
	Korneal lezyonlar
Okuler	Noduler keratitis
	Diffuz veya granülamotöz anterior ve posterior uvea lezyonları
	Gluakom ve panoftalmitis
	Granülamotöz orbital lezyonlar
	Gastrointestinal veya neurolojik tutulum
Diğerleri	

2.5. Laboratuvar Bulguları

Visseral leishmaniasisli köpeklerde laboratuvar bulguları, hastalığın seyri, safhası ve şiddetine göre değişiklikler gösterebilir. Hastalıkta görülebilen başlıca laboratuvar bulguları ve görülme sıklıkları Çizelge 2.5’de özetlenmiştir.

Enfekte köpeklerde anemi en sık görülen hematolojik anormalliklerdendir (De Luna ve ark 2000). Anemi, kan kayıpları (epistaksis vb.), eritrositlerin membran dayanıklılığını azalması (otoantikorlar, immunkompleksler), kronik enfeksiyon anemisi, demir yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, eritroid displazisi, eritropoesisin azalması, monositik ehrlichiosis gibi eş zamanlı enfeksiyonlar sonucu gelişen en sık karşılaşılan hematolojik anormallikdir (De Luna ve ark 2000). Otoantikorlar ve immunkompleksler nedeniyle meydana gelen hemoliz ile anemi üzerine kronik enfeksiyonun rolünün son zamanlarda glukokortikoid immunosupresif yanıt eksikliği, normal serum demir konsantrasyonu, transferrin saturasyonu ve kemik iliği hemosiderin miktarı ile ilişkili olduğu da vurgulanmaktadır (Adamama–Moraitou ve ark 2005).

Benzer ilişkili patolojik mekanizmalar trombositopeni için de geçerli (otoantikorlar, immun kompleksler, kemik iliği üretimi azalması, eşzamanlı enfeksiyonlar) olup şiddetli olgularda bile kanamaya nadiren sebep olduğu bildirilmektedir (Moreno ve ark 1998).

Visseral leishmaniasisli köpeklerde en sık karşılaşılan biyokimyasal anormallik hiperglobulinemi ve hipoalbuminemidir. Bu duruma temel olarak artmış gamma-globulin ve bazen de artmış alfa-2 ve beta-globulin konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu durum, kronik yangıya bağlı olarak böbrek, karaciğer ve bağırsak patolojileri olduğu düşünülmektedir (Corona ve ark 2004). Bu değişimler oluşan hiperproteinemi içerisinde albumin / globulin oranında azalma olarak kendini göstermektedir (Romdane ve ark 1992).

Enfekte köpeklerde böbrek yetmezliği, immun kompleks birikimleri sonucu glomerular hasarla ilişkili glomerulonefritis, intersitisiyal nefritis, tubular nefritis ve nadiren de glomerular amilodiosis’e bağlı olarak meydana geldiği bildirilmektedir (Poli ve ark 1991, Palacio ve ark 1997, Solano–Gallego ve ark 2007). Şiddetli böbrek yetmezlikli enfekte köpeklerde, sağaltım uygulansa bile prognozun kötü olduğu vurgulanmaktadır (Palacio ve ark 1997). Bu açıdan enfekte köpeğin prognozunun belirlenmesinde ve sağaltım protokolün tespitinde böbrekler ile ilgili hasarın şiddetinin erken dönemde

belirlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Pasa ve ark 2009). Veteriner hekimlikte renal fonksiyonların değerlendirilmesinde serum kreatinin ve üre değerleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak, serum kreatinin ve üre konsantrasyonlarının, protein alımı ve kas kütlesi gibi bazı böbrek dışı faktörlerden etkilenebildiği de bilinmektedir (Randers ve Erlandsen 1999). İnsan Hekimliğinde, serumda C–Cistatin (sCys–C) renal fonksiyon değerlendirmesi en önemli endojen belirteç olarak kullanılmakta (Herget–Rosenthal ve ark 2004), köpeklerde renal fonksiyonların değerlendirmesi amacıyla da bu parametrelerin kullanılabileceği rapor edilmiştir (Jensen ve ark 2001, Antognoni ve ark 2005). Pasa ve ark (2009), KVL’li köpeklerde böbrek fonksiyon bozukluklarının erken dönemde belirlenmesinde serum sCys–C seviyesinin önemli bir belirteç olduğunu vurgulamıştır.

Köpeklerde klinik muayene sonucu çoğu zaman ortaya koyulamayan, post mortem bulgularda belirlenebilen hepatomegalinin, yangısal hücre infiltrasyonu, dayanıklı hücrelerin hiperplazisi/hipertrofisi ve bunlara bağlı olarak oluşan pasif konjesyon sonucu oluştuğu bildirilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b). Karaciğer patolojileri, hipalbuminemi, serum enzim aktivitelerinde artış (ALT, AST, GGT ve ALP) gibi değişken klinikopatolojik anormallikler ile kendini gösterirken (Ciaramella ve ark 1997), nadiren karaciğer yetmezliğiyle de sonuçlanabilmektedir (Giunchetti ve ark 2008b).

Visseral leishmaniasisli köpeklerde doku hasarını ve yangısal parametreleri takip etmek amacıyla akut faz yanıtının da kontrol edilebileceği yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Eckersall 2000). Karaciğerde sentezlenen doku hasarı, travma ve yangıyı takiben artış eğilimine geçen akut faz proteinlerinden özellikle haptoglobin (Hp), C–reaktif protein (CRP) ve seruloplazminin (CP) enfekte köpeklerde artış eğiliminde olduğu, kısa süreli sağaltım sonucunda ise serum konsantrasyonlarının önemli derecede düştüğü, sağaltım süresince ve sağaltım sonrası takiplerde önemli belirteçler olabileceği rapor edilmiştir (Martinez–Subiela ve ark 2003).

Çizelge 2.5. KVL’de başlıca laboratuvar bulguları ve görülme sıklıkları
(Ciaramella ve ark 1997 ^a, Slappendel ve Ferrer 1998 ^b, Koutinas ve ark 1999 ^c)

Klinikopatolojik Bulgular	Görülme sıklığı (%)
Hiperproteinemi	63.3 –72,8 ^{a, c}
Hiperglobulinemi	70.6 – 100 ^{a, b}
Hipoalbuminemi	68 – 94 ^{a, b}
Albumin/Globulin oranında azalma	76 ^a
Nonrejeneratif anemi	60 –73,4 ^{a, c}
Trombositopeni	29.3 – 50 ^{a, b}
Lökositozis	24 ^a
Lökopeni	22 ^b
ALT, GGT ve ALP aktivitesinde artış	16 ^a
Üre ve kreatinin düzeyinde artış	16 – 45 ^{a, b}
Hafif veya şiddetli proteinuri	71.5 – 85 ^{b, c}

2.6. Tanı

2.6.1. Direkt Tanı

2.6.1.1. Mikroskopik Muayene

Köpek visseral leishmaniasisinde kesin tanı, kemik iliği, lenf yumruları, deri veya periferik kan gibi enfekte doku ve organlardan alınan örneklerin mikroskop altında incelenmesi sonucu *Leishmania* amastigotlarının görülmesiyle konulur (Alvar ve ark 2004). Örneklerin çoğunluğunun invaziv yöntemlerle alınması ve asemptomatik köpeklerde genellikle uygun olmaması, bu yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır. Alınan yayma preparat örneklerinin Giemsa veya *Leishman* boyasıyla boyanması sonucu amastigotlar tek başlarına veya monosit, makrofaj ve nötrofiller gibi hücrelerin içinde oval, 2–4 mm çapında görülebilmektedir (Resim 2.2). Sitoplazmaları açık mavi, nükleusları nispeten daha büyük, kinetoplastları ise çubuk benzeri bir görünümündedir. Kemik iliği ve lenf yumrularının incelenmesi sonucu amastigotların görülme olasılığı sırasıyla %60–75 ve %30–50 olarak bildirilmiştir (Alvar ve ark 2004). Rosypal ve ark (2005), doğal olarak enfekte olan köpeklerin lenf yumruları ve kemik iliği aspirasyonunda etkenin ortalama %93 oranında rastladıklarını ve bu oranın kemik iliğinde daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

2.6.1.2. Histopatolojik Muayene

Leishmaniasis ile enfekte köpeklerin, doku ve organlarının histopatolojik muayenelerinde parazitin tespit edilebildiği, popliteal lenf yumrularında etken tespitinin daha kolay olduğu bildirilmektedir (Moreira ve ark 2007). *Leishmania* ile enfekte köpeklerin lenf yumrularından yapılan histopatolojik muayeneler sonucunda semptomatik köpeklerde %43,9, oligosemptomatik köpeklerde %40 ve asemptomatik köpeklerde ise %39,13 oranında parazite rastlandığı rapor edilmiştir (Moreira ve ark 2007). Bourdoiseau ve ark (1997)'da deri biyopsilerinde %32,35 oranında parazite rastladıklarını rapor etmişlerdir.

2.6.1.3. İmmunohistokimyasal Muayene

Köpek visseral leishmaniasisinde gerek histopatolojik gerekse immünohistokimyasal muayeneler amastigotların tespit edilmesi ve mikroskop altında tam olarak tanımlanması amacıyla kullanılan yöntemlerdir (Alvar ve ark 2004, Baneth ve Aroch 2008, Gomes ve ark 2008).

Dokularda immunoperoksidaz ve direkt immunofloresans gibi yöntemler kullanılarak yapılan immunohistokimyasal muayeneler hastalığın tanısını doğrulamak amacıyla kullanılmaktadır (Bourdoiseau ve ark 1997). Amastigot belirlemek amacıyla immunohistokimyasal muayeneler, parafinle fiske edilmiş doku içerisine streptavidin–peroksidaz/biotin sistemi ile birlikte köpek hiper immun serumu kullanılarak uygulanabilmektedir (Bourdoiseau ve ark 1997, Tafuri ve ark 2004). Xavier ve ark (2006) değişik anatomik bölgelerde immunohistokimyasal metodun histopatolojik muayeneye göre hastalığın tespitinde daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Moreira ve ark (2007) semptomatik, oligosemptomatik ve asemptomatik köpeklerin lenf yumrularını direkt immunofloresans yöntemiyle incelemiş, lenf yumrularının özgünlüğünün %100, duyarlılığının bu köpeklerde sırasıyla %92, %68, %60 ve %73,91 olduğunu belirlemişlerdir.

2.6.1.4. Kültür

Farklı dokuların *in vitro* kültür incelemeleri parazitin tanımlanmasında kolaylık sağlamaktadır. Ancak, tüm *Leishmania* suşları aynı oranda ürememekte, aynı köpekten alınan aynı parazit yüküne sahip dokularda aynı miktarda üreme oluşamayabilmektedir (Evans 1989). Kültürler, Schneider's insect medium, M199, RPMI, Grace's medium gibi monofazik şekilde veya Novy–McNeal–Nicolle Media gibi difazik olabilmektedir. Media nitelemesi aspiratın veya homojenize edilmiş organ parçasının inokulasyonunda bir veya iki damla kullanılması ve 22,8 ve 26,8 °C'de inkübe edilmesi olarak açıklanmaktadır. Kültürler promastigotların varlığını araştırmak amacıyla haftada bir kez kontrol edilmeli ve gerekirse taze media uygulaması yapılmaz. Maia ve ark (2009), enfekte köpeklerden alınan lenf yumrusu, kemik iliği, dalak ve karaciğerin kültür ekimlerinde %77,1 ilk haftada, %23'ünün ise 2. ve 3. haftalarda pozitiflik verdiğini rapor etmişlerdir.

2.6.1.5. Laboratuvar Hayvanlarından Parazit İzolasyonu

Parazitin varlığı, Golden Hamsterlerine (*Mesocricetus auratus*) inokulasyonla ortaya konulabilmektedir. Bu yöntem sonuçların elde edilmesinin birkaç ay sürmesi nedeniyle tanısal amaçla kullanılmamaktadır (Alvar ve ark 2004). İnokulasyonun ardından hepatosplenomegali gibi enfeksiyon belirtilerinin tespiti amacıyla hayvanlar haftalık olarak muayene edilmelidir. Amastigotlara çoğu zaman karaciğer ve dalak örneklerinde rastlanmaktadır (Alvar ve ark 2004).

2.6.1.6. Ksenodiagnozis

Ksenodiagnozis, doğal artropod vektörler kullanılarak izolasyon ve identifikasyon tekniğidir. Bu teknikle yapılan çalışmalarda *Phlebotomus perniciosus* ve *P. ariasi*'nin Akdeniz bölgesinde (Molina ve ark 1994), *Lutzomyia longipalpis*'in ise Güney Amerika'da (Travi ve ark 2001) hastalığın bulaşmasında vektör oldukları ortaya konmuştur. *Phlebotomus* türlerinde değişik araştırmalarda enfeksiyon oranının % 21,9 ve %92 arasında değiştiği (Molina ve ark 1994), bu oranın *L. longipalpis*'de ise %13'den %29'a kadar değişim gösterebildiği bildirilmektedir (Sherlock 1996). Ksenodiagnozis, klinik durum ve ilaç sağaltımı gibi önemli epidemiyolojik sorulara yanıt vermekle birlikte özel laboratuvarlarda yapılabilmesi ve iyi kurulmuş bir kum sineği kolonisine ihtiyacı nedeniyle KVL de tanısall amaçla nadiren kullanılmaktadır (Sherlock 1996).

2.6.1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hastalığın aktif olduğu durumlarda ve sağaltım etkinliğinin izlenmesinde güvenle kullanılan bir yöntemdir. PZR ile tam kan, buffy coat, kemik iliği aspiratı, lenf yumrusu aspiratı, deri biyopsisi ve konjunktival swap gibi pek çok klinik örnek *Leishmania* DNA'sının belirlenmesinde kullanılmaktadır (Andrade ve ark 2002, Strauss–Ayali ve ark 2004, Maia ve ark 2006). Maia ve ark (2009) lenf yumrusu aspiratında yapılan PZR'in tanısall amaçla ve sağaltım takibinde daha kullanışlı olduğunu, lenf yumrusu örneğinin alınmaması durumunda kemik iliğinin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Son yıllarda, konjunktival swap örneklerinden yapılan PZR'ların da tanısall amaçla ve sağaltım takibinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Reithinger ve Davies 2002 , Barrouin–Melo ve ark 2005). *Leishmania* DNA'sı belirtilen klinik örneklerin dışında dalak, karaciğer, penis, vajina, testis, semen, uterus, plasenta, böbrek, bağırsaklar, süt ve idrar gibi diğer biyolojik materyallerde de tespit edilebilmiştir (Andrade ve ark 2002, Reithinger ve Davies 2002 , Barrouin–Melo ve ark 2005, Diniz ve ark 2005, Rosypal ve ark 2005).

Polimeraz zincir reaksiyonu tabanlı diagnostik testlerin periferik kanda kullanılması, uygulamasının basit olması nedeniyle diğer invaziv yöntemlere kıyasla hasta sahipleri tarafından daha kabul edilebilir yöntemlerdir. Epidemiyolojik çalışmalarda filtre kağıtları üzerine damlatılan tam kan örneklerinin serolojik testlerin sonuçlarının tamamlanması için kullanılabildiği rapor edilmiştir (Maia ve ark 2009). Bununla birlikte

klirik şüpheli köpeklerde tek bir basit PZR sonucunun hastalığı ekarte etmek için yeterli olmadığı, enfekte köpeklerin farklı dokularından alınan örneklemelerde PZR sonuçlarının bazen çelişkili sonuçlar verebildiğı rapor edilmiştir (Baneth ve Aroch 2008). Bu çelişki değışik çalışmalarda gözlemlenmiş ve parazitin doku ve organlarda heterojen dağılması, organ ve dokularda parazit yükünün farklı olması ve lokal immün yanıtla açıklanmaya çalışılmıştır (Maia ve ark 2009). Diğ r taraftan hastalığın bulaşmasının mümkün olduğı mevsimlerde doğal kontaminasyonlar ve geçici enfeksiyonlar nedeniyle PZR ile yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca, PZR'nin duyarlılığı primerler, hedefin kopya sayısı, DNA ekstraksiyon metodu, biyolojik materyal ve PZR protokolü gibi değışik faktörlere bağlı olarak da değıştiğı rapor edilmiştir (Alvar ve ark 2004, Cortes ve ark 2004, Baneth ve Aroch 2008).

2.6.1.8. Real–time PZR

Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerine ilavaten 1988 yılında “thermus aquaticus” bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte PZR için otomatize termal sikl s cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışıma tekniklerinin de kullanıma girmesiyle kinetik revers transkriptaz–PCR ’da bir devrim yaşanmaktadır. Bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençlerinden kemoterapi taramalarına ve tümör evrelerinin moleküler saptanmasına kadar uzanan birçok farklı alanda gen anlatımını sayısal bir değ er olarak ölçmek mümkün olmaktadır. Bu gelişim sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değ erlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PZR reaksiyonunu ekranda izleyerek ‘Real Time’ (eşzamanlı) olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PZR döngülerinin sayısıyla oynayabilmek de mümkündür. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda Floresan Kantitatif RT–PZR, Kantitatif–kinetik PZR gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür (Rolao ve ark 2004). Real time PZR'nin avantajlarını řu şekilde sıralanmaktadır; Konvansiyonel PZR “plato fazında” yani son noktada değ erlendirilebilir, real time PZR esnasında ”ekponansiyel büyüme fazında” data gözlemlenebilir. Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır. Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az RNA ile çalışılabilir. Bu da ne kadar duyarlı olduğunu göstermektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonrası elektroforez gerektirmez. İki kat artmış değışimi belirleyebilme duyarlılığındadır. Sonuçların normal PZR'na göre daha hızlı alınması, kontaminasyon riskini daha az olması ve yüksek

duyarlılığı ile real time PZR son yıllarda pek çok çalışmada güvenli bir biçimde kullanılmıştır (Mortarino ve ark 2004, Rolao ve ark 2004, Gomes ve ark 2008). Köpek visseral leishmaniasisinde yapılan çalışmalarda tanıda, değişik dokularda sağaltım öncesi ve sonrası takipte parazit yükünün belirlenmesinde ve oluşabilecek nükslerin kontrolünde bu tekniğin yol gösterdiği bildirilmiştir (Pennisi ve ark 2005, Francino ve ark 2006, Manna ve ark 2007).

2.6.2. İndirekt Tanı

2.6.2.1. İndirekt İmmunofluoresan Antikor Testi (IFAT)

Köpek visseral leishmaniasisin tanısında IFAT altın standart tanı yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu test, epidemiyolojik çalışmalarda ve sağaltım takiplerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Gradoni 2002, Alvar ve ark 2004). Ancak, IFAT'da, uygulayıcının yüksek deneyimi ve becerisi ile pahalı laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca seri dilüsyonların yapılması gerekmekte ve örnekleme fazla olduğu çalışmalar da uygun bir yöntem olmadığı bildirilmiştir (Gradoni 2002). IFAT'nin hazır antijen kitleri bulunmakla birlikte laboratuvar ortamında hazırlanan antijenlerin daha etkili olduğu belirlenmiştir (Gradoni 2002). Homojen yeşil floresan renk pozitif, kırmızı mat renk ise negatif olarak değerlendirilmektedir. Testin duyarlılığı değişik araştırmacılar tarafından değerlendirilmiş ve enfekte köpeklerde % 21,6 (Silva ve ark 2001) ile %100 (Ciaramella ve ark 1997) arasında değiştiği rapor edilmiştir. Maia ve ark (2009) endemik bir bölgede asemptomatik ve semptomatik köpeklerde duyarlılığının %85,5 ve özgüllüğünün % 94,7 olduğunu bildirmişlerdir.

İndirekt immunofluoresan antikor testi, KVL'de sağaltım etkinliğinin belirlenmesinde ve hastaların durumunun kontrolünde de kullanım bulmaktadır. Hasta köpeklerde klinik iyileşmenin değerlendirilmesinde antikor düzeylerinin kullanımı tartışma konusudur. Önceki çalışmalarda sağaltımı takip eden ilk aylarda antikor titresinin düşüş eğiliminde olmadığı bildirilmesine karşın (Ferrer ve ark 1995), son yıllardaki çalışmalar klinik iyileşme ile ilişkili IgG ve IgA antikor düzeylerinde yavaş ve sürekli bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark 2006). Bu nedenle, hasta köpeklerde ilk aylarda yüksek titre tespit edilmesi, IgG'nin nispeten daha uzun yarı ömrü olması gibi nedenlerden dolayı laboratuvarında tekrarlanan kantitatif serolojik testler tavsiye edilmektedir (Anderson ve ark 2006). Sağaltımın takibinde ve hastanın durumunun kontrolündeki en ideal olan

yolun, hastalardan alınan serum örneklerinde aynı test ile sağaltım süresince farklı zamanlarda antikor kinetiğinin takip edilerek değerlendirilmesi olduğu rapor edilmiştir (Anderson ve ark 2006). Bu kapsamda IFAT titrelerinde iki katı bir düşüş önemli olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, sağaltımın sonlandırılmasını takiben antikor düzeylerinde oluşan belirgin bir artış özellikle meydana gelebilecek nüksün bir göstergesi olarak yorumlanması gerektiği vurgulanmaktadır (Anderson ve ark 2006).

2.6.2.2. Kounterimmunoelktroforezis

Kounterimmunoelktroforezis, Barbosa ve ark (1973) tarafından geliştirilen anti-*Leishmania* antikorları tespiti için niteliksel bir tekniktir. Bu teknik, serum içersinde bulunan antijen ve antikorların arasındaki etkileşimi, cellogel-1 şeridi üzerinde elektroforez ile mavi renkli görünür hale gelmesine dayanmaktadır. Mancianti ve Meciani (1988), şiddetli klinik leishmaniasisli köpeklerde bu yöntemin duyarlılığının %96,1, hafif olgularda %80 ve asemptomatik köpeklerde ise %72,7 olduğunu rapor etmişlerdir.

2.6.2.3. İmmunodiffüzyon

İmmunodiffüzyon, Bernadina ve ark (1997), tarafından KVL'nin tanısı amacıyla geliştirilmiştir. Bu teknik, ikili immunodiffüzyonun % 3'lük polyetilenglykol içeren %1 agaroz jel içersinde yapılmasıyla ve serum örnekleri ve *Leishmania* soluble antijen (LSA) kullanılmasıyla yapılmaktadır. Bu tekniğin kullanılmasıyla yapılan çalışmalarda duyarlılığının endemik bölgelerde %98 olduğu, ancak endemik olmayan bölgelerde ise %69'a kadar düşebildiği bildirilmiştir (Bernadina ve ark 1997).

2.6.2.4. Direkt aglütinasyon testi

Bu yöntemde süspansiyon olarak veya liyofilize formda promastigotlar kullanılabilir. Bu yöntemin ucuz, basit ve hem saha ortamında hemde laboratuvar kullanımı için ideal olduğu rapor edilmiştir (Meredith ve ark 1995). Köpeklerde yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmada duyarlılığının %70,6 ile %100 arasında değiştiği ve özgüllüğünün ise %100'e (Schallig ve Oskam 2002 , Mohebbi ve ark 2004) kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir. Plazma ve serum ile çalışılabilen bu yöntemin saha şartlarında kullanılabilirliğinden bahsedilse bile (Schallig ve Oskam 2002), inkubasyon periyodunun uzun olmasından dolayı (18 saat) ve serum ve plazma örneklerinin seri dilüsyonlara ihtiyacı olması nedeniyle güçlükler yaşandığı bildirilmiştir (Harith ve ark 1989). Fast

Agglutinasyon Screening Test olarak isimlendirilen ve daha sonradan geliştirilen direkt agglutinasyon yöntemiyle ise çok daha kısa zamanda (3 saat) az miktarda örnekle çalışılabildiği, KVL’li köpeklerde testin duyarlılığının % 93,6 ile % 97,7 arasında değiştiği vurgulanmaktadır (Schallig ve Oskam 2002).

2.6.2.5. Enzyme–linked immunosorbent assay (ELISA)

Enzyme–linked immunosorbent assay saha uygulamaları için yararlı, oldukça kolay yapılabilen, kısa sürede çok sayıda örneğin incelenebildiği kolayca tüm sitoplazmatik, saflaştırılmış antijenler gibi çeşitli antijenlerin incelenebildiği, tanımlanmış sentetik peptidler ve rekombinant proteinleri ile kullanılmak üzere uyarlanmış bir testtir. Mettler ve ark (2005), asemptomatik köpeklerde ELİSA’nın duyarlılığının %94,1–100 arasında değiştiğini ve bu oranın semptomatik köpeklerde % 100 olduğu rapor etmişlerdir. Fisa ve ark (1997), ise protein A–peroxidaz ile yaptıkları dot–ELISA’nın duyarlılığının %100 olduğunu vurgulamışlardır. Köpek antikorları yerine protein A–peroxidaz ile işaretleme yönteminin insan ve diğer olası konakçıların tespiti için bir kolaylık sağladığı bildirilmiştir (Baleeiro ve ark 2006).

2.6.2.6. ELISA–rekombinant antijenleri

Rekombinant DNA teknolojisi daha spesifik serodiyagnostik yöntemlerin geliştirilmesi için olanak sağlamakta ve özellikle rK39 KVL’nin tanısı için sıklıkla kullanılmaktadır (Mettler ve ark 2005).

2.6.2.7. İmmunokromatografik Hızlı Testler

İmmunokromatografik hızlı test kitleri kullanım kolaylığı ve çok hızlı tepki süresi nedeniyle veteriner hekim tarafından tercih edilen test olmakla birlikte, KVL’nin serolojik tanısı konusunda ne kadar güvenilir oldukları hala tartışma konusudur (Gradoni 2002). rK39 antijen kullanan bir immünokromatografik ticari test saha koşullarında kullanım için adapte edilmiş ve kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Mohebbi ve ark 2004, Rosypal ve ark 2005). Ancak, bazı araştırmacılar soğuk zincirle saklanması gereken bu testlerin yüksek sıcaklıklarda güvenilirliğinin olmadığını vurgulamaktadır (Schallig ve Oskam 2002). rK39 dipstiklerinin en önemli dezavantajının yanlış pozitif sonuçlara neden olabilecek, % 61–75 arasında değişen düşük özgüllüğü olduğunu rapor etmişlerdir (Schallig ve Oskam 2002). Buna karşın Mettler ve ark (2005) semptomatik köpeklerde bu oranın çok yüksek olduğu

vurgulamıştır. Costa ve ark (2003), KVL tanısı için hızlı immünokromatografik testler biçimlendirerek, rK39 ile rK26 etkinliğini karşılaştırmış ve rK26 az, rK39 daha duyarlı olmasına rağmen, iki antijenin birbirini tamamlayıcı olduğu sonucuna varmışlardır.

2.6.2.8. Western Blotting

Bu tanısal yöntemin uzmanlık gerektirmesi, zaman alması, zahmetli ve pahalı olması nedeniyle rutin tanı için geçerli bir yöntem olmadığı bildirilmiş, tanısal amaçla kullanılabilirliği ve güvenilirliği açısından araştırmacıların hala hemfikir olamadığı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Ferroglia ve ark 2007).

2.6.2.9. Flow Sitometri

Flow Sitometri, sayma, inceleme ve sıvı akışı içerisinde asılı mikroskobik partikülleri sıralama için kullanılan bir tekniktir (Andrade ve ark 2007). Bu yöntem elektronik algılama cihazları ile optik akan tek hücre özelliklerini aynı anda çok parametrelili analizini sağlamaktadır. Bu yöntemin doğru, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem olması, hem sağlık kuruluşlarında hemde araştırma laboratuvarlarında kullanımını arttırmıştır. Andrade ve ark (2007) yaptıkları aşı çalışmalarında *L. chagasi* ile enfekte köpeklerin serum örneklerinde (FC-AFPA-IgG, FC-AFPAIgG1 ve FC-AFPA-IgG2) *L. chagasi* antikorlarının saptanması için flow Sitometri tabanlı yöntemin performansı değerlendirmiş ve FC-AFPAIgG ve IgG2 kullanımının % 97 duyarlılığı ve % 93 özgüllüğü olduğunu tespit ederek enfekte köpeklerin belirlenmesinde yararlı bir araç olduğu sonucuna varmışlardır.

2.6.3. Hücresel Bağışıklıktan Yararlanılarak Yapılan Test

2.6.3.1. Montenegro Testi

Montenegro veya Leishmanin Deri Testi (LST), *Leishmania* antijenlerine karşı gecikmiş tip aşırı duyarlılık prensibine dayanır. Fenol veya merthiolate ile serum fizyolojik içinde dilüe edilmiş inaktif promastigotların bir süspansiyon halinde intradermal inoküle edilmesi ve kontrol serumunun inoküle edilmiş bölgesi ile karşılaştırılması prensibine dayanmaktadır. 48 veya 72 saatte kontrolleri yapılan inokulasyon bölgelerinde pozitif sonuç için 5 mm ve üzerinde bir sertleşme olması gerektiği bildirilmektedir (Montenegro 1926, Cardoso ve ark 1998). Hastalığın tespit edildiği olgular genel olarak aktif hastalık esnasında olmaktadır. Leishmanin deri testinin negatif tespit edildiği durumlar da ise

subklinik enfeksiyonlar ya da başarılı sağaltım sonrası erken dönemde karşılaşılabildiği rapor edilmiştir (Solano–Gallego ve ark 2001).

Leishmanın deri testi, basit, ucuz, hayvanların çok sayıda olduğu saha çalışmaları için uygun bir tanı yöntemi olduğu (Cardoso ve ark 1998, Fernandez–Bellon ve ark 2005), ancak 48–72 saat aralıkla tekrarlanan LST testler sonrasında yanlış pozitif sonuçların çıkabileceği vurgulanmaktadır (Fernandez–Bellon ve ark 2005).

Köpek visseral leishmaniasisinde tanısal yöntemlerin avantaj ve dezavantajları çizelge 2.6’da özetlenmiştir.

Çizelge 2.6. Köpek Visseral leishmaniasisde tanısal yöntemlerin avantaj ve dezavantajları
(Maia ve Compino 2008)

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Mikroskopik Muayene	Kesin tanı konur.	Amastigotların görülme olasılığı düşüktür Örnek alımı invaziv olabilir.
Histopatolojik Muayene	Kesin tanı konur.	Amastigotların görülme olasılığı düşüktür. İnvaziv yöntemlerle veya nekropsilerde örnekler alınabilir. Uygun laboratuvar şartlarına ve laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır.
İmmuno-histokimyasal Muayene	Özgünlüğü ve duyarlılığı yüksektir.	İnvaziv yöntemlerle veya nekropsilerde örnekler alınabilir. Uygun laboratuvar şartlarına ve pahalı laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır.
Kültür	Tanının konulmasının ardından devam edecek çalışmalara olanak sağlar.	Tüm <i>Leishmania</i> suşları aynı oranda çoğalmaz, aynı köpekten farklı dokulardan alınan örneklerde bir örnek çoğalma olmaz ve uzun süreye ihtiyaç duyar.
Ksenodiagnozis	Klinik durum ve ilaç sağaltımı çalışmalarında yararlı sonuçlar verir	İyi kurulmuş kum sinek kolonilerine ve özel laboratuvar şartlarına ihtiyaç duyar.
PZR	Hastalığın aktif olduğu durumlarda güvenle kullanılır. Yüksek duyarlılığa sahiptir.	Hastalığın evresine ve alınan dokuya göre duyarlılığı değişim göstermektedir.
Real-time PZR	PZR'ye göre 1000 kat daha az RNA ile çalışabilmektedir. PZR ye göre sonuçlar daha hızlı alınır. Kontaminasyon riski daha azdır. Yüksek duyarlılığa sahiptir.	Örnekleme yapıldığı dokuya göre duyarlılığı değişim gösterebilmektedir.
IFAT	Seroprevalans ve sağaltım çalışmalarında kullanıma elverişlidir.	Deneyime ve pahalı laboratuvar malzemelerine ihtiyaç duymaktadır.
Direkt Aglütinasyon Testi	Basit, ucuz ve saha şartlarında kullanılabilir.	Kross reaksiyonlar nedeniyle özgünlüğü düşüktür.
ELİSA	Saha şartları için yararlı, kısa sürede çok sayıda örnek çalışılabilir.	Kross reaksiyonlar nedeniyle özgünlüğü düşüktür.

2.7. Prognoz

Köpek visseral leishmaniasisde prognoz, hastalığın evresine göre iyiden kötüye kadar değişmektedir (Çizelge 2.7). Hastalığın sağaltımında meglumin antimoniate ve allopurinol kombinasyonu veya yalnız allopurinol uygulaması ile genellikle klinik yanıtın alınabildiği bildirilmiştir (Noli ve Auxilia 2005). Ancak, bazı köpekler sağaltıma iyi yanıt verebilmelerine karşın, sağaltım kesildikten sonra klinik nükslerle karşılaşılabilir (Pasa ve ark 2005). Ayrıca, parazitolojik iyileşme nadiren gerçekleşmekte ve sağaltımda uzun süre allopurinol uygulaması yapılması sonucunda paraziti bulaştırma riskinin devam ettiği rapor edilmiştir (Ikeda–Garcia ve ark 2007).

Klinik olarak sağlıklı enfekte köpeklerin kendiliğinden iyileşip iyileşemeceği tam olarak açıklanamamıştır (Solano–Gallego ve ark 2009). İnsan ve kemirgenlerde yapılan çalışmalarda, (Dereure ve ark 2003, Soliman 2006), klinik olarak sağlıklı persiste enfeksiyonlarda kendiliğinden iyileşmenin olmadığı rapor edilmiştir. Uzun süreli deneysel çalışmalarda, klinik olarak sağlıklı enfekte köpeklerin, klinik belirti gösteren köpeklere göre daha az sayıda parazit yüküne sahip oldukları rapor edilmiştir (Rodriguez–Cortes ve ark 2007). Oliva ve ark (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, endemik bir bölgeye giren köpekler incelenmiş ve kemik iliğinden alınan örneklerin PZR yönünden pozitif oldukları tespit edilmiştir. Bunun ardından ilerleyen zamanlarda bazı köpeklerin yapılan incelemelerinde zaman içerisinde örneklerin negatif sonuçlar verdiği de görülmüştür. Ancak, bu çalışma sadece bir doku örneklemesinin yapılması nedeniyle sınırlı kalmıştır. Son yıllarda KVL üzerine yapılan çalışmalarda, hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olarak adlandırılan klinik evrelere göre hastalığın prognozunun değiştiği bildirilmiştir (Çizelge 2.7) (Solano–Gallego ve ark 2009).

Çizelge 2.7. KVL’de seroloji, klinik görünüm, laboratuvar bulguları ve sağaltıma göre klinik evre ve prognoz arasındaki ilişki

(Solano–Gallego ve ark 2009)

Klinik Evre	Seroloji	Klinik Görünüm	Laboratuvar bulguları	Sağaltım	Prognoz
Evre I: Hafif Şiddetli	Negatif veya düşük antikor titresi	Periferik lenfadenopati, papüller dermatitis (Ordeix ve ark 2005, Bottero ve ark 2006)	Genellikle bir anormallik tespit edilemez	Allopurinol tek başına veya meglumin antimoniat kombinasyonu, miltefosin tek başına	İyi
Evre II Orta Şiddetli	Düşük veya Yüksek antikor titreli	Evre I’ e ilaveten eksfoliyatif dermatitis/onychogryphosis, ülserasyonlar, anoreksi, kilo kaybı, ateş ve epistaksis (Petanides ve ark 2008)	Hafif düzeyde non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemi (Petanides ve ark 2008)	Allopurinol tek başına meglumin antimoniat kombinasyonu veya miltefosin	İyi, Dikkatle takip edilmelidir
Evre III Şiddetli olgular	Orta veya yüksek antikor titresi	Evre I ve II dahil olmak üzere, İmmün kompleks lezyonlar meydana gelir; vaskulitis, artritis, uveitis ve glomerulonefritis	Evre II’ye ilaveten, kronik böbrek hastalıkları Kreatinin: 1,4–2 mg/dl (İris, 2006)	Allopurinol tek başına meglumin antimoniat kombinasyonu veya miltefosin	Dikkatle takip edilmelidir veya kötü
Evre IV Çok Şiddetli olgular	Yüksek serum antikor düzeyi	Evre II’ ilaveten, pulmoner tromboembolizm, nefrotik sendrom, böbrek hastalıklarının son evreleri görülür	Kreatinin (2–5 mg/dl veya daha yüksek) nefrotik sendroma bağlı proteinuri UPV>5	Allopurinol tek başına	Kötü

2.8. Sağaltım

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

Köpek visseral leishmaniasisin sağaltımında pek çok ilaç denenmiş ve sağaltım etkinliğinin takibinin belirgin aralıklarla yapılan klinik, hematolojik, biyokimyasal, serolojik ve moleküler muayeneler sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesiyle yapılması gerekliliği vurgulanmıştır (Cavaliero ve ark 1999, Noli ve Auxilia 2005, Pasa ve ark 2005, Solano–Gallego ve ark 2009, Gomez–Ochoa ve ark 2009).

Son 50 yıldan beri insanlarda ve köpeklerde hastalığın sağaltımında pentavalent antimonial bileşiklerden olan meglumine antimoniat ve sodium stiboglukonat en sık kullanılan ilaçlardandır (Herwaldt ve Berman 1992, Baneth ve Shaw 2002). Meglumine'nin, yan etkilerinin sodium stiboglukonat'dan daha az olduğu bildirilmiştir (Noli 1999). Köpek visseral leishmaniasisin sağaltımında, meglumine antimoniat'ın 100 mg/kg ve sodium stiboglukonat'ın 30–50 mg/kg deri altı, 3–4 hafta uygulanmasından iyi yanıtların alındığı rapor edilmiştir (Slappendel ve Ferrer 1990, Valladares ve ark 1998, Cavaliero ve ark 1999).

Çizelge 2.8. KVL’de uygulanan sağaltım protokolleri (Solano–Gallego ve ark 2009)

Protokol	İlaç ve Dozları	Yan Etkileri	Kaynaklar
1. Seçenek	N–Methylglucamine ^a (75–100 mg/kg/gün) 4–8 hafta S.C.	Nefrotoksisite ve Kutanöz apseler	Denerolle ve Bourdoiseau (1999)
	+ Allopurinol (10 mg/kg/günde iki kez P.O. 6–12 ay	(N–Methylglucamine) Ksantin Ürolitleri (allopurinol)	Ikeda–Garcia ve ark (2007) Manna ve ark (2008) Cavaliero ve ark (1999)
2. Seçenek	Miltefosin ^a (2 mg/kg/gün) 4 hafta P.O.	Kusma, ishal(Miltefosin)	Manna ve ark (2008)
	+ Allopurinol (10 mg/kg/günde iki kez P.O. 6–12 ay veya Tekbaşına	Ksantin Ürolitleri (allopurinol)	Cavaliero ve ark (1999)
3. Seçenek	*Allopurinol (10 mg/kg/günde iki kez P.O. 6–12 ay	Ksantin Ürolitleri (allopurinol)	Cavaliero ve ark (1999)
	*Amfoterisin B ^b (0,5–0,8 mg/kg günde iki kez İ.V. haftada iki kez, 2 ay boyunca)	Nefrotoksisite	Lamothe (2001)
	*Lipozomal Amfoterisin B ^b (3 mg/kg/günde iki kez 5 gün boyunca)	Geçici Nefrotoksisite	Oliva ve ark (1995)
	*Metronidazol (25 mg/kg/gün) +	Tanımlanmamış	Pennisi ve ark (2005)
	Spiramisin (150,000 U/gün) 3 ay P.O.	Tanımlanmamış	Rougier ve ark (2008)
	*Marbofloksasin (2 mg/kg/gün) 1 Ay P.O.		

P.O.: Per os; S.C: Subkutan; İ.V.:İntravenöz

^aVeteriner pratikte kullanılan

^bBirinci seçenekte kullanılan ilaçlar insan leishmaniasis’inin sağaltımında kullanılmaktadır ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından parazitte oluşabilecek direnç düşünülerek köpeklerde kullanılması önerilmemektedir.

Meglumine antimoniat ve sodium stiboglukonat gibi pentavalent antimonial bileşiklerin yanında allopurinol, amphoterisin B, lipozomal amphoterisin B, aminosidin, paromomisin, spiramisin, metranidazol, marbofloksasin ve miltefosin mono ve/veya kombine olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Cavaliero ve ark 1999, Pasa ve ark 2005, Noli ve Auxillia 2005, Rougier ve ark 2008, Solano–Gallego ve ark 2009). Köpek visseral leishmaniasisinde hastalığın evresine göre kullanımı önerilen ilaçlar Çizelge 2.7, sağaltım protokolleri, önerilen ilaçlar ve dozları Çizelge 2.8 özetlenmiştir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde kombine sağaltım protokolleri sıklıkla denendiği, allopurinol ile meglumin antimoniat kombinasyonunun en etkili sağaltım seçeneği olduğu ve hastalığa karşı ilk sağaltım protokolü olabileceği bildirilmiştir (Paşa ve ark 2005). Bunun yanında doz aralığı ve sağaltım süresi ile ilgili önerilen pek çok farklı sağaltım protokollü bulunmaktadır (Noli ve Auxilia 2005). Visseral leishmaniasisli köpeklerde gelişebilen böbrek yetmezliğinin antimon bileşiklerinin yarılanma ömrünü artırarak, farmakokinetiğini önemli ölçüde değiştirebildiği ve glomerüler filtrasyon hızının azalması sonucu toksisite riskinin artabildiği bildirilmiştir (Zaghloul ve Al–Jasser 2004).

Son yıllarda KVL'nin sağaltımında, miltefosin ile allopurinol kombinasyonunun, meglumin antimoniat ve allopurinol kombinasyonuna alternatif olabileceği rapor edilmiştir (Manna ve ark 2008).

Farklı klinik çalışmalarda amfoterisin B'nin visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltımında etkinliğinin iyi olduğu vurgulanmış; ancak, böbrekler üzerinde doğrudan zararlı bir etkiye sahip olması nedeniyle özellikle intravenöz (iv) yolla uygulanmasında nefrotoksisite meydana getirmesi gibi dezavantajlarının olduğu bildirilmiştir (Manna ve ark 2008). Aminosidin de KVL'nin sağaltımında denenmiş; ancak, nefrotoksisite, ototoksisite gibi ciddi yan etkilerinin fark edilmesi nedeniyle kullanılması önerilmemektedir (Manna ve ark 2008). Söz konusu ilaçların dışında, az sayıda kontrollü klinik çalışmada KVL'in sağaltımında pentamidin, aminosidin, ketoconazol, metronidazole ve spiramisin ve marbofloksasin *in vitro* ve laboratuvar hayvanlarında incelenmiş, ancak etkilerinin yetersiz olduğu kanısına varılmıştır (Noli ve Auxilia 2005, Miro ve ark 2008, Gomez-Ochoa ve ark 2009). Doğal enfekte köpeklerle bu ilaçların sağaltım değerini onaylamak için daha kapsamlı klinik çalışmalar gereklilik arz etmektedir.

Sağaltım amacıyla kullanılan ilaçlardan beklenen klinik yanıt, kliniko-patolojik durumuna bağlı olarak iyi veya kötü arasında değişmektedir (Çizelge 2.7). Enfekte ve böbrek yetmezliği gelişen köpeklerde iyileşme oranının daha düşük olduğu bildirilmektedir (Pennisi ve ark 2005, Manna ve ark 2008). Ancak, hastalığın sağaltıma yanıt vermemesi ile ilaçların yan etkilerinin de birbirinden ayırt edilmesi gerekli olduğu bildirilmiştir (Noli ve Auxilia 2005). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, bazı *Leishmania* türlerinin, özellikle pentavalent antimonial bileşikler, amfoteresin B, aminosidin, miltefosinin gibi ilaçlara karşı direnç geliştiği de rapor edilmiştir (Croft ve ark 2006). Köpek visseral leishmaniasis üzerine yapılan bazı araştırmalarda ise antimonial ilaçların *L. infantum*'a karşı duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir (Gramiccia ve ark 1992, Carrio ve Portus 2002).

Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltımında şimdiye kadar kullanılan ilaçların klinik ve özellikle parazitolojik iyileşmede yetersiz oluşu, *Leishmania* suşlarında ilaca karşı direnç gelişimi, hastalığın klinik olarak nüks etmesi, toksik etkilerinin fazla oluşu, ilaçların pahalı olması ve zor bulunması nedeniyle sağaltımda büyük güçlükler yaratmaktadır (Strauss–Ayali ve Baneth 2000, Baneth ve Shaw 2002, Pasa ve ark 2005, Frezard ve ark 2009). Bu nedenle klinik ve parazitolojik iyileşme açısından etkinliği yüksek, kolay uygulanabilir ve maliyeti yüksek olmayan sağaltım protokollerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Purin analogu olan allopurinolün, parazit nükleotidleri tarafından metabolize edilerek adenin nükleotidinin birleşimini engellediği, RNA diziliminin oluşamamasına ve protein sentezinin gerçekleşmemesine neden olduğu ve hastalığın klinik olarak düzelmesini sağladığı bildirilmiştir (Cavaliero ve ark 1999, Pasa ve ark 2005, Solano-Gallego ve ark 2009). Cavaliero ve ark (1999), allopurinolün 10 mg/kg uygulanmasıyla doğal enfekte 10 köpeğin 9'unun 2-6 ay içerisinde iyileştiğini; ancak, hastalığın 3 köpekte sağaltımın kesilmesinin ardından nüks ettiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada antikor titrelerinin sağaltım öncesinde yüksek olduğu ve sağaltımın ardından bir değişim göstermediği de vurgulanmıştır. Allopurinol, fiyatının ucuz olması, kolay bulunması, yan etkilerinin minimal düzeyde olması ve oral olarak kullanılması nedeniyle KVL'nin sağaltımında kullanılabileceği rapor edilmiştir (Pasa ve ark 2005, Solano-Gallego ve ark 2009).

Domperidon; gastrik prokinetik ve anti-emetik olarak kullanılan D2 reseptör antagonistidir. İlk kez iki yıl önce KVL'nin sağıaltımında domperidonun oral 2 mg/kg bir ay süreyle kullanılmasının serum prolaktin seviyesinde önemli artışlara sebep olduğu, *anti-Leishmania* antikor titresinde önemli düzeyde düşme ve klinik iyileşmeyi sağlayabildiği rapor edilmiştir (Gomez-Ochoa ve ark 2009). Sibirya hamsterlarda (*Mesocricetus auratus*) yapılan çalışmalarda laktasyonun leishmaniasise karşı koruyucu etkinliği olduğu ve laktasyon süresi boyunca parazitin etkisinin engellenmesinin nedeninin hiperprolaktemiden ileri geldiği rapor edilmiştir (Gomez-Ochoa ve ark 2009). Laktasyon döneminde prolaktin immun reaksiyonlarda önemli rol oynamakta; ancak, immun sistem üzerine etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Memelilerde ana fonksiyonu süt üretimini stimüle etmek olan bu hormonun ikincil bir etki ile bağışıklık sistemini stimüle ettiği ve bu durumun meydana gelen serum prolaktin seviyesindeki artış sonucu, serum CD4+Th1 alt gruplarında da artışa, interlökin (IL)-2, IL-12, interferon (INF)-c ve tümör nekrosiz faktör (TNF) salınımına, natural killer hücrelerinin oluşumuna ve makrofaj aktivasyonuna sebep olduğu bildirilmektedir (Di Carlo ve ark 1993, Majumder ve ark 2002). Domperidonun KVL'nin sağıaltımında kullanılmasının etkin olabileceğini takiben leishmaniasis dahil bir çok hücre içi paraziter veya bakteriyel etkenden ileri gelen enfeksiyonların sağıaltımı ve profilaksisinde kullanılabilirliği konusunda patent alınmıştır (Sabate Elias ve ark 2010).

Gomez-Ochoa ve ark (2011) hafif ve orta şiddetli klinik bulgulara sahip 20 enfekte köpek üzerinde yaptıkları çalışmada domperidonun 0,5 mg/kg dozda kullanılması ile 17 köpeğin antikor titrelerinin düştüğü ve hücrel bağışıklık sisteminin aktivasyonunda kullanılan nitroblue tetrazolium reduction test (NBT) ile nötrofil ve monosit hücre popülasyonlarının ilk 15 gün içerisinde artış eğiliminde olduğunu tespit etmişlerdir.

Ceballos ve ark (2011) ise domperidonun NBT ile ortaya konulan periferik kanda aşamalı olarak nötrofil ve monosit artışı sağılamasının hastalığa karşı potansiyel bir koruma etkisi yaratabileceği hipotezi ile endemik bir bölgede 90 sağılıklı köpek üzerinde yaptıkları çalışmada, 21 aylık takip sonucu domperidonun 4 ayda bir, 1 ay süre ile 0,5 mg/kg/gün dozda verildiği 44 köpekte, leishmaniasis klinik bulgularını gösteren köpek sayısının ve IFAT serolojik titrelerinin diğeri sağıaltım altına alınmayan 46 köpeğe göre oldukça düşük olduğunu belirlemişler ve endemik bölgelerde hastalığa karşı korunmada domperidon tabanlı bir sağıaltım programının son derece etkin olduğunu vurgulamışlardır.

2.9. Korunma

Köpek visseral leishmaniasisde korunma *Phelebotom* türü kum sineklerinin hastalığı bulaştırmasını engellenmesi esasına dayandırılmaktadır. Kum sineklerinin ısırıklarına maruz kalmaması için köpeklerin vektörün aktif olduğu dönemlerde alacakaranlık ve geceleri kapalı tutulması, köpeklerin zaman geçirdiği yerden veya evden kum sineklerinin mikrohabitatını uzaklaştırmaya veya azaltmaya yönelik girişimlerde bulunulması, çevresel insektisit uygulanması, etkinliği kanıtlanmış insektisitler ile köpeğin ilaçlanması veya korucu tasmaların takılması gibi önlemlerin alınması gerekliliği bildirilmektedir (Alexander ve Maroli 2003).

Son yıllarda hastalığın kontrolüne yönelik insektisitlerin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yürütülen saha ve laboratuvar çalışmalarından ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Deltamethrin emdirilmiş tasmalar ile yapılmış çalışmalarda, insektisitin yavaş yavaş salındığı ve hayvanların deri altı yağ dokusuna 1–2 hafta içinde dağıldığı ve optimal koşullar altında, bu tasmaların kovucu etkisinin 6 ay kadar sürebildiği bildirilmiştir (Killick–Kendrick ve ark 1997, Halbig ve ark 2000). Sprey ve enseye damlatılarak yapılan formülizasyonları da yüksek aktivite görülmekle birlikte, 2–3 hafta gibi kısa süreli etki edebildikleri rapor edilmiştir (Halbig ve ark 2000). Permetrinin topikal uygulanması sonucu *P. perniciosus*'a karşı birkaç hafta etkili olduğu da bildirilmiştir (Molina ve ark 2001). Bu tip topikal formülizasyonların uygulama sonrası *Stratum corneum*'a çok iyi yayılması gerekliliği vurgulanmıştır. Toz halinde yapılan uygulamalara bakıldığında, bunların çok kısa sürede etki ettiği, etkisinin ise kalıcı olmadığı belirlenmiştir. Saha çalışmalarında topikal ilaç uygulamalarının hem insan hem de hayvan sağlığı açısından yararlı olduğu bildirilmiştir (Maroli ve ark 2001, Gavgani ve ark 2002, Otranto ve ark 2007). Özellikle endemik bölgelerde Veteriner Hekimlerin köpek sahiplerine gerekli eğitimi vermeleri ve hastalık açısından korunmanın önemini vurgulamaları gerekmektedir. Endemik olmayan bölgelerden, endemik olan bölgelere seyahatler bile yolculuktan 2 hafta önce tasmanın takılması veya 2–3 gün önce enseye damla uygulamalarının yapılmasının gerektiği rapor edilmiştir (Otranto ve ark 2007).

Leishmaniasise karşı aşı çalışmalarına hastalığın tanımlanmasından uzun bir süre sonra gündeme getirilmiş ve çalışmalar oldukça sınırlı kalmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda bazı ümit verici sonuçlar elde edilmiş ve saha değerlendirme aşamasında oldukları rapor edilmiştir (Miro ve ark 2008). Yapılan çalışmalarda saflaştırılmış

Leishmania fraksiyon aşılarının başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu aşı grubunun ana temsilcisi aşı antijeni olarak kullanılan *L. donovani* "fucose mannoz ligand" olarak da bilinen glikoprotein GP63 zenginleştirilmiş fraksiyonu olduğu rapor edilmektedir (Miro ve ark 2008).

Fucose mannoz ligand bazlı aşı, iyi bir koruma oranı ile Brezilya saha çalışmaları değerlendirilmiş ve KVL için ilk ticari aşı (Leishmune1) olarak bu ülkede lisans alabildiği bildirilmiştir (Borja–Cabrera ve ark 2002, Nogueira ve ark 2005). Saraiva ve ark (2006), bu aşının insanları zoonotik visseral leishmaniasisten %92–97 ve köpekleri ise %79,3 oranında koruduğunu rapor etmişlerdir. Fucose mannoz ligand aşısının hasta köpeklerin bağışıklık sisteminin sağaltımındaki (Borja–Cabrera ve ark 2004) ve bulaşmayı engelleyici etkileri nedeniyle uygulanması gerektiği ileri sürülmüştür (Saraiva ve ark 2006). Ancak pek çok Veteriner Hekim tarafından seropozitif köpeklerin resmi yollarla itlaf edilmesi ve FML aşısı uygulanan köpeklerle doğal olarak enfekte olan köpekleri birbirinden ayırmanın güçlüğü nedeniyle aşı çalışmalarında büyük zorluklar yaşanmakta olduğu bildirilmektedir (Dantas–Torres ve Brandao–Filho 2006).

Son yıllarda Fransa’da muramyl dipeptide’li *L. infantum* promastigotlarının spesifik medium kültürlerinin süpernatantlarından salınan saflaştırılmış antijenler kullanılarak yapılan aşı sonucunda deneysel *L. infantum* enfeksiyonuna karşı koruyucu bir etkinlik sağlandığı (Lemesre ve ark 2005) ve saha çalışmalarında yüksek bir etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Lemesre ve ark 2007).

2.10. Araştırmanın Amacı

Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltımında kullanılan ilaçların klinik ve özellikle parazitolojik iyileşmede yetersiz oluşu, *Leishmania* suşlarında ilaca karşı direnç gelişimi, hastalığın klinik olarak nüks etmesi, toksik etkilerinin fazla oluşu, ilaçların pahalı olması ve zor bulunması nedeniyle sağaltımda zorluklarla karşılaşmaktadır (Strauss–Ayali ve Baneth 2000, Baneth ve Shaw 2002, Pasa ve ark 2005, Frezard ve ark 2009). Gastrik prokinetik ve anti–emetik olarak kullanılan D2 reseptor antagonisti domperidonun, son yıllarda KVL’nin sağaltımında kullanılabileceği ve serum prolaktin seviyesinde önemli artışla birlikte *anti–Leishmania* antikor titresinde de önemli düzeyde düşme ve klinik iyileşmeyi sağladığı (Gomez–Ochoa ve ark 2009), allopurinolün ise fiyatının ucuz olması, kolay bulunması, yan etkilerinin minimal düzeyde olması ve oral verilmesi nedeniyle KVL’nin sağaltımında kullanımı rapor edilmiştir (Cavaliero ve ark 1999, Pasa ve ark 2005).

Literatür taramalarında KVL’nin sağaltımında domperidon ile allopurinolün kombine olarak kullanımı üzerine bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmada, VL’li köpeklerin sağaltımında mevcut sağaltım prosedürlerine bir alternatif olabilecek, kısa sürede etki edebilecek, maliyetleri ucuz domperidon ile allopurinolün kombine kullanımının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, Ocak 2008 ile Aralık 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğine getirilen, *Leishmania* spp. ile doğal enfekte olduğu saptanan, farklı ırk, yaş ve cinsiyetten toplam 17 köpekte yürütülmüştür. Hasta sahiplerine köpeklerin olası prognozları açıklanmış, hastalıkla ve uygulanacak sağıltım protokolü ile ilgili gerekli bilgiler verilerek kendilerinden bilgi onam formları alınmıştır.

Klinik muayenede visseral leishmaniasis şüpheli tanısı konulan köpeklerin, ırk, yaş ve cinsiyeti ile dişi köpeklerin sıklık aktiviteleri kaydedilmiştir. Hematolojik, biyokimyasal ve parazitolojik muayeneler için her bir hayvandan antikoagülanlı (EDTA) ve antikoagülanlı tüpler içine *Vena cephalica antebrachi*'den kan örnekleri alınmıştır.

Her bir köpekte visseral leishmaniasisin tanısı Giemsa ile boyanmış lenf yumrusu yayma preparatlarında amastigotların mikroskopik olarak direkt görülmesi ve IFAT ile anti-*Leishmania* antikor titrelerinin belirlenmesiyle konulmuştur. Ayrıca PZR testi de uygulanmıştır.

Visseral leishmaniasis tanısı konulan köpekler ehrlichiosis, diroflariosis, borelliosis, anaplazmosis, babesiosis ve hepatozoonosis gibi bazı eşzamanlı enfeksiyonlar yönünden incelenmiştir. Ehrlichiosis, diroflariosis, borelliosis ve anaplazmosis Snap 4DX kiti (IDEXX, USA) ile, babesiosis ve hepatozoonosis ise kan örneklerinden hazırlanan preperatlarda araştırılmıştır. *Leishmania* spp. ile doğal enfekte olduğu saptanan 17 köpek eşzamanlı hastalıklar yönünden değerlendirilerek toplam 40 enfekte köpek arasından 23 köpek çalışma dışı bırakılarak seçilmiştir.

Visseral leishmaniasisli hayvanlar, rasgele seçilerek 2 sağıltım grubuna ayrılmıştır. İlk gruptaki enfekte köpeklere domperidon (Motillium®Janssen-Cilag, Türkiye) oral olarak 2 mg/kg dozda 1 ay süre ile ve allopurinol (Ürikoliz ® Sandoz, Türkiye) 30 mg/kg dozda 3 ay süreyle oral, günde 1 kez verilmiştir. İkinci grupta bulunan enfekte köpeklere ise allopurinol tek başına 30 mg/kg dozda oral olarak, 3 ay süreyle, günde 1 kez verilmiştir.

Enfekte her bir köpeğe *Phlebotomus* cinsi kum sineklerinin ısırığından koruyan %4'lük deltametrin içeren tasma (Paraband ® Intervet Schering-Plough) yaşamları boyunca önerilmiştir. Sağaltım protokolünün bitiminden sonraki dönemlerde hastalığın nüksü yönünden hayvan sahipleriyle iletişim kurularak hastaların klinik durumu hakkında bilgi alınmıştır.

Her iki gruptaki köpeklerin sağaltım öncesi (0. gün), sağaltıma başladıktan sonraki 15., 30., 60. ve 90. günlerde klinik, hematolojik, biyokimyasal ve parazitolojik muayeneleri yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hematolojik Değerlendirme

Hematolojik analizlerden; total lökosit sayısı (WBC), eritrosit sayısı (RBC), hematokrit (PCV), ortalama korpüsküler hacim (MCV), ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) ve trombosit sayısı (PLT) otomatik kan sayım cihazı (Junior vet 5, Abacus, Macaristan) ile ölçülmüştür.

3.2.2. Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal analizler için antikoagülsiz tüpler içine alınan kan örnekleri, 3000 r.p.m.'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış, analizler yapılincaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Biyokimyasal analizlerden alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz aktiviteleri (AST), üre ve kreatinin konsantrasyonları kuru sistem analiz cihazı (Reflotron plus, Roche) total protein (TP) ve albumin (Alb) konsantrasyonları spektrofotometrede (Microlab 200, Merck) ticari test kitleri (Gesam, İtalya) kullanılarak ölçülmüştür. Serum globulin konsantrasyonu total proteinden albuminin çıkartılması ile hesaplanmıştır.

3.2.3. IFAT

3.2.3.1. IFAT Antijenli Lamaların Hazırlanması

Antijen hazırlanacağı zaman % 20 Fetal Sığır Serumı (FCS Sigma Cat No: S1632) ve % 2 antibiyotik solüsyonu (Sigma Cat No: P3539) içeren RPMI 1640 (Biological Industries Cat No: 01-106-1A) besiyeri hazırlanmış 25 cm²'lik flasklere konulmuştur. NNN besi yeri tüpünden RPMI 1640 besiyerinin bulunduğu flask'e 4-5 damla aktarılmış ve 26 °C'de saklanarak 2 günde bir inverted mikroskop ile kontrol edilmiş, 1 hafta sonra, promastigotlar yeterli miktarda ürediğinde antijen hazırlanmak için toplanmıştır.

Yaklaşık 5 mm'lik besi yeri santrifüj tüpüne aktararak 2500 r.p.m.'de 15 dakika santrifüj edilerek üst kısmı atılmış ve dipte kalan kısım üzerine serum fizyolojik eklenerek aynı şartlarda santrifüj yapılmıştır. Bu yıkama işlemi 7 kez tekrar edilmiştir. En son yıkama işleminden sonra çökelti 1 ml serum fizyolojik ile sulandırılmış ve promastigotlar Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve 2.000.000 promastigot/ml olacak şekilde sulandırılmıştır. Elmas kalem ile daireler çizilerek hazırlanmış IFAT lamalarının her bir çukuruna 10 µl antijen konulmuş ve kurutulduktan sonra pelur kağıtlara sarılarak kullanıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3.2. IFAT Yöntemi Uygulanması

3.2.3.2.1. Tampon ve Solüsyonlar

PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu) 2.40 g K₂HPO₄, 0.44 g NaH₂PO₄, 17 g NaCl, 2000 ml distile su karıştırılarak yapılmış ve PH 7,4'e ayarlanmıştır. Kapatma Solüsyonu ise 1 ml PBS ve 9 ml Gliserin'in karıştırılmasıyla yapılmıştır.

3.2.3.2.2. Testin uygulanması

Köpek serumları sulandırma plaklarında PBS ile 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 oranlarında sulandırılmış ve her bir sulandırmadan 1 damla antijen kaplı yerlerine aktarılmıştır. 1/64 ve üzeri dilüsyonları çalışılmıştır. Lamalar 37°C'lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş ve süre sonunda PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkanıp oda ısısında kurutulmuştur. FITC işaretli tavşan anti-dog IgG (Sigma, A-9042) 1:200 oranında sulandırılarak kullanılmış ve her deliğe bir damla konulmuştur. Lamalar 37°C'lik etüvde nemli kapalı kutularda 30 dakika tutulmuş, PBS ile 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Lamalar kurumadan

kapatma solüsyonu damlatılmış ve lamel kapatılmıştır. Lamalar, Fluoresan mikroskopunda (Olympus BHS₅₀) X 20 objektifde ışık kaynağı olarak HBO 50 civa buharlı ampul ve mavi bant filtre seti kullanılarak (Uyarma Filtre Seti 490) engelleme filtresi 510 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

3.2.4. Parazitolojik Muayene

Visseral leishmaniasis şüpheli, genaralize lenfadenopatili köpeklerin popliteal lenf bezinden alınan aspiratlarla hazırlanan sürme preparatlar Giemsa yöntemiyle boyanarak amastigotların varlığı yönünden sağaltım öncesi (0. gün) ve sağaltım sonrası 15., 30., 60. ve 90. günlerde her iki gruptaki tüm köpeklerde araştırılmıştır.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Her iki gruptaki köpeklerin sağaltım öncesi (0. gün), sağaltıma başladıktan sonraki 15., 30., 60. ve 90. günlerinde EDTA'lı tüpler içerisine alınan kan örnekleri “buffycoat” çıkartılması amacıyla soğutmalı santrifüjde santrifüje edilmiştir. Steril tüpler içerisine alınan toplam seksen bir buffycoat içersinden PZR template preparation kiti ile (Roche® Applied Science) genomik DNA örneği ekstrakte edilmiştir.

LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) (forward primer; 5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3', reverse primer; 5'- GAAGCCAAGTCATCCATCGC-3', Fluorescein probe; 5'- CCGTTTATACAAAAAATATACGGCGTTTCGGTTT – Fl-3'; LCRed640 probe; 5'- LCRed640- GCGGGGTGGGTGCGTGTGTG-P-3') ile real time PZR primerleri ve problemleri birlikte kullanılarak ITS1 bölgesinde, tür ayrımı yapılmıştır.

Real time online PZR, 50 ng genomik DNA, her bir primerden 400 nM (200-bp'ye yükseltildi), her bir proba 400 nM, MgCl₂ (25 mM) 1.6 µl, LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes kitinden (Roche Applied Science) 2 µl ve PZR grade water (Roche Applied Science) 3,4 µl eklenerek, 20 µl total hacme ulaştırılmıştır. PCR amplifikasyonu; 10 dakika 95°C'de, bunu takiben 45 denatürasyon siklusları 95°C'de 10 dakika 50°C'de 10 saniye ve 72°C'de 10 saniye, erime basamağında 95°C'de 0 saniye, 40 °C'de 10 saniye, 80 °C'de 0 saniye, 50°C'de 10 saniye ve soğutma 40 °C'de 30 saniye tutularak yapılmıştır. Deneme, Charalampos Aslandis ve Gerd Schmitz (Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University of Regensburg, Regensburg,

Germany) protokolüne göre LightCycler™ cihazı (Roche Applied Science; Mannheim, Germany) ile gerçekleştirilmiştir. Tür ayrımı kendine özgü erime sıcaklıklarına göre tespit edilmiştir. *Leishmania major* örnekleri 54°C’de, *Leishmania tropica* örnekleri 61°C’de ve *Leishmania infantum* örnekleri 66°C’de pik seviyeye ulaşması yönünden değerlendirilmiştir.

3.2.6. Sonuçların Yorumlanması

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

3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen sayısal verilerin varyasyonunun kontrolü için dağılım analizleri *Shapiro–Wilk* testi kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca *Levene* testi ile varyansların homojenliğine bakılmıştır. Normal dağılım varsayımlarına uymayan parametrelere logaritmik transformasyon uygulanmıştır. Veriler grup ve zaman faktörleri göz önünde bulundurularak tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi ile değerlendirilmiş ve farkın hangi grup, gruplar ya da zamanlardan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltmeli *post hoc Tukey* testi yapılmıştır. $p \leq 0,05$ istatistiksel açıdan önemli olarak kabul edilmiştir. Verilerin analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS for Windows; version 15.0, seri no: 416a1604ed18748d3f27) paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama ($\bar{x}$) ve standart sapma ($s\bar{x}$) şeklinde verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Klinik Muayene Bulguları

Leishmania spp. ile enfekte olduğu belirlenen köpeklerin bazı eşzamanlı hastalıklar yönünden değerlendirilmesi sonucunda tespit edilen hastalıklar Şekil 4.1’de özetlenmiştir. *Leishmania* spp. ile enfekte olduğu belirlenen toplam 40 köpeğin 14’ünün ehrlichiosis, 4’ünün dirofilariosis, 2’sinin hipotiroidizm oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca leishmaniasisli 3 köpeğin klinik evre IV olduğu saptanarak hasta sahiplerinin isteği üzerine ötanazi edilmiştir. Bu şekilde yalnızca *leishmania* spp. ile enfekte 17 köpeğin sağaltım öncesi ve sonrası bulguları değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. *Leishmania* spp. ile enfekte olduğu saptanan köpeklere genel bakış

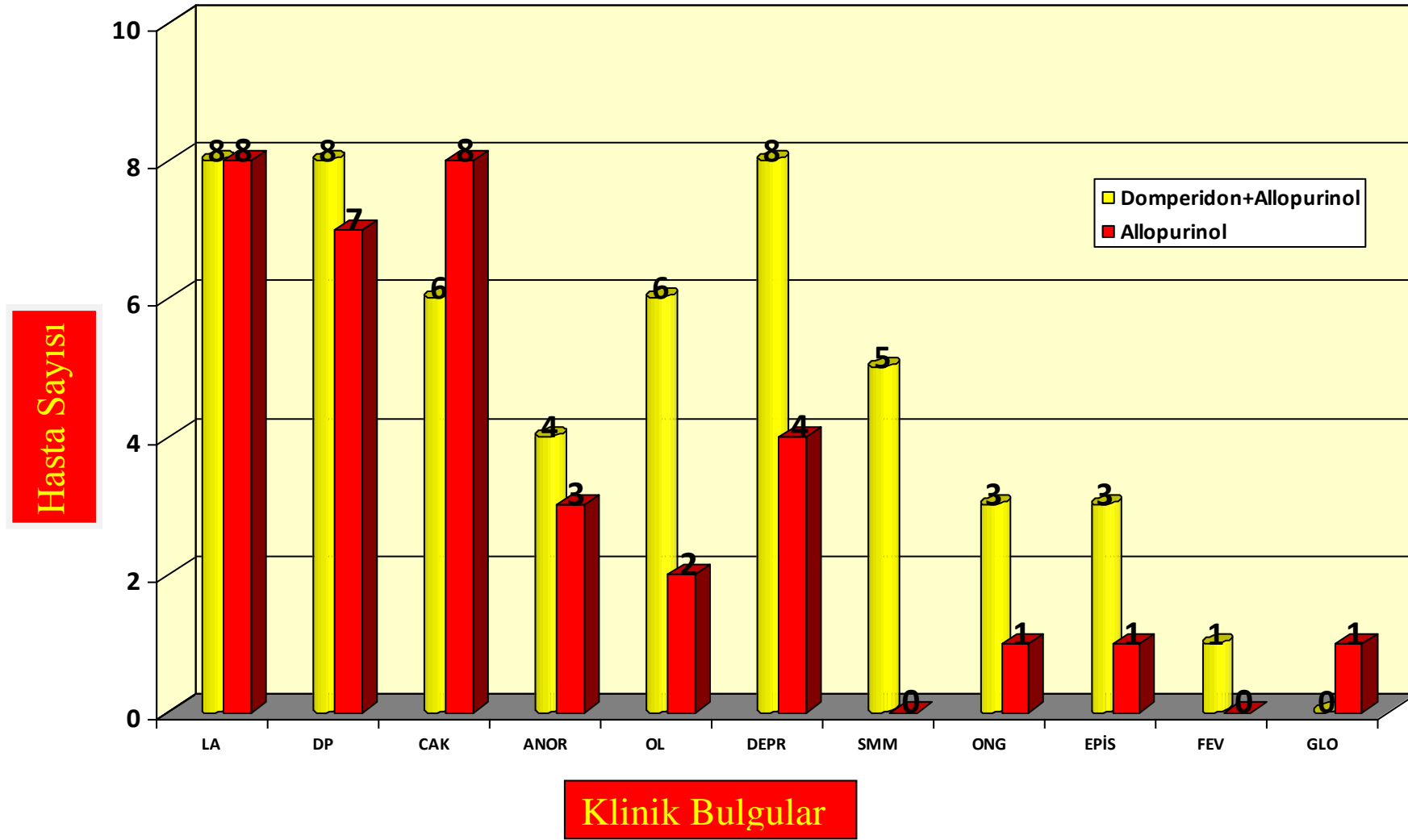
Bu çalışmada yalnızca *Leishmania* spp. ile enfekte, hastalığa karşı daha önce spesifik sağaltım girişiminde bulunulmamış, farklı ırk, yaş ve cinsiyetten toplam 17 köpeğin ırk, yaş, cinsiyetleri ile sağaltım öncesi klinik bulguları ve evreleri izelge 4.1’de özetlenmiştir. şekil 4.2’de de her iki sağaltım grubundaki köpeklerde sağaltım öncesi klinik bulgular ve görüldüğü hasta sayıları gösterilmiştir.

Muayene ve değerlendirme protokollerine göre köpeklerin sağaltım öncesi yapılan ilk klinik muayesinde, 16’sında genaralize lenfadenopati, 15’inde deri problemi, 14’ünde canlı ağırlık kaybı, 8’inde depresyon, 8’inde okuler lezyon, 7’sinde iştahsızlık, 5’inde müköz membranlarda solgunluk, 4’ünde onychogryphosis, 4’ünde epistaksis, 1’inde vücut sıcaklığında artış ve 1’inde ise glossitis belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. VL’li köpeklerin tanımlanması, sağaltım öncesi klinik bulguları ve evreleri

Grup	Köpek No	İrk	Yaş	Cinsiyet	Klinik Görünüm	Klinik Evre
Domperidon + Allopurinol	1	Seter	12	Dişi	CAK, ANOR, DEPR, LA, DP, OL, ONG	II
	2	Melez	3	Dişi	CAK, ANOR, DEPR, LA, DP, OL, ONG, SMM	II
	3	Melez	4,5	Erkek	CAK, ANOR, DEPR, LA, DP, OL, SMM, EP	II
	4	Melez	10	Erkek	CAK, DP, LA, SMM	II
	5	Melez	2,5	Dişi	DEPR, DP, LA, SMM, OL, ONG, EP	II
	6	Doberman	3	Dişi	DEPR, DP	II
	7	Melez	2	Dişi	DEPR, LA, FEV	II
	8	Melez	3	Erkek	CAK, DEPR, DP, LA, SMM, OL, EP	IV
	9	Beagle	8 ay	Dişi	CAK, ANOR, DEPR, DP, LA, OL	II
Allopurinol	1	Boxer	3	Erkek	CAK, DP, LA	II
	2	Doberman	3	Erkek	CAK, ANOR, DEPR DP, LA, OL, ONG	II
	3	Kangal	3	Erkek	CAK, DEPR, DP, LA, OL, EP	II
	4	Melez	2	Erkek	CAK, DP, LA	II
	5	Melez	2	Erkek	CAK, DP, LA	II
	6	Melez	5	Dişi	CAK, DP, LA	II
	7	Doberman	10	Dişi	CAK, DEPR, ANOR, DP, LA, GLO	II
	8	Beagle	9	Erkek	CAK, DEPR, ANOR, LA	II

ANOR, Anoreksi; CAK, Canlı ağırlık Kaybı; DEPR, Depresyon; DP, Deri Problemi; EP, Epistaksis, FEV, Vücut Sıcaklığı Artışı; GLOS, Glossitis; LA, Genaralize lenfadenopati; OL, Okuler Lezyon; ONG, Onychogryphosis; SMM, Solgun Müköz Membranlar



ANOR, Anoreksi; CAK, Canlı ağırlık Kaybı; DEPR, Depresyon; DP, Deri Problemi; EP, Epistaksis; FEV, Vücut Sıcaklığı Artışı; GLOS, Glossitis; LA, Genaralize lenfadenopati; OL, Okuler Lezyon; ONG, Onychogryphosis; SMM, Solgun Müköz Membranlar

Şekil 4.2. Sağaltım öncesi her iki grupta görülen klinik bulgular

Visseral leishmaniasisli köpeklerde domperidon ve allopurinol'ün kombine olarak uygulandığı sağıltım grubunda, sağıltım ve sonrası klinik bulgularındaki değışim Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Bu gruptaki VL'li köpeklerin belirli aralıklarla yapılan muayenelerinde genaralize lenfadenopatili 8 köpekden 3'ünde sağıltımın 30. gününde, 5'inde ise sağıltımın 60. gününde lenfadenopatilerinin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Aynı grupta deri problemi olan 8 köpeğın ise 2'sinin 30. günde, 3'ünün 60. günde, 3'ünün 90. günde iyileştiğı görölmüştür. Bu grupta canlı ağırlık kaybı tespit edilen 6 köpeğın 2'sinin 15. günden itibaren, 4 köpeğın ise 30. günden itibaren düzenli olarak canlı ağırlıklarının arttığı saptanmıştır. Anoreksili 4 köpeğın 2'sinin 15. günde, 2 sinin 30. günde düzeldiğı tespit edilmiştir. Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı grupta bulunan ve okuler lezyonlu 6 köpeğın, 2'sinin 15. günde, 4'ünün 30. günde iyileştiğı saptanmıştır. Aynı grupta depresyon tespit edilen 8 köpeğın 7'sinin 15. günde, 1'inin ise 30. günde iyileştikleri belirlenmiştir. Solgun mukozal membranlı 5 köpeğın, 3'ünün 30. günde, 2'sinin 60. günde düzeldiğı belirlenmiştir. Epistaksisli 3 köpeğın 1'inin 60. günde, 2'sinin ise 90. günde epistaksislerinin ortadan kalktığı belirlenmiştir. Vücut sıcaklığında artış tespit edilen 1 köpeğın ise 15. günde normale döndüğü tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Domperidon ve allopurinol'ün kombine olarak uygulandığı VL'li köpeklerde, sağaltım süresince klinik bulguların takibi

Olgu	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	ANOR, DEPR, OL'da düzelme	CAA	LA'de düzelme	DP'de düzelme
2	—	ANOR, DEPR, OL'da düzelme ve CAA	LA, SMM'da düzelme	DP'de düzelme
3	ANOR'de, DEPR'da, OL'da düzelme ve CAA	SMM'da düzelme	EP'de, LA'de, düzelme	DP'de düzelme
4	DEPR'da düzelme	DP'da düzelme, CAA	LA'de, SMM'da düzelme	İyileşme devam ediyor
5	DEPR'da düzelme	DP, LA, OL'da düzelme ve CAA	DP'de düzelme	EP'de düzelme
6	DEPR'da düzelme	CAA	DP'de düzelme	İyileşme devam ediyor
7	DEPR, FEV'de düzelme, CAA	CAA devam ediyor	LA'de düzelme	Tam Klinik iyileşme
8	DEPR'da düzelme, CAA	LA, SMM, OL'da düzelme, CAA	DP'de düzelme	EP'de düzelme
9	ANOR, DEPR'da düzelme, CAA	LA, OL'da düzelme	Tam Klinik iyileşme	Tam Klinik iyileşme

ANOR, Anoreksi; **CAK**, Canlı ağırlık Kaybı; **DEPR**, Depresyon; **DP**, Deri Problemi; **EP**, Epistaksis, **FEV**, Vücut Sıcaklığı Artışı; **GLOS**, Glossitis; **LA**, Genaralize lenfadenopati; **OL**, Okuler Lezyon; **ONG**, Onychogryphosis; **SMM**, Solgun Müköz Membranlar
— Klinik düzelme sağlanamadı

Allopurinol'ün yalnız başına uygulandığı grupta, sağaltım süresince klinik bulgulardaki değişim Çizelge 4.3'de özetlenmiştir. Bu sağaltım grubunda genaralize lenfadenopati 8 köpekden, 3'ünde lenfadenopatinin sağaltımının 60. gününde düzeldiği saptanmıştır. Aynı grupta deri problemi olan 8 köpeğin yalnızca 1'inde 60. günden itibaren lezyonların düzeldiği belirlenmiştir. Bu grupta canlı ağırlıkta azalma tespit ettiğimiz 8 köpeğin 1'inde 30. günden itibaren, 5'inin 60. günden itibaren, 2'sinin 90. günden itibaren düzenli olarak canlı ağırlıklarının artmaya başladığı saptanmıştır. Anoreksili 3 köpeğin tamamında 30. günde düzeldiği belirlenmiştir. Bu grupta okuler lezyon belirlenen 2 köpeğin, 1'inin 90. günde düzeldiği, 1'inin ise klinik bulguların takip edildiği 90 gün içerisinde düzelmediği saptanmıştır. Aynı grupta depresyon belirlenen 4 köpeğin 2'sinin 30. günde, 2'sinin ise 60. günde iyileştiği tespit edilmiştir. Epistaksis belirlenen 1 köpeğin ise sağaltım süresince düzelmediği saptanmıştır. Glossitis tespit edilen 1 köpeğin ise 90. günde iyileşmeye başladığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL'li köpeklerde sağaltım süresince klinik bulguların takibi

Olgu	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	—	—	CAA	Kepeklenmede hafif düzelme
2	—	DEPR, ANOR'da düzelme	CAA	OL'de düzelme
3	—	DEPR'da düzelme, CAA	LA'de düzelme	—
4	—	—	LA'de düzelme	Düzelme devam ediyor
5	—	—	CAA	CAA devam ediyor
6	—	—	LA'de düzelme	CAA
7	—	ANOR'da düzelme	DEPR, DP'de düzelme, CAA	GLOS'da düzelme
8	—	ANOR'da düzelme	DEPR'da düzelme, CAA	—

ANOR, Anoreksi; CAK, Canlı ağırlık Kaybı; DEPR, Depresyon; DP, Deri Problemi; EP, Epistaksis; FEV, Vücut Sıcaklığı Artışı; GLOS, Glossitis; LA, Genaralize lenfadenopati; OL, Okuler Lezyon; ONG, Onychogryphosis; SMM, Solgun Müköz Membranlar
 — Klinik düzelme sağlanamadı

Enfekte köpeklerin tamamında sağaltımla 15., 30., 60. ve 90. günlerde elde edilen bulgulara göre, kombine sağaltım protokolünün uygulandığı grupta, sadece allopurinol uygulanan gruba göre daha hızlı bir iyileşme olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2–4.3). Kombine sağaltım protokolünün uygulandığı gruptaki köpeklerin tamamına yakınında 90. gün içersinde klinik iyileşme sağlanmış, sadece klinik evresi IV olarak değerlendirilen 8 nolu köpeğin sağaltım sonrası 3. ayda öldüğu belirlenmiştir. Bu grupta bulunan diğer 8 köpeğin ise uzun süreli takiplerinde klinik olarak herhangi bir nüks görülmemiştir (Çizelge 4.2). Buna karşın allopurinolün yalnız başına uygulandığı grupta 3 nolu köpeğin klinik evresi II olarak değerlendirilmesine rağmen 3. ayda öldüğu, 7 ve 8 nolu köpeklerde ise sırasıyla 12. ve 10. ayda hastalıklarının nüks ettiği belirlenmiştir.

Çalışmada, kombine sağaltım uygulanan grupta 12 ile 30 ay arasında değişen klinik takipte klinik nüks belirlenmemiştir. Bu grupta 8 nolu köpeğin 6. ayda öldüğu öğrenilmiş ve 9 nolu köpekte ise sağaltım sonrasında 13. ayda genel durumunun iyi olmasına rağmen şiplenomegali geliştii belirlenmiştir. Şiplenektomi sonrasında hasta sağlığına kavuşmuştur.



Resim 4.1. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı gruptaki 9 nolu köpekte sağaltım süresince klinik görünüm



Resim 4.2. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı gruptaki 1 nolu köpekte sağaltım süresince klinik görünüm

Çizelge 4.4. Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı VL’li köpeklerde sağaltım sonrası klinik takip ve nüks durumu

Olgu	Klinik Takip	Nüks
1	30 ay	—
2	21 ay	—
3	20 ay	—
4	20 ay	—
5	19 ay	—
6	21 ay	—
7	26 ay	—
8	6. ay EX	
9	20 ay	—

Çizelge 4.5. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL’li köpeklerde sağaltım sonrası klinik takip ve nüks durumu

Olgu	Klinik Takip	Nüks
1	29 ay	—
2	13 ay	Tam Klinik iyileşme sağlanamadı
3	3. ay EX	—
4	5 ay	—
5	5 ay	—
6	5 ay	—
7	14 ay	12. ay
8	12 ay	10. ay

4.2. Laboratuvar Bulguları

Domperidon ve allopurinolün kombine ve allopurinol yalnız başına uygulandığı visseral leishmaniasisli 17 köpeğin sağaltım öncesi (0. gün) ve sağaltım süresince 15., 30., 60. ve 90. günlerde bireysel hematolojik ve biyokimyasal analiz sonuçları Ek 1 ve Ek 2’de gösterilmiştir. Her iki sağaltım grubunda belirli zamanlarda ölçülen hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin aritmetik ortalamaları ($\bar{x}$), standart sapmaları ($S\bar{x}$) ve min-max değerleri ile istatistiksel değerlendirilmesi Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

4.2.1. Hemogram Bulguları

Muayene ve değerlendirme protokollerine göre sağaltım öncesi yapılan hematolojik analizde domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı gruptaki 9 köpeğin 7’sinde farklı şiddetlerde anemi ($PCV < \%37$) ve 4’ünde hafif trombositopeni ($PLT = 150-200 \cdot 10^9/L$), allopurinolün yalnız başına uygulandığı gruptaki 8 köpeğin ise 1’inde lökositosis ($WBC > 17,00 \cdot 10^9/\mu l$), 4’ünde farklı şiddetlerde anemi ve 2’sinde hafif trombositopeni tespit edilmiştir (Ek 1, 2). Gruplarda hematolojik parametrelerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresindeki değerleri ile istatistiksel sonuçları Çizelge 4.6’da özetlenmiştir. Buna göre;

Hematolojik parametrelerin sağaltım öncesi (0. gün=çıkış) değerlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Tekrarlı ölçümler varyans analizi, ortalama WBC sayılarının uygulanan sağaltıma göre anlamlı bir farklılık gösterdiğini ($p=0,032$), bu parametrelerin zamanla gösterdiği değişim ile grup/zaman ilişkisinin ise önemli olmadığını ortaya koymuştur (Çizelge 4.6). Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı grupta 60. ($8,43 \pm 2,20$) ve 90. ($9,71 \pm 3,73$) günlerdeki ortalama WBC sayılarının allopurinolün yalnız başına uygulandığı gruptaki 60. ($13,95 \pm 5,27$) ve 90. ($12,94 \pm 2,65$) günlerdeki WBC sayılarına göre önemli ($p < 0,05$) düzeyde düşük bulunmuştur.

Ortalama RBC sayısının uygulanan sağaltıma göre anlamlı bir farklılık göstermediği ($p=0,686$), bu parametrelerin zamanla gösterdiği değişimin ($p=0,040$) ve grup/zaman ilişkisinin ($p=0,012$) ise önemli olduğunu tekrarlı ölçümler varyans analizi göstermiştir.

Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı grupta 15. gün ($5,04 \pm 1,09$) ve 90. gün ($5,93 \pm 0,87$) RBC değerleri sağaltım öncesi ortalama RBC değerine ($4,51 \pm 1,60$) göre önemli ($p < 0,05$) düzeyde yüksek bulunmuştur.

Tekrarlı ölçümler varyans analizi ortalama PCV yüzdelerinin uygulanan sağaltıma göre anlamlı bir farklılık göstermediği ($p = 0,976$), parametrelerin zamanla gösterdiği değişimin ($p = 0,003$) ve grup/zaman ilişkisinin ($p = 0,038$) ise önemli olduğunu ortaya koymuştur. Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı grupta 90. günde ($39,30 \pm 7,13$) PCV yüzdesinin sağaltım öncesi ortalama PCV yüzdesine ($29,70 \pm 9,78$) göre önemli ($p < 0,05$) düzeyde yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Ortalama MCV, MCHC ve PLT değerlerinde, sağaltım grupları arasında, zaman ve grup/zaman ilişkisi yönünden anlamlı bir farklılığın olmadığı tekrarlı ölçümler varyans analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Visseral leishmaniasisli köpeklerde sağaltım öncesi ve sağaltım süresince saptanan kan tablosu sonuçları

Parametreler	Gruplar Domp +Allop (n=9) Allopurinol (n=8)	Sağaltım Öncesi 0. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	Sağaltım Süresince				p değerleri			Referans değerler [∞]
			15. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	30. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	60. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	90. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	Grup	Zaman	Grup *Zaman	
WBC (10 ⁹ /μl)	Domperidon +Allopurinol	10,76±3,94 (4,87–15,40)	9,88±4,11 (4,94–17,68)	8,93±4,09 (1,58–13,13)	8,43±2,20* (5,67–12,97)	9,71±3,73* (5,14–15,75)	0,032*	0,449	0,390	6-17
	Allopurinol	13,01±4,39 (5,03–18,92)	15,32±7,57 (6,60–31,39)	13,53±5,15 (6,32–22,30)	13,95±5,27 (8,10–23,40)	12,94±2,65 (9,05–16,50)				
RBC (10 ¹² /μl)	Domperidon +Allopurinol	4,51±1,60 (2,08–6,58)	5,04±1,09 [€] (3,24–6,22)	5,87±1,91 (2,89–8,54)	5,34±1,24 (2,99–6,68)	5,93±0,87 [€] (3,87–6,88)	0,686	0,040[€]	0,012	5,5-8,5
	Allopurinol	5,21±1,54 (3,35–7,32)	4,78±1,14 (3,43–5,98)	4,97±1,15 (3,55–6,50)	5,26±1,163 (3,01–6,49)	4,87±0,79 (3,28–5,80)				
PCV (%)	Domperidon +Allopurinol	29,70±9,78 (14,87–42,24)	31,80±7,00 (21,52–41,83)	37,42±12,85 (18,27–61)	35,37±9,09 (18,36–44,56)	39,30±7,13 [€] (23–46,40)	0,976	0,003[€]	0,038	37-55
	Allopurinol	34,35±10,09 (20,80–50,16)	33,17±8,92 (22,26–44,10)	34,52±9,08 (24,65–45,90)	34,03±8,29 (21–46)	34,87±7,57 (21,89–45,60)				
MCV (fL)	Domperidon +Allopurinol	66,67±4,38 (61–72)	63,67±8,83 (43–75)	66,00±1,06 (58–71)	65,67±4,58 (61–74)	66,11±2,80 (62–70)	0,642	0,511	0,418	60-77
	Allopurinol	66,38±4,37 (62–74)	65,25±4,52 (59–70)	63,63±11,30 (37–72)	64,38±10,09 (41–74)	63,38±10,08 (40–72)				
MCHC (pg)	Domperidon +Allopurinol	33,61±2,93 (30,1–37,7)	30,37±10,44 (31–37,6)	34,35±1,39 (32,6–37,3)	33,94±1,88 (31,4–36,7)	34,36±4,48 (24,4–39,2)	0,516	0,365	0,359	32-36
	Allopurinol	34,02±1,93 (31–36,5)	33,56±2,30 (30,4–37,1)	33,07±1,93 (30–36)	33,36±2,18 (30–36,1)	33,67±2,01 (30,5–37,2)				
PLT (10 ⁹ /L)	Domperidon +Allopurinol	217±72 (141–342)	317±100 (171–443)	248±98 (35–373)	238±92 (112–385)	347±126 (218–557)	0,260	0,164	0,259	200-900
	Allopurinol	303±140 (150–512)	321±97 (201–445)	302±91 (178–477)	325±145 (198–622)	318±136 (179–598)				

*: Aynı sütunda gruplar arası fark önemlidir (p<0,05).

€: Aynı satırda sağaltım öncesine göre fark önemlidir (p<0,05).

∞: The Merck Veterinary Manual

4.2.2. Biyokimyasal Bulgular

Muayene ve değerlendirme protokollerine göre sağaltım öncesi yapılan biyokimyasal analizlerde domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı gruptaki 9 köpeğin 5'inde hiperproteinemi ($TP \geq 7,5$ g/dl), 7'sinde hipoalbuminemi ($Alb \leq 2,6$ g/dl), 8'inde hiperglobulinemi ($Glb \geq 3,7$ g/dl), 6'sında üre ($üre \geq 50$ mg/dl), 2'sinde kreatinin ($kreatinin \geq 1,6$ mg/dl), 1'inde ALT ($ALT \geq 57$ U/L) ve 3'ünde AST ($AST \geq 49$ U/L) aktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı gruptaki 8 köpeğin 6'sında hiperproteinemi, 8'inde hipoalbuminemi, 8'inde hiperglobulinemi, 5'inde üre, 2'sinde kreatinin, 2'sinde ALT ve 3'ünde AST değerlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir (Ek 1, 2). Gruplarda incelenen biyokimyasal parametrelerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresinceki değerleri ile istatistiksel sonuçları Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. Buna göre;

İncelenen biyokimyasal parametrelerin sağaltım öncesi (0. gün=çıkış) değerlerinin gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Tekrarlı ölçümler varyans analizi ortalama serum TP ve globulin konsantrasyonlarının, gruplar arasında, zamanla gösterdiği değişimin ve grup/zaman ilişkisinin önemsiz olduğunu göstermiştir. Buna karşın, ortalama albumin konsantrasyonlarının uygulanan sağaltıma göre anlamlı ($p=0,033$) bir farklılık gösterdiğini, bu parametrenin zamanla gösterdiği değişim ile grup/zaman ilişkisinin ise önemli olmadığını tekrarlı ölçümler varyans analizi ortaya koymuştur (Çizelge 4.7). Domperidon ve allopurinolün kombine olarak uygulandığı grupta 30. ($2,21 \pm 0,45$) ve 60. ($2,35 \pm 0,53$) günlerdeki ortalama albumin konsantrasyonlarının allopurinolün yalnız başına uygulandığı gruptaki 30. ($1,71 \pm 0,61$) ve 60. ($1,60 \pm 0,74$) günlerdeki albumin konsantrasyonlarına göre önemli ($p < 0,05$) düzeyde yüksek bulunmuştur.

Ortalama serum ALT ve AST aktivitelerinde, sağaltım grupları arasında, zaman ve grup/zaman ilişkisi yönünden anlamlı bir farklılığın olmadığını tekrarlı ölçümler varyans analizi göstermiştir (Çizelge 4.7).

Tekrarlı ölçümler varyans analizi ortalama serum üre ve kreatinin konsantrasyonları, sağaltım grupları arasında, zamanla ve grup/zaman ilişkisi yönünden anlamlı bir farklılığın olmadığını belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Visseral leishmaniasisli köpeklerde sağaltım öncesi ve sağaltım süresince saptanan biyokimyasal analiz sonuçları

Parametreler	Gruplar Domp +Allop (n=9) Allopurinol (n=8)	Sağaltım Öncesi 0. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	Sağaltım Süresince				p değerleri			Referans değerler [∞]
			15. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	30. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	60. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	90. Gün $\bar{x} \pm S \bar{x}$ (min-max)	Grup	Zaman	Grup *zaman	
ALT (U/L)	Domp +Allop	40,44±21,63 (15,9-84,6)	36,54±18,24 (14,2-66,4)	32,45±10,37 (13,3-47,3)	45,12±21,97 (10,4-74)	37,156±19,61 (16,1-68,2)	0,311	0,577	0,318	8,2-57
	Allopurinol	53,55±44,25 (22,1-153)	62,59±52,20 (25,8-183,6)	55,90±45,05 (15,8-158,4)	47,60±32,73 (25,2-121,2)	50,588±41,83 (19,7-147,8)				
AST (U/L)	Domp +Allop	50,06±21,47 (25,8-92,1)	43,07±15,93 (20,3-71,4)	34,70±9,86 (21,7-49,1)	38,36±14,68 (22,7-63)	34,31±7,64 (22,3-47,6)	0,264	0,172	0,158	8,9-49
	Allopurinol	64,37±65,74 (20,1-221)	72,61±56,15 (28,7-183)	68,83±63,99 (17,6-198)	68,13±60,25 (20,8-183)	65,22±54,81 (27,4-169)				
Üre (mg/dl)	Domp +Allop	57,90±68,2 (20-235)	46,51±33,81 (20-131)	39,57±19,63 (20-88,7)	41,60±22,34 (25,3-90,3)	37,23±18,93 (22,6-78)	0,069	0,313	0,430	20-50
	Allopurinol	107,00±89,45 (18,6-224)	95,94±66,68 (22,8-193)	86,86±50,67 (25,2-163)	70,91±52,19 (22,7-170)	76,60±49,09 (28,5-224)				
Kreatinin (mg/dl)	Domp +Allop	1,52±1,94 (0,51-6,62)	1,16±0,95 (0,61-3,65)	1,00±0,74 (0,59-2,94)	1,11±0,77 (0,60-3,13)	1,11±0,62 (0,63-2,68)	0,182	0,359	0,342	0,5-1,6
	Allopurinol	1,46±0,43 (1,04-2,19)	1,77±1,59 (0,75-5,63)	1,59±1,15 (0,85-4,32)	1,60±1,14 (1,01-4,38)	1,43±0,89 (0,78-3,47)				
TP (g/dl)	Domp +Allop	7,90±1,8 (5,76-10,38)	7,28±2,41 (2,59-10,34)	7,42±1,59 (5,07-9,83)	7,61±2,25 (4,02-11,03)	7,79±1,72 (5,75-11,21)	0,464	0,635	0,394	5,5-7,5
	Allopurinol	7,84±1,2 (5,85-9,19)	8,28±1,46 (6,42-10,41)	8,04±1,62 (6,75-10,26)	7,65±1,11 (6,77-10,11)	7,99±1,42 (6,26-10,38)				
Albumin (g/dl)	Domp +Allop	2,22±0,6 (1,46-3,10)	2,10±0,64 (1,25-3,09)	2,21±0,45* (1,40-2,99)	2,35±0,53* (1,64-3,2)	2,29±0,62 (1,15-3,14)	0,033*	0,779	0,404	2,6-4,0
	Allopurinol	1,68±0,5 (1,06-2,48)	1,71±0,41 (1,09-2,21)	1,71±0,61 (1,01-2,32)	1,60±0,74 (0,47-2,67)	1,81±0,70 (0,28-2,45)				
Globulin (g/dl)	Domp +Allop	5,67±2,0 (2,66-8,26)	5,18±2,24 (1,35-8,27)	5,21±1,65 (2,77-7,72)	5,26±2,29 (2,38-9,30)	5,50±1,81 (2,62-8,74)	0,287	0,540	0,637	2,1-3,7
	Allopurinol	6,15±1,4 (4,18-7,92)	6,60±1,70 (5,02-9,24)	6,40±1,58 (4,91-9,17)	5,90±1,48 (4,43-8,84)	6,02±1,53 (3,88-8,26)				

*: Aynı sütunda gruplar arası fark önemlidir (p<0,05).

[∞]: The Merck Veterinary Manual

4.2.3. Serolojik Bulgular

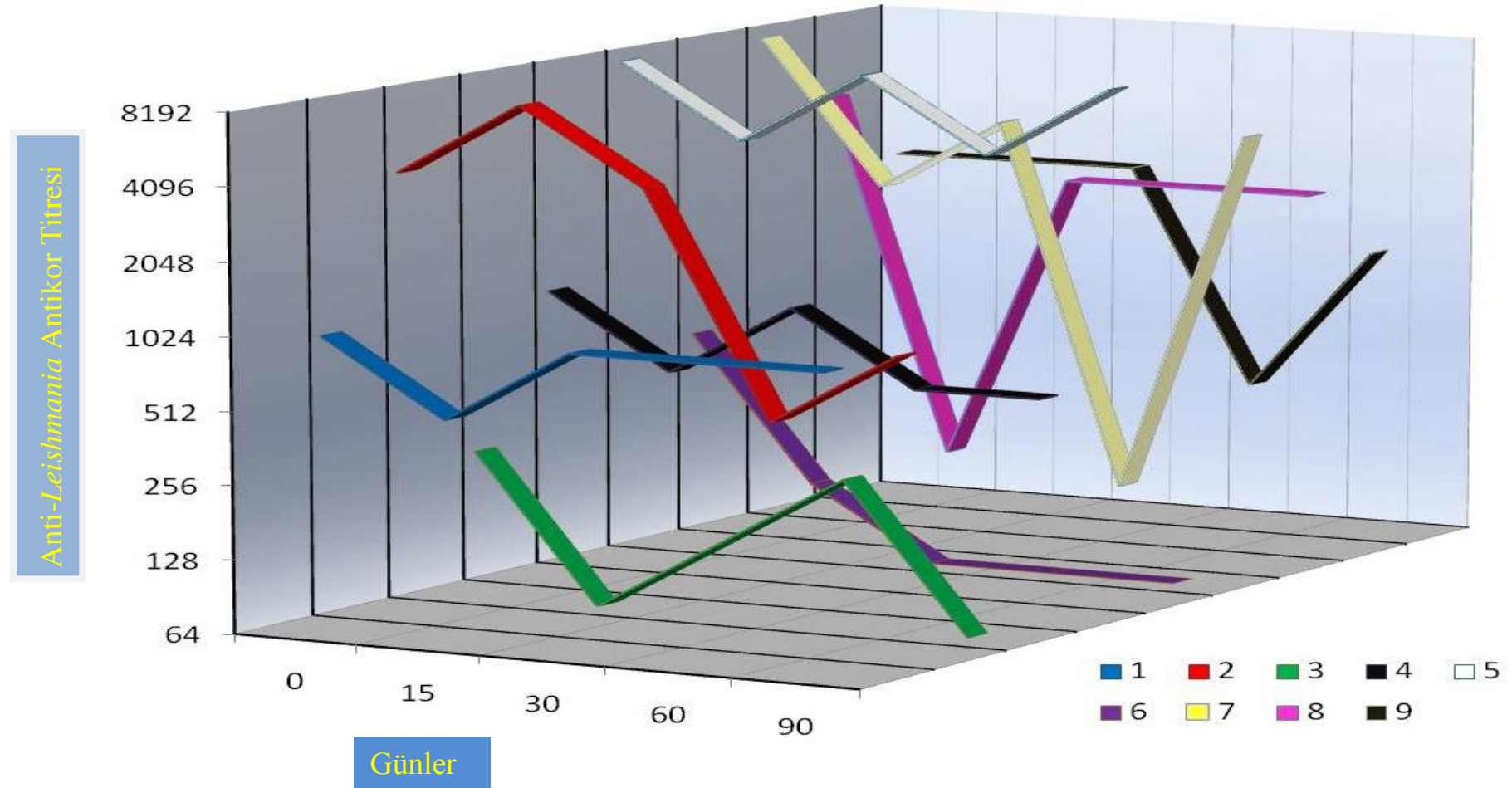
Visseral leishmaniasis tanısı konulan, sağıaltım gruplarındaki her bir köpeğın sağıaltım öncesi (0. gün) ve sağıaltımaya başladıktan sonraki 15., 30., 60. ve 90. günlerde alınan serum örneklerindeki IFAT sonuçları Çizelge 4.8 ve 4.9’de sunulmuştur. Visseral leishmaniasisli köpeklerde domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı grupta sağıaltımın 90. gününde anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 7 köpekte düştüğü (%77,7), iki köpekte stabil kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2, 4.3). Allopurinolün yalnız başına uygulandığı grupta 90. günde anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 2 köpekte yükseldiğı, 2 köpekte stabil kaldığı ve 4 köpekte düştüğü belirlenmiştir. Anti-*Leishmania* antikor titreleri açısından yapılan istatistiki ölçümlerde domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı grupta daha fazla olmak üzere düşme eğilimi tespit edilmiştir (p=0,064). Ancak yapılan istatistiki ölçümlerde bir önem belirlenememiştir.

Çizelge 4.8. Domperidon ve allopurinol kombine uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince anti-*Leishmania* antikor titreleri

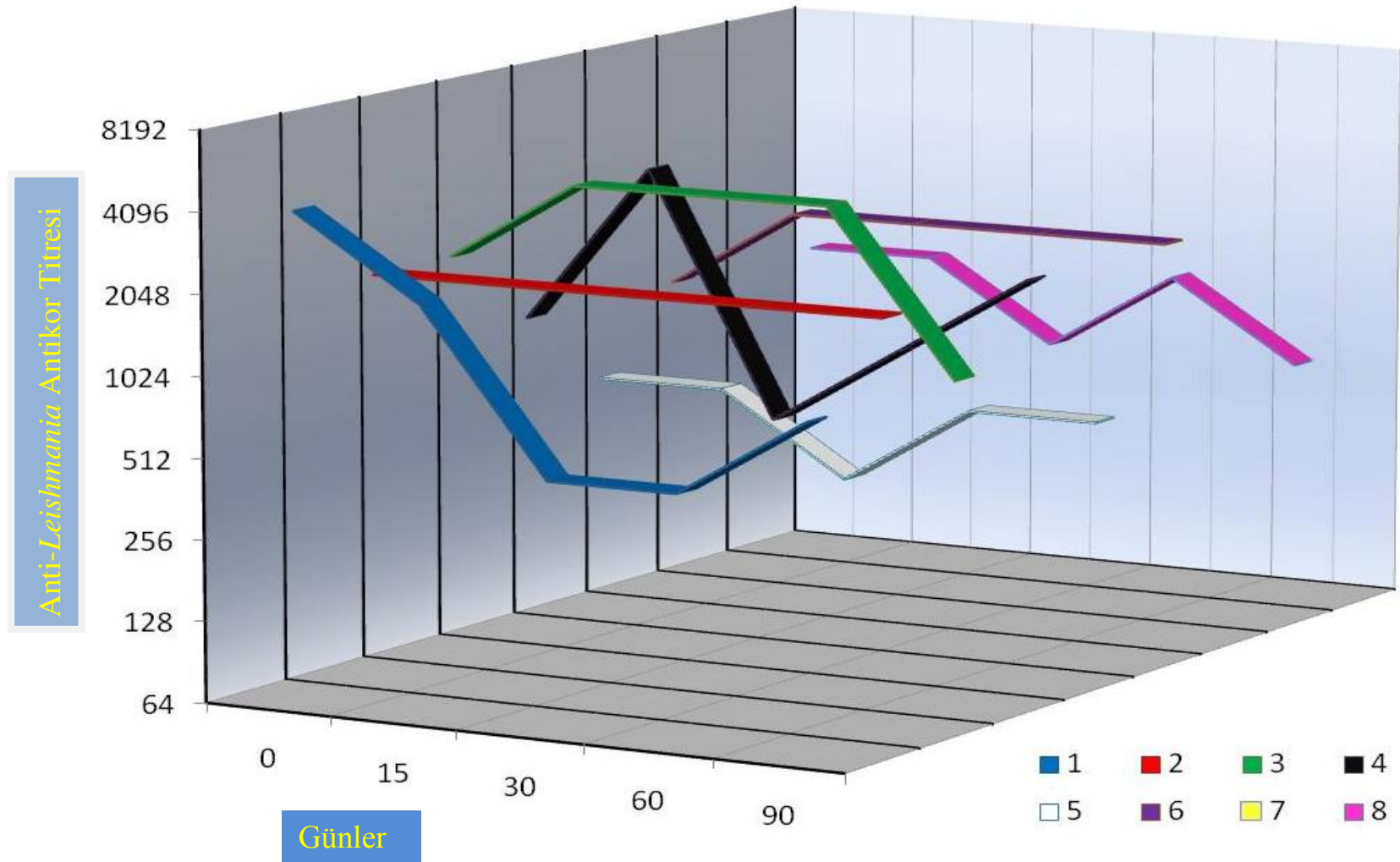
IFAT anti- <i>Leishmania</i> antikor titreleri 1/					
Köpek No	Sağaltım öncesi	Sağaltım başladıktan sonraki günler			
	0. gün	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	1024	512	1024	1024	1024
2	4096	8192	4096	512	1024
3	256	64	128	256	64
4	1024	512	1024	512	512
5	8192	4096	8192	4096	8192
6	512	128	64	64	64
7	8192	2048	4096	128	4096
8	4096	128	2048	2048	2048
9	2048	2048	2048	256	1024

Çizelge 4.9. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince anti-*Leishmania* antikor titreleri

IFAT anti- <i>Leishmania</i> antikor titreleri 1/					
Köpek No	Sağaltım öncesi	Sağaltım başladıktan sonraki günler			
	0. gün	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	4096	2048	512	512	1024
2	2048	2048	2048	2048	2048
3	2048	4096	4096	4096	1024
4	1024	4096	512	1024	2048
5	512	512	256	512	512
6	512	256	256	128	128
7	1024	2048	2048	2048	2048
8	1024	1024	512	1024	512



Şekil 4.3. Domperidon ve allopurinol'ün kombine olarak kullanıldığı gruptaki VL'li köpeklerin bireysel anti-*Leishmania* antikorlarının zamana göre değişimi



Şekil 4.4. Allopurinol'ün yalnız başına kullanıldığı gruptaki VL'li köpeklerin bireysel anti-*Leishmania* antikorlarının zamana göre değişimi

4.2.4. Parazitolojik Bulgular

Visseral leishmaniasis tespit edilen her iki gruptaki köpeklerin sağaltım öncesi (0. gün) ve sağaltım sonrası 15., 30., 60. ve 90. günlerdeki parazitolojik bulguları Çizelge 4.10 ve 4.11’de özetlenmiştir. Bu çalışmada, sağaltım öncesi VL’li 17 köpeğin 14’ünde lenf yumrusu aspiratları alınabilmektedir. Bu 14 köpeğin lenf yumrusundan alınan aspiratlardan hazırlanan yayma preparatların mikroskopik incelenmesinde 12 (%70,5) köpekte *Leishmania* amastigotu tespit edilmiştir (Resim 4.3). Sağaltım öncesi amastigot tespit edilen 12 köpeğin 8’inin domperidon ile allopurinolün kombine uygulandığı grupta, 4 köpeğin ise allopurinolün tek başına kullanıldığı grupta olduğu belirlenmiştir. Lenf aspiratında amastigot saptanan ve domperidon ile allopurinolün kombine uygulandığı 8 VL’li köpeğin 5’inde 15. günden, 2’inde 60. günden itibaren, 1’inde ise 90. günden itibaren lenf yumrusundan hazırlanan yayma preparatların incelenmesinde amastigot saptanamamıştır. Allopurinolün yalnız başına kullanıldığı gruptaki amastigot tespit edilen 4 köpeğin 1’inde 30. günden, 2’sinde 60. günden, 1’inde 90. günden itibaren lenf yumrusu aspiratlarında amastigot saptanamamıştır.

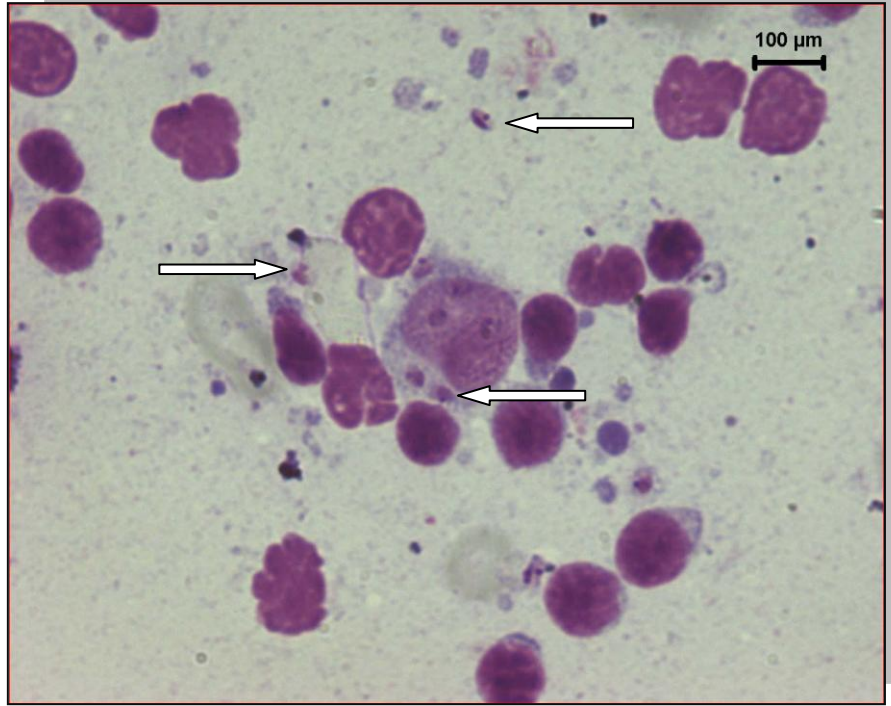
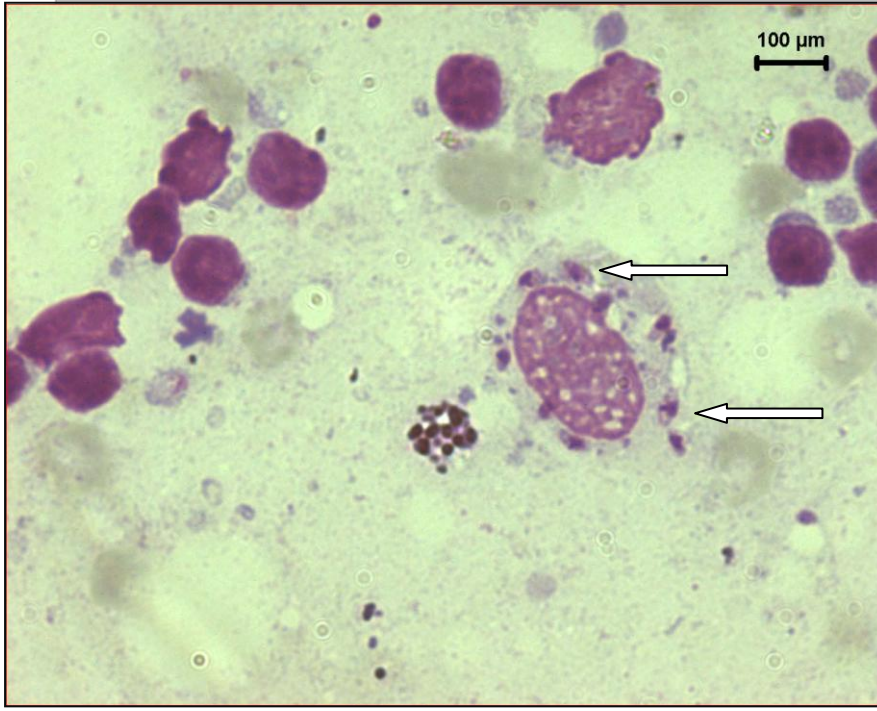
Çizelge 4.10. Domperidon ve allopurinol kombine uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince parazitolojik bulguları

Lenf yumrusu aspiratlarında amastigot varlığı					
Köpek No	Sağaltım öncesi	Sağaltım başladıktan sonraki günler			
	0. gün	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
2	pozitif	pozitif	negatif	negatif	negatif
3	pozitif	negatif	negatif	negatif	negatif
4	pozitif	negatif	negatif	negatif	negatif
5	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	negatif
6	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif
7	pozitif	negatif	negatif	negatif	negatif
8	pozitif	negatif	negatif	negatif	negatif
9	pozitif	negatif	negatif	negatif	negatif

Çizelge 4.11. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı VL’li köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım süresince parazitolojik bulguları

Lenf yumrusu aspiratlarında amastigot varlığı					
Köpek No	Sağaltım öncesi	Sağaltım başladıktan sonraki günler			
	0. gün	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
2	pozitif	pozitif	pozitif	pozitif	negatif
3	pozitif	pozitif	pozitif	negatif	negatif
4	LAA	LAA	LAA	LAA	LAA
5	LAA	LAA	LAA	LAA	LAA
6	LAA	LAA	LAA	LAA	LAA
7	pozitif	pozitif	negatif	negatif	negatif
8	negatif	negatif	negatif	negatif	negatif

- LAA: Lenf aspiratı alınamadı



Resim 4.3. Domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı 1 ve 9 nolu köpeklerin sağaltım öncesi lenf yumrusu aspiratlarında amastigotların görünümü

4.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Visseral leishmaniasis tanısı konulan köpeklerde sağaltım öncesi ve sağaltım süresince her iki gruptaki köpeklerden EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinin Real Time PZR sonuçları Çizelge 4.12'de özetlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonunda örnekler *L. infantum*, *L. major* ve *L. tropica* açısından değerlendirilmiştir. Pozitif çıkan örneklerin *L. infantum* olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.12. Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası PZR sonuçları

Köpek No	Grup	PZR				
		0. gün	15. gün	30. gün	60. gün	90. gün
1	Domperidon + Allopurinol	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-
3		-	-	-	-	-
4		-	-	-	-	-
5		-	-	-	-	-
6		-	-	-	-	-
7		-	-	-	-	-
8		-	-	-	+	+
9		-	-	-	-	-
1	Allopurinol	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-
3		-	+	+	-	-
4		+	+	+	+	-
5		+	-	-	-	-
6		+	-	-	-	-
7		+	-	-	-	-
8		-	-	-	-	-

(-): Negatif; (+): Pozitif

Çizelge 4.13. Çalışmaya alınan VL'li köpeklerin klinik, serolojik ve parazitolojik bulgularının zaman içindeki değişimleri

Köpek No	Grup	0. gün				15. gün				30. gün				60. gün				90. gün			
		Klinik	LYA	IFAT 1/	PZR	Klinik	LYA	IFAT 1/	PZR	Klinik	LYA	IFAT 1/	PZR	Klinik	LYA	IFAT 1/	PZR	Klinik	LYA	IFAT 1/	PZR
1	Domperidon + Allopurinol	Poz	Poz	1024	Neg	Poz	Poz	512	Neg	Poz	Poz	1024	Neg	Poz	Neg	1024	Neg	Neg	Neg	1024	Neg
2		Poz	Poz	4096	Neg	Poz	Poz	8192	Neg	Poz	Neg	4096	Neg	Poz	Neg	512	Neg	Neg	Neg	1024	Neg
3		Poz	Poz	256	Neg	Poz	Neg	64	Neg	Poz	Neg	128	Neg	Poz	Neg	256	Neg	Neg	Neg	64	Neg
4		Poz	Poz	1024	Neg	Poz	Neg	512	Neg	Poz	Neg	1024	Neg	Poz	Neg	512	Neg	Neg	Neg	512	Neg
5		Poz	Poz	8192	Neg	Poz	Poz	4096	Neg	Poz	Poz	8192	Neg	Poz	Poz	4096	Neg	Neg	Neg	8192	Neg
6		Poz	Neg	512	Neg	Poz	Neg	128	Neg	Poz	Neg	64	Neg	Poz	Neg	64	Neg	Neg	Neg	64	Neg
7		Poz	Poz	8192	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Poz	Neg	4096	Neg	Poz	Neg	128	Neg	Neg	Neg	4096	Neg
8		Poz	Poz	4096	Neg	Poz	Neg	128	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Poz	Poz	Neg	2048	Poz
9		Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Neg	Neg	256	Neg	Neg	Neg	1024	Neg
1	Allopurinol	Poz	Poz	4096	Neg	Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Poz	512	Neg	Poz	Neg	512	Neg	Poz	Neg	1024	Neg
2		Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg
3		Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Poz	4096	Poz	Poz	Poz	4096	Poz	Poz	Neg	4096	Neg	Poz	Neg	1024	Neg
4		Poz	LAA	1024	Poz	Poz	LAA	4096	Poz	Poz	LAA	512	Poz	Poz	LAA	1024	Poz	Poz	LAA	2048	Neg
5		Poz	LAA	512	Poz	Poz	LAA	512	Neg	Poz	LAA	256	Neg	Poz	LAA	512	Neg	Poz	LAA	512	Neg
6		Poz	LAA	512	Poz	Poz	LAA	256	Neg	Poz	LAA	256	Neg	Poz	LAA	128	Neg	Poz	LAA	128	Neg
7		Poz	Poz	1024	Poz	Poz	Poz	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg	Poz	Neg	2048	Neg
8		Poz	Neg	1024	Neg	Poz	Neg	1024	Neg	Poz	Neg	512	Neg	Poz	Neg	1024	Neg	Poz	Neg	512	Neg

Poz: Pozitif, Neg: Negatif, LAA: Lenf aspiratı alınamadı.

LYA: Lenf yumrusu aspiratı

5. TARTIŞMA

Köpeklerin, *L. infantum*'un neden olduğu insan visseral leishmaniasis de en önemli rezervuar olmaları ve immun sistemi baskılanmış yetişkinlerde ve çocuklarda ciddi bir enfeksiyon riski oluşturmalarından dolayı, hastalığın köpekler arasında yayılımının, köpeklerden insanlara bulaşmasının kontrolünün, hastalığın tespit edildiği köpeklerin sağaltım ve kontrol altına alınmasının gerekli olduğu bilinmektedir (Ashford ve ark 1993). Brezilya'da yapılan çalışmalarda da gösterildiği gibi enfekte köpeklerin eliminasyonunun, uzun vadede hastalıkla yapılan mücadeleye yardım etmediği, enfekte insan ve köpek sayısını azaltmadığı belirlenmiştir (Dantas-Torres ve ark 2006, Nunes ve ark 2008). Bu bilgiler ışığında enfekte hayvanların eliminasyonu hastalığın yaratmış olduğu tehlikeyi ortadan kaldırmamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, klinik evresi III veya IV olarak değerlendirilen köpeklerin sağaltımla bile klinik olarak iyileşmelerinin zor olduğu ifade edilmekle birlikte hasta sahibinin isteği dışında, ötanazi edilmesi veya eliminasyonu tarzında bir ifadeye rastlanılmamıştır. Bu açıdan hayvan refahı da düşünüldüğünde enfekte hayvanların kontrol ve sağaltım altına alınması en uygun yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Farklı sağaltım protokollerinde uzun süreli takip edilen köpeklerin sağaltımında daha iyi sonuçlar elde edildiği ve sağaltımda klinik takibin çok önemli olduğu da pek çok araştırmacı tarafından da bildirilmektedir (Miro ve ark 2009, Torres ve ark 2011).

Köpeklerde visseral leishmaniasin ırk, cinsiyet ve yaş predispozisyonuna bağlı olmadığı, ancak kırsal bölgelerde bulunan köpeklerin ve av köpeklerinin hastalığa yakalanma riskinin daha fazla olduğu bildirilmektedir (Moreno ve Alvar 2002). Bu kapsamda endemik bölgelerde, kum sinekleri için uygun çevresel şartlar ortaya çıktığında, bir köpeğin bir saat içersinde 100' den fazla ısırığa maruz kalabildiği ve bu ısırıkları yapan kum sinekleri içerisinde enfekte sineklerin oranının % 10,5'e kadar ulaşabildiği rapor edilmiştir (Bettini ve ark 1986). Endemik bölgede yaşayan özellikle gece boyu dışarıda duran köpeklerin sürekli olarak parazitle karşı karşıya kaldıklarının unutulmaması gerektiği rapor edilmiştir (Berrahal ve ark 1996). Bu çalışmada *Leishmania* spp. ile enfekte olduğu tespit edilen toplam 17 köpeğin kum sineğine maruz kalacak şekilde bahçe gibi, ev ortamından uzak bir yerde bakıldığı öğrenilmiştir. Bu bilgiler ışığında ülkemizde de endemik bölgelerde özellikle gece boyunca dışarıda kalan köpeklerin detaylı olarak incelenmesi gerekliliği karşımıza çıkmaktadır.

Köpek visseral leishmaniasisinde inkübasyon süresinin uzun olmasından dolayı hastalığın çok genç ve çok yaşlı köpeklerde daha az görüldüğü bildirilmektedir (Denerolle 1996, Noli 1999, Solano-Gallego ve ark 2009). Ancak bu çalışmada 8 aylık ve 12 yaşında olan enfekte köpekler de tespit edilmiştir. Bu durum bildirimlerle uyumlu değildir. Sekiz aylık bir köpekte hastalığı tespit edebilmemizin son yıllarda yapılan çalışmalarda da bildirildiği gibi transplesantal yolla bulaşma (Rosypal ve ark 2005, Silva ve ark 2009) ile ilişkili olabileceği ve 12 yaşında bir köpekte ise hastalığın belirlenmesi bazı araştırmacıların da değindiği gibi (Baneth 2005) hastanın immun durumuna dayandırılabilir.

Köpek visseral leishmaniasisin gerek erkek gerekse dişilerde eşit oranda görüldüğü, ancak erkek köpeklerin dişilere göre hastalıktan daha çok etkilendiği rapor edilmiştir (Slappendel 1988, Martinez ve Lleret 1992, Denerolle 1996, Ciaramella ve ark 1997, Gallego ve ark 2009). Bu çalışmada da VL tespit ettiğimiz toplam 17 köpekten, 9'unun erkek, 8'inin ise dişi olduğu belirlenmiştir. Bu durum yazarların çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir.

Konağın genetik geçmişi hastalığa karşı oluşan direnç veya duyarlılık açısından büyük önem arz etmektedir (Ferrer ve ark 2002). Doğal seleksiyona dayanıklı sokak köpekleri ve yerli ırklarının endemik bölgelerde parazite karşı daha etkili immun yanıt verebildiği bildirilmiştir (Solano-Gallego ve ark 2000). Bu çalışmada KVL tespit ettiğimiz toplam 17 köpeğin, 9'unun melez ırk olduğu belirlenmiştir. Bu durum ülkemizde sokak köpeği sayısı ve bakıma muhtaç melez köpek sayısının fazla olması nedeniyle hayvan severlerin özellikle bu köpeklere ilgi göstermesiyle ilişkili olabileceği düşüncesini oluşturmaktadır.

Visseral leishmaniasis ile doğal enfekte köpekler, ortaya konan patogenezi hipotezinin kanıtlanmasında en iyi sağlamakla birlikte, enfeksiyonun zaman içerisinde değişkenlik gösterebilmesi, her köpeğin duyarlılık ve dirençlilik özelliğinin katagorize edilmesinin zorluğu, klinik bulguların sayısının değişken olması, farklı şiddette klinik bulguların değerlendirme altına alınması ve eş zamanlı hastalıkların olası etkisi gibi bazı doğal sakıncalar bulunmaktadır. Deneysel enfekte edilen köpeklerde ise bu dezavantajları aşmak daha kolaydır. Ancak bu çalışmalarda, genel olarak konak direncini aşacak dozlarda inokulasyonlar yapılmakta bunun sonucunda da elde edilecek sonuçlar parazitin enfekte evresine (promastigot veya amastigot), enfeksiyonun ilerleyiş yönüne, inokulasyonun

büyüklüğüne bağlı olarak değişmektedir (Slappendel ve Ferrer 1998, Gradoni ve ark 2005, Petanides ve ark 2008). Köpek visseral leishmaniasisde eşzamanlı, enfeksiyöz hastalıklar (monositik ehrlichiosis, babesiosis, anaplasmosis, bartonellosis, hepatozoonosis, dirofilariosis, spirocercosis, demodikosis, sarkoptik uyuz), immun–mediatör hastalıklar (pemfigus foliaceus, sistemik lupus eritematosus), endokrinopatiler (hipotiroidizm) ve çeşitli neoplazilerle (hemanjiosarkoma, lenfoma, miyeloma, histiositoma, transmissible venereal tümör) karşılaşılabilceği rapor edilmiştir (Slappendel ve Ferrer 1998, Levy ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2008, Petanides ve ark 2008). Bu çalışmada *Leishmania* spp. ile enfekte olduğu belirlenen toplam 40 köpek bazı eş zamanlı hastalıklar yönünden araştırılmış ve bu köpekler arasından 14'ünün ehrlichiosis, 4'ünün dirofilariosis, 2'sinin hipotiroidizm oldukları tespit edilmiştir. Endemik bölgelerde sıklıkla görülen ve kronik seyirli olması nedeniyle KVL'ye eşlik eden sporadik hastalıklarla karşılaşılabilceği bildirilmiştir (Gaskin ve ark 2002, Miranda ve ark 2008). Bu durum, köpeklerin bakım besleme koşullarıyla, eşzamanlı hastalıkların ve KVL'nin köpeklerin bağışıklık sistemine etkisi (immunsupresyon) ile açıklanmaya çalışılmıştır (Cringoli ve ark 2002). Bununla birlikte KVL ile enfekte köpeklerde hücrel bağışıklığın şiddetli olarak baskılanmasının eşzamanlı hastalıklara karşı duyarlılığın artmasına sebep olabileceği de vurgulanmaktadır (Gaskin ve ark 2002). Ayrıca hipotezler arasında bunun tersinin de düşünülmesi gerektiği bildirilmiştir (Cringoli ve ark 2002).

Köpeklerde VL'nin sağaltımı için allopurinolün terapötik etkinliği üzerine birçok çalışma yapılmış (Caveliero 1999, Pasa ve ark 2005, Manna ve ark 2008, Torres ve ark 2011), allopurinolün tek başına veya diğer ilaçlar ile kombine olarak uygulanmasının genellikle klinik iyileşme sağladığı; ancak, serolojik ve parazitolojik iyileşmeyi sağlayamadığı rapor edilmiştir (Caveliero 1999, Pasa ve ark 2005, Manna ve ark 2008). Yapılan literatür taramalarında VL'li köpeklerin sağaltımında allopurinolün domperidon ile kombine kullanımı hakkında bir bilgiye rastlanılmamıştır. Bu çalışmada *Leishmania* spp. ile enfekte 17 köpek iki gruba ayrılarak sağaltımı ve kontrol altına alınması, elde edilen verilerin KVL'nin sağaltımında mevcut sağaltım prosedürlerine bir alternatif olarak domperidon ve allopurinol kombinasyonu ile yan etkisi minimize edilmiş, kısa sürede etki eden, maliyeti ucuz bir sağaltım protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır.

Köpek visseral leishmaniasisin parazitolojik tanısı, kemik iliği, lenf yumruları, deri veya periferik kan gibi enfekte doku ve organlardan alınan örneklerinde *Leishmania*

amastigotlarının mikroskopik olarak görülmesiyle konulur (Alvar ve ark 2004). Ancak amastigotların görülme olasılığının düşük olması nedeniyle (Alvar ve ark 2004), hastalığın tanısı serolojik yöntemler (IFAT, ELİSA, DAT) ve farklı dokularda PZR ile *Leishmania* DNA'sının tespit edilmesiyle konulabilmektedir (Meredith ve ark 1995, Gradoni 2002, Alvar ve ark 2004, Baleeiro ve ark 2006). Bu çalışmada, hastalığın tanısı 17 köpekte IFAT ile anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 1/128 ve üzerinde olmasıyla ve 14 köpekten alınan lenf yumrusu aspiratlarından yapılan yayma preparatların mikroskopik incelemesinde 12 köpekte amastigotların görülmesiyle konulmuştur.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde klinik bulgular, parazitin virülensine, konak genetiğine, konağın immun yanıtına ve eş zamanlı hastalıkların varlığına (Slappendel ve Ferrer 1998, Levy ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2006, Mylonakis ve ark 2008, Petanides ve ark 2008) göre değişiklik göstermektedir (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999). Hastalıkla ilişkili olarak paraziti taşıdığı halde hiçbir klinik bulgu göstermeyen köpekler asemptomatik, en az iki klinik bulgu gösterenler oligosemptomatik, belirgin üç ya da daha fazla klinik bulgu gösterenler polisemptomatik olarak nitelendirilmektedirler (Saridomichelakis 2009). Bu çalışmada her iki grupta bulunan enfekte köpeklerin klinik bulgularının tipi ve sayısında farklılık gözlenmiş ve polisemptomatik olarak nitelendirilmiştir. Nitekim sağaltım öncesi VL'li 17 köpeğin 16'sında genaralize lenfadenopati, 15'inde deri lezyonu, 14'ünde kilo kaybı, 8'inde depresyon, 8'inde okuler lezyon, 7'sinde iştahsızlık, 5'inde müköz membranlarda solgunluk, 4'ünde onychogryphosis, 4'ünde epistaksis, 1'inde vücut sıcaklığı artışı ve 1 köpekte ise glossitis belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu çalışmada sağaltım öncesi belirlenen bulgular araştırmacıların (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde görülen en genel hemato-biyokimyasal bulgular anemi ve trombositopeni, hiperproteinemi, hiperglobulinemi ve hipoalbuminemi (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999) (Çizelge 2.5). Çalışmada VL'li köpeklerde sağaltım öncesi belirlenen en önemli hemato-biyokimyasal bulgular diğer araştırmacıların (Ciaramella ve ark 1997, Slappendel ve Ferrer 1998, Koutinas ve ark 1999, Pasa ve ark 2005) bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada KVL'de görülen hemato-biyokimyasal bulgular anemi, hipoalbuminemi ve hiperglobulinemi olarak belirlenmiştir. Ciaramella ve ark (1997) visseral leishmaniasisli

köpeklerde sağaltım öncesi belirlenen hemato-biyokimyasal bulguların hastalığın şiddeti ve konağın immun yanıtı ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Visseral leishmaniasisli köpeklerde aneminin epistaksis sonucu oluşan kan kayıpları, otoantikorlar ve immunkompleksler sebebiyle eritrositlerin membran dayanıklılıklarının azalması, kronik enfeksiyonlar, demir yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, eritroid displazisi, eritropoesisin azalması ve ehrlichiosis gibi eş zamanlı enfeksiyonlar nedeniyle oluşabilmektedir (De Luna ve ark 2000). Hipoalbuminemi ve hiperglobulineminin ise kronik yangı sebebiyle meydana gelen böbrek, karaciğer ve bağırsak patolojilerinden oluştuğu, temel olarak da artmış gamma-globulin ve bazen de artmış alfa-2 ve beta-globulin konsantrasyonları sebebiyle şekillenebildiği rapor edilmiştir (Romdane ve ark 1992, Corona ve ark 2004).

Köpeklerde VL'nin sağaltımında allopurinol ile sodyum stiboglukonat ve glukantim gibi antimon bileşiklerinin kombinasyonu en sık kullanılan sağaltım protokollerindendir (Denerolle ve Bourdoiseau 1999, Pasa ve ark 2005). Ancak antimon bileşiklerinin parazitolojik iyileşmede yetersiz oluşu, *Leishmania* suşlarında ilaca karşı direnç gelişimi, hastalığın klinik olarak nüks etmesi, toksik etkilerinin fazla oluşu, fiyatının pahalı olması ve zor bulunması nedeniyle sağaltımda büyük güçlükler yaşanmaktadır (Strauss-Ayali ve Baneth 2000, Baneth ve Shaw 2002, Pasa ve ark 2005, Frezard ve ark 2009).

Purin analogu olan allopurinolün etki mekanizması parazitin nükleotidleri tarafından metabolize edilerek adenin nükleotidinin birleşimine, RNA diziliminin oluşumuna ve protein sentezlemesine engel olmasıyla gerçekleşmektedir (Cavaliero ve ark 1999, Pasa ve ark 2005). Köpeklerde VL'nin sağaltımı için allopurinolün terapötik etkinliği üzerine birçok çalışmada allopurinolün tek başına ve kombine sağaltımın genellikle kısa sürede klinik iyileşme sağladığı; ancak, parazitolojik iyileşmeyi sağlamadığı rapor edilmiştir (Caveliero 1999, Pasa ve ark 2005, Manna ve ark 2008, Torres ve ark 2011). Allopurinolün yalnız başına kullanıldığı veya kombine sağaltım protokollerine dahil edildiği çalışmalarda 8 ile 12 ay arasında kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (Caveliero 1999, Pasa ve ark 2005, Manna ve ark 2008, Torres ve ark 2011). Ancak, kombine sağaltım protokollerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde allopurinolün klinik iyileşme olana kadar kullanıldığı da görülmektedir (Pasa ve ark 2005). Bununla birlikte allopurinolün ancak 2. aydan sonra klinik iyileşme sağlayabildiği de

klirik tecrübelerle görülmüştür. Bu çalışmada allopurinolün hem kombine sağıaltım grubunda hem de allopurinolün yalnız başına kullanıldığı grupta 3 ay süre ile kullanılması ile erken dönemde allopurinolün etkinliğinin kombine sağıaltım protokolü ile karşılaştırmak, kısa sürede etki edebileceğı düşünölen bir sağıaltım protokolü oluşturmak, hasta sahiplerinin sağıaltımını hem takip etmelerini rahatlatarak hem de uygulanan sağıaltım protokolüne sadık kalmalarını sağılamak, ucuz bir maliyet çıkartarak sağıaltım protokollerine bir alternatif yaratılmıştır.

Son yıllarda köpek visseral leishmaniasisin sağıaltımında domperidonun ucuz bir ilaç olması, oral olarak uygulanabilmesi, yan etkilerinin olmaması ve kolay bulunması nedeniyle alternatif bir sağıaltım seçeneğı olabileceğı rapor edilmiştir (Gomez–Ochoa ve ark 2009). Köpek visseral leishmaniasisin sağıaltımında domperidonun etkinliğı klinik bulgulara iyileşme, anti–*Leishmania* antikor titresinde önemli düzeyde düşme ve serum prolaktin seviyesinde önemli artışla değerlendirilebilmektedir (Gomez–Ochoa ve ark 2009). *Leishmania* parzitrine karşı domperidonun etki mekanizmasının serum prolaktin seviyesindeki artış sonucu serum CD4+Th1 alt gruplarında da artışa, interlökin (IL)–2, IL–12, interferon (INF)–c ve tümör nekrosiz faktör (TNF) salınımına, doğal öldürücü hücrelerinin oluşumuna ve makrofaj aktivasyonuna bağılı olduğı bildirilmektedir (Di Carlo ve ark 1993, Majumder ve ark 2002, Gomez–Ochoa ve ark 2009). Bir çalışmada, KVL’in sağıaltımında domperidonun yalnız başına 1 ay süre ile uygulanmasının diğerk ilaçlar gibi tam bir parazitolojik iyileşmeyi sağılamadığı; fakat, düşük parazit yüklü hayvanlarda klinik iyileşmeyle birlikte antikor titrelerinde de azalmaya neden olduğı belirlenmiştir (Noli ve Auxilia 2005, Gomez–Ochoa ve ark 2009). Bu nedenle VL’li semptomatik köpeklerde domperidon ile daha farklı sağıaltım protokollerinin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada visseral leishmaniasis tanısı konulan hayvanlara, oral olarak 2 mg/kg dozda 1 ay süre ile domperidon ve 30 mg/kg dozda 3 ay süreyle oral olarak allopurinolün kombine uygulandığı grupta 9 köpeğın 8’inin allopurinolün yalnız başına kullanıldığı gruba göre daha fazla sayıda klinik bulguya sahip olmalarına rağmen ilk 15 gün içerisinde klinik iyileşme eğiliminde olduğı ve yaşam kalitelerinin her geçen gün arttığı belirlenmiş ve uygulanan kombine sağıaltım ve yapılan takip süresince (Çizelge 4.4, 4.5) hiçbir yan etki tespit edilmemiştir. Ayrıca yaklaşık 20 kg canlı ağırlığına sahip VL’li bir köpekte kombine sağıaltım protokolünün yaklaşık olarak toplam 35 TL gibi oldukça ucuza mal olduğı da saptanmıştır. Buna karşın allopurinolün tek başına aynı dozda kullanıldığı grupta ise ilk bir

ay içersinde klinik iyileşmeye rastlanamamış, ancak 30. günden itibaren sadece 4 köpekte hafif düzeyde iyileşme belirlenebilmiştir.

Klinik iyileşmeyi takiben domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı grupta WBC, RBC, PCV ve alb değerlerindeki değişim allopurinolün tek başına uygulandığı gruba göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Bu çalışmada domperidon ile allopurinolün kombine olarak kullanıldığı bütün köpeklerde sağaltım süresince klinik iyileşmeyi takiben albumin konsantrasyonlarındaki artışın, globulin konsantrasyonlarındaki azalışın belirlenmesi kombine sağaltımın allopurinolün yalnız başına kullanıldığı gruba göre daha iyi yanıt vermesiyle ilişkilendirilebilir. Bu çalışmada domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı sağaltım grubundaki köpeklerde klinik iyileşmeden sonra 2 köpekte albumin konsantrasyonları normale dönerken 7 köpekte azalma belirlenmiştir. Buna karşın allopurinolün tek başına uygulandığı sağaltım grubunda klinik iyileşmelerden sonra hiç bir köpeğin albumin konsantrasyonlarının normale dönmediği tespit edilmiştir. Domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı sağaltım grubundaki köpeklerde klinik iyileşmeden sonra 3 köpekte globulin konsantrasyonlarında azalma eğilimi görülürken, allopurinolün tek başına uygulandığı sağaltım grubunda ise klinik iyileşmelerden sonra 2 köpekte globulin konsantrasyonlarının azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada sağaltım süresince leishmaniasisli hayvanların klinik olarak iyileşmelerine rağmen hemato-biyokimyasal bulgularında tam bir düzelme görülmemesi, pek çoğunda meydana gelen immunopatolojik mekanizmaların devam etmesiyle ilişkilendirilebilir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde sağaltım etkinliğinin takibinde IFAT, ELİSA ve western blood gibi birçok serolojik metodlar kullanılmaktadır (Vercammen ve ark 2002, Pasa ve ark 2005). Hastalıkta sağaltımın takibinde ve hasta hayvanın durumunun kontrolündeki en ideal yolun, hastalardan farklı zamanlarda alınan serum örneklerinde IFAT ile antikor kinetiğinin takip edilmesi olduğu rapor edilmiştir (Anderson ve ark 2006). Hastalığın sağaltımında klinik iyileşmeye paralel olarak spesifik antikor titrelerinde azalmanın olabildiği (Vercammen ve ark 2002) veya bir değişimin olmadığı rapor edilmiştir (Ferrer ve ark 1995). Bu çalışmada sağaltım öncesi her iki gruptaki bütün köpeklerde spesifik antikor titreleri yüksek bulunmuş ve bütün hayvanlardan elde edilen serum örnekleri sağaltım periyodu sonunda paralel olarak çalışılmıştır. Domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı grupta sağaltım sonunda klinik iyileşmeye paralel

olarak anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 7 köpekte (%77,7) azaldığı, iki köpekte ise stabil kaldığı belirlenmiştir. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı grupta anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 2 köpekte arttığı, 2 köpekte stabil kaldığı ve 4 köpekte ise azaldığı saptanmıştır. Gomez-Ochoa ve ark (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, domperidonun yalnız başına uygulandığı VL'li köpeklerin büyük çoğunluğunda anti-*Leishmania* antikor titrelerinde artışın görülmediği ve bu durumun antijenik uyarımın azalmasıyla ilişkilendirilebildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar (Martinez-Moreno ve ark 1995, Solano-Gallego ve ark 2001) visseral leishmaniasisli köpeklerde belirlenen yüksek antikor düzeyleri farklı dokularda parazitin yaygınlığı ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada sağaltım sürecinde IFAT ile elde edilen antikor titrelerinin kombine sağaltım uygulanan grupta yüksek oranda azalma göstermesi domperidon ve allopurinolün kombine olarak kullanıldığı gruptaki hayvanların sağaltıma daha iyi yanıt verdikleri şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca domperidonun yalnız başına uygulandığı Gomez-Ochoa ve ark (2009) tarafından DAT ile yapılan çalışmada 90. günde sağlanan antikor düşüşü kombine sağaltıma alınan 7 köpekte daha kısa bir sürede (15. gün) elde edilebilmiştir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltımında allopurinol ve meglumin antimoniatın kombine kullanımı sonucunda daha yüksek bir parazitolojik iyileşmeye ulaşıldığı belirlenmiştir (Roura ve ark 1997). Koutinas ve ark (2001) allopurinolün tek başına uygulandığı VL'li köpeklerde, meglumin antimoniatın tek başına uygulandığı hayvanlara göre parazitolojik iyileşmenin daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Pasa ve ark (2005) yılında yaptıkları bir çalışmada ise allopurinol ve sodyum stiboglukonatın 1 ay süre ile kombine kullanıldığı, daha sonra allopurinolün yalnız başına uzun süreli sağaltım sonucunda VL'li 7 köpeğin 3'ünden aldıkları lenf yumrusu yayma preparatlarında amastigotlara rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, sağaltım öncesi 17 köpeğin 14'ünden alınan lenf yumrusu aspiratlarının incelenmesinde 12 köpekte (%70,5) amastigot belirlenmiştir. Domperidon ve allopurinol ile kombine sağaltıma alınan gruptaki köpeklerin 6'sında 15. günden, 2'sinde ise 60. günden itibaren amastigot saptanmamıştır. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı grupta ise amastigot tespit edilen 4 köpeğin, 2'sinde 60. günden, 1'inde 30. günden, 1'inde ise 90. günden itibaren amastigot saptanmamıştır. Bu çalışmada domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı köpeklerin allopurinolün yalnız başına verildiği sağaltım protokolüne göre savunma

sisteminin birinci karakolları olarak isimlendirilen lenf yumrularında daha erken dönemde parazite rastlanamamasının kombine sağaltım protokolünün enfeksiyon şiddetini erken dönemde azaltmasıyla ilişkilendirilebilir.

Visseral leishmaniasisli köpeklerde PZR sonuçları ile seroloji sonuçlarının paralelliğı konusunda net bir bilgi bulunmamaktadır. Visseral leishmaniasisli köpeklerde PZR tekniğinin kullanılması sonucunda pozitif olarak tespit edilen hayvanların *Leishmania* yönünden seronegatif (Olivia ve ark 2006), PZR ile negatif olan köpeklerin ise serolojik olarak pozitif olabildikleri rapor edilmiştir (Solano-Gallego ve ark 2009). Yapılan bir çalışmada kanın, deri ve lenf yumrularıyla karşılaştırılmasında PZR yöntemiyle Leishmaniasisin tanısında kanın en iyi örnek olmadığı rapor edilmiştir (Strauss-Ayali ve ark 2004). Manna ve ark (2008) KVL’de parazit için kanın bir rezervuar doku olmadığı, yalnızca dokulara yerleşmesi amacıyla kısa bir süre için bir yol olarak kullanıldığı belirlenmiştir. Bunun yanında PZR’nin duyarlılığı primerler, hedefin kopya sayısı, DNA ekstraksiyon metodu, biyolojik materyal, PZR protokolü, örnek alım ve örneklerin hazırlanmasındaki hatalar gibi değişik faktörlere bağılı olarak da değiştiğı rapor edilmiştir (Alvar ve ark 2004, Cortes ve ark 2004, Baneth ve Aroch 2008). Bu çalışmada sağaltım öncesi ve sağaltım süresince her iki gruptaki köpeklerden EDTA’lı tüpler içerisine kan örnekleri alınmış ve bu örneklerden buff-coat’ları çıkartılarak PZR çalışılmıştır. Bu çalışmada her iki grupta sağaltım öncesi IFAT ile serolojik olarak pozitif tespit edilen 17 köpeğın yalnızca 4’ünde PZR ile *Leishmania* DNA’sı tespit edilmiştir. *Leishmania* DNA’sı tespit edilen bu 4 köpeğın yalnız başına allopurinol ile sağaltıma alınan grup içerisinde olduğu ve sağaltım süresince 1’inin *Leishmania* yönünden PZR ile pozitif olduğu diğerk 3 hayvanın ise negatif olduğu belirlenmiştir. Ancak, bu bulgular ışığında klinik olarak VL şüpheli köpeklerde kandan tek bir negatif veya pozitif PZR sonucu ile enfeksiyonun ortaya çıkarılmasının güvenilir bir tanı yöntemi olmadığı, diğerk parazitolojik testlerle birlikte değerlendirilmesinin daha faydalı olabileceğı birçok araştırmacı tarafından vurgulanmıştır (Alvar ve ark 2004, Cortes ve ark 2004, Baneth ve Aroch 2008).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünya Sağlık Örgütü tarafından leishmaniasisin kontrolü amacıyla enfekte köpeklerin tespitinin, etkin sağaltım yönteminin ve vektör kontrolü gibi önlemlerin alınmasının gerekli olduğu önemle vurgulamaktadır. Ancak bu önerilerin, kullanılan insektisidlere karşı vektörün, sağaltımda kullanılan ilaçlara karşı etkenin direnç kazanması ve bu ilaçları istenen etkileri sağlayamaması gibi nedenlerden dolayı ciddi sıkıntılar ortaya çıkmaktadır. Hastalıktan korunmak için köpeklerin *Phlebotomus*'larla temasının azaltılması ve visseral leishmaniasise karşı aşının veya daha etkili bir sağaltım protokolünün geliştirilmesi gibi alternatif stratejilerin uygulamaya geçirilmesinin gerekli olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, KVL'nin sağaltımında parazitin protein sentezlemesini engelleyen allopurinol ile dopamin D2 reseptör antagonisti olan, prolaktin hormon üretimini artırarak bağışıklık sisteminin hastalığa karşı daha iyi yanıt vermesini sağladığı bildirilen domperidonun kombine kullanımının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, elde edilen veriler ile mevcut sağaltım prosedürlerine bir alternatif olarak yan etkisi minimize edilmiş, kısa sürede etki eden, maliyetleri ucuz bir sağaltım protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre *Leishmania* spp. ile enfekte köpeklerde domperidon (2 mg/kg) ve allopurinol (30 mg/kg) kombinasyonunun kullanılmasının allopurinolün yalnız başına kullanılmasına göre klinik, hematolojik, biyokimyasal, serolojik ve parazitolojik olarak daha başarılı sonuçlar verebildiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile şimdiye kadar kullanılan ilaçlar ve ilaç kullanım protokollerine göre yan etkisi minimize edilmiş, kısa sürede etki edebilen, maliyetleri ucuz bir alternatif sağaltım protokolü oluşturulmuştur.

Köpek visseral leishmaniasisin sağaltımında kombine olarak kullanılan domperidon ve allopurinolün hastalığın klinik belirtilerinin azalmasında, hematobiyokimyasal bulguların düzelmesinde, hastalığın kontrolünde ve anti-*Leishmania* antikor titrelerinin azalmasında etkili olabildiği kanısına varılmıştır. Ancak domperidon'un farklı dozlarıyla, çok sayıda enfekte köpekte domperidon ve allopurinolün kombine kullanımıyla ve kombine sağaltım protokolünün uzun süreli takibiyle yapılacak çalışmalardan elde edilecek verilere gereksinim duyulmaktadır.

ÖZET

ATASOY A. Köpek Visseral Leishmaniasisin Sağaltımında Allopurinol ve Domperidon'un Kombine Kullanımının Etkinliği

Visseral leishmaniasisli köpeklerin sağaltımında kullanılan ilaçların klinik ve özellikle parazitolojik iyileşmede yetersiz oluşu, *Leishmania* suşlarında ilaca karşı direnç gelişimi, hastalığın klinik olarak nüks etmesi, toksik etkilerinin fazla oluşu, ilaçların pahalı olması ve zor bulunması nedeniyle sağaltımda zorluklarla karşılaşilmektedir.

Gastrik prokinetik ve anti-emetik olarak kullanılan D2 reseptor antagonisti domperidonun, son yıllarda KVL'nin sağaltımında kullanıldığı ve serum prolaktin seviyesinde önemli artışla birlikte *anti-Leishmania* antikör titresini önemli düzeyde azalma ve klinik iyileşmeyi sağlaması, allopurinolün ise klinik iyileşmeyi sağlaması, fiyatının ucuz olması, kolay bulunması, yan etkilerinin minimal düzeyde olması ve oral verilmesi nedeniyle KVL'nin sağaltımında kullanıldığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, VL'li köpeklerin sağaltımında domperidon ile allopurinolün kombine kullanımının etkinliği amaçlanmıştır. Bu çalışmada klinik bulgulara, lenf yumrusu aspiratlarında amastigotların tanımlanmasına ve serolojik testlerden IFAT ile pozitif saptanmasına göre VL tanısı konulan 17 köpek kullanılmıştır. Visseral leishmaniasis tanısı konulan hayvanlar, rasgele seçilerek 2 gruba ayrılmış, ilk gruptaki VL'li köpeklere domperidon oral olarak 2 mg/kg dozda 1 ay süre ile allopurinol ise 30 mg/kg dozda 3 ay süreyle oral olarak, günde 1 kez verilmiştir. İkinci grupta bulunan enfekte köpeklere ise allopurinol yalnız başına 30 mg/kg dozda oral olarak, 3 ay süreyle, günde 1 kez uygulanmıştır. Her iki gruptaki VL'li hayvanların sağaltım öncesi (0. gün) ve sağaltım süresince (15., 30., 60. ve 90. günlerde) klinik, hemato-biyokimyasal, parazitolojik ve serolojik muayeneleri yapılmıştır.

Bu çalışmada domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı gruptaki hayvanların ilk 15 gün içerisinde klinik iyileşme eğiliminde olduğu buna karşın allopurinolün tek başına kullanıldığı grupta ise ilk bir ay içinde klinik iyileşmeye rastlanılmadığı, ancak bazı köpeklerde 30. günde hafif düzeyde iyileşme olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte domperidon ve allopurinolün kombine uygulandığı grupta klinik iyileşmeyi takiben WBC, RBC, PCV ve albumin değerlerindeki değişimin allopurinolün yalnız başına uygulandığı gruba göre istatistiksel olarak önemli olduğu

bulunmuştur ($p<0,05$). Domperidon ve allopurinol ile kombine sağaltıma alınan grupta bulunan ve lenf yumrusu aspiratlarında amastigot tespit edilen 8 köpeğin 6'sında 15. günden, 2'inde ise 60. günden itibaren amastigot saptanamamıştır. Allopurinolün yalnız başına uygulandığı grupta ise amastigot tespit edilen 4 köpeğin, 1'inde 30. günden, 2'sinde 60. günden, 1'inde ise 90. günden itibaren amastigot saptanamamıştır. Domperidon ve allopurinolün kombine kullanıldığı grupta sağaltım sonunda klinik iyileşmeye paralel olarak anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 7 köpekte (%77,7) azaldığı, iki köpekte ise stabil kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte allopurinolün tek başına uygulandığı grupta anti-*Leishmania* antikor titre düzeylerinin 2 köpekte arttığı, 2 köpekte stabil kaldığı ve 4 köpekte ise azaldığı saptanmıştır.

Köpek visseral leishmaniasisin sağaltımında kombine olarak kullanılan domperidon ve allopurinolün, allopurinolün yalnız başına kullanıldığı gruba göre hastalığın klinik belirtilerinin azalmasında, hematobiyokimyasal bulguların düzelmesinde, hastalığın kontrolünde daha etkili olabildiğı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Allopurinol, Domperidon, Köpek, *Leishmania*, Sağaltım

SUMMARY

ATASOY A. Domperidone and Allopurinol Combination Effectiveness in the Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis

Some concerns involving; deficiency of drugs for clinical and especially parasitological cure that are used in treatment of visceral leishmaniasis, resistance developed within *Leishmania* strains against drugs, relaps of clinical disease, excessive toxicological effects, expensive prices and rarely finding of drugs cause difficulties at therapy.

Domperidone, a D2 receptor antagonist used as gastric prokinetic and anti-emetic, has recently been used in the treatment of canine visceral leishmaniasis, provide significant increase in serum prolactin level besides cause decrease in anti-*Leishmania* antibody titers by clinical remission, whereas allopurinol has also been used for the treatment of canine visceral leishmaniasis because of clinical recovery, deemed as reasonable price, easily availability, minimal side effects and oral usability. In the present study the aim was to determine the efficacy of combined use of both domperidone and allopurinol in treatment of dogs with visceral leishmaniasis. A total of 17 dogs diagnosed as visceral leishmaniasis with clinical findings besides identification of amastigotes in lymphoid nodules aspirates and serological tests (IFAT) were enrolled in this study. Dogs with visceral leishmaniasis were randomly divided into two groups: in first group dogs were treated with domperidone at a dosage of 2 mg/kg per orally for one month period and plus oral allopurinol at a dosage of 30 mg/kg once a day for 3 months period. In the second group infected dogs were given allopurinol solely at a dosage of 30 mg/kg once a day for 3 months period. Dogs infected with visceral leishmaniasis in both groups were examined clinically, haemato-biochemically, parasitologically and serologically in pre-treatment (day 0) and during treatment period.

In the present study in animals belonging to groups treated with domperidone and allopurinol combination had tendency for recovery in the first 15 days, however in group treated solely with allopurinol dogs did not recover in the first month. Besides in domperidone and allopurinol combination group following clinical recovery variances in WBC, RBC, PCV and albumin values were statistically significant ($p < 0.05$) in contrast to group involving solely allopurinol treated. In domperidone and allopurinol combination group, in that amastigotes were diagnosed within lymph node aspirates, 6 out of 8 after 15

days and in other 2 after 60 days amastigotes were nor detected furthermore. In group with solely allopurinol application in dogs with amastigote diagnosis, 1 out of 4 after 30 days and in 2 after 60 days and in 1 after 90 days no more amastigotes were detected. In domperidone and allopurinol combination group at the end of therapy period in paralel to clinical recovery anti-*Leishmania* antibody titers were decreased in 7 (77%) and were remained stabilised in 2 of dogs, respectively. Besides in group with solely allopurinol application anti-*Leishmania* antibody titers were increased in 2 dogs and remained stabilised and decreased in 2 and 4 dogs, respectively.

In conclusion it may be suggested that domperidone and allopurinol combination therapy against canine visceral leishmaniasis may be more efficacious for relieving clinical signs, remission of hematobiochemical signs, controlling of the disease and decreasing anti-*Leishmania* antibody titers in contrast to alone allopurinol therapy.

Key Words: Allopurinol, Dog, Domperidone, *Leishmania*, Treatment

KAYNAKLAR

- Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *Journal of Parasitology* 1991;77(4):557–561.
- Acedo-Sanchez C, Morillas-Marquez F, Sanchiz-Marín MC, Martín-Sánchez J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. *Veterinary Parasitology* 1998;75(1):1–8.
- Adamama-Moraitou KK, Saridomichelakis MN, Polizopoulou Z, Kritsepi M, Tsompanakou A, Koutinas AF. Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Canadian Journal of Veterinary Research* 2005;69:287–292.
- Agut A, Corzo N, Murciano J, Laredo FG, Soler M. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record* 2003;153:648–652.
- Akman L, Aksu HS, Wang RQ, Ozbel Y, Ozensoy S, Alkan MZ, Ozcel MA, Culha G, Ozcan K, Uzun S, Memisoglu HR, Chang KP. Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinico-epidemiology of leishmaniasis in a specific region. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2000;47(6):545–554.
- Alexander B, Maroli M. Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology* 2003;17(1):1–18.
- Alhaidari Z, Rivierre C. Leishmaniasis and other arthropod-vector-borne diseases. In: Hillier A, Foster AP, Kwochka KW (eds.) *Advances in Veterinary Dermatology*, Volume 5. Oxford, UK, Blackwell Publishing 2005;295–299.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology* 2005;127:227–232.

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

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitology* 2006;22(12):552–557.

Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, Lawyer P, Garfield M, Pham M, Valenzuela JG. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 2006;7:52.

Andrade H, Toledo V, Marques M, Silva J, Tafuri W, Mayrink W, Genaro O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Veterinary Parasitology* 2002;103:71–81.

Andrade R, Reis A, Gontijo C, Braga L, Rocha R, Araujo M, Vianna L, Martins-Filho O. Clinical value of anti-*Leishmania (Leishmania) chagasi* IgG titers detected by flow cytometry to distinguish infected from vaccinated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;116:85–97.

Antognoni MT, Siepi D, Porciello F, Fruganti G. Use of serum cystatin C determination as a marker of renal function in the dog. *Veterinary Research Communications* 2005;29(2):265–267.

Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marie JL, Terrier O, Levieuge A, Davoust B. Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Veterinary Parasitology* 2009;166(1–2):27–31.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998;59(1):53–57.

Ashford RW, Bettini S. Ecology and epidemiology: Old World, The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Peters W, Killick-Kendrick R. (Eds), London, Academic Press;1987.p. 366–414.

Aslantas O, Ozdemir V, Kılıc S, Babur C. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis, and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Veterinary Parasitology* 2005;129(3–4):187–191.

Atasoy A, Pasa S, Ozensoy Toz S, Ertabaklar H. Seroprevalance of Canine Visceral Leishmaniasis Around the Aegean Cost of Turkey. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas, Kars* 2010;16(1):1–6.

Balcioglu IC, Ertabaklar H, Pasa S, Ozbel Y, Ozensoy Toz S. Investigating the seroprevalance of leishmaniasis in four dog shelters in antalya and its districts. *Turkiye Parazitolo Dergisi* 2009;33(1):4–7.

Baleeiro C, Paranhos-Silva M, Santos J, Oliveira G, Nascimento E, Carvalho L, Santos W. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Veterinary Parasitology* 2006;139:21–28.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis—a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal* 2008;175:14–15.

Baneth G, Dank G, Keren-Kornblatt E, Sekeles E, Adini I, Eisenberger CL, Schnur LF, King R, Jaffe CL. Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. *Am Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998;59(5):722–755.

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;24:324–330.

Baneth G, Shaw SE. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2002;106(4):315–324.

Baneth G. Leishmaniasis. In: Greene GE (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat* 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders;2005.p.685–695.

Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology* 2007;64:107–109.

Barbosa W, Pinheiro Z, Oliveira R. Electroimmunodiffusão no diagnóstico do calazar com os anti'genos de *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* e *Leptomonas pessoai*. Resultados preliminares. *Revue Pathologie Tropicale* 1973;4:377–386.

Barrouin–Melo S, Laranjeira D, Filho F, Trigo J, Juliao F, Franke C, Aguiar P, Santos W, Pontes–de–Carvalho L. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Veterinary Journal* 2005;171:331–339.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal of Parasitology* 2007;37(10):1097–1106.

Belazzoug M. La leishmaniose canine en Algerie. *Maghreb Veterinaire* 1987;3:11–13.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology* 2000;165(2):969–977.

Ben Said M, Jaiem A, Smoorenburg M, Semiao–Santos SJ, Ben Rachid MS, El Harith A. Canine leishmaniasis in the region of Enfidha (Central Tunisia). Assessment of seroprevalence with direct agglutination (DAT) and indirect immunofluorescence (IFAT). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 1992;85(2):159–163.

Bernadina W, Luna R, Oliva G, Ciaramella P. An immunodiffusion assay for the detection of canine leishmaniasis due to infection with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 1997;73:207–213.

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

Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniosis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniosis. *Insect Science and its Application* 1986;7:241–245.

Bettini S, Gramiccia M, Gradoni L, Atzeni MC. Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle,

1908, in the province of Cagliari. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1986;80:458–459.

Blanc C, Robert A. Cinquieme observation de kala-azar congenital. La Presse Medicale 1984;13:1751.

Borja-Cabrera GP, Correia Pontes NN, da Silva VO, Paraguai de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M, Palatnik de Sousa CB. Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amarante, RN). Vaccine 2002;20(27–28):3277–3284.

Borja-Cabrera GP, Cruz Mendes A, Paraguai de Souza E, Hashimoto Okada LY, de A Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, Reis AB, Genaro O, Batista LM, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. Vaccine. 2004;22(17–18):2234–2243.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 1997;9(4):439–440.

Brandonisio O, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A, Puccini V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. Veterinary Immunology and Immunopathology 1996;53:95–103.

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

Cardoso L, Neto F, Sousa J, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmaniaspecific cellular immunity. Veterinary Parasitology 1998;79:213–220.

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.

Carrio J, Portus M. In vitro susceptibility to pentavalent antimony in *Leishmania infantum* strains is not modified during in vitro or in vivo passages but is modified after host treatment with meglumine antimoniate. *BMC Pharmacology* 2002;2:11.

Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999;13(4):330–334.

Ceballos JL, Gomez-Ochoa P, Elias DS, Beguer JH, Ferrer L. Clinical efficacy of a domperidone-based treatment program for the prevention of canine leishmaniasis. 8-10th September 2011, Spain; 2011.

Chatterjee M, Baneth G, Jaffe CL, Sharma V, Mandal C. Diagnostic and prognostic potential of antibodies against O-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999;70:55–65.

Ciaramella P, Corona S. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 2003;25:358–368.

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

Coelho WM, Richini-Pereira VB, Langoni H, Bresciani KD. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011;176(2–3):281–282.

Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* 2011;109(2):267–274.

Corona M, Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Santoro D, Lombardi P. Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications* 2004;28:331–334.

Cortada VM, Doval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL,

Cupolilo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Veterinary Research Communications* 2004;28:365–374.

Cortadellas O, Fernandez del Palacio MJ, Bayon A, Talavera J. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006;20:941–947.

Cortadellas O, Fernandez del Palacio MJ, Talavera J, Bayon A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22:293–300.

Cortes S, Rolao N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2004 98, 12–17.

Coskun S, Batmaz H, Aydın L, Yılmaz F. Seroprevalence of *Leishmania infantum* infection of dogs in the western part of Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997;21:287–291.

Costa R, Franca J, 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;97:678–682.

Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, 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;147:320–325.

Couto CG, Lorentzen L, Beall MJ, Shields J, Bertolone N, Couto JJ, Couto KM, Nash S, Slack J, Kvitko H, Westendorf N, Marin L, Iazbik MC, Vicario FC, Sanz P, Ruano R.

Serological study of selected vector-borne diseases in shelter dogs in central Spain using point-of-care assays. *Vector Borne Zoonotic Disease* 2010;10(9):885–8.

Cringoli G, Rinaldi L, Capuano F, Baldi L, Veneziano V, Capelli G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Veterinary Pathology* 2002;106:307–313.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19(1):111–126.

Dantas-Torres F, Brandao-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2006;48(3):151–156.

Dantas-Torres F, de Brito ME, Brandao-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2006;140(1–2):54–60.

Dantas-Torres F, Martins TF, Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Lima BS, Brandao-Filho SP. Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Experimental Parasitology* 2010;125:184–185.

De Freitas E, Melo MN, Da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology* 2006;137:159–167.

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

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

Denerolle P. Leishmaniosis canine: difficulté du diagnostic et du traitement. *Pratique Médicale et Chirurgienne des Animaux de Campagne* 1996;31:137–145.

Deplazes P, Grimm F, Papaprodromou M, Cavaliero T, Gramiccia M, Christofi G, Christofi N, Economides P, Eckert J. Canine leishmaniosis in Cyprus due to *Leishmania infantum* MON 1. Acta Tropica 1998;71(2):169–178.

Dereure J, El-Safi SH, Bucheton B, Boni M, Kheir MM, Davoust B, Pratlong F, Feugier E, Lambert M, Dessein A, Dedet JP. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host–parasite relationships. Microbes and Infection 2003;5(12):1103–1108.

Desjeux P. Leishmaniasis. Nature Review Microbiology 2004;2(9):692.

Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. Medical Microbiology and Immunology 2001;190 (1–2):77–79.

Di Carlo R, Meli R, Galdiero M, Nuzzo I, Bentivoglio C, Carratelli CR. Prolactin protection against lethal effects of *Salmonella typhimurium*. Life Science 1993;53:981–989.

Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. Veterinary Pathology 2005;42:650–658.

Dogan N, Ozbel Y, Toz SO, Dinleyici EC, Bor O. Sero–epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in northwestern Turkey: prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. Journal of Tropical Pediatrics 2006;52(3):212–217.

Dos Santos LR, Barrouin–Melo SM, Chang YF, Olsen J, McDonough SP, Quimby F, dos Santos WL, Pontes–de–Carvalho LC, Oliveira GG. Recombinant single–chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology 2004;98:43–48.

Duarte A, Castro I, Pereira da Fonseca IM, Almeida V, Madeira de Carvalho LM, Meireles J, Fazendeiro MI, Tavares L, Vaz Y. Survey of infectious and parasitic diseases in stray

cats at the Lisbon Metropolitan Area, Portugal. *Journal of Feline Medicine Medicine Surgery* 2010;12(6):441–446.

Duprey Z, Steurer F, Rooney J, Kirchhoff L, Jackson J, Rowton E, Dchantz P. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000–2003. *Emerging Infectious Disease* 2006;12:440–446.

Eckersall PD. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Medicine Veterinaire* 2000;151(7):577–584.

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

Ertabaklar H, Ozensoy Toz S, Taylan Ozkan A, Rastgeldi S, Balcıoglu IC , Ozbel Y. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey, Corum province. *Acta Tropica* 2005;93(3):239–246.

Ertabaklar H. Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visseral leishmaniasis araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2001;25(2):128–131.

Evans D. Handbook on Isolation Characterization And Cryopreservation of Leishmania. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1989;p.45.

Fernandez–Bellon H, Solano–Gallego L, Bardagí M, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology* 2006;135(2):181–185.

Fernández–Bellon H, Solano–Gallego L, Rodríguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005;107(1–2):163–169.

Fernandez–Perez FJ, Mendez S, De La Fuente C, Gomez–Munoz MT, Cuquerella M, Alunda JM. Short report: improved diagnosis and follow–up of canine leishmaniasis using amastigote–based indirect immunofluorescence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1999;61(4):652–653.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Porus. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1995;136:514–516.

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

Ferrer L, Solano-Gallego L, Arboix M, Arberola J. Evaluation of the specific immune response in dogs infected by *Leishmania infantum*. In: Thoday KL, Foil C, Bond R (eds.) *Advances in Veterinary Dermatology*, Volume 4. Oxford, UK, Blackwell Science, 2002;92–9.

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

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. valuation 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;144:162–166.

Fisa R, Gallego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, De Colmenares M, . Castillejo S, Portus M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *Journal of Veterinary Diagnostics and Investigations* 1997;9(1):50–55.

Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997;56:319–327.

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

Frezard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 2009;14(7):2317–2336.

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

Galletti E, Bonilauri P, Bardasi L, Fontana MC, Ramini M, Renzi M, Dosa G, Merialdi G. Development of a minor groove binding probe based real-time PCR for the diagnosis and quantification of *Leishmania infantum* in dog specimens. *Research in Veterinary Science* 2011; 91(2):243-245.

Gambino G, Basile A, Mocciaro C, Chifari N, Grazia Zisa M, Corriere G, Mira L, Piccione E, Mansueto P, Tantillo R, Vitale G, Mansueto S. La leishmaniosi canina in provincia di Catania: situazione epidemiologica del 1993–1994. *Giornale Italiano di Malattie Infettive* 1997;3:293–297.

Garcia-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C, Nieto CG. Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* 1996;18:617–623.

Gasanzade GB, Safianova VM, Tagi-Zade TA, Agaev A, Gadzhibekova EA, Savina MA, Alieva KHKH, Emelianova LP, Shalmiev GB, Faramazov AZ. An outbreak of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Geokchai District, Azerbaijan SSR. *Medical Parazitology (Mosk)* 1990;2:41–45.

Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, Breitschwerdt EB. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002;16:34–44.

Gavvani ASM, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbi M, Davies CR. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;67(5):511–515.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, Reis AB. Parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008a;121:23–33.

Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* 2008b;84:269–277.

Gomes Y, Cavalcanti M, Lira R, Abath F, Alves L. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis:biotechnological advances. *Veterinary Journal* 2008;175:45–52.

Gomez–Ochoa P, Castillo JA, Gascon M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Veterinary Journal* 2009;179(2):259–263.

Gomez-Ochoa P, Sabate D, Homedes J, Ferrer L. Efficacy of Domperidone for the Treatment of Mild and Moderate Cases Of Canine Leishmaniosis: Clinical and Immunological Shortterm Follow-Up. 8-10th September 2011, Spain; 2011. p. 1503.

Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T, Oliva G. Failure of a multi–subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 2005;23:5245–5251.

Gradoni L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: Killick–Kendrick R (ed.) *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine LeishmaniasisForum. Sevilla, Spain, Intervet International BV 2002;7–14.

Gramiccia M, Gradoni L, Orsini S. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1992;86(6):613–620.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 2005;35(11–12):1169–1180.

Grimaldi GJ, Tesh RB. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews* 1993;6:230–250.

Guttadauro S. Intracranial granuloma in a leishmaniasis affected dog. In: *Proceedings of the International Congress on Canine Leishmaniasis*. Naples, Italy, SCIVAC 2004;89.

Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi–Gavani AS, Mohite H, Davies CR. Further evidence that deltamethrin–impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Medical and Veterinary Entomology* 2000;14(2):223–226.

Harith A, Salappendel R, Reiter L, Knapen F, Korte P, Huigen E, Kolk R. Application of a direct agglutination test for detection of specific-Leishmania antibodies in the canine reservoir. *Journal of Clinical Microbiology* 1989;27:2252–2257.

Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney International* 2004;66:1115–1122.

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

Ikeda-Garcia FA, Lopes RS, Ciarlini PC, Marques FJ, Lima VM, Perri SH, Feitosa MM. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science* 2007;83(1):105–108.

Jensen AL, Bomholt M, Moe L. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 2001;30:86–90.

Jüttner C, Rodriguez Sanchez M, Rollan Landeras E, Slappendel RJ, Fragió Arnold C. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Veterinary Record* 2001;149:176–179.

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

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M. Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick R, ed. *Canine Leishmaniasis: an Update. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain, Hoechst Roussel Vet, 1999.*p.26–31.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 1999;7(3):279–289.

Killick-Kendrick R. The life-cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: Killick-Kendrick R (Ed.). *Canine Leishmaniasis: Moving Towards a Solution*. Proceedings of the 2nd International Canine Leishmaniasis Forum. Sevilla, Spain, Intervet International BV 2002;p.57–68.

Koehler K, Stechele M, Hetzen U, Domingo M, Schonian G, Zahner H, Burkhardt E. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 2002;109:9–17.

Kontos VJ, Koutinas AF. Old World canine leishmaniasis. *Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1993;15:949–960.

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

Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2001;98:247–261.

Kuman HA, Altıntaş N. *Protozoon Hastalıkları*. Ege Üniversitesi Basımevi. İzmir;1996. p.79–100.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabberd E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40(1):210–215.

Lamothe J, Poujade A. Ulcerative glossitis in a dog with leishmaniasis. *Veterinary Record* 2002;151:182–183.

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

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

Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 2005;23(22):2825–2840.

Lemesre JL, Holzmuller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* 2007;25(21):4223–4234.

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

Lima WG, Oliveira PS, Caliari MV, Gonçalves R, Michalick MS, Melo MN, Tafuri WL, Tafuri WL. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b / CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;117:129–136.

Lipoldova M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Review Genetics* 2006;7:294–305.

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

Maia C, Cristovao J, Ramada J, Rolao N, Campino L. Diagnóstico da leishmaniose canina pela técnica de PCR aplicada a sangue periférico em papeis de filtro Resultados preliminares. *Veterinary Medicine* 2006;47:29–33.

Maia C, Gomesc J, Cristovao J, Nunes M, Martins A, Rebelo E, Campino L.. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology* 2010;174:336–340.

Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary Journal* 2009;179(1):142–144.

Majumder B, Biswas R, Chattopadhyay U. Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *International Journal of Cancer* 2002;97:493–500.

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

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

Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008;1149:358–360.

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

Manna L, Reale S, Vitale F, Pavone L, Gravino A. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimonite and allopurinol. *Veterinary Journal* 2007;177:279–282.

Manson Bahr PEC. Old World Leishmaniasis. In: Cox FEG (Ed.) *Illustrated History of Tropical Diseases*. The Wellcome Trust, London 1996;p.207–217.

Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'oorazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Veterinary Entomology* 2001;15(4):358–363.

Maroli M, Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglia E, Genchi C, Gramiccia M, Mortarino M, Pietrobelli M, Gradoni L. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Tropical Medicine and International Health* 2008;13(2):256–64.

Martínez–Moreno A, Moreno T, Martínez–Moreno FJ, Acosta I, Hernández S. Humoral and cell–mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995;48:209–220.

Martínez–Subiela S, Bernal LJ, Ceron JJ. Serum concentrations of acute–phase proteins in dogs with leishmaniasis during short–term treatment. *American Journal of Veterinary Research* 2003;64(8):1021–1026.

Martínez–Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record* 2002;150(8):241–244.

Martín–Sanchez J, Acedo C, Muñoz–Perez M, Pesson B, Marchal O, Morillas–Marquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Veterinary Parasitology* 2007;145(3–4):267–273.

Meredith S, Kroon N, Sondorp E, Seaman J, Goris M, Ingen C, Oosting H, Schoone G, Terpstra W, Oskam L. Leish–KIT, a stable direct agglutination test based on freeze–dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33:1742–1745.

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;43:5515–5519.

Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L, Ramis A. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniasis diseased dogs. *Research in Veterinary Science* 2008;85:35–38.

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

Mohebbi M, Hajjarian H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology* 2005;129(3–4):243–251.

- Mohebbali M, Taran M, Zaralı Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. *Veterinary Parasitology* 2004;121:239–245.
- Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Reueno JM, Soto M, Nieto CG, Alonso C. A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2003;92:1–13.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo J, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1994;88:491–493.
- Molina RL, Moreno J, Nieto J. Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Veterinary Therapy* 2001;2:261–267.
- Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives of Dermatology Syphilis* 1926;13:187–194.
- Moreira M, Luvizotto M, Garcia J, Corbett C, Laurenti M. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology* 2007;145:245–252.
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology* 2002;18(9):399–405.
- Moreno P, Lucena R, Ginel PJ. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1998;42:81–83.
- Moritz A, Prinzinger S, Bauer N. Die kanine viszerale leishmaniose: erregere, infektion, klinik, diagnose, therapie und prophylaxe– eine ubersicht. *Kleintierpraxis* 2001;46:533–547.
- Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. *Parasitologia* 2004;46:163–167.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366(9496):1561–1577.

Mylonakis ME, Rallis T, Koutinas AF, Leontides LS, Patsikas M, Florou M, Papadopoulos E, Fytianou A. Clinical signs and clinicopathologic abnormalities in dogs with clinical spirocercosis: 39 cases (1996–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2006;228:1063–1067.

Mylonakis ME, Saridomichelakis MN, Lazaridis V, Leontides LS, Kostoulas P, Koutinas AF. A retrospective study of 61 cases of spontaneous canine epistaxis (1998 to 2001). *Journal of Small Animal Practice* 2008;49:191–196.

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 leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2005;133:37–47.

Nejjar R, Lemrani M, Boucedda L, Amarouch H, Benslimane A. Variation in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in northern Morocco. *Revue de Medecine Veterinaire* 2000;151:841–846.

Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999;67(2):117–130.

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

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

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

Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2008;153(1–2):19–23.

Ok UZ, Balcioglu IC, Taylan Ozkan A, Ozensoy S, Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey. *Acta Tropica* 2002;84(1):43–48.

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

Oliva G, Scalone A, Manzillo F, Gramiccia M, Pagano A, Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:1318–1322.

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;16:187–191.

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

Overath P, Aebischer T. Antigen presentation by macrophages harboring intravesicular pathogens. *Parasitology Today* 1999;15:325–32.

Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P, Giger U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001;219:1076–1083.

Ozbel Y, Oskam L, Ozentoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Ozcel MA. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays.

Acta Tropica 2000;74(1):1–6.

Ozbel Y, Turgay N, Ozensoy S, Ozbilgin A, Alkan MZ, Ozcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oskam L, Abranches P. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniosis in the Mediterranean region. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995;89(1):89–93.

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

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

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

Özensoy Töz S, Korkmaz M, Balcıoğlu İC, Özbel Y, Ertabaklar H, Rastgeldi S. Karaburun ve Urla Bölgesinde Zoonotik Visseral Leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2002;26(3):234–238.

Palacio J, Liste F, Gascon M. Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1997;140:477–480.

Palacio J, Liste F, Gascon M. Urinary protein / creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1995;137:567–568.

Paltrinieri S, Solano–Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010;36(11):1184–1191.

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;104:227–237.

Papadopoulou C, Kostoula A, Dimitriou D, Panagiou A, Bobojianni C, Antoniadis G. Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. *Journal of Infection* 2005;50(1):53–60.

Pasa S, Bayramli G, Atasoy A, Karul A, Ertug S, Ozensoy Toz S. Evaluation of serum cystatin–C in dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Research Communication* 2009;33:529–534.

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

Paz GF, Ribeiro MF, de Magalhães DF, Sathler KP, Moraes MH, Fiúza VO, Brandao ST, Werneck GL, Fortes–Dias CL, 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.

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

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK, Lekkas S. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008;22:866–872.

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

Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis: a light–microscopic, immunohistochemical and electron–microscopic study. *Nephron* 1991;57:444–452.

- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology* 1991;105(3):279–286.
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 2003;52:23–28.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 2001;183(9):1421–1424.
- Ramiro MJ, Zárate JJ, Hanke T, Rodriguez D, Rodriguez JR, Esteban M, Lucientes J, Castillo JA, Larraga V. Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime–boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing lack. *Vaccine* 2003;21:2474–2484.
- Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as endogenous marker of the renal function—A Review. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 1999;37:389–395.
- Reithinger R, Davies CR. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. The 2nd International Forum on Canine Leishmaniasis. Spain. 2002.
- Rhalem A, Sahibi H, Guessous–Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology* 1999;81:173–184.
- Riera C, Valladares JE. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today* 1996;12(10):412.
- Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania*–host–cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today* 2000;16:292–297.
- Rodes D, Acena MC, Gascon M. Etude cytologique et biochimique du fer medullaire chez les chiens atteints de leishmaniose et sa relation avec des parameters sanguines et seriques. *Revue de Medecine Veterinaire* 1999;150:965–74.

Rodriguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Riera C, Gállego M, Portús M, Alberola J. Dynamics of Leishmania-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006;20(3):495–498.

Rodriguez-Cortes A, Fernandez-Bellon H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;116(3–4):190–198.

Rolao N, Cortes S, Rodrigues O, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by realtime polymerase chain reaction and polymerase chain reactionenzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology* 2004;90:1150–1154.

Romdane MN, Romdhane SB, Jemli MH, Metoui K. Profils electrophoretiques dans la leishmaniose canine. *Revue de Medecine Veterinaire* 1992;143:753–756.

Rosypal AC, Troy GC, Duncan RB, Zajac AM, Lindsay DS. Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005;19:802–809.

Rosypal AC, Zajac AM, Lindsay DS. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Veterinary Clinics of North America–Small Animal Practice* 2003;33:921–937.

Rougier S, Vouldoukis I, Fournel S, Peres S, Woehrle F. Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniosis: a pilot study. *Veterinary Parasitology* 2008;153(3–4):244–254.

Roura X, Sanchez A, Ferrer L. Follow-up of *Leishmania* infected dogs after treatment using a PCR technique. In: *Proceedings of the 14th Annual Congress ESVD-ECVD* 1997;p. 171.

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

Sabate Elias D, Homedes Beguer JM, Gomez-Ochoa P. Domperidone at a low dose for use in the treatment or prevention of disease associated with an alteration of the immun response. European Patent Application, Bulletin 2010/42; date of publication: 20.10.2010.

Sacchi L, Calvi LE, Kramer LH, Ferroglio E, Grandi G, Clementi E, Corona S. The intradermal leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression. Journal of Comparative Pathology 2006;135:17–24.

Saint-Andre Marchal I, Dezutter-Dambuyant C, Willett BJ, Woo JC, Moore PF, Magnol JP, Schmitt D, Marchal T. Infection of canine Langerhans cells and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. Revue de Medecine Veterinaire 1997;148:29–36.

Saldarriaga OA, Travi BL, Park W, Perez LE, Melby PC. Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. Vaccine 2006;24:1928–1940.

Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. Journal of Heredity 2005;96(7):755–758.

Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romao P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Veterinary Immunology Immunopathology 2002;88:21–30.

Saraiva EM, de Figueiredo Barbosa A, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, de Oliveira Mendes-Aguiar C, de Souza EP, Fampa P, Parra LE, Menz I, Dias JG Jr, de Oliveira SM, Palatnik-de-Sousa CB. The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. Vaccine 2006;24(13):2423–2431.

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

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

Semiao–Santos SJ, El Harith A, Ferreira E, Pires CA, Sousa C, Gusmao R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitology Research* 1995;81(3):235–239.

Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* 2009;47(6):412–423.

Shaw SE, Lerga AI, Williams S, Beugnet F, Birtles RJ, Day MJ, Kenny MJ. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Veterinary Record* 2003;152:176–177.

Sherlock I. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996;97:671–683.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in greater Athens area, Greece. *European Journal of Epidemiology* 1999;15:271–276.

Silva E, Gontijo C, Pirmez C, Fernandes O, Brazil R. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001;65:896–898.

Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN, Michalick MZM. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009;166:159–162.

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

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

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarter* 1988;10(1):1–17.

Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *The Journal of Immunology* 2000;164:3681–3688.

Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A, Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 2008;155(3–4):198–203.

Solano-Gallego L, Baneth G. Canine leishmaniosis—a challenging zoonosis. *European Journal of Companion Animal Practice* 2008;18:232–241.

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

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

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

Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by *fret*-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2007;147:315–319.

Soliman MF. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania* major in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 2006;97(2):146–50..

Strauss–ayali D, Baneth G. Canine visseral leishmaniasis. In “Recent Advances in Canine Infectious Diseases” 2000. Erişim: www.ivis.org. Document No. A0107.0300, [Electronic Journal].

Strauss–Ayali D, Jaffe C, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *Journal of Infectious Disease* 2004;189:1729–1733.

Strelkova MV, Eliseev LN, Ponirovskii EN, Erokhin PI, Rakitskaia TA, Valevich TA, Sysoev VV, Allenov VA, Adamishina TA, Dergacheva TI. The isoenzyme identification of *Leishmania* isolates taken from greater gerbils, sandflies and human patients in foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Turkmenistan. *Medical Parazitology (Mosk)* 1993;5:34–37.

Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002;9:951–958.

Symmers WS. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet* 1960;16(1):127–132.

Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de 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.

Tafuri W, Santos R, Arantes R, Gonc,alves R, Melo M, Michalick M, Tafuri W. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffinembedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods* 2004;292:17–23.

Teske E, van Knapen F, Beijer EG, Slappendel RJ. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Veterinaria Scandinavia* 2002;43(4):195–201.

The Merck Veterinary Manual. Hematologic Reference Ranges, <http://www.merckvetmanual.com>. Erişim Tarihi: 07 Temmuz 2011.

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;46:549–552.

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

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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2001;64:119–124.

Unat EK. Leyismanyaz'ların Tarihçesi. "Leishmaniasis". Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını;1981. p.1–9.

Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Veterinary Record* 1996;138(8):181–183.

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

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Record* 2000;146:698–703.

Vercammen F, Fernandez-Perez FJ, del Amo C, Alunda JM. Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Tropica* 2002;84(3):175-181.

Vinuelas J, García-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Mirón C, Carcelén J, Alonso C, Nieto CG. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2001;101:23–27.

Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular crosstalks in Leishmania–sandfly–host relationships. *Parasite* 2008;15(3):237–243.

Volf P, Ozbel Y, Akkafa F, Svobodova M, Votypka J, Chang KP. Sand flies (Diptera: Phlebotominae) in Sanliurfa, Turkey: relationship of *Phlebotomus sergenti* with the epidemic of anthroponotic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Medical Entomology* 2002;39(1):12–15.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L–arginine nitric oxide pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40:253–256.

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

World Health Organization. Leishmaniasis, <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>. Erişim Tarihi: 07 Temmuz 2011.

Xavier S, Andrade H, Haddad S, Chiarelli I, Lima W, Michalick M, Tafuri W. Comparison of paraffinembedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *Veterinary Research* 2006;2:17.

Yaşarol Ş, Sencer Ü. Ege’de kala–azar olayları ve rezervuarları üzerine araştırmalar. *Türk Hijyen Tecrubi Biyol Dergisi* 1964;24:298–305.

Zafra R, Jaber JR, Pérez–Ecija RA, Barragán A, Martínez–Moreno A, Pérez J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008;123:353–359.

Zaghloul IY, Al–Jasser M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2004;98(8):793–800.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Kayseri’de doğdum. İlkokul öğrenimimi Etlik İlkokulunda, ortaokulu öğrenimimi Yükseliş Koleji’nde, lise öğrenimimi ise Anıttepe Lisesinde Ankara’da tamamladım. 1997 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesine girerek 2002 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Programını kazanarak Anabilim Dalı araştırma görevlisi kadrosuna atandım. 2005 yılında yüksek lisansımı bitirdim. 2006 yılında doktora programına başladım. Halen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmakta olup, evli ve bir kız çocuğu babasıyım.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince ilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Serdar PAŞA'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, her konuda katkılarını esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA'ya, moleküler sonuçların elde edilmesinde ve yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ'e ve Sayın Prof. Dr. Yusuf ÖZBEL'e, serolojik sonuçların elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Hatice ERTABAKLAR'a, istatistik verilerin elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Aykut Göktürk ÜNER'e, özellikle tezin bitiş aşamasında göstermiş oldukları yardım ve sabırdan dolayı Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ, Doç. Dr. Kerem URAL'a ve Araştırma Görevlileri Sayın Mehmet Gültekin ve Sayın Gülten Emek TUNA'ya, tüm doktora ve yüksek lisans öğrencileri ile emeği geçen tüm öğrencilere teşekkür ederim.

Benim geçtiğim bu zorlu süreci sabırla bekleyen aileme, bu uzun süreçte beni yalnız bırakmadığı ve sonuna kadar desteklediği için hayat arkadaşım ve biricik eşim Sayın Tülay ATASOY'a, doktora tezimi hazırlarken dünyaya gelen küçücük bir bebekken bile en sıkıntılı anlarımda sıcaklığıyla bana mutluluk ve güç veren bir tanecik kızım İpek'e sonsuz teşekkürler.

EK 1. Domperidon ve Allopurinolün kombine olarak kullanıldığı sağaltım grubunun zamana göre hematolojik ve biyokimyasal sonuçları

Köpek	Zaman (Gün)	Tp (g/dl)	Alb (g/dl)	Glb (g/dl)	Üre (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	WBC (10 ⁹ /µl)	RBC (10 ¹² /µl)	PCV (%)	MCV (fL)	MCHC (pg)	PLT (10 ⁹ /L)
1	0	7.82	2.48	5.34	30.10	0.66	19.30	47.90	5.97	4.64	33.43	72.00	31.80	141.00
1	15	8.18	2.88	5.30	33.20	0.61	17.90	45.00	4.94	4.32	32.58	75.00	30.10	174.00
1	30	8.05	2.38	5.67	35.10	0.59	31.00	41.50	1.58	8.54	61.00	71.00	33.30	35.00
1	60	7.52	2.61	4.91	29.60	0.68	63.20	42.70	6.59	5.39	39.70	74.00	34.10	145.00
1	90	7.40	2.52	4.87	36.90	0.63	58.70	47.60	9.83	5.95	41.55	70.00	34.90	557.00
2	0	8.09	1.60	6.48	20.00	0.73	42.30	66.60	15.23	2.66	18.83	71.00	31.60	143.00
2	15	10.34	2.07	8.27	38.80	0.87	34.70	47.54	6.29	6.19	26.80	43.00	33.00	443.00
2	30	8.51	2.07	6.44	43.20	0.63	37.80	34.50	12.62	5.02	33.10	66.00	34.60	373.00
2	60	11.03	1.73	9.30	63.50	0.84	74.00	63.00	10.93	3.99	25.25	63.00	31.40	134.00
2	90	8.94	1.55	7.39	57.60	1.32	59.90	37.30	13.94	6.00	41.19	69.00	24.40	388.00
3	0	7.00	2.96	4.04	54.80	1.68	49.90	28.80	12.79	3.15	19.82	63.00	31.70	199.00
3	15	7.76	2.68	5.08	48.60	1.22	56.50	20.30	13.69	3.89	24.35	63.00	34.70	274.00
3	30	6.69	2.69	4.00	36.30	1.10	33.80	22.40	11.88	4.54	27.25	58.00	33.80	220.00
3	60	6.91	2.70	4.20	28.80	1.15	30.10	26.80	8.03	5.37	33.05	62.00	31.69	112.00
3	90	6.97	2.84	4.13	25.40	1.18	20.10	30.60	12.91	5.61	34.63	62.00	39.10	218.00
4	0	9.66	2.40	7.26	22.80	0.75	45.20	33.50	4.87	4.46	29.17	65.00	37.70	194.00
4	15	8.77	2.06	6.70	29.20	0.92	50.40	41.30	7.09	4.84	33.28	69.00	33.40	171.00
4	30	9.25	2.10	7.15	31.20	0.89	38.20	39.80	6.21	4.96	34.54	70.00	35.50	283.00
4	60	8.06	2.58	5.48	28.40	0.79	33.20	23.10	5.67	6.30	42.32	67.00	36.30	274.00
4	90	8.18	2.40	5.79	22.60	0.73	24.90	39.90	6.17	5.79	36.57	63.00	39.20	224.00
5	0	10.16	1.91	8.25	37.20	0.92	15.90	47.40	9.32	5.36	33.00	62.00	36.70	342.00
5	15	9.92	1.86	8.05	35.80	0.88	14.20	42.30	6.72	4.82	29.00	60.00	37.60	332.00
5	30	9.83	2.11	7.72	26.80	0.73	18.90	33.50	12.97	7.87	38.00	69.00	32.60	297.00
5	60	10.82	2.45	8.37	25.30	1.02	27.30	51.90	7.91	4.72	30.82	65.00	36.70	317.00
5	90	11.21	2.47	8.74	23.20	1.06	24.90	39.40	5.14	6.49	43.09	66.00	31.70	326.00
6	0	5.76	3.10	2.66	25.70	1.02	44.40	25.80	8.53	6.52	42.24	65.00	36.80	296.00
6	15	6.20	3.09	3.11	23.80	0.92	38.70	24.20	9.69	6.17	41.83	68.00	35.20	296.00
6	30	5.76	2.99	2.77	36.40	0.87	35.40	21.70	9.59	5.80	39.22	68.00	37.30	291.00
6	60	6.18	3.20	2.97	32.00	0.92	60.80	22.70	7.78	6.16	44.56	72.00	34.50	297.00
6	90	5.76	3.14	2.62	27.60	0.79	68.20	22.30	7.97	6.26	43.26	69.00	35.80	298.00
7	0	10.38	2.12	8.26	27.90	0.87	46.10	92.10	14.47	5.19	35.74	69.00	31.00	283.00
7	15	2.60	1.25	1.35	20.00	0.70	30.60	59.70	11.31	5.68	36.60	64.00	33.50	406.00
7	30	7.05	2.32	4.73	20.00	0.72	36.40	44.30	5.44	8.18	52.96	65.00	33.40	259.00
7	60	8.06	2.52	5.54	26.40	0.93	68.10	37.30	8.02	6.46	42.31	65.00	33.40	385.00
7	90	8.91	2.59	6.32	25.20	0.87	33.70	28.40	9.23	6.57	46.40	66.00	33.20	367.00
8	0	6.19	1.46	4.73	235.00	6.62	16.30	42.30	15.40	2.08	14.87	72.00	30.10	201.00
8	15	6.06	1.52	4.54	131.00	3.65	19.50	35.90	17.68	3.24	21.52	66.00	30.5	431.00
8	30	5.07	1.40	3.68	88.70	2.94	13.30	25.50	13.13	2.89	18.27	63.00	34.60	308.00
8	60	4.02	1.64	2.38	90.30	3.13	10.40	26.60	12.97	2.99	18.36	61.00	34.90	258.00
8	90	5.92	1.15	4.78	78.00	2.68	16.10	28.70	15.75	3.87	23.00	66.00	36.60	223.00
9	0	6.03	2.02	4.01	67.60	0.51	84.60	66.20	10.27	6.58	40.24	61.00	35.10	158.00
9	15	5.75	1.53	4.22	58.20	0.63	66.40	71.40	11.59	6.22	40.27	65.00	32.80	327.00
9	30	6.64	1.88	4.76	38.50	0.60	47.30	49.10	6.95	5.05	32.51	64.00	34.10	168.00
9	60	5.95	1.73	4.22	50.10	0.60	39.00	51.20	8.05	6.68	42.04	62.00	32.50	225.00
9	90	6.88	1.99	4.89	38.60	0.78	27.90	34.60	6.51	6.88	44.07	64.00	34.40	523.00

EK 2. Allopurinolün tek başına kullanıldığı sağıltım grubunun zamana göre hematolojik ve biyokimyasal sonuçları

Köpek	Zaman (Gün)	Tp (g/dl)	Alb (g/dl)	Glb (g/dl)	Üre (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	ALT (U/L)	AST (U/L)	WBC (10 ⁹ /µl)	RBC (10 ¹² /µl)	PCV (%)	MCV (fL)	MCHC (pg)	PLT (10 ⁹ /L)
1	0	8.69	2.48	6.21	65.20	1.26	28.40	43.20	16.40	7.32	50.16	69.00	32.70	269.00
1	15	7.48	2.21	5.28	61.10	1.12	42.10	66.50	13.63	5.65	39.10	69.00	32.70	260.00
1	30	7.59	2.31	5.28	70.50	1.12	59.20	60.40	12.75	5.68	40.73	72.00	34.20	288.00
1	60	7.04	2.00	5.04	43.70	1.33	40.40	47.50	10.07	5.66	38.86	69.00	32.40	466.00
1	90	8.09	2.39	5.70	55.20	1.23	37.80	55.90	12.07	5.75	37.90	66.00	37.20	388.00
2	0	9.20	1.28	7.92	216.00	2.08	79.90	221.00	16.01	4.68	28.00	69.00	32.00	266.00
2	15	8.87	1.60	7.27	193.00	2.01	81.20	183.00	15.80	4.25	29.00	68.00	33.00	308.00
2	30	8.48	1.36	7.12	163.00	1.98	73.20	198.00	16.69	5.01	27.00	69.00	32.00	278.00
2	60	8.02	1.43	6.59	170.00	1.80	68.10	183.00	14.70	5.60	26.00	68	33.00	266.00
2	90	8.53	1.58	6.96	152.00	1.92	68.20	169.00	15.50	4.90	28.00	71.00	33.00	251.00
3	0	5.86	1.68	4.18	185.10	2.19	153	65.30	11.57	3.79	28.02	74	34.6	150.00
3	15	6.43	1.71	5.02	191.00	5.63	183.64	129.30	31.39	3.43	23.88	70.00	30.40	277.00
3	30	7.91	1.05	6.51	147.00	4.32	158.40	132.90	22.30	3.55	24.65	71.00	31.20	214.00
3	60	7.07	0.47	5.46	127.00	4.38	121.20	144.00	23.40	3.01	21.00	74.00	30.80	198.00
3	90	6.26	0.28	4.64	155.00	3.47	147.80	134.00	14.01	3.28	21.89	72.00	30.50	201.00
4	0	8.52	1.06	7.45	21.80	1.12	37.80	20.07	10.80	6.10	40.08	62.00	35.20	188.00
4	15	9.76	1.09	8.67	34.20	1.04	40.20	28.70	9.87	5.80	44.10	63.00	35.90	201.00
4	30	8.99	1.01	7.98	37.50	0.85	15.80	17.60	9.56	5.30	44.00	63.00	34.20	178.00
4	60	8.12	1.44	6.68	40.20	1.01	27.80	20.80	10.20	5.98	46.00	62.00	35.00	228.00
4	90	9.14	1.52	7.62	49.90	0.97	39.00	33.00	14.24	4.60	37.00	63.00	33.50	179.00
5	0	7.64	2.11	5.53	20.30	1.21	26.80	44.40	18.92	6.58	42.90	65.00	34.40	512.00
5	15	7.26	2.08	5.18	52.40	1.12	25.80	32.10	19.15	5.88	39.30	63.00	32.00	445.00
5	30	7.24	2.29	4.95	47.40	0.96	31.50	38.40	17.50	6.50	40.70	37.00	30.00	339.00
5	60	7.09	2.67	4.43	27.60	1.08	27.60	40.20	18.98	6.30	37.00	41.00	30.00	275.00
5	90	6.33	2.45	3.88	43.70	0.78	19.70	27.40	16.50	5.10	42.00	40.00	32.00	387.00
6	0	6.27	1.88	4.39	18.60	1.41	22.10	21.60	14.78	6.30	39.00	62.00	31.00	199.00
6	15	6.86	1.73	5.13	22.80	1.22	27.20	34.80	15.25	5.98	42.30	60.00	32.00	229.00
6	30	6.75	1.45	5.3	25.20	1.38	32.40	20.10	13.50	6.20	45.90	63.00	34.00	356.00
6	60	6.77	2.24	4.53	22.70	1.13	25.20	33.30	15.81	6.49	41.29	64.00	36.10	237.00
6	90	6.93	2.18	4.81	28.50	1.07	26.30	28.60	12.60	5.80	45.60	62.00	34.00	264.00
7	0	8.66	1.21	7.45	105.00	1.37	49.80	31.60	10.58	3.35	20.80	62.00	35.80	335.00
7	15	10.41	1.17	9.24	97.00	0.75	39.20	32.20	10.87	3.62	22.26	59.00	37.10	412.00
7	30	10.26	1.09	9.17	98.30	1.10	35.20	27.40	9.68	3.89	25.60	65.00	33.00	289.00
7	60	10.11	1.27	8.84	78.10	1.02	32.70	36.30	8.10	4.42	30.01	68.00	35.10	309.00
7	90	10.38	2.12	8.26	73.50	1.03	29.40	32.70	9.05	4.56	32.50	65.00	34.00	279.00
8	0	7.85	1.80	6.05	224.00	1.04	30.60	67.80	5.03	3.56	25.90	68.00	36.50	512.00
8	15	9.14	2.10	7.04	116.00	1.28	61.40	74.30	6.60	3.64	25.44	70.00	35.40	442.00
8	30	7.09	2.18	4.91	106.00	1.06	41.50	55.90	6.32	3.66	27.60	69.00	36.00	477.00
8	60	6.98	1.01	5.97	58.00	1.12	37.80	40.00	10.40	4.69	32.14	69.00	34.50	622.00
8	90	8.28	1.99	6.29	55.00	0.98	36.50	41.20	9.60	4.98	34.10	68.00	35.20	598.00