

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

**CANİNE VİSCERAL LEİSHMANİASİS' İN FARKLI
EVRELERİNDE KONVENSİYONEL RUTİN KOAGÜLASYON
PROFİLİ İLE D-DİMER KONSANTRASYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**SERKAN ÖZKAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kerem URAL**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-15063 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Serkan ÖZKAN tarafından hazırlanan "Canine Visceral Leishmaniasis' in farklı evrelerinde konvensiyonel rutin koagülasyon profili ile D-dimer konsantrasyonunun değerlendirilmesi" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

20/12/2016

İMZA

Üye (T.D.): Prof. Dr. Kerem URAL, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Serdar PAŞA, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Erdoğan UZLU, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamda; ilgi, bilgi ve yardımını her daim yoğun Şekilde gösteren danıőmanım Prof. Dr. Kerem URAL' a

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA, Prof. Dr. Serdar PAŞA, Prof. Dr. Bülent ULUTAŐ ve Yrd. Doç. Dr. Hasan ERDOğAN' a

Çalışmada elde edilen verilerin istatistik analizlerinin yapılmasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Hasan ERDOğAN' a

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisinden faydalandığım ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiő oldukları hoőgörü ve sabırlarından dolayı İç Hastalıkları Anabilim Dalı Araştırma görevlileri, doktora ve yüksek lisans öğrencileri arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve bana her zaman destek olan arkadaşlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Etiyoloji	5
2.2. Epidemiyoloji	10
2.3. Patogenezis	13
2.4. Klinik Bulgular	16
2.4.1. Erken Dönem.....	19
2.4.2. Patent Dönem	19
2.4.3. Son Dönem	20
2.4.4. Canine viseralleishmaniasis'in kronik formları	21
2.4.4.1. Genel bulgular	21
2.4.4.2. Kutanöz Belirtiler	21
2.4.4.3. Oküler belirtiler	22
2.4.4.4. Non-Spesifik Belirtiler	22
2.4.4.5. Organlardaki Lezyonlar	24
2.5. Tanı.....	26
2.6. Sağaltım.....	31
2.7. Korunma	32
2.7.1. Aşılama.....	33
2.7.1.1. Leishmune®	33
2.7.1.2. Leish-Tec®.....	33
2.7.1.3. Canileish® (LiESP/QA-21)	33

2.7.2. İnsektisitli tasmaların kullanımı	34
2.7.3. Vektör Kontrolü.....	34
2.8. CVL ile hemostazis arasındaki ilişki	35
2.8.1. Koagülasyon mekanizması.....	37
2.8.2. Protrombinin trombine dönüşümü.....	38
2.8.3. FIB' in fibrine dönüşümü-pıhtı oluşumu.....	39
2.8.4. Fibrin oluşumunda trombinin FIB' e etkisi	39
2.8.5. Pıhtı Retraksiyonu	39
2.8.6. Pıhtı oluşumunun kısır döngüsü	40
2.8.7. Pıhtının başlaması; protrombinin aktivatörünün yapımı	40
2.8.8. Koagülasyonun başlamasında ekstrinsek yol.....	41
2.8.9. Koagülasyonun başlamasında intrinsek yol.....	41
2.8.10. Kalsiyumu iyonlarının koagülasyondaki rolü	43
2.8.11. Ekstrinsek ve intrinsek yollar arasındaki etkileşim ile koagülasyon mekanizmasının özeti.....	43
2.8.12. Primer Hemostazis.....	43
2.8.13. Sekonder Hemostazis	44
2.9. Hemostatik bozukluk testleri	45
2.9.1. Trombosit Sayımı	45
2.9.2. Aktive Edilmiş Parsiyel Tromboplastin Süresi (APTT).....	46
2.9.3. Protrombin Süresi (PT).....	46
2.9.4. D-dimer.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması	49
3.2. Evrelendirmeye yönelik laboratuvar analizleri	51
3.3. Hemostatik profil ve ilişkili analizler	52
3.3.1. Mikrokoagülometre test prosedürü.....	52
3.3.2. D-dimer Seviyesinin Belirlenmesi	57
3.4. İstatiksel Analizler.....	58
4. BULGULAR	59
4.1. Olgulara Ait Demografik Bulgular.....	59
4.2. Olgulara Ait Klinik Bulgular.....	61
4.3. Olgulara Ait Laboratuvar Bulguları	64
4.3.1. Hematolojik analizler	64

4.3.1.1. IFAT bulguları.....	64
4.3.1.2. Serum biyokimyasal bulgular	64
4.3.1.3. İdrarda protein/kreatinin bulguları	66
4.3.1.4. Koagülasyon bulguları.....	67
5. TARTIŞMA.....	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR.....	84
EKLER	109
ÖZGEÇMİŞ.....	110



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
A/G protein	: Albumin/globulin oranı
AF	: Atrial Fibrilasyon
ALB	: Albumin
ALT	: Alanin amino transferaz
APC	: Aktive protein C
APTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
BMBT	: Bukkal mukozal kanama zamanı
C1	: Kompleman 1
C2	: Kompleman 2
C4	: Kompleman 4
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat
CREA	: Kreatinin
CVL	: Canine Visceral Leishmaniasis
DIC	: Dissemine intra vasküler koagülopati
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DPP	: Tek kullanımlık çift yol platformları
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzim bağlı immunosorbent assay
EPR-1	: Efektör hücre proteinaz reseptör-1
EPRC	: Endotelyal hücre protein C
FDPs	: Fibrin yıkımlanma ürünleri
FIA	: Fluoroimmunoassay
FIB	: Fibrinojen
FIX	: Faktör IX
FML	: Fruktoz-manozligand
FVa	: Aktif faktör V
FVIIa	: Aktif faktör VII
FVIII	: Faktör VIII

FVIIIa	: Aktif faktör VIII
FX	: Faktör X
FXa	: Aktif FX
FXI	: Faktör XI
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HMWK	: Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen
ID	: Kimlik
IFAT	: İndirekt Floresans Antikor Tekniği
IgG	: İmmuno globülin G
IL-6	: İnterlöykin-6
IRIS	: Uluslararası Nefroloji Derneği
İPK	: İdrarda protein/kreatinin oranı
kDa	: Kilodalton
<i>L. infantum</i>	: <i>Leishmania infantum</i>
LAMP	: Döngü ortamlı izotermal amplifikasyon
LiESAp	: <i>L. infantum</i> promastigotlarının süpernatant aşısı kültürü
M	: Metre
MDP	: Muramyl dipeptid
mg/dL	: Miligram/desilitre
mg/L	: Miligram/ Litre
MHC	: Majör histokompatibilite kompleksi
Min-maks	: minimum-maksimum
mm	: Milimetre
m-OSPT	: Modifiye tek aşamalı protrombin zamanı
NO	: Nitrik oksit
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PAR	: Proteaz aktive reseptörleri
PCR	: Polimerize zincir reaksiyonu
PGI₂	: Prostaglandin I ₂
pH	: Hidrojen konsantrasyon kologaritması
PT	: Protrombin zamanı
sn	: Saniye
TF	: Doku faktörü

TP	: Total protein
tPA	: Plazminojen aktivatörü
TT	: Trombin zamanı
USG	: Ultrasonografi
vb	: Ve benzeri
VL	: Visceral leismaniasis
vWf	: von Willebrand faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YDPB	: Yaygın damar içi pıhtılaşma bozukluğu
ZM-1	: Zymodem-1
α_2AP	: α_2 - antiplazmin
μL	: Mikro litre
γ- globülin	: Gamma globulin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Memeli konakçıda ve kum ineklerindeki <i>Leishmania infantum</i> ' un yaşam döngüsü	7
Şekil 2. Leishmania etkenlerinin sınıflandırılması	10
Şekil 3. Canine leishmaniasis' in genel epidemiyolojik döngüsü.....	13
Şekil 4. Koagülasyon, yangısal reaksiyon ve vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye yönelik şema	35
Şekil 5. Yangısal reaksiyonlarla koagülasyon arasındaki ilişkinin farklı aşamalarına yönelik şema.....	37
Şekil 6. Pıhtılaşma Mekanizması	42

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Canine leishmaniasis' in küresel dağılımı	3
Resim 2. Canine leishmaniasis' in Türkiye' deki bölgelere göre dağılımı	3
Resim 3. Kum sineği	4
Resim 4. İnsanlarda leishmaniasisin değişen klinik görünümü	4
Resim 5. Elektron mikroskobu ile makrofaj sitoplazması içinde görünen Leishmania amastigot formu.....	8
Resim 6. Köpekte leishmaniasis' e bağlı gelişen nodüler deri lezyonları.....	14
Resim 7. Dorsal bölgede deride hiperkeratozis ve burun ucunda hiperkeratozis olgusu.....	23
Resim 8. Aynı olguda ülseratif dermatitis ve keratokonjunktivitis.....	23
Resim 9. CVL' li bir köpekte onikogrifozis.....	24
Resim 10. (1) <i>Leishmania sp.</i> ile enfekte köpekte kaşeksi, ekfoliyatif dermatitis ve birkaç kemik çıkıntılarının üzerinde yaygın ve hipotrikhotik ekfoliyatif dermatit ve ülserasyonlar (2) Yüzde ve kulaklarda ekfoliyatif dermatitis (3) Çene derisinde ülserasyon ve plak oluşumu (4) Ön bacaklarda aşırı tırnak uzaması (Onikogrifozis) ve multifokal derin stafilokok piyoderma (5) Nodüler ve ülseratif blefaritis, purulent konjunktivitis ve korneal opasite ve neovaskularizasyon ile anterior üveitis (6) Kronik miyozitis nedeniyle temporal kaslarda şiddetli ve simetrik atrofi.....	25
Resim 11. CVL' li bir köpekte (A) pododermatitis, onikogrifozis, paronişi (B) Göz kapaklarında granülamatöz lezyonlar ve kornealopasite.....	26
Resim 12. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D' da mevcut Beijing Precil 4 kanallı yarı otomatik koagülometre cihazı.....	52
Resim 13. PT reaktifi.....	53
Resim 14. Trombin reaktifi ve Imidazole saline buffer.....	54
Resim 15. APTT ve PT reaktifleri, kalsiyum klorid solüsyonu.....	56
Resim 16. Wondfo Finecare FIA meter cihazı.....	58
Resim 17. Evre I' e ait olguda ön bacakta bilek eklemi üzerinde deri lezyonu.....	62
Resim 18. CVL' li olguda (A) kulak ucu dermatozu, (B) kulak kepçesinin içerisinde ve (C) bukkal mukozada hiperemi mevcut.....	62
Resim 19. Evre III' e ait bir olguda baş bölgesinde deri lezyonları ve gözlerde üveitis.....	62

Resim 20. Evre IV' e ait bir olguda epistaksis.....	63
Resim 21. CVL' li evre III ' e ait köpekte kulak ucu nekrozu.....	63
Resim 22. CVL' li evre II' ye ait köpekte üveitis.....	63



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>L. infantum</i> ' un neden olduğu canine leishmaniasisin bazı klinik ve laboratuvar bulguları.....	18
Tablo 2. CVL tanısı için kullanılan bazı tekniklerin avantajları ve kullanımını sınırlayan durumlar.....	30
Tablo 3. Hemostatik test profillerinin yorumlanması.....	48
Tablo 4. CVL' de evreleme.....	50
Tablo 5. Projede izlenecek laboratuvar yöntemleri.....	51
Tablo 6. Projedeki olguların demografik bilgileri.....	60
Tablo 7. Hasta gruplardaki belirtilen klinik bulguları gösteren olgu sayısı	61
Tablo 8. Çalışmadaki gruplara ait IFAT analiz (titre) sonuçları.....	64
Tablo 9. Proje kapsamındaki CVL ile enfekte köpeklerin gruplara göre albumin, kreatinin ve total protein (minimum-maksimum) değerleri.....	65
Tablo 10. Çalışmadaki gruplara ait İPK bulguları.....	66
Tablo 11. Koagülasyon parametrelerinin olgu sayısı bazında değerlendirilmesi.....	67
Tablo 12. Projedeki CVL ile enfekte köpeklerin gruplara göre koagülasyon değerlerinin karşılaştırılması.....	68

ÖZET

CANİNE VİSCERAL LEİSHMANİASİS' İN FARKLI EVRELERİNDE KONVENSİYONEL RUTİN KOAGÜLASYON PROFİLİ İLE D-DİMER KONSANTRASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZKAN S. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Bu çalışmada Canine Visceral Leishmaniasis' in farklı evrelerinde trombozise zemin hazırlayan koagülasyon eğiliminin D-dimer düzeyleri ve konvansiyonel rutin koagülasyon profilinin ölçülerek belirlenmesi amaçlandı.

Araştırmanın hayvan materyalini 28' i CVL' li, 7' si sağlıklı olmak üzere beş gruba ayrılan toplam 35 köpek oluşturdu. CVL tanısı, hastalıkla uyumlu klinik bulgulardan bir ya da birkaçını gösteren köpeklerin hızlı ELISA prensibiyle çalışan test kitlerive IFAT analizleri ile konuldu. VL tanısı konulan köpekler serolojik, klinik bulgular ile hematolojik ve biyokimyasal bulgular temelinde Leishvet Grubu tarafından bildirilen şekilde evrelendirilerek 4 farklı gruba (her grupta n=7) ayrıldı. Bu bağlamda araştırma grupları;

- 1. Grup:** Evre I (Hafif şiddetli olgular)
- 2. Grup:** Evre II (Orta şiddetli olgular)
- 3. Grup:** Evre III (Şiddetli olgular)
- 4. Grup:** Evre IV (Çok şiddetli olgular)
- 5. Grup:** Sağlıklı kontrol şeklinde belirlendi.

Evrelerine göre gruplandırılan CVL' li ve sağlıklı köpeklerin alınan kan örneklerinde evrelemeye ilişkin hematolojik ve biyokimyasal parametreler, idrar örneklerinde protein/kreatinin oranları ile D-dimer konsantrasyonu ve konvansiyonel rutin koagülasyon profili (APTT, PTT, FIB) ölçüldü. Çalışmada elde edilen sayısal veriler, dağılımlarının kontrolünü takiben uygun parametrik veya non-parametrik testlerle gruplararası karşılaştırma (ANOVA) ve parametrelerin ilişkisi ile değerlendirildi.

Serum albumin düzeyleri (minimum-maksimum) sırasıyla evre I-IV ile enfekte CVL' li olgularda 2-2.86 mg/dL (evre I); 1.84-3.16 mg/dL (evre II); 1.3-2.76 mg/dL (evre III); 1.3-2.1 mg/dL (evre IV) ve 2-2.5 mg/dL (sağlıklı kontrol grubu) olarak saptandı. Serum kreatinin düzeyleri ele alındığında (minimum-maksimum) evre I, 0.44-1.3 mg/dL; evre II, 0.48-1.3

mg/dL; evre III, 0.6-2.3 mg/dL; evre IV, 0.6-2.6 mg/dL ve sağlıklı kontrol grubunda ise 0.4-0.8 mg/dL olarak saptandı. Serum total protein düzeyleri sırasıyla evre I-IV ile enfekte CVL'li olgularda (minimum-maksimum) 2.8-8.3 mg/dL (evre I); 5.4-6-8 mg/dL (evre II); 3.86-6.22 mg/dL (evre III); 5.2-8.9 mg/dL (evre IV) ve 3.6-5.8 mg/dL (sağlıklı kontrol grubu) olarak saptandı.

Ortama APTT değerleri arasında sağlıklı grup ile evre IV grubu arasında istatistiksel bir fark olduğu (p=0.009) saptandı. PT ve FIB değerleri açısından gruplar arası farklılık yoktu. D-dimer düzeyleri açısından yapılan değerlendirmede sağlıklı grup ile evre III ve evre IV grupları arasında istatistiksel olarak belirgin farklılık olduğu (p=0.009) saptandı.

Anahtar Kelimeler: Canine Visceral Leishmaniasis, evre, koagölasyon, profil



ABSTRACT

THE EVALUATION OF CONVENTIONAL ROUTINE COAGULATION PROFILE AND D-DIMER CONCENTRATION IN DIFFERENT STAGES OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

Özkan S. Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences Internal Medicine (Veterinary) Programme Master of Science Thesis, Aydın, 2017.

In the present the aim was to determine the D-dimer levels of coagulation tendency, which provides a basis for thrombosis in different stages of Canine Visceral Leishmaniasis and profile of conventional routine coagulation by testing.

The animal material of the study consisted of a total 35 dogs, enrolled into five groups, 28 of which were with CVL and 7 healthy. CVL diagnosis was based on one or more clinical findings attributable to the disease subjected to rapid ELISA test kits and IFAT analyses. The dogs diagnosed with VL were classified into 4 different groups (n=7 in each group) established by Leishvet Group based on serological, clinical findings within haematological and to those of serum biochemical findings,

By this context, research groups were determined as;

- 1. Group:** Stage I (Mild Cases)
- 2. Group:** Stage II (Moderate Cases)
- 3. Group:** Stage III (Severe Cases)
- 4. Group:** Stage IV (Very Severe Cases)
- 5. Group:** Healthy Control

To those of classified dogs with CVL, obtained blood samples were subjected to haematological and biochemical parameters, protein/creatinine ratios in urine samples, D-dimer concentration and conventional routine coagulation profile (APTT, PTT and fibrinogen) were measured. The numeric data obtained in this study were checked for distribution were subjected to parametric or non-parametric tests (ANOVA) for intergroup comparison.

The levels of serum albumine (minimum-maximum) were detected as 2- 2.86 mg/dL (stage I); 1.84-3.16 mg /dL (stage II); 1.3-2.76 mg/dL (stage III); 1.3-2.1 mg/dL (stage IV) in CVL infected cases, respectively and 2-2.5 mg/dL in healthy control group. Taking into account serum creatinin elevels (minimum-maximum) were determined as 0.44-1.3 mg/dL in stage I;

0.48-1.3 mg/dL stage II; 0.6-2.3 mg/dL stage III; 0.6-2.6 mg/dL stage IV and 0.4-0.8 mg/dL in healthy control group. Serum total protein levels were detected as respectively from stage I to IV in infected CVL cases (minimum-maximum) 2.8-8.3mg/dL (stage I); 5.4-6.8 mg/dL (stage II); 3.86-6.22mg/dL (stage III); 5.2-8.9 mg/dL (stage IV) and 3.6-5.8 mg/dL (healthy control group) were determined.

Regarding mean APTT values there was a statistical difference among healthy group and stage IV ($p=0.009$) cases. There was no difference among groups in terms of PT and Fibrinogen values. Conducting D-dimer levels, there was a statistically significant difference determined among healthy group within stage III and stage IV infected dogs ($p=0.009$).

Key Words: Canine Visceral Leishmaniasis, stage, coagulation, profile



1. GİRİŞ

Canine Visceral Leishmaniasis etkeni olan *Leishmania infantum* potansiyel mortalite sebebi olduğundan, ayrıca insanlara bulaşma özelliğinden ötürü önemli bir hastalıktır. İnsan ve hayvanlarda neden olduğu hastalıkların geniş bir yelpazenin bir parçasıdır, kum sinekleri tarafından bulaştırılan intraselüler protozoon olan Leishmania genusu içerisinde bulunan bir etkidir. İnsanlardaki leishmania türlerinin neden olduğu hastalıklar arasında kutanöz, mukokutanöz ve visceral leishmaniasis vardır, visceral leishmaniasis son ve en ağır formudur (Solano–Gallego ve ark, 2016).

Kronik ve genellikle ölümcül seyreden leishmaniasis, insan, köpek ve diğer memelilerin protozoal bir hastalığıdır (Gönül ve ark, 2002; Ashutosh ve ark, 2007). *Leishmania* cinsi protozoonlar memeli konakta hücre içinde yaşayan parazitler olup, insanlarda iç organları (Visceral Leishmaniasis) veya deriyi tutabilen (Kutanöz Leishmaniasis) çok farklı klinik semptomlarla seyreden farklı hastalıklara neden olabilmektedirler (Turgay ve ark 2006; Ashutosh ve ark, 2007). Doğada kertenkelelerde ve memelilerde görülen hastalığın insan dışında en yaygın görüldüğü memeli olarak köpeklerdir. Köpekler, klinik olarak hastalığa yakalanmalarının yanı sıra insanlar başta olmak üzere diğer memeliler için hastalığın rezervuarı olması açısından da önem taşımaktadır. Hastalık köpeklerde ölüme kadar giden ciddi problemlere yol açmaktadır (Zuckerman, 1977; Abranches, 1991).

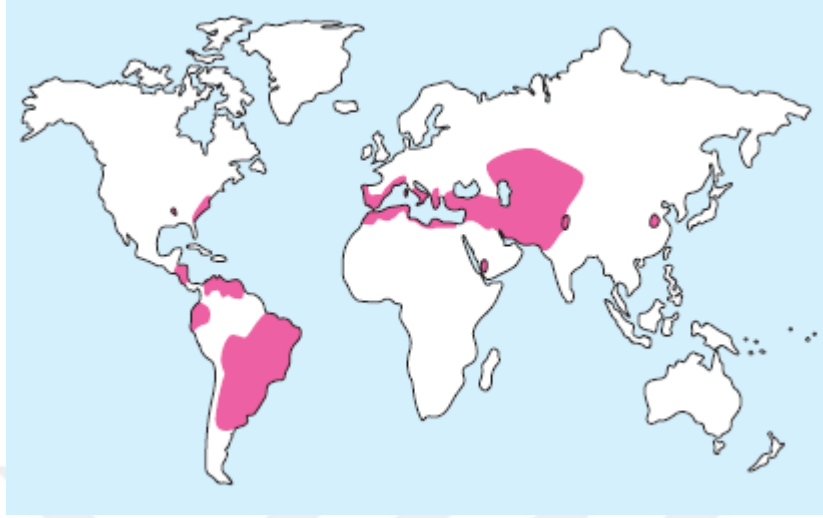
Leishmaniasis günümüzde insanlarda ve hayvanlarda oluşturmuş olduğu hastalık açısından birbirine benzer bir tablo ile öne çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından zoonoz, sağaltım gerçekleştirilemediğinde şiddetli ve ölümlü seyreden önemli alarm veren aciller arasında gösterilen Visceral Leishmaniasis güncel verilerle neredeyse 90 ülkede tespit edilmiş, 200 milyon insanın risk altında olduğunu göstermektedir. Yılda 2 milyona yakın sayıda yeni birey bu hastalığa yakalanmaktadır (Web-1; Candido ve ark, 2008).

Visceral leishmaniasis içerisinde değerlendirilen zoonotik leishmaniasiste köpekler, insanlar için hastalığın rezervuarlarıdır. Anthroozoonotik leishmaniasiste kum sinekleri tarafından bulaşma olmadan ve herhangi bir hayvan rezervuarının belirgin katılımı olmadan enfekte insanlar diğer insanlar için hastalık rezervuarı oluşturmaktadır. Zoonotik leishmaniasis enfeksiyonunun nedeni *Leishmania infantum*' iken, anthroozoonotik enfeksiyonunun nedeni *leishmania donovani*, çoğunlukla Hindistan ve Doğu Afrika'da gözlemlenir. İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV) pozitif ve bağışıklık sistemi baskılanmış

genç hastalarda (çocuklarda) leishmania enfeksiyonu önemli bir risk oluşturur. Yerli köpekler *leishmania infantum* enfeksiyonunun ana rezervuarı olarak kabul edilir. Siyah sıçan, tavşan, tilki ve çakal gibi yabancı memeli popülasyonları arasındaki enfeksiyon Akdeniz havzasında ve Güney Amerika' da rapor edilmiştir ve ayrıca bu durum, bu bölgelerde *L. infantum* enfeksiyonunun epidemiyolojisinde rol oynayabilir. Güney Avrupa, Kuzey ve Orta Afrika, Orta Doğu, Çin ve Güney ve Orta Amerika da dahil olmak üzere dünyanın tropik, subtropik ve ılıman bölgelerinde *leishmania infantum*' un bulaşması gözlenir (Solano-Gallego ve ark, 2016).

Kuzey Afrika (Resim 1), Türkiye (Resim 2) ve Avrupa ve gibi farklı ve çeşitli coğrafyada hastalığa neden olan etken *Leishmania infantum* (*L. infantum*)' dur (Slappendel ve ark,1998; Molano ve ark, 2003; Gramiccia ve Gradoni, 2005). Neotropik ekolojinin mevcut olduğu bölgelerde hastalığa neden olan etken ise *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*)' dir (Baneth ve ark, 2008). Türkiye' de Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) için çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda farklı illerde %3-%36 arası oranda seropozitiflik bildirilmiştir (Coşkun ve ark, 1997). CVL' in Ege Bölgesinde dağılımına dair yapılan araştırmalarda %1,6 ile %28,26 arasında değişen oranlar belirlenmiştir. Manisa' da sokak köpeklerinde % 3,6 - %19 (Özbel ve ark, 2000), İzmir'de % 23 - %27 (Özensoy Toz ve ark, 2005), Aydın ve İzmir' de %3,2 (Voyvoda ve ark, 2004) seroprevalans tespit edilmiştir. Aydın iline bağlı Kuşadası ilçesinde 109 köpeğin 10' un da IFAT ve rK39 ELİSA testleri ile seropozitivite dikkati çekmektedir (Özensoy-Töz ve ark, 2002). Yine Kuşadası ilçesinde asemptomatik köpeklerde yapılan çalışmada %23 seropozitivite tespit edilmiştir (Keskin-Kürklü 2011). Atasoy ve ark (2010) Ege bölgesinde İzmir/Selçuk, Aydın, Aydın/Kuşadası, Manisa/Turgutlu, Muğla/Bodrum, Muğla/Marmaris gibi farklı coğrafyalarda 300 sokak köpeğinden 27' sinde (% 9) seropozitiflik saptamışlardır. Kedilerde son 20 yılda yapılan çalışmalar sonucu Leishmania enfeksiyonunun hem deri hem de sistemik olarak çeşitli bozukluklarına yol açtığı bildirilmektedir (Baneth ve Shaw, 2002). Evcil kedilerde *L. infantum*' un neden olduğu doğal enfeksiyonlar köpeklere oranla daha az görülmektedir. Köpeklerde Leishmania enfeksiyonu için endemik olan bölgelerde subklinik kedi enfeksiyonları yaygındır, fakat *L. infantum* nedeniyle oluşan klinik tabanlı enfeksiyon nadiren görülmektedir. Serolojik ve moleküler temelli araştırmalar *L. infantum* ile oluşan kedi enfeksiyonunun prevalans oranının % 0 ile % 68 arasında olduğunu göstermektedir. Böylece; kedilerin *L. infantum* ve *L. donovani* ile oluşturulan deneysel enfeksiyonlara nispeten dirençli olduğunu göstermiştir. Deri lezyonlarının Güney Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri' nin

güneyinde *L. venezuelensis*, *L. mexicana*, *L.braziliensis* ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Solano–Gallego ve ark, 2016).



Resim 1. Canine Visceral Leishmaniasis' in küresel dağılımı (Solano–Gallego ve ark, 2016).



Resim 2. Canine Visceral Leishmaniasis' in Türkiye'deki bölgelere göre dağılımı (Ateş ve ark, 2011)



Resim 3. Kum sineği (Hailu ve ark, 2016)



Resim 4. İnsanlarda leishmaniasisin değişen klinik gornm (Hailu ve ark, 2016)

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Etiyoloji

Leishmania etkenleri bifazik parazitlerdir, yaşam döngüsünü iki ayrı konakçıda tamamlar. Omurgalıda hücre içi amastigot formu olarak bulunurken, kum sineklerinde ekstraselüler flagellası bulunan promastigot formu bulunur. Eski Dünya vektörleri olarak *Phlebotomus* genusuna ait kum sinekleri, yeni Dünya vektörleri *Lutzomyia* genusuna ait kum sinekleridir (Solano–Gallego ve ark, 2016).

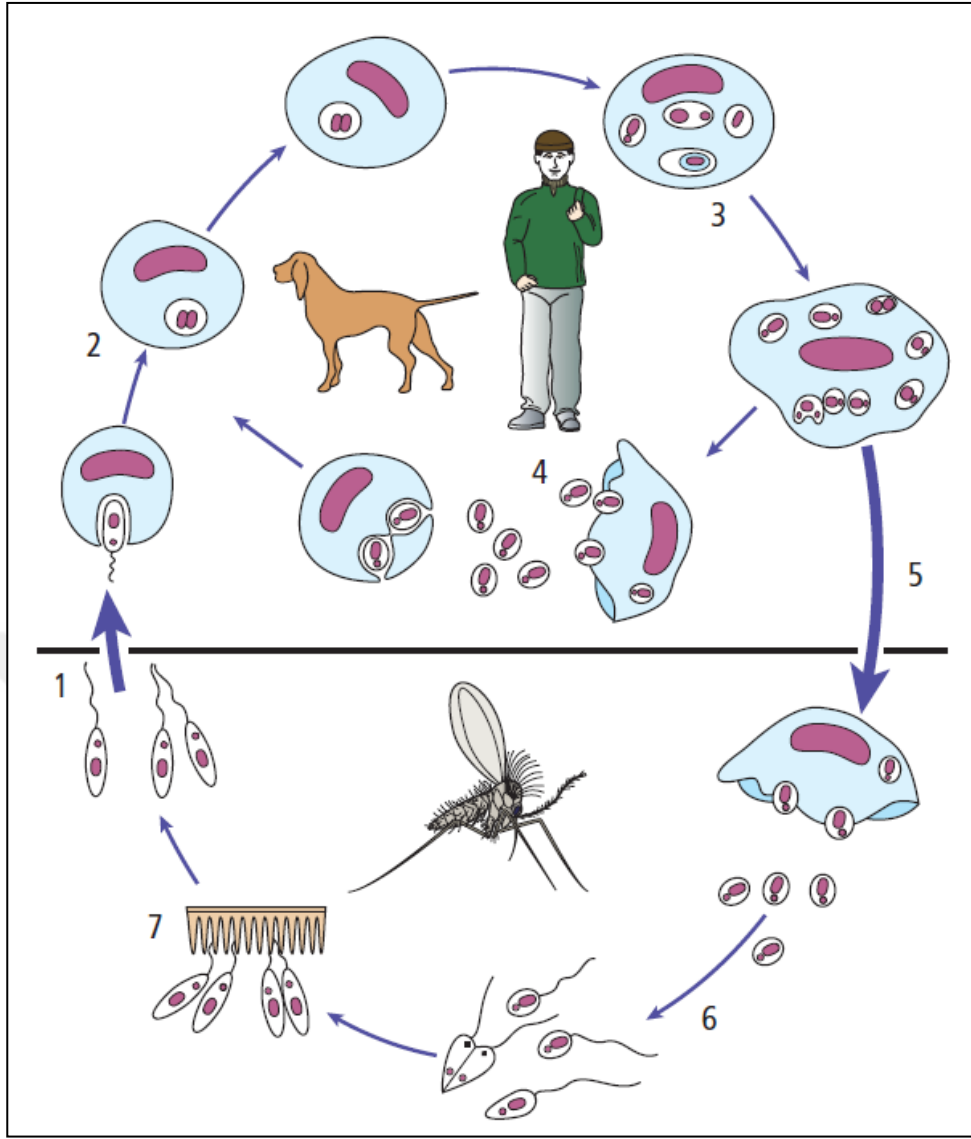
Kum sineklerinin (Resim 3) ısırılmaları ile doğal olarak *L. infantum*' un bulaşması görülürken vertikal bulaşmada uterus tan yavruya etkenlerin geçişi söz konusudur ayrıca cinsel temas yolu ile (veneral bulaşma) bulaşmada bildirilmiştir. Hastalığın vektörlerinin bulunmadığı alanlardaki bazı enfeksiyonlarda hematofagöz vektör katılımı olmadan direkt bulaşma olabileceği yönünde şüpheli durumlar vardır. Kuzey Amerika' daki köpeklerde enfekte kan transfüzyonu sonucu *L. infantum*' un bulaştığı ve İspanya' da kullanılmış enjektör paylaşımı sonucu insanlarda (Resim 4) bulaşma olduğu bildirilmiştir (Solano–Gallego ve ark, 2016).

Leishmania genusu insanlar, evcil ve yabani memelilerin birkaç obligat protozoon parazitleridir. Vektörün bağırsağındaki yerlerine bağılı olarak, Lainson ve Shaw (1987) Leishmania iki alt cinsini *Leishmania* ve *Viannia* şeklinde tespit etmişlerdir (Aransay ve ark, 2000). 1970' lerden beri, immunolojik, biyokimyasal ve genetik kriterlerini Leishmania türlerini belirlemek için kullanılmışlardır (Rioux ve ark, 1990).

L. infantumun yol açtığı canine leishmaniasis enfeksiyonu Amerika Birleşik Devletlerinin doğusunda köpek barınaklarında görüldüğü bildirilmiştir, bu bölgelerde bulaşma modelleri tam olarak bilinmemektedir. Eski Dünyada kutanöz leishmaniasisin ajanı olan bir diğ er leishmania türü *L. tropica*' dır, insanlarda visceral leishmania enfeksiyonuna da neden olurlar ve Kuzey Afrika ve Orta Doğu'da köpeklerde leishmania enfeksiyonuna nadir neden olduğu rapor edilmiştir. Amerika kıtasında insanların kutanöz leishmania enfeksiyonunun nedeni olarak *L. braziliensis* ve *L. amazonensis* olduğu rapor edilmiştir. Bu etkenler aynı zamanda köpeklerde de enfeksiyon oluştururlar. Endemik bölgelerde köpeklerde leishmania enfeksiyonunun prevalans oranı bulaşma için gerekli çevre koşulları ve enfeksiyonu belirlemek için kullanılan yöntemlere göre değişir. Endemik bölge olan Akdeniz havzasında seroprevalans oranları % 10 ve % 37 arasında değişir. Köpek dokularında

Leishmania DNA' sının tespiti için kullanılan yöntemler veya serolojik yöntemlerle ve DNA tespitini birleştiren araştırmalar daha yüksek enfeksiyon oranına sahip olduğunu ortaya koymuştur hatta bazı bölgelerde %70' e yaklaşan oranlardadır. Endemik bölgelerde yaşayan köpeklerin çoğunda leishmania enfeksiyonuna maruz kalır, enfeksiyon veya subklinik kronik enfeksiyon gelişimi şekillenir. Birçok ülkede kum sinekleri ile bulaşma olmaksızın ortaya çıkan leishmaniasis tanısı konulan bir hastalık olmuştur, bu durum köpeklerin ve sahiplerinin artan hareketlilikleri ile ilgilidir. Avrupa da birçok köpek leishmania enfeksiyonu için endemik bölgelere seyahat etmeleri veya bu bölgelerdeki başıboş hayvanların sosyal yardım grupları tarafından sahiplendirilmesi sonucu endemik olmayan bölgelerde görülen klinik vaka sayısı artmaktadır. Avrupa ve ABD' de endemik olmayan bölgelerde yaşayan fakat seyahat etmeyen köpeklerde de leishmaniasis enfeksiyonu belirlenmiştir, bu durumda hastalığın bulaşmadaki en muhtemel mekanizmaları olarak vertikal geçiş ve cinsel temas ile olduğu düşünülür (Solano–Gallego ve ark, 2016).

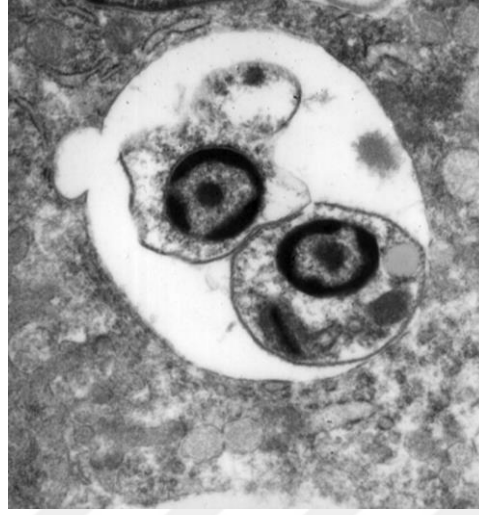
Leishmania ile enfekte dişi kum sineklerinin kan emmesi sırasında bulaşma şekillenir. Bulaşıcı leishmania evresi (promastigot) vektörün hortumundan konağın derisine inoküle edilir. Promastigotlar makrofajlar ve diğer mononükleer fagositik hücreler tarafından fagosite edilirler, amastigotlara dönüşerek, ikiye bölünürler ve diğer mononükleer fagosite hücrelerini enfekte ederler. Parazit ve konak arasındaki ilişki hastalığın sonucunu belirler. *Leishmania infantum* konağın tüm organlarını işgal edebilir. Yinede, konağın derinin dermis tabakasındaki varlığı enfeksiyonun vektöre iletimi için gereklidir. Kum sineklerinde, amastigotlar promastigotlara dönüşürler, kalın bağırsakta (*Viannia* alt cinsi parazitler) ya da orta bağırsakta (*Leishmania* alt cinsi parazitler) gelişirler ve hortuma geri dönerler (Gharbi ve ark, 2015). Memeli ve ara konakçıda *Leishmania* türlerine ait yaşam döngüsü şekil 1' de gösterildi.



Şekil 1. Memeli konakçıda ve kum ineklerindeki *Leishmania infantum*'un yaşam döngüsü (Solano–Gallego ve ark, 2016)

1. Kan emme sırasında dişi kum sineği tarafından promastigotlar omurgalı konakçının derisine tükürük ile enjekte edilir.
2. ve 3. Promastigotlar deride makrofajlar tarafından fagosite edilir ve amastigotlar ikili bölünme ile çoğalır.
4. Serbest amastigotlar ve makrofajların rupturu sonucu konakçının komşu hücrelerine penetre olurlar ve visceral organlara yayılırlar
5. Amastigotları içeren hücreler kanın emilmesi sırasında kum sineği tarafından alınır.
6. Amastigotları konakçı hücrelerden serbest bırakılır ve promastigotlara dönüşümü ve çoğalımı gözlenir. (Resim 5)

7. Promastigotlar kum sineğinin bağırsak duvarına tutunur, çoğalmaya devam ederler ve kum sineklerinin hortumuna kadar ulaşırlar. Buradan duyarlı konakçıyı enfekte eder.



Resim 5. Elektron mikroskobu ile makrofaj sitoplazması içinde görünen *Leishmania* amastigot formu (Solano–Gallego ve ark, 2016)

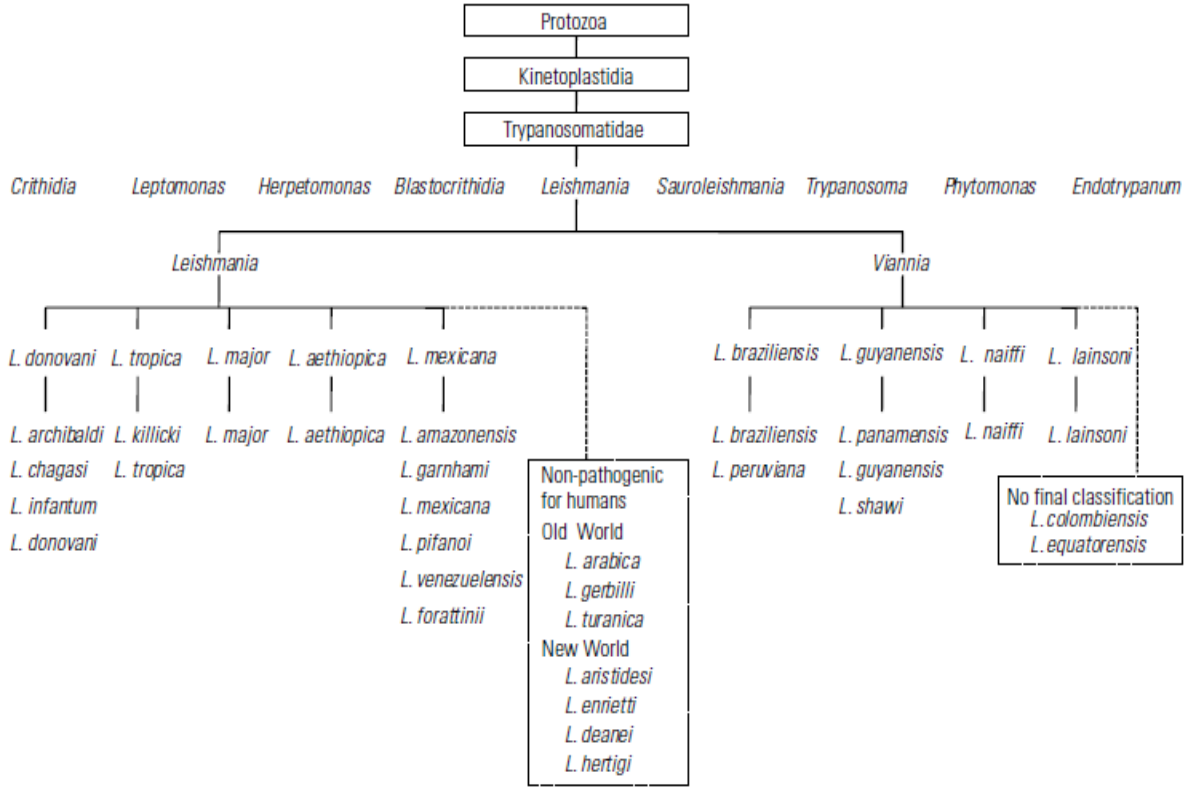
Kum sinekleri Leishmanianın biyolojik olarak yayılması için adapte olmuş tek arthropodlardır. *L.infantum* barındıran kum sinekleri, nispeten düşük bir bölümü (0,5-3%) endemik bölgelerde enfeksiyonu sürdürmek için yeterli olmaktadır. Bulaşmanın kum sinekleri ile olmayan biçimleri de tanımlanmıştır fakat leishmaniasisin doğal seyri ve epidemiyolojisindeki rolleri belirsiz kalır (Solano-Gallego 2011). Kum sineklerinin günümüzdeki sınıflandırılması oldukça tartışmalı ve elverişsizdir (Gharbi ve ark, 2015). Lewis (1977) de iki nesil eski dünya türü (*Phlebotomus spp.* ve *Sergentomyia spp.*) ve 3 nesil yeni dünya türünden bahsetmiştir (*Lutzomyia spp.*, *Brumptomyia spp.* ve *Warileya spp.*) (Lewis ve ark, 1977). Phlebotomus ailesi 11 ana tür 96 cins ve 17 alt cins barındırır (Lewis 1982). Galati (2003) 464 cins neotropical kum sineklerinin 23 cins, 20 alt cins ve 3 gruba bölündüğünü fark etmiştir (Galati 2003; WHO 2010). Kum sinekleri asıl Asya, Afrika, Avustralya, Güney Avrupa ve Amerika' nın sıcak bölgelerinde bulunurlar (Killick-Kendrick, 1999). Dağılımları kuzeye doğru Kanada' nın güney batısında 50°K (Young ve Perkins, 1984) ve hemen bunun aşağısında Fransa ve Moğolistan' a kadar uzanır (Galati, 2003). Güney dağılımları 40°G kadar uzanır, ancak Pasifik Adaları ve Yeni Zelanda da bulunmazlar. Yeni Zelanda kum sineği aslında *Austrosimulium* türünde bir karasinektir (Lane, 1993). Onların yüksekliğe göre dağılımları Afganistan' da deniz seviyesinden 3.300 m yukarı ve deniz

seviyesinin altına kadar uzanır (Artemiev, 1980). Kum sinekleri tumbaşkalaşım (holometabolous) geçirirler, (dört gelişim aşamaları olan tam bir metamorfoz geçirirler): yumurta; dört larva dönemi; pupa; ve ergin form. Yaşam döngüsü değişkendir; tür, yağmur, sıcaklık ve nem gibi abiyotik faktörlere, göre değişkenlik gösterir. Ergin formlar küçüktür (1,5-4 mm) ve uçarken ses yapmazlar. Kum sineklerinin dönemsel aktivitesi genelde yağmur ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Dişilerin kan ile beslenmeleri sabahın erken saatleri, akşam ve geceleri yaparlar ama eğer rahatsız edilirse bu durum gün içerisinde de olabilir. Bir kan emme işleminden sonra dişiler uygun bir üreme bölgesi etrafına 30 ile 70 arasında yumurta bırakır. Aktif olmadıkları zamanlarda yetişkin kum sinekleri buldukları yere göre değişen özel dinlenme bölgelerine çekilirler. Bunlar genelde larva bölgelerine yakın veya benzer, nemli karanlık ve serin bölgelerdir. Yetişkin kum sinekleri kuru bölgelerde sıcaklık düştüğünde ve nem arttığında gündüz serin nemli dinlenme bölgelerine hareket ederek ve geceleri aktif olarak hayatta kalırlar. Yumurtalar bir veya iki haftada çatlarlar. Larvalar organik maddelerle beslenirler. Bitki kalıntıları ve organik maddeler içeren mağaralarda, hayvan barınaklarında, duvar ve kayalardaki çatlaklar gibi organik madde içerebilen nemli ortamlarda bulunurlar. Eğer sıcaklık düşerse, dördüncü larva evresi duraklar (diapoz evresi). Pupa evresi beş ile on gün arası sürer (Gharbi ve ark, 2015).

Kum sinekleri dışında günümüze değin ispatlanmamış yayılma biçimleri olarak enfeksiyonu taşıyan kan donörlerinden elde edilen kan ürünleri, vertikal ve veneral yayılma yolu ile oluşan enfeksiyonu kapsar (Owens ve ark, 2001; Rosypal ve ark, 2005; Freitas ve ark, 2006; Tabar ve ark, 2008; Silva ve ark, 2009; Boggiatto ve ark, 2011).

Şüphelenilen fakat kanıtlanamayan bulaşma biçimleri, ABD'deki tilki tazılarında ya da Avrupa'daki barınaklardaki köpeklerde endemik olmayan bölgelerde vektörlerin yokluğunda oluşan leishmaniasis klinik olguların varlığını açıklayabilen durumlar, ısırık ya da yaralarla doğrudan köpekten köpeğe bulaşma olduğunu (Duprey ve ark, 2006; Shaw ve ark, 2009; Chamaille ve ark, 2010) veya kene ve pire gibi diğer artropodlardan bulaşmayı açıklar (Coutinho ve ark, 2005; Dantas-Torres ve ark, 2011).

Hastalığın gelişimi için yavrulama, yaş ve genetik geçmiş dahil birçok zemin hazırlayan etmenler tanımlanmaktadır. İbizian tazısı gibi diğer köpeklerde leishmaniasisin klinik belirtileri nadiren gelişirken Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler ve Alman çoban köpeği gibi bazı köpek ırkları hastalığın gelişimine karşı daha hassas görünürler. En yüksek prevalans sıklığı üç yaşından küçük köpeklerde ve sekiz yaşından büyük köpeklerde rapor edilmiş olmakla birlikte hastalığın dağılımı çift durumludur (Abranches ve ark, 1991; Cardoso ve ark, 2004).



Şekil 2. Leishmania etkenlerinin sınıflandırılması (Gharbi ve ark, 2015)

2.2. Epidemiyoloji

Köpeklerde leishmaniasis varlığı epidemiyolojik olguların sayısına göre belirlenir. Bu durum enfekte kum sinekleri ile omurgalı konakçı arasındaki çok yakın temas sonucu gelişir. Böylece etkenin biyolojik döngüsüne olanak sağlar (Alvar ve ark, 2004).

L. infantum (Şekil 2) canidea familyasında rezervuar olarak yerini almaktadır. Birçok kurt, tilki ve çakal paraziti taşıyarak yaban döngüsünü meydana getirirler fakat düşük sayıdadırlar ve mesafeleri uzak olduğu için asıl rezervuar olarak kabul edilemezler. Yaban döngüsü sadece tilkiler arasında olurken evcil döngü ise rezervuar köpekler tarafından gerçekleştirilir insanlarda bulaşma ise synantropik olarak gerçekleşir. İtalya ve güney İspanya’ da ratlarda *leishmania infantum* belirlenmiş olmasına rağmen bu bulgunun epidemiyolojik önemi kanıtlanmamıştır (Bettini ve ark, 1980; Morillas ve ark, 1985). *L. infantum* ayrıca, kertenkele, tavuklar, atlar ve kedilerde bulunmuştur. Bunlar sadece epidemiyolojik önemi olmayan paratenik konak olarak etki ederler. “Eski Dünyada“ köpeklerde visseral leishmaniasisin ana rezervuarı *leishmania infantum* olarak bilinirken “Yeni Dünyada“ ise *L.*

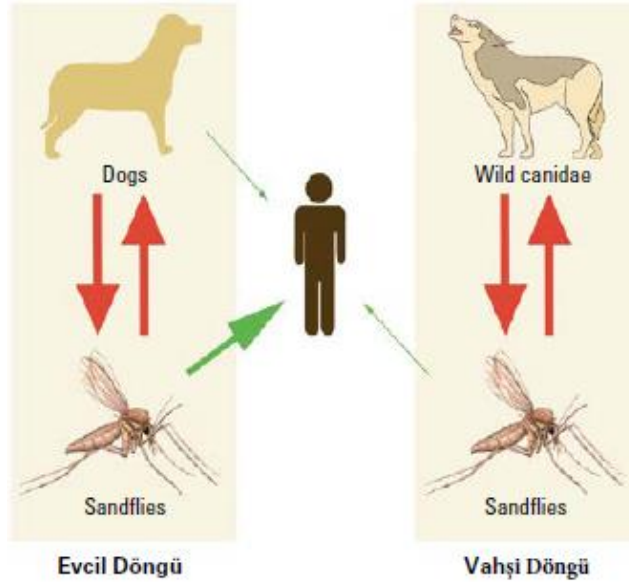
chagasi' dir. Bunların, genel olarak aynı tür olduğu düşünülmektedir ve sırasıyla *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* genusuna ait insektlerle bulaştırılırlar (WHO, 1990). Güney Akdeniz ülkelerinde *L. arabica*, *L. tropika* ve *L. major* ile ilgili rastlantısal vakalar bildirilmiştir (Peters ve ark, 1986; Dereure ve ark, 1991; Elbihari ve ark, 1987). Leishmania etkenlerine ait sınıflandırma şekil 2' de, genel epidemiyolojik döngüsünde şekil 3' de gösterilmiştir.

Konağın cinsiyeti, yaşı ve yetiştirilme koşulları ile hastalığın ortaya çıkışı arasındaki ilişkinin önemi epidemiyolojik araştırmalar sonucu gösterilmiştir. Cinsiyet normalde belirleyici faktör değildir (Amela ve ark, 1995; Acedo-Sanchez ve ark, 1996; Morillas ve ark, 1996), fakat bunun tersi de yaşlı köpekler için rapor edilmiştir ki, bu duruma göre yaşlı erkek köpekler daha sıklıkla enfekte olmaktadır (Fisa ve ark, 1999). Yaş grubuna göre Leishmaniasisin prevalansı normalde iki modlu bir dağılıma sahiptir, enfekte köpeklerin %80' i, üç ve üçün altındaki yaşa sahiptir. Köpekler 8-10 yaşlarında immünolojik olarak pik seviyeden gerilemeye başlar bu dönem daha önemsizdir (Gomez-Nieto, 1990; Amela ve ark, 1995; Acedo-Sanchez ve ark, 1996). Teorik olarak tüm köpek ırkları leishmania enfeksiyonuna karşı oldukça duyarlıdır. Bazı durumlarda örneğin endemik bölgelerdeki İbiza tazısı ve melez köpeklerinde direnç gelişimi bildirilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2000). Safkan olarak üretilen köpek ırkları enfeksiyona daha duyarlıdır (Abranches ve ark, 1991). Bazı ırklar kendine özgü klinik belirtiler gösterirler (Boxer ırkı köpeklerde nodüler dermatitis) (Ferrer ve ark, 1988). *L. infantum*' un değişkenliği ve epidemiyoloji üzerindeki etkisi izoenzimatik karakterizasyonu ile ortaya konulmuştur. Akdeniz ülkelerinde, Birincil ve ikincil konakçılarda *L. infantum*' un 25 ayrı zymodemese (aynı grup izoenzime sahip parazit topluluğu) sahip olduğu tarif edilmiştir (Alvar, 2001). Aynı zamanda iki farklı zymodemese aynı anda aynı konağı (insan veya köpek) etkileyebileceği ifade edilmiştir (Acedo-Sanchez ve ark, 1996; Rhalem ve ark, 1999). İnsanlarda *L. infantum*' un yaklaşık 230 izolatında en yaygın zymodem bulundu bu ise ZM-1 olarak tanımlandı. Visseral leishmaniasis vakalarının %90' ı ve Kutanöz leishmaniasis vakalarının % 20' sinden sorumludur. Köpeklerde, suş benzer sayıda incelenmiştir, bunların çoğunluğu lenf nodüllerinden ya da kemik iliğinden elde edilmiştir. Birkaç istisna dışında hemen hemen tüm izolatlar ZM-1 di (Alvar, 2001). Portekiz, Fransa ve İtalya' daki tilkilerde, İspanya ve İtalya'daki sıçanlarda yalnızca zymodeme ZM-1 bulunmuştur (Abranches ve ark, 1982; 1984; Mancianti ve ark, 1988; Brandonisio ve ark, 1992; 1996; Oliveira ve ark, 1993; Fisa ve ark, 2001). İnsanlarda bulunan bazı spesifik zymodemeler köpeklerde tespit edilmemiştir, bu durum diğer bilinmeyen rezervuarların *L. infantum* döngüsünde rol oynayabileceğini öne sürmüştür (Alvar ve ark, 1997; Chicharro ve

ark, 2002). Kırsal ve yarı-kırsal alanlarda, köpeklerin % 3' ü her bulaşma sezonu sırasında enfekte olmuştur, enfeksiyonun bulaşması açısından bekçi köpekleri diğer köpeklere göre %70 daha fazla riske sahiptir (Amela ve ark, 1995). Bunun nedeni varoşlarda ve köylerde köpek bakılan ev sayısının fazla olması kum sinekleri için ideal bir iklim oluşturmasıdır. (Ayrışan organik maddeler larvalar için ideal bir ortam, bahçeler, ahşap eşyalar, rezervuar hayvanların yakınlığı vb. durumlar nedeniyle) (Alvar ve ark, 2004).

Leishmaniasisin prevalansı genelde sero-epidemiolojik araştırmalarla belirlenmiş bunu kısıtlayan iki durum vardır; sorunun ölçülmesi zordur çünkü serolojik tekniklerde (örneğin immünofloresan) sınırlı bir duyarlılık söz konusudur (%90-95), bazı köpeklerin (%5-10) antikor düzeylerinin geleneksel olarak ölçülmesi mümkün değildir. Çünkü bu köpekler enfekte olmalarına rağmen araştırma sırasında serokonversiyon (kanda özgül antikorların görülmesi) geçirmiş olmayabilir (Oliveira ve ark, 1993). Sadece %87 düzeyinde bir özgüllük, yanlış pozitif sonuçlar, çapraz reaksiyonlar (babesiosis, trypanosomiasis gibi) ve ortadan kaldırılan bir geçiş enfeksiyonu sonucu seroprevalansının olduğundan fazla belirlenmesi mümkündür (Alvar ve ark, 2004).

Deneysel hayvan modelleri köpek leishmaniasis'in doğal seyri hakkında bilgi vermiştir. Parazitlerin inokülasyonundan 15 gün veya bir ay sonra poliklonal hiperglobülinemi şekillenir (Abranches ve ark, 1991). İkinci ve üçüncü aylar arasında, spesifik anti-Leishmania antikorları görünür, parazitler varlığında devam eder hatta gizli enfeksiyonlarda da devam etmektedir. Aslında, hastalığın erken ve ileri aşamalarda antikorların üretimi söz konusudur hatta lenfosit stimülasyon testleri negatif olduğunda da devam eder (Martinez-Moreno ve ark, 1993). Köpeklerde leishmaniasisin subklinik formunun varlığı, enfekte köpeklerde deneysel olarak kanıtlanmıştır, 25 ay boyunca hastalığın anlamlı işareti görülmemiştir (Atipik granülomatöz lezyonlar da dahil olmak üzere). Hastalığın subklinik formlarda hücrel bir bağışıklık cevabının gelişiminin sorumlu olduğu düşünülür (Oliveira ve ark, 1993).



Şekil 3. Canine leishmaniasis' in genel epidemiyolojik döngüsü (Gharbi ve ark, 2015)

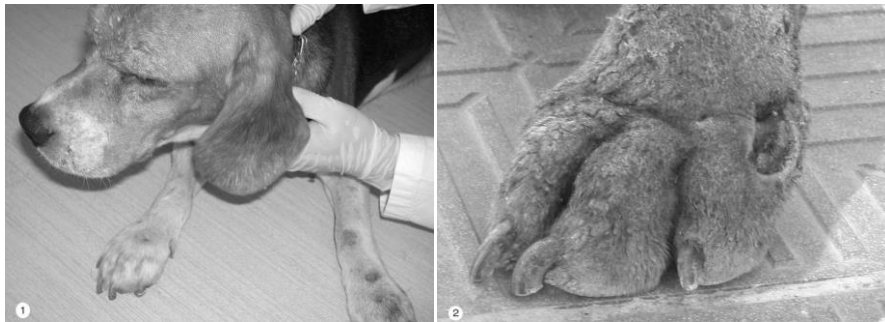
2.3. Patogenezis

Klinik bulgular ve altta yatan patoloji artropod olan vektör, *Leishmania* etkeni ve konağın immun sistemi arasındaki doğal etkileşimi ile ilişkidir. Bu durum leishmaniasis hastalığının klasik bir örneğidir. Bu etkileşimler, birçok konak türünde hem deneysel olarak hem de kendiliğinden gelişen enfeksiyonlarda detaylı şekilde incelenmiştir. Farklı T lenfosit alt tipleri arasındaki fonksiyonel etkileşimi ile ilgili bilgi ilk olarak fare modelleri ile elde edilmiştir (Solano–Gallego ve ark, 2016).

Phelobotomlar ile bulaştırılan *Leishmania* etkenlerinin kandan uzaklaştırılması, retiküloendotelial sistem hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu uzaklaştırma esnasında retikülo-endotelyal hücrelerinde çoğalıp, büyürler ve bu durumun sonucunda her organ retikülo-endotelyal hücre zenginliği oranında patolojik değişikliğe uğrar. Bu nedenle hastalığı karakterize eden en önemli değişiklikler dalak, karaciğer, kemik iliği ve lenf yumrularında görülmektedir (Yaşarol 1981). Buna bağlı olarak retiküloendotelyal hücrelerden zengin lenf yumrularında büyüme, kemik iliğinde hemoraji, dalak ve karaciğerde hipertrofi yaygın olarak görülen patolojik bulgulardır (Spreng, 1993; Evans ve ark, 1996; Carrasco ve ark, 1997; Valladares ve ark, 1997).

Canine visceral Leishmaniasis' de, parazit yayılımı; dalak, karaciğer, lenf yumrusu, kemik iliği, böbrek, deri ve benzeri organ ve ilgili sistemleri kapsamaktadır. İnsanlarda meydana gelenden farklı olarak parazitin dağılımı normalde kemik iliği, dalak ve karaciğer ile sınırlıdır. (Tryphonas ve ark, 1977; Marzochi ve ark, 1985; Longstaffe ve Guy, 1986; Swenson ve ark, 1988). Kum sineği ısırığı sonrası, parazitler hızla kan veya lenf yoluyla lenf düğümü ve dalağa dağılmakta oradan da böbrek ve karaciğere ulaşmaktadır. Daha sonra, parazitler üreme organları, deri, idrar kesesi, sindirim ve solunum sistemleri ve benzeri sistemlere yayılır (Molyneux ve Ashford, 1983). Birçok farklı doku ve organlarda parazitlerin varlığı reaksiyonlara yol açar ve köpek leishmaniasis' in karakteristik lezyonları ve belirtileri ortaya çıkar. Hücre infiltrasyonu sonucu giderek geniş bölgelerine uzanan proliferatif yangısal reaksiyonlar meydana gelir. Etkilenen organlarda ilerleyici şekilde değişiklikler ve fonksiyonel dengesizliğe neden olur. (Bourdeau ve Groulade, 1988). Bir humoral cevap ile oluşturulan ve B hücrelerinin poliklonal uyarımı ile başlayan yüksek konsantrasyonda Y-globulinler üretilir (Galvao-Castro ve ark, 1984; Bunn-Moreno ve ark, 1985). Bu duruma spesifik ve spesifik olmayan immünoglobulinler dahildir (Persechino ve Oliva, 1986). Buna ek olarak, temel olarak IgG ve fraksiyonlar C1, C2 ve kompleman C4 oluşan bağışıklık kompleksleri, vücudun farklı yerlerinde gelişir (Makni ve ark, 1989; Lucena ve ark, 1994).

Yaygın ve çeşitli immün yanıtlar ile ilişkili deri lezyonları mevcuttur. Direnç cevabı olarak, karakteristik dermatitis ile birlikte dermiste keratonsitler ve langerhans hücreleri tarafından salınan majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf III, T hücreleri, makrofajlar ve parazitler oluşturur. Duyarlılık cevabı olarak, antijen sunmayan hücreler ve birçok parazite makrofajlar ile nodüler lezyonlar (Resim 6) görünür (Fondevila ve ark, 1997).



Resim 6. Köpekte leishmaniasis' e bağlı gelişen nodüler deri lezyonları (Alvar ve ark, 2004)

Deride gözlenen parazite fibroblastlar ülser gelişimi için önemli olabilir (Rodriguez ve ark, 1996). İmmun yanıt ile beraber tubuler ve glomeruler hasar oluşumu sonucunda böbrekteki karakterize lezyonlar ortaya çıkabilir. Akut glomerülonefrit ve ekstra membranous

glomerulonefrit immükomplekslerin çökmesi sonucu böbrek yetmezliği neden olur (Benderitter ve ark, 1988). Bu immükompleksler, anti-Leishmania IgG tarafından oluşturulur (Mancianti ve ark, 1989). Böbrek fonksiyon dengesizliği immükomplekslerin dolaşımdaki yüksek konsantrasyonları ile ilişkilidir (Lopez ve ark, 1996). Belirli bir enfeksiyonu olan köpeklerde çok az veya hümorale yanıt oluşmamış ise bu durumda renal lezyonlar şekillenmez (Nieto ve ark, 1992). Böbrek lezyonlarında T hücrelerinin varlığı, immun kaynaklı glomerulonefrit bir hücre tepkisinin tutulumu olduğunu gösteriyor. İmmünolojik kaynaklı glomerulonefritte böbrek lezyonlarında T hücrelerinin varlığının görülmesi ayrıca hücresele cevabın rolünde işaret etmektedir (Costa ve ark, 2000). Karaciğer morfolojisindeki değişim yangısal infiltrasyonun varlığı, granülom oluşumu, kupffer hücrelerinin hipertrofisi ve hiperplazisinin görülmesi ile belirlenir. Paraziter enfeksiyon hepatositlerde morfolojik değişikliklere neden olur. Endomembran sistemde ve peroksimal kompartımantında değişiklikler şekillenir ve böylece karaciğer metabolizması etkilenir (Vianna ve ark, 2002). Canine leishmaniasis merkezi arteriyol etrafında sadece birkaç lenfositler ile dalaktaki beyaz pulpa içersinde organizasyon bozukluğuna neden olur. Kırmızı pulpa marjinal bölgede plazma hücreleri ve parazitize makrofajlar ile hiperselüler olur ve endotel hücrelerinde proliferasyon şekillenir. Kapsül ve trabeküllerde kalınlaşma gözlenir (Tafari ve ark, 2001). Kortikal ve medüller bölgede lenfatik nodüllerde hipertrofi, germinal merkezde B-bağımlı hiperplazi bölgesi ve birçok makrofaj görünürken T-bağımlı bölge ise tükenmiştir (Tafari ve ark, 2001). Bu organların yanında, diğerlerinin de etkilendiğine dair kanıtlar vardır. Parazitin mukozayada etkisi vardır ve lezyonlar dil, penis ve ağız boşluğu içinde gözlenmiştir (Font ve ark, 1996). Amastigotlar birçok organın küçük arteriyollerde vasküler lezyonlar oluşturur. (Deri, bağırsak, böbrek, göz, akciğer ve benzeri) (Pumarola ve ark, 1991). Oküler lezyonlar, plazma hücre infiltrasyonu sonucu şekillenirken amastigotları içeren makrofajlar ise farklı oküler yapılarla lezyonlara neden olur. Vasküler geçirgenliği etkileyen IgG birikiminin varlığı teyit edilmiştir (Garcia-Alonso ve ark, 1996). Amastigotlar kas hücrelerinde (myofibril) görülür ve yanı sıra IgG birikimide gözlenir. Bu durum kas dokusunda nekroz ve atrofiye proveke eder (Vamvakidis ve ark, 2000). *Leishmania infantum*' un neden olduğu beyin-omurilik sıvısında parazite karşı antikor üretimi ile menegitis tespit edilmiştir (Vinuelas ve ark, 2001). Köpeklerde parazit tarafından indüklenen ciddi immun sistem depresyonu sonucu şekillenir. İlk başta immunodepresyon parazit için spesifiktir fakat etkilenen hayvanlarda tüm T-hücre fonksiyonlarını etkilenir (De Luna ve ark, 1999).

2.4. Klinik Bulgular

Canine leishmaniasis genellikle kronik ve multisistemik bir rahatsızlıktır. Etkilenen doku ve organlarda immunopatojenik etkilerinin karmaşıklığı, protozoonun farklı suşlarının olması, klinik bulguların polimorfik olması sebebiyle birçok vakada yanlış tanıya yol açabilir (Ciaramella ve ark, 1997; Greene, 2012; Rallis ve ark, 2005).

Klinik belirtiler ve hastalığın ortaya çıkış zamanı geniş ölçüde değişkenlik gösterir. Klinik belirtilerin yokluğundan ağır klinik sendromlara kadar değişen belirtiler ortaya çıkar (Alvar ve ark, 2004). Gaeta ve ark (1994) hastalığın inkübasyon döneminin 2 ve 8 ay arasında değiştiğini önermiştir. Bununla birlikte, Rioux ve ark. (1979) 15 aya kadar bu süreyi genişletmiştir. Endemik alanı ziyaretten sonra 5 ve 7 yıl arasında klinik belirtilerin geliştiği bildirilmiştir. Leishmania enfeksiyonundan arı ülke olan Hollanda’ da birçok köpekte rapor edilmiştir (Slappendel, 1988). CVL’ deki patolojik spektrum etkendeki farklılığa bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ayrıca bireysel olarak köpeklerde farklı yanıtlar şekillenmesi sonucu çeşitli klinik formlarda elde edilir (Semiao-Santos ve ark, 1995). Generalize yayımlı anerjik durumda, yüksek sayıda parazit varlığı ve az ya da hiç klinik bulgu göstermezken, hiperreaktif formda parazit tespit edilemez fakat köpeklerde organik lezyonlar ve ağır belirtiler gözlenir. Hastalık bu formlar arasında değişkenlik gösterir (Griffiths, 1987). Aynı şekilde hastalık tablosunun farklı yolları olduğu, semptomatolojinin de çok çeşitli olabildiği bildirilmiştir (Lanotte ve ark, 1979). CVL Lanotte ve ark (1979) tarafından akut, subakut, kronik ya da regresiv latent olarak sınıflandırılmış, Mancianti ve ark (1988) ve Abranches ve ark (1991) ise klinik semptomlara göre polisemptomatik, oligosemptomatik ve asemptomatik olarak sınıflandırmışlardır. Hastalığın başlangıcında belirtileri inceleyen az sayıda çalışma vardır. Sadece yapılan deneysel enfeksiyonlar sonucunda bilgi sağlanmıştır. Bu çalışmalar, sadece erken klinik belirtileri değil, aynı zamanda latent dönemi ve hastalığın ilerlemesi hakkında birçok farklılığı göstermiştir (Dunan, 1978; Catarsini, 1981).

Visceral leishmaniasis köpeklerde kronik kilo kaybı, iştahsızlık, ekzersiz toleransında azalma, periferik lenfadenopati, keratokonjunktivitis, kaslarda zayıflık, aralıklı bir ateş, anemi, hiperproteinemi, uyuşukluk, hepatomegali ve splenomegali ile karakterize ilerleyici sistemik bir hastalıktır (Grant ve ark, 1991; Lester ve ark, 1996; Arias ve ark, 1996; Poli ve ark, 1997; Tüzer ve ark, 1999). Daha sonraları epistaksis, kronik renal bozukluk, pıhtılaşma bozuklukları, nasal depigmentasyon, erozyon ve şiddetli ülserasyonların geliştiği bildirilmektedir. *L. tropica* ile infekte köpeklerde gözlenen kutanöz formda ise deride aylarca devam eden ağrılı ülser ve nodüller, pul pul dökülme, perioküler alopesi ve kabuklarla

karakterize dermatitis tablosu şeklinde lezyonlar görülmektedir. Visceral formda da deride ülserler görülebildiği bildirilmiştir (Fraser ve ark, 1986; Lester ve ark, 1996; Morgan ve ark, 1997; Yılmaz ve ark, 1998; Luna ve ark, 1999; Tüzer ve ark 1999).

Deri lezyonları sıklıkla saptanmakta ve diğer klinik belirtilerle ya da klinikopatolojik anormalliklerle birlikte görülebilmektedir. Ancak köpekler deriye ait lezyonlarla bağlantısız diğer klinik belirtilerle esas sunulan şikayet olarak sunulabilirler (Ciaramella ve ark, 1997; Koutinas ve ark, 1999). Böbreğe ait hastalık CVL' nin tek klinik göstergesi olabilir ve hafif proteinüriden nefrotik sendroma ya da son aşamasına gelmiş böbrek rahatsızlığına kadar ilerleyebilir. Kronik böbrek yetmezliği hastalığının ilerlemesinin şiddetli bir sonucu ve CVL' ye bağlı ölümün ana nedenidir. Enfekte olmuş köpeklerde böbreğe ait patolojinin tekrarlanma sıklığı yüksek olmasına karşın böbreğe ait azotemi (Tablo 1) yaygın olmayan bir laboratuvar bulgusudur (Costa ve ark, 2003; Zatelli ve ark, 2003).

Tablo 1. *L. infantum* ' un neden olduğu CVL' nin bazı klinik ve laboratuvar bulguları (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Klinik Bulgular	Laboratuvar Bulguları	
Genel	Kutanöz	Serum proteinleri ve elektroforetogram
<ul style="list-style-type: none"> ○ Generalize lenfadenopati ○ Kilo Kaybı ○ Letarji ○ Mukozal membranlarda solgunluk ○ Splenomegali ○ Poliüri ve polidipsi ○ Ateş ○ Kusma ○ Diyare (Kronik kolitis) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Non-pruritik, alopesi olmayan exfoliatif dermatitis ○ Nodüler dermatitis ○ Onychogryphosis ○ Püstüler dermatitis ○ Papüler dermatitis ○ Eroziv-ülseratif dermatitis 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hiperglobulinemia ○ Poliklonal beta ve/veya gammaglobulinemi ○ Hipoalbuminemi ○ Albumin/Globulin oranında azalma
Oküler	Diğer bulgular	CBC/Hemostazis
<ul style="list-style-type: none"> ○ Blefaritis (eksfoliatif, ülseratif ya da nodüler) ○ Konjunktivitis (nodüler) ○ Keratokonjunktivitis ○ Anterior üveitis 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mukokutanöz ve mukozal ülseratif ya da nodüler lezyonlar (oral, genital ve nasal) ○ Epistaksis ○ Topallık (eroziv yada non-eroziv poliartritis, osteomyelitis, polimyositis) ○ Atrofik myositis ○ Vasküler bozukluklar (sistemik vaskülit, arterial tromboembolizm) ○ Sinirsel bozukluklar 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Non-rejeneratif anemi ○ Lökositosis ya da lökopeni ○ Trombositopati ○ Trombositopeni ○ Bozulmuş sekonder hemostazis ve fibrinolizis
		Biyokimyasal profili/ İdrar Analizi
		<ul style="list-style-type: none"> ○ Hafif ya da şiddetli proteinüri ○ Renal azotemi ○ Karaciğer enzim aktivitesinde yükselme

2.4.1. Erken Dönem

Genellikle, bu erken dönemde açık ve kesin belirtiler yoktur. Bu durum hayvanın genel durumu spesifik olmayan değişikliklerden etkilenir. Bu durum hastalığın ilerleyici, artan gelişimi olduğu ve zayıf sinsi bir başlangıç şekillendirdiğini açıklar. Çarpıcı olarak yavaş ama istikrarlı kilo kaybı ile beraber apati ve letarji gözlenir. Üçüncü aydan itibaren dermatolojik belirtiler (Periorbital ve auricular bölgede yama şeklinde alopesi), hafif kalp krizleri, böbrek palpasyonunda ağrı ve konjunktivitis gözlenir. Diğer araştırmacılar ise ilk belirti olarak hemorajik değişiklikler olduğunu rapor etmişlerdir (Corlouer ve ark, 1983).

2.4.2. Patent Dönem

Leishmaniasis' de hastalık sürecinin geliştirilmesi, yoğunluğu ve sayısına göre semptomlar da çeşitlilik gösterir. Ağır enfekte köpeklerin çoğu hastalığın karakteristik belirtileri gösterirken diğerlerinde ancak diğerlerinde gözlenmemiştir. İlgisizlik, halsizlik, kilo iştah, polidipsi, kayıp değişmesi arasındaki hipertermi gibi yaygın non-spesifik semptomların bir sayıdır. Ortak olan non-spesifik semptomlardan bazıları şunlardır; hipertermi, letarji, kilo kaybı, apati, polidipsi, iştah değişikliği ve halsizlik ve benzeri bulgular gözlenir (Catarsini, 1981; Keenan ve ark, 1984a, b; Hernandez-Rodriguez ve ark, 1987). Bu aşamanın en karakteristik belirtileri arasında lenfadenopati göze çarpar. Lenf nodüllerinin boyutunda ve kıvamında artış şekillenir. Yüzeysel olan lenf nodüllerinin palpasyon ile muayenesinde kolayca bu bulgular elde edilebilir. Bu duruma örnek olarak popliteal, preskapüler ve submaksillar lenf nodülleri verilebilir (Abranches ve ark, 1991a). Hepatomegali, aynı zamanda bu hastalığın aşaması, hem de önemli ölçüde splenomegali dikkate değerdir. Hepatomegali hastalığın bu safhasında dikkat çekicidir ayrıca dikkate değer splenomegalide gözlenir (Slappendel, 1988). Deri lezyonlarının çeşitli ve geniş aralığı vardır, bol kuru deskuamasyonun kapsadığı küçük alopesik alanlar, soyulmuş ve seborea az ya da çok geniş kabuklu ülserler şeklindedir. Bu lezyonlar normal olarak burun, göz küresinde ve kulak çevresinde başlar. Daha sonra vücudun her yerinde yayılan özellikle belirgin kemikler üzerindeki deri yapısında kendini gösterir. Lezyonlarda özellikle kaşıntı yoktur (Hernandez-Rodriguez ve ark, 1987; Slappendel, 1988). Kutanöz belirtiler köpek ve insanlarda farklıdır. Orada lokal yangı ve patolojik değişiklikler bu bölge ile sınırlıdır, köpeklerde deri etkilenir iken hastalık iç organlara doğru ilerler (Ferrer,

1989). Birkaç yazarlara göre, semptomatik köpeklerin en az % 90' ı kutanöz patolojiye sahiptir (Slappendel, 1988; Ferrer, 1989). Kutanöz lezyonları bulunan 43 köpekte yapılan çalışmada kutanöz semptomlara göre dört gruba ayrılmıştır (Ferrer 1989). (1) Çalışmadaki köpeklerin %60' ında alopesi ve deride soyulmalar ile deride bulunan makrofajlarda çok sayıda amastigot bulunmuştur. (2) Köpeklerin %23' ünde bacaklarda ve eklemlerde deri ülserinin varlığı ile karakterize ülseratif dermatoz ve birkaç amastigot gözlenmiştir. (3) Olguların %11' inde nodül ile karakterize nodüler dermatitis ile büyük sayıda enfekte makrofajlar gözlenmiştir. (4) İncelenen köpeklerin %6' sında vücudun her yerinde yaygın ekzantemin ortaya çıkması ile karakterize püstüler dermatitis belirlenmiştir. Histolojik olarak parazit belirlenmemiştir. Oküler belirtiler de oldukça sık görülür. Muközden mukopurulente kadar değişen derecede konjunktivitis ve sarımsı akıntı lakrimal marjine yapışık durumda olur. Mukoza anemi nedeni ile solgundur. Benzer şekilde keratitis şekillenebilir ülser ilerleyerek sonraki durumda körlük meydana gelebilir (Swenson ve ark, 1988). Burun akıntısı yaygındır bu akıntı serözden mukopurulente kadar değişebilir. Epistaksis tek veya iki taraflı olabilir. Kanamalar aralıklı damlalar şeklinde de olabilirken frank kanama şeklinde de olur (Hernandez-Rodriguez ve ark, 1987; Swenson ve ark, 1988). Müsküler atrofi hastalık ilerledikçe giderek artar ve sık görülür. Canine leishmaniasis enfeksiyonu sırasında, perionyxis, Onikogrifozis ve onychorrhaxis görünebilir ayrıca sinir sistemide etkilenmiş olabilir bu nedenle tremorlar ve motor aktivitede azalmalar şekillenir, son aşamalarda arka bacaklarda paralizler de görülebilir (Bourdeau ve Groulade, 1988). Bazı vakalarda topallık ve artrit görülür (Slappendel, 1988; Spreng, 1993). Osteomyelit ve artrosinovitis bazı durumlarda da tarif edilmiştir ve leishmaniasisin sağaltımına iyi cevap verirler (Buracco ve ark, 1997).

2.4.3. Son Dönem

Semptomların ortaya çıkış zamanı (enfeksiyondan sonraki iki ya da üç aydan yıllara kadar değişir) çok çeşitlidir. Aynı şekilde, hastalığın son aşamasında gelişti tahmin etmek zordur. Bu aşamada, köpeklerde en çok etkilenen organlarıdır bunun yanında ülserler ve alopesi alanları görülür. Bu dönemde köpeklerde kaşeksi göze çarpar, ölüm nedeni ise böbrek ve karaciğer yetmezliği sonucu olur. Bu aşamada fırsatçı enfeksiyonlarında gelişimi şekillenir (Ferrer, 1989).

2.4.4. CVL' nin kronik formları

2.4.4.1. Genel bulgular

Canine visceral leishmaniasis' in belirtileri çıban benzeri oluşumlarla başlar. Bu tek bir ülseratif akıntılı yaradır, birkaç gün sonra, enfeksiyonun klinik göstergeleri hafif ama ilerleyen ve sonrasında ciddi durum kazanan belirtilerle ortaya çıkar, sersemlik ve hareket etmede olan isteksizlik, vücut kondüsyonunda azalma, hiporeksi, kilo kaybı ve bölgesel (baş bölgesinde) genel amyotrofi. Yinede, hastalığın erken dönemleri genel klinik bulgularla eşleştirilemez (Gharbi ve ark, 2015). CVL' de en sık görülen belirti lenf yumrularının büyümesidir (lenfadenomegali), ağrısız ve hareketlidir (Ciaramella ve ark, 1997). Bu büyüme bazı olgularda sadece klinik belirti şeklinde sırasında erkenden oluşur. Splenomegali tespit edilse de bu durum değişkendir (Baneth ve ark 2008).

2.4.4.2. Kutanöz Belirtiler

Dermatolojik bulgular CVL' de en belirgin ve en yaygın ikinci belirtisidir (Greene, 2012; Baneth ve ark, 2008; Ferrer ve ark 1988; Martinetti, 2013; Koutinas ve ark 2010). Tek belirlenen bulgu olabilir veya diğer tip lezyonlarla ilişkili olabilir (Papadogiannakis ve ark, 2005). Dermatolojik belirtiler tipi ve yoğunluğu değişebilir ama kaşıntı ile ilişkili değildir (Gharbi ve ark, 2015).

Kaşıntısız yaygın alopesi, kabuklu kuru seborrhea ile ilişkilendirilebilir, bölgesel olabilir (genelde dorso-lumbar bölge) ya da tüm vücuda dağılmış olabilir (Blavier ve ark, 2001). Bazı vakalarda köpeklerde foliküler keratoz şekillenir, yangısal infiltrasyon sonucu şekillenen parakeratosis, bazen histiyositler, plazmositler ve makrofajlarla ile de ilişkilendirilebilir. Bazen leishmania amastigotları bulunabilir. Hiperkeratoz baş, burun ve patilerde bulunabilir. Multifokal kutanöz ya da mukozal ülserler derinin epidermal ve dermal bölümlerinin nekrozuyla ilişkilendirilebilir. Nekrozların etrafında Leishmania amastigotlarından enfekte olmuş histiyositler, lenfositler, plazmositler ve makrofajlardan oluşan polimorfik bir hücre infiltrasyonu vardır. Sıklıkla, yangısal histiyo-lenfoplazmositik infiltrat varlığıyla karakterize edilen süperfisiyal ve/veya derin bakteriyel (başlıca *Staphylococcus spp.*) ya da fungal (*Malassezia pachydermatis*), püstüler dermatitis şeklindeki enfeksiyonlar rapor edilmiştir (Gharbi ve ark, 2015).

Nodüler dermatit yangısal infiltrasyonlu, yüksek parazit yüklü makrofajlar içerebilir ve bazı lenfositler ve plazmositler rapor edilmiştir. Boxer türlerinde nodüler form daha sık gözlemlenmiştir (Young ve Perkins, 1984; Vidor ve ark, 1991). Atipik ve seyrek kutanöz lezyonlar da görülebilir bunlar depigmentasyon (çoğunlukla nazal bölgede), panikülitis ve nazal hiperkeratöz (Resim 7 ve 8) ayrıca bu lezyonlar patilerde de görülebilir (Gharbi ve ark, 2015).

Tırnakların aşırı uzaması belirginleşebilir (Resim 9). Ayaklarda nodüller oluşabilir. Bunlar basit papüllerden periferik lenfadenopatiyi içeren tümör benzeri nodüllere uzanan değişiklikte olabilir. Bu nodüller parmakarası bölgelerde gözlemlenebilir. Bazı vakalarda nodüller ülserleşebilir (Blavier ve ark, 2001).

2.4.4.3. Oküler belirtiler

Oküler belirtiler polimorfiktir (Resim 10) ve difüze veya nodüler konjunktivitis; eksofoliyatif, ülseratif veya nodüler blefaritis (Resim 11); nodüler veya diffüze skleritis; anterior veya posterior üveitis, granülomatoz veya diffüze olabilen glokom, panoftalmi ve keratokonjunktivitis bildirilmiştir (Baneth ve ark, 2008; Solano-Gallego ve ark, 2009; Amara, 2003).

2.4.4.4. Non-Spesifik Belirtiler

CVL ile birlikte çeşitli atipik formlar rapor edilmiştir, örneğin yangısal foliküliteye bağlı olarak steril püstüller dermatit; poliartrit'e bağlı topallık, tip III hipersensitivite ve daha nadiren granülomatoz miyositis gözlenir (Blavier ve ark, 2001; Greene, 2012).



Resim 7. Dorsal bölgede deride hiperkeratozis ve burun ucunda hiperkeratozis olgusu (Gharbi ve ark, 2015).



Resim 8. Ülseratif dermatitis ve keratokonjüktivitis (Gharbi ve ark, 2015).



Resim 9. CVL' li bir köpekte onikogrifozis (Gharbi ve ark, 2015).

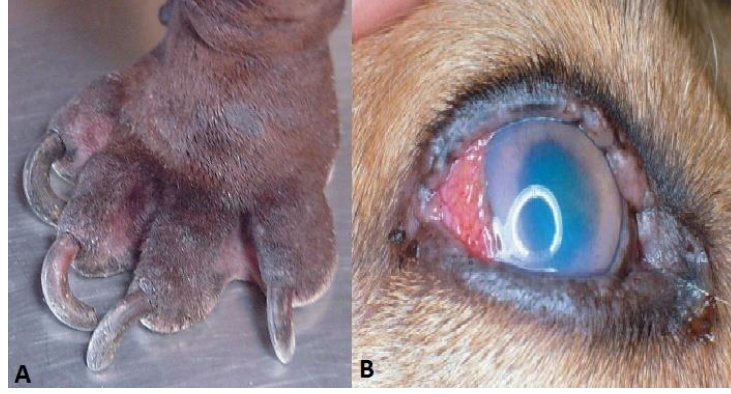
2.4.4.5. Organlardaki Lezyonlar

Dalakta lezyonlar immun sistem hücreleri tarafından infiltrasyonu sonucu özellikle monosit ve makrofajlar ve ayrıca kırmızı ile beyaz pulpaların hiperplazisi sonucu splenomegali sık görülür. Kemik iliği koyu pembe veya kırmızı jel görünümündedir. Lenf düğümlerinde lezyonlar, kortikal ve medüller bölgelerin aşırı büyümesi söz konusudur. Yinede gelişmiş aşamalarda periferik lenf düğümlerinin büyüklüğü normal hatta hipoplazik bile olabilir. Çok sayıda intra ve inter makrofajik leishmania ile makrofajların ve lenfositlerin yaygınlaşması görülür. Karaciğer son aşamalarda büyür ve kalsifiye olur (Rallis ve ark, 2005). CVL' de granümatöz veya pyogranümatöz yangısal reaksiyonlar geliştiğinde, ilerlemiş vakalarda kronik diyareye yol açmaktadır (Benzouine, 2000; Ferrer, 1991; Keenan ve ark, 1984). Testislerde fibröz septumun kalınlaşmasıyla kurumuş, sarımsı kahverengi veya grimsi renktedir (Amara ve ark, 2009). Böbrek belirtileri glomerulonefritis ve/veya interstisyel nefritis, daha nadiren amiloidoz şeklindedir. Bunlar proteinürinin varlığını gösterir ve hipertansiyon gelişmesinin sebebi olabilir ve bir kısır döngü oluşumunu işaret eder, son aşaması olan nefrotik sendrom ve/veya kronik böbrek yetmezliği, leishmaniasis' in en temel ölüm sebebidir (Gharbi ve ark, 2015). Diğer lezyonlar sık ve polimorfiktir (Blavier ve ark, 2001). Bunlar; eklem distensiyonu, bazen eroziv artrit, proliferatif veya litik kemik lezyonları, kronik hepatitis, kronik kolitis,

menenjitis ve masseter kaslarda atrofik myositis ve/veya polimiyositis şeklindedir (Gharbi ve ark, 2015).



Resim 10. (1) *Leishmania sp.* ile enfekte köpekte kaşeksi, eksfoliyatif dermatitis ve birkaç kemik çıkıntılarının üzerinde yaygın ve hipotrikhotik eksfoliyatif dermatit ve ülserasyonlar (2) Yüzde ve kulaklarda eksfoliyatif dermatitis (3) Çene derisinde ülserasyon ve plak oluşumu (4) Ön bacaklarda aşırı tırnak uzaması (Onikogrifozis) ve multifokal derin stafilokok piyoderma (5) Nodüler ve ülseratif blefaritis, purulent konjonktivitis ve korneal opasite ve neovaskülarizasyon ile anterior üveitis (6) Kronik miyozitis nedeniyle temporal kaslarda şiddetli ve simetrik atrofi (Koutinas, 2014).



Resim 11. CVL' li bir köpekte (A) pododermatitis, onikogrifozis, paronişi (B) Göz kapaklarında granülamatöz lezyonlar ve korneal opasite (Solano-Gallego ve ark, 2016)

2.5. Tanı

Bireysel olgularda leishmaniasisin tanısının onaylanması zor olabilir, özellikle klinik belirtiler spesifik değildir. Buna ek olarak, leishmania enfeksiyonu için yapılan uzun çalışmalar tanı testleri için göreceli prediktif (belirleyici) değerlerinin enfeksiyonun aşamasına bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Sonuç olarak, birden fazla test yöntemlerini içeren bir tanısal yaklaşım önerilmektedir ve tek bir tanı yöntemi tüm enfekte hayvanların tanısını koyamaz (Solano-Gallego ve ark, 2016).

Hücre içi ya da hücre dışı leishmania amastigotları Giemsa ya da diğer Romanowsky türü ile boyalı doku aspiratlarıyla tanımlanabilir ya da lenf nodülleri, konjunktiva, kemik iliği, dalak ve deri lezyonlarından alınan biyopsi örnekleri ile de tespit edilebilir. Leishmania amastigotları küçük yuvarlak veya oval organizmalardır, $1.5-3.0 \times 2.5-3.5$ mikron büyüklüğünde ve serbest flagellası yoktur. Organizma, nispeten büyük bir çekirdek ve kinetoplasta sahiptir. Mikroskopik incelemenin duyarlılığı göreceli olarak zayıftır (%60), kemik iliği ve lenf nodüllerinin örneklerinde %50' den az parazit yoğunluğuna sahiptir. Kinetoplast DNA' sını hedef alan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve leishmanianın belirlenmesinde duyarlılığı ve özgüllüğü artışı sağlayan immünohistokimyasal teknikler taze veya dondurulmuş kemik iliği, lenf düğümü ve deri biyopsi örneklerini kullanılmak için geliştirilmiştir. Bu tür örneklerde, PCR duyarlılığı %95-100' e yaklaşır. Ancak periferik kan örneklerinde PCR duyarlılığı düşüktür (Solano-Gallego ve ark, 2016).

Leishmania sp. ile enfekte birçok köpekte spesifik humoral immun yanıt geliştirir ve bu durumda sero-diagnostik testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Erken leishmania enfeksiyonunda (ilk birkaç ay) serolojik duyarlılık (%41) düşüktür fakat ilerleyen enfeksiyonda yüksek duyarlılık söz konusudur (% 93-100). Hafif enfeksiyonlarda özellikle lokalize kutanöz Leishmania enfeksiyonunda olduğu gibi duyarlılık sınırlı olabilir. Çok çeşitli serolojik testler kullanılabilir. Böylece İndirekt floresan antikor testi, direkt aglütinasyon, konventional enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot-ELISA, kompetitive ELISA ve western blotting testlerinden faydalanabilir. Spesifite, duyarlılık ve prediktif değerlerinde bazı varyasyonlar olmasına rağmen, serolojik tanıda en çok bu testler kabul edilebilir düzeydedir. Hali hazırda, rekombinant Leishmania K39 ELISA onaylanmış olmasına rağmen birçok testte kaba leishmania antijeni kullanılmaktadır. Birçok immünokromatografik hızlı test kitleri CVL için üretilmiştir ancak çoğu nispeten spesifik olmasına rağmen, duyarlılık %35-76 arasında değişmektedir (Solano–Gallego ve ark, 2016).

Köpeklerde leismaniasis' e karşı aşılama henüz geliştirilmemiştir. Yüksek antikor düzeyleri genellikle enfeksiyon ve şiddetli parazit yoğunluğu ile ilgilidir bu sebeple bunların hepsi leismaniasisin kesin tanısında faydalı olur. Ancak, düşük antikor seviyelerinin varlığı latent hastalığın her zaman göstergesi değildir ve bu durumun PCR, histoloji, sitoloji gibi diğer tanı yöntemleri ile teyit edilmesi gerekir. (Tablo 2) Seroloji sonuçlarının yorumlanmasındaki zorluklar içerisinde diğer patojenlerin oluşturduğu çapraz reaktivite ve antikorları oluşturan aşılama yer alır. Bazı serolojik testlerde farklı patojenler serolojik olarak çapraz-reaktivite oluşturması mümkündür. Çapraz reaktivite şekillendiği diğer bazı leishmania türleri ve *Trypanosoma cruzi* enfeksiyonlarında rapor edilmiştir. Bu yüzden, *Trypanosoma* türlerinin enfeksiyonunda olan çapraz reaksiyon sonucu serolojik spesifite Orta ve Güney Amerika' da azalabilir. Enfeksiyondan sonra oluşan antikorlar ve aşılama sonrası oluşan antikorların arasındaki ayrımı yapan serolojik teknikler günümüzde yoktur. Bunun için aşılama sonrası oluşan antikorların kinetiği hakkında iyi bilgi sahibi olunması önemlidir. CaniLeish® aşısı ile aşılama suretiyle oluşan antikorların maksimum pik düzeyi ilk aşı protokolünün üçüncü aşılamasından 2 hafta sonra ulaşır. Antikor seviyelerinde zamanla azalma görülmektedir, Aşılanmış köpeklerin çoğunda saptanabilir antikor varlığına sahip değildir, bu durum 6 ay sonra yapılan IFAT ile elde edilmiştir (Tablo 2) (Solano–Gallego ve ark, 2016).

Kültür CVL enfeksiyonunun tanısı için de kullanılabilir, ancak teknik anlamda uzman laboratuarlara ve uygun muhafaza tesislerine ihtiyaç vardır. Buna ek olarak, uygun spesifiteyi elde etmek için çok sayıda örneklerin çeşitli bölgelerden alınması gereklidir. Leishmania türlerinin karakterizasyonu için temeli geleneksel izoenzim analizleri ve moleküler teknikler kullanılır (multilocus sequence yazımı ve microsatellite identifikasyonu). Yeni ve Eski Dünya türlerinin farklılaşma gibi primer dizileri artık mevcuttur, PCR ve dizilemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Solano–Gallego ve ark, 2016).

İlk aşama leishmaniasis ile ilgili bulgulara yönelik detaylı bir klinik muayene yapılmasıdır. Lenf yumrularına yönelik bir aspirasyon uygulanması ilk diyagnostik tekniktir ve özellikle de büyüme farkedildiyse yapılması önemlidir. Aspirat mikroskop slaytına sürülür, daha sonra Giemsa ile boyanarak, optik mikroskopta $\times 1,000$ büyütme ile amastigotların varlığının tespiti için incelenir. Parazitler çubuk şeklindedir, bir nukleus ve kinetoplast içerir (bu iki yapı koyu kırmızı-mor renktedir) ve hücre konağı sıklıkla ruptüre edildiğinden sürme işlemi sırasında intrasellüler ve ekstrasellüler kompartımanlarda bulunabilir. Alternatif olarak, dalak, kemik iliği ve deri biyopsisi de yapılabilir. Tekniğin hassasiyeti zayıf olduğundan (%50–60), negatif klinik vakalar diğer teknikler kullanılarak araştırılmalıdır (Gharbi ve ark, 2015).

İmmunoflorasan antikör testi (IFAT) promastigotların kullanılmasıyla yapılan referans tekniği olarak kullanılır, cut-off değeri köpeklerde 1/80' dir (WHO, 2015). ELISA giderek IFAT' ın yerini almaktadır çünkü ticari kitleri bulunabilir hale gelmiştir. Daha hassas ve belirgindir; otomatize edilebilir, okuması kolaydır ve objektif sonuçlar verir (Gharbi ve ark, 2015).

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) DNA, lökositlerden veya diğer doku biyopsilerinden elde edilir. Parazite genomunun çeşitli parçalarını özellikle kinetoplast DNA sarmalını açarak bize Leishmania cinslerinden çeşitli türleri ayırt etmemize yardımcı olan birçok primer setler geliştirilmiştir (Ravel ve ark, 1995; Gomes ve ark, 2007).

Döngü-ortamlı izotermal amplifikasyon (LAMP) PCR ısı döngüleyici gerektirmez ve böylelikle çok donanımlı olmayan laboratuarlarda bile kullanılabilir. Dahası LAMP PCR' da kullanılan *Bacillus stearothermophilus* polimeraz 60–65°C lerdeki çalışmalarda kullanılır. (Gharbi ve ark, 2015). Chaouch ve ark (2013) *L. infantum* DNA sını belirlemek için sistein proteaz B multi-kopya genini hedefleyen bir LAMP PCR geliştirmiştir. Bu tekniğin hassasiyeti geleneksel PCR ile kıyaslanabilir özelliktedir. Belirginliği sıradan 18S LAMP' ten daha fazla olsa da Adams ve ark (2010) *Trypanosoma*

cruzi ile çapraz reaksiyon belirlemişlerdir. Birtakım hızlı, kullanıma hazır, piyasada mevcut tek kullanımlık çift yol platformları (DPP) (hızlı test kitleri) bulunmaktadır. A/G protein ve antikorlara bağlı antijenler ile bağlanmış koloidal altın parçalarının reaksiyonu üzerine hazırlanmışlardır (Castro-Júnior ve ark, 2014). Beş μL bir örnek cihazın içine yerleştirilir. Bu testler serum, plazma ve tam antikoagülanlı kan üzerinde uygulanabilir ama antikor nicelliği uygulanamaz (Gharbi ve ark, 2015).



Tablo 2. CVL tanısı için kullanılan bazı tekniklerin avantajları ve kullanımını sınırlayan durumlar (Gharbi ve ark, 2015)

Direkt Teknikler	Belirti	Avantajları	Dezavantajları	Uygulama
Lenf nodüllerinin biyopsisi	Amastigotlar	<ul style="list-style-type: none">○ Hızlı○ Az maliyet○ Mükemmel Spesifite	<ul style="list-style-type: none">○ Düşük Sensitivite	<ul style="list-style-type: none">○ İlk teknik olarak uygulama
Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	Nükleik asitler	<ul style="list-style-type: none">○ Mükemmel Spesifite○ Mükemmel Sensitivite○ Subjektif değildir	<ul style="list-style-type: none">○ Pahalı○ Taşıyıcı ve enfekte dönem arasında fark yoktur○ Laboratuvar ekipmanı gerektirir	<ul style="list-style-type: none">○ Araştırma için○ Sağaltım takibi
Immunofloresan antikor testi (IFAT)	Somatik antikor	<ul style="list-style-type: none">○ Düşük maliyet○ Kolay uygulama○ Pahalı ekipman gerektirmez○ Standart teknik	<ul style="list-style-type: none">○ Bazen objektif değildir○ Uygulaması zaman alır	<ul style="list-style-type: none">○ Toplu tarama○ Klinik tanı
Enzim-bağlı immunosorbent testi (ELISA)	Çözünebilir Antikor	<ul style="list-style-type: none">○ Objektif○ Oldukça ucuz○ Basit○ Nicel teknik	<ul style="list-style-type: none">○ Kit şeklinde bulunabilir	

2.6. Sağaltım

CVL' li köpeklere yönelik bir mevzuat bulunmadığından, köpeğin sağaltımına yönelik uygulamalar köpek sahibi ile veteriner hekim arasında gerçekleşmektedir. Sağaltım protokolünde önemli bir faktör köpek sahibinin düşüncesidir. Öncelikle, köpeğin böbrek ve karaciğer fonksiyonları incelenmelidir. Eğer bunlar etkilendiyse tenazi yerinde olacağı bildirilmiştir. Sağaltımı yapılan her köpeğin rezervuar olmasını engellemek ve vektörün aktif olduğu sezonda yeniden enfekte olmasını engellemek için kum sineklerine karşı insektisitli tasma takılmalıdır. Bazı protokollerle CVL' nin sağaltımı yapılmaya çalışılsa da; en sağlıklı yaklaşım leishmanistatik ve leishmanisidal moleküllerdir. CVL sağaltım ve denemeleri hakkında incelemeler içeren kapsamlı araştırmalar vardır (Andrade ve ark, 2011; Athanasiou ve ark, 2013; Noli ve Saridomichelakis, 2014). Sağaltımı yapılan hayvanlarda kkk bir oranda dahi olsa etken kalacağından serolojik ve klinik gözlem hayvanın hayatı boyunca devam edilmelidir. Sağaltım metodu olarak meglumin antimonyat (leishmanisidal molekül) ile allopurinol (leishmaniastatik molekül) kullanıldığı bildirilmektedir (Gharbi ve ark, 2015).

Meglumin antimonyat günlük 75–100 mg/kg veya günde iki defa 40–75 mg/kg, 4–6 hafta boyunca subkutanöz olarak ya da intramusküler enjeksiyon şeklinde yapılır. Meglumin antimonyat, nefrotoksisite (Bianciardi ve ark 2009), anoreksi, kusma, diyare ve lokal enfeksiyon bölgesi oluşumu gibi yan etkiler gözlemlenir (Noli ve Saridomichelakis, 2014).

Allopurinol en az 6–12 haftalığına günde iki defa 10–15 mg/kg oral olarak verilir (Solano-Gallego ve ark, 2011). Bazı allopurinol ile sağaltımı yapılan köpeklerde (%12) ksantin üriner kristaller, sonrasında, bazı vakalarda, ksantin rolitiasis görülmüştür (Torres ve ark, 2011).

Miltefosin, bir leishmanisidal alkilfosfokolindir, insan dermatolojisinde bir antimitotik olarak kullanılır ve köpeklerde leishmaniasis sağaltımında (2 mg/kg günde bir kez, 30 gün süre ile) allopurinol ile birlikte kullanılır (Farca ve ark, 2012).

L. infantum miltefosine karşı hızlıca direnç geliştirir. Semptomatik sağaltımda sekonder enfeksiyonlar (lserler, keratokonjunktivitis ve diğer belirtiler gibi) içinde sağaltım uygulanmalıdır. Kortikosteroidler, eklem ve böbreklerde immunokomplekslerin birikme riski olduğunda kullanılması önerilir (Gharbi ve ark, 2015).

Parazitolojik olarak kanıtlanmış CVL ile enfekte yedi köpek allopurinol ve sodyum stiboglukonat kombinasyonu ile sağaltımı yapılmıştır. Bu çalışmaya göre köpekler, klinik bulgular iyileşene kadar (her 12 saatte bir oral olarak 15 mg/kg) allopurinol verilmiştir, bunu takiben bir ay süre ile sodyum stiboglukonat 30 mg/kg dozda subkutanöz şekilde allopurinolle kombine edilmiştir. Daha sonra allopurinol 8 ayın sonuna kadar aynı dozda tek başına devam edilmiştir. 8 aylık sağaltımın sonunda, klinik bulguların ve klinikopatolojik anormalliklerin normale restorasyonu fark edilmiştir. Sağaltımın sonunda yedi köpeğin üçüne yapılan lenf yumrularından alınan aspirasyon örneği incelenmiş ve amastigot gözlenmemiştir. Köpeklerin IFAT titreleri halen pozitif olmasına karşın ortalama IFAT titreleri, sağaltım öncesi ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük ($P < 0.001$) olarak belirlenmiştir (Paşa ve ark, 2005).

2.7. Korunma

L. infantum' a yatkınlığı az olan sağlıklı insanlarda, çoğunlukla asemptomatik enfeksiyonlar görülür. Klinik olarak tesbit edilmiş enfeksiyonlar iki yaşın altındaki çocuklarda daha yaygındır (Takken ve Knols, 2007). *L. infantum*' un ana kaynağı köpeklerdir; ayrıca vahşi karnivorlarda da olabilir ancak bunlar parazitin epidemiyolojik döngüsünde daha az öneme sahip bir yer tutarlar. Bu daha küçük biyokütle ve yoğunluğa sahip olmalarından ve insan popülasyonları ile daha uzak ilişkide olmalarından kaynaklanmaktadır. Parazit hasta bir köpekten kum sineğine bulaşır, daha sonrada vektörden insanlara bulaşma şekillenir. Leishmaniasis' in küresel sıklığı ve coğrafi dağılımı hakkındaki istatistik bilgileri güvenilir değildir ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Otranto ve Dantas-Torres, 2013). Dünya Sağlık Örgütüne göre 98 ülkede endemiktir (WHO, 2010). Dünya çapında iki milyon vaka, 0,5 milyonu Visceral Leishmaniasis ve 1,5 milyonu kutanöz form şeklindedir. Dengesiz beslenme, HIV enfeksiyonu, immunodepresyon, insanları paraziter bu enfeksiyona hazır hale getirir (WHO, 2015; Rodriguez-Cortes ve ark, 2013). Ateş, mukozal solukluk ve splenomegali, düşük düzeyde kan hücresi (anemi, lökopeni ve trombositopeni) ve bir yangısal sendrom ile ilişkilendirilen klinik görünüm şekillendirir (Marty ve ark, 2011).

CVL' nin kontrolü hasta köpeklerdeki şiddetli yapısından ve zoonotik karakterinden dolayı önemlidir. Önlem almak sağaltımdan daha önemlidir çünkü sağaltıma ilişkin kısıtlamalar mevcuttur ve yüksek maliyete sebep olabilmektedir. Dahası köpek

nüfusunun büyükçe bir bölümü bu ölçülerden etkilemeyeceğinden, bireysel kontrol mekanizmalarının hastalığın epidemiyolojisi üzerine etkisi yoktur (sahipli köpekler, başıboş köpekler ve yabani köpek türleri). Herhangi bir kontrol opsiyonu seçmeden önce, şu iki faktörü göz önünde bulundurmak önemlidir. (1) Hedeflenen bölgenin epidemiyolojik şekli nasıldır? (Örneğin, hastalık sporadik, enzootik ya da hiperenzootik şekilde mi ortaya çıkıyor?) (2) Köpeklerde leishmaniasis' in hedef alanındaki insanların yaşamı üzerine etkisi nasıldır? (Gharbi ve ark, 2015).

2.7.1. Aşılama

Veteriner sağlık alanında çok önemli olmasına ve hasta sayısına rağmen CVL ' ye karşı aşı sadece son 10 yıldır uygulanmaktadır. Günümüzde üç ticari aşı bulunmaktadır (Otranto ve Dantas-Torres, 2013).

2.7.1.1. Leishmune®

Bu bir fruktoz-manoz ligand (FML)-saponin aşısıdır; Brezilya'da 2003' te *L. donovan*' ye karşı köpekleri korumak amacıyla lisanslanmıştır. Bu parazite karşı etkililiği %76 ve koruma oranı %92' dir. Brezilya Sağlık Bakanlığı Leishmune®' u köpeklerde leishmaniasis' e karşı kullanımı kabul etmemiştir. (Gharbi ve ark, 2015).

2.7.1.2. Leish-Tec®

Bu aşı of *Leishmania* amastigotlarının A2-antijen rekombinantıdır ve saponin' i adjuvant (destekleyici-tedavi edici) olarak kullanır. 2008' de lisanslanmıştır. Bu ticari aşının etkililiği hakkında yeterli bilgi yoktur (Wylie ve ark, 2014).

2.7.1.3. Canileish® (LiESP/QA-21)

Bu aşı çeşitli Avrupa ülkelerinde 2011' de lisanslı ürün sıfatını kazanmıştır. Söz konusu aşı *L. infantum* promastigotlarının süpernatant bir kültürü olarak (LiESAp), 54-kilodalton (kDa) salgılanmış *L. infantum* proteini ile muramyl dipeptid (MDP) içermektedir. Aşının *L. infantum*' a karşı etkililiği % 68,4 koruma oranı ise % 92,7' dir.

Doğal *L. infantum* enfeksiyonuna maruz kaldıktan sonra, aşılanmış köpeklerin PCR pozitif olma olasılığı kontrol grubundaki köpeklerle benzerdir fakat PCR pozitif köpeklerin, PCR negatif duruma dönüşmesi aşıları hayvanlarda kontrol grubundan daha fazla olasılık taşımaktadır (Wylie ve ark, 2014; Oliva ve ark, 2014).

2.7.2. İnsektisitli tasmaların kullanımı

Deltamethrin'in insektisitli tasmalarda kullanımı endemik bölgelerde köpeklerde enfeksiyon riskini azaltır (Gharbi ve ark, 2015). Manzillo ve ark (2006) leishmaniasis 'in yüksek endemik olduğu yerlerdeki barınaklarda sahihsiz köpeklerde iki yıllık bir alan çalışması yapılmıştır. Bu araştırmacılar köpeklerde leishmaniasis'in belirtilerinin tasmalı köpeklerde daha sıklıkla gözlemlendiğini belirtmiş ve enfeksiyonun daha hızlı geliştiğini rapor etmişlerdir (Manzillo ve ark, 2006). Ama diğer etkili insektisitlerin de kullanılmaması durumunda deltametrine olan direnç mutlaka ortaya çıkacaktır (Gharbi ve ark, 2015).

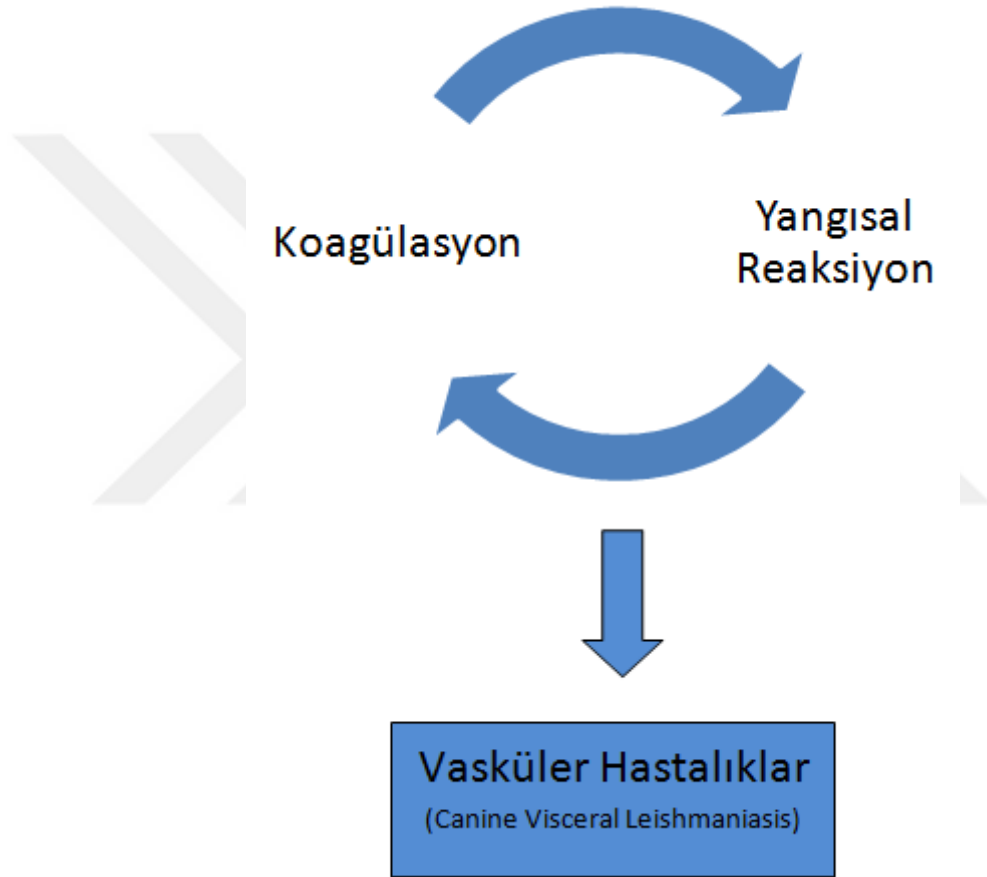
2.7.3. Vektör Kontrolü

Vektör kontrolü kum sineklerine karşı genellikle imkansızdır, çünkü olgunlamamış safhalarda barınaklarda yuvaların tespiti zordur ve ergin formları çok geniş bir çevreye yayılmış durumdadırlar. Durgun veya akışkan sulara uygulama yapmanın kum sineklerine etkili olacağı yaygın bir yanıltır (Gharbi ve ark, 2015).

Yaygınlaştırma programı köpek sahiplerine, özellikle de gelişmekte olan ülkelerde kırsal bölgelerde olanlara yönelik olmalıdır. Köpek sahiplerinin köpeklerinin yaşam koşullarını iyileştirmeleri konusunda bilgilendirilmeli, özellikle kaliteli ve yeterli beslenme ve uygun sağlık önlemlerinin sağlanması konusunda bilinçlendirilmeleri gerekmektedir. Parazitler için bir rezervuar görevi yapan geniş sokak köpeği topluluğunun oluşmasını engellemek amacıyla evsel atıkların düzenli bir şekilde toplanmasının sağlanması gereklidir. Bu bölgelerde Veteriner Hekimler toplumu bu üç önemli konuda bilinçlendirmelidirler; (1) Leishmaniasis hayvandan insana bulaşan ve kum sinekleri ile taşınan özellikle bağışık sistemi zayıflamış çok genç ve yaşlı insanlarda ortaya çıkan bir hastalıktır. (2) Köpeklere kum sineklerinden bulaştırılması genelde gün batımı ve gün

doğumu arasında dışarıda olmaktadır. (3) Eğer köpeklerde ilgili belirtilerden (deri lezyonları, halsizlik veya lenf nodüllerinde aşırı büyüme) bir ya da birkaçı görülürse Veterinere Hekime danışılmalıdır. (Gharbi ve ark, 2015).

2.8. CVL ile hemostazis arasındaki ilişki

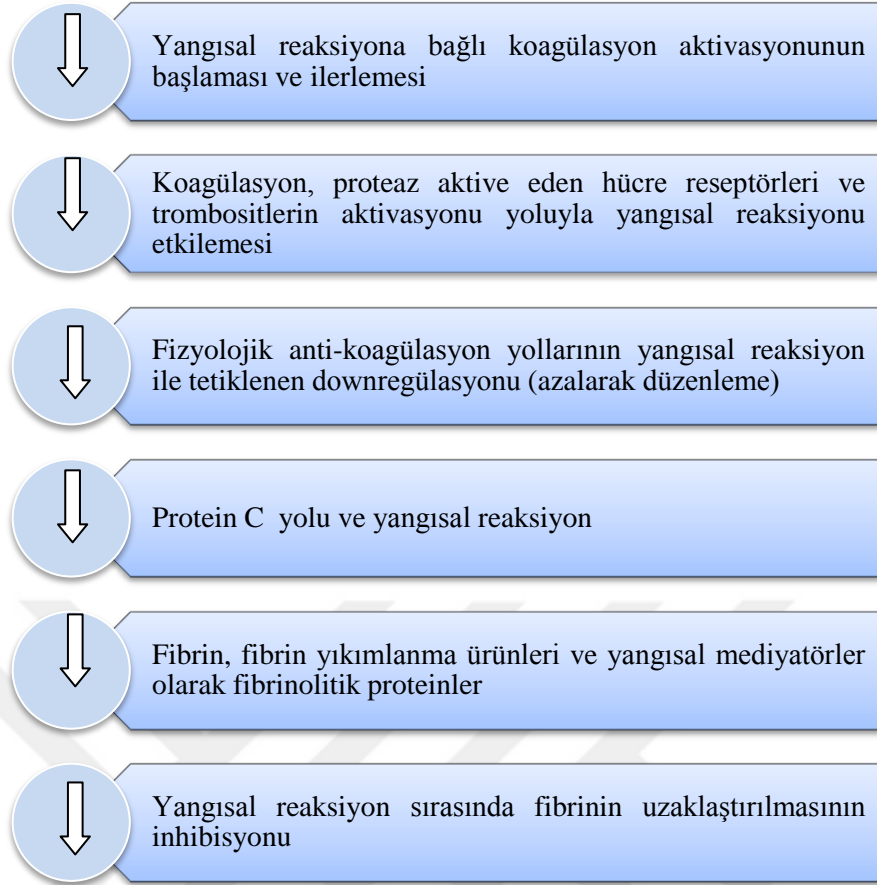


Şekil 4. Koagülasyon, yangısal reaksiyon ve vasküler hastalıklar arasındaki ilişkiye yönelik şema (Esmon, 2000)

CVL' de meydana gelen damar hasarı, direkt olarak gerçekleşebildiği gibi antijen tarafından oluşturulan immun kompleksler ve hücresel bağışıklık sonucu immun sistemin cevabı ile de hasar meydana gelir. Leishmania türlerinin invazyonu ile gelişen vaskülitis ve parazitin küçük çaplı kapillar damarlara göllenmesiyle trombozis, iskemi ve nekrozlar görülür (Pumarola ve ark, 1991).

CVL' de sirkülasyondaki persiste antijen üretimine bağlı olarak oluşagelen immunkompleksler glomeruluslardaki kapillar duvarda ve kan damarlarında birirmektedirler. Son sözü edilen çözünebilir (soluble) kompleksler koagülasyon kaskadını uyararak yangısal cevap oluşturmakta ve böylece glomerulopati ve vaskülitis şekillendirmektedir. Önceden bildirilen bir vakada leismaniasisli bir köpekte vaskülitisin akut parapleji' ye neden olduğu gösterilmiştir (Font ve ark, 2004).

Son zamanlarda hemostaz ve yangı arasındaki bağlantı çok ilgi çekmektedir (Esmon, 2000). Bu bağlantı, pıhtılaşma faktörlerinin trombin, FX ve FVII' nin, hemostazda bilinen bir rolü olmayan spesifik hücre membranı kapsayan reseptörlere bağlanarak hücre içi sinyal kaskatlarını tetiklediğini gösteren çalışmalarla belirlenmiştir (Röttingen ve ark, 1995; Papapetropoulos ve ark, 1998; Ellis ve ark, 1999; Ruf ve Mueller, 1999) Trombin reseptörleri (proteaz aktive reseptörleri-PAR) en iyi karakterize edilenlerdir. "PAR" lar reseptörün exodomainini bölen proteaza bağlandıktan sonra etkinleşen G-protein bağlı reseptörler ailesine aittirler (Coughlin, 1999). Bu manipülasyon, daha sonra kendi reseptörünü uyanan bağlı bir peptidin ligandını açığa çıkarır. Şu ana kadar, bu mekanizmayla tetiklenmiş dört reseptör tanımlanmıştır. PAR-2 tripsin, mast hücresi tripsini, *Porphyromonas gingivalis*' ten bir sistein proteinaz tarafından harekete geçirilirken trombin PAR-1, PAR-3 ve PAR-4' ü harekete geçirir (Nystedt ve ark, 1994; Loubakos ve ark, 1998; Akers ve ark 2000; Steinhoff ve ark, 2000). FX reseptörleri (efektör hücre proteinaz reseptör-1 [EPR-1] ve FVII (TF) G-protein bağlı reseptörler ailesine ait değildir ve farklı mekanizmalar tarafından harekete geçirilir (Nicholson ve ark, 1996; Cunningham ve ark, 1999). Ek olarak, protein C için bir reseptör (endotelial hücre protein C [EPCR]) tanımlandı (Esmon ve ark, 1999). Bu reseptörün intraselüler işareti tetikleyip tetiklemediği araştırılmaktadır (Kurosawa ve ark, 1997; Simmonds ve Lane, 1999; Esmon ve ark, 1999). Septisemisi olan hastalar, EPCR' nin bulaşıcı hastalıklarda markör protein olarak kullanılabileceğini göstererek, plazmadaki EPCR' nin çözülebilir bir formunun seviyelerini önemli derecede artırdı (Kurosawa ve ark, 1998). Koagülasyon faktörlerinin bu reseptörlere bağlanması ve daha sonraki aktivasyonu, lökosit alımı, sitokinlerin, nitrik oksidin salınması ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi gibi yangısal reaksiyonları (Şekil 5) tetiklenir (Cirino ve ark, 1997; Duchosal ve ark, 1996; Papapetropoulos ve ark, 1998; Cunningham ve ark, 1999; Vergnolle, 1999).



Şekil 5. Yangısal reaksiyonlarla koagölasyon arasındaki ilişkinin farklı aşamalarına yönelik şema (Esmon, 2005; Levi ve Vander Poll, 2010).

Hemostazis, kan kaybının durdurulması anlamına gelmektedir. Hemostazis; bir damar zedelendiği zaman çeşitli mekanizmalar ile sağlanmaktadır. Bu mekanizmalar; damar spazmı, trombosit tıkaçı oluşumu, kanın koagölasyonu sonucu, kan pıhtısı oluşumu, fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır (Turgut, 2000).

2.8.1. Koagölasyon mekanizması

Koagölasyona etki eden 50' ye yakın madde kanda ve dokularda bulunmaktadır. Bu maddelerin bazıları koagölasyonu sağlar, bunlara prokoagölün denir. Bazıları ise koagölasyonu inhibe eder bunlara antikoagölün denir. Koagölasyonun oluşup oluşmaması bu maddeler arasındaki dengeye bağlıdır. Fizyolojik olarak normal bir durumda

antikoagülanlar baskındır bu durumda koagülasyon şekillenmez. Damar yapısı bozulduğunda hasar alan bölgedeki prokoagülanlar uyarımlar ile antikoagülanlara karşı baskın hale gelir. Koagülasyon gerçekleşir. Koagülasyonun temel olarak 3 basamaktan oluştuğunu koagülasyon ile ilgili çalışan tüm araştırmacılar birleşirler. (1) Bir dizi kimyasal reaksiyonlar; damarda ya da kanda oluşan hasar sonucu kanda bir seri koagülasyon faktörünün aktivasyonunu sonucu protrombin aktivatörü adı verilen kompleks oluşturmasıdır. (2) Protrombinin trombine dönüştürülmesi; protrombin aktivatörü ile katalizlenir. (3) FIB' in fibrin ipliklerine dönüştürülmesi; trombin enzim görevi yaparak fibrin ipliklerini meydana getirir. Oluşan fibrin iplikleri trombositleri, kan hücrelerini, plazmayı içine alarak pıhtıyı oluşturur (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.2. Protrombinin trombine dönüşümü

Protrombin aktivatörü, kandaki bazı özel aktivatör maddelerin ve damarların hasarlanması sonucu oluşur. Ortamda yeterli düzeyde Ca^{+2} varlığında protrombin trombine dönüşür. Takibinde trombin fibrin molekülleri ortalama 10-15 saniye içinde fibrin ipliklerine polimerizasyonuna neden olur. Koagülasyonda hız sınırlayıcı faktör olarak genellikle protrombin faktörünün oluşumudur. Çünkü bu noktadan sonraki aşamalar kan pıhtısı oluşturmak için hızla gerçekleşir (Guyton ve Hall, 2006).

Hasarlanan dokuya önceden bağlanan trombositler üzerinde bulunan protrombin reseptörlerine bağlanır. Bu durumdan dolayı trombositler de protrombinin trombine dönüşümünde önemli rol oynar. Protrombin alfa₂-globulin proteini olan plazma proteinidir ve stabil olmayan yapıdaki protein daha küçük bileşiklere ayrılabilir. Protrombinin yarısı yaklaşık trombin molekülüdür. Protrombin karaciğerde sentezlenir fakat üretimi azalırsa plazma konsantrasyonu bir veya birkaç gün içinde normal koagülasyon için gerekli olan miktarın altına düşer. Karaciğerde protrombin üretimi için K vitaminine gereksinim vardır. Bu nedenle K vitamini eksikliğinde ve karaciğerde normal protrombin üretimi engelleyecek bir hastalığın varlığında protrombin düzeyini kanama eğilimine neden olacak düzeyde etkiler (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.3. FIB' in fibrine Dönüşümü-Pıhtı oluşumu

FIB karaciğer de üretilir ve koagülasyon sistemindeki esas faktörlerden biridir. Karaciğer hastalıklarında FIB' in plazma konsantrasyonu protrombindeki gibi azalır. Büyük moleküler yapısı nedeni ile az miktarda FIB intersitisyel alana geçer. Bu nedenle intersitisyel sıvı genellikle çok az ya da hiç pıhtılaşmaz. Fakat kapillar permeabilitede oluşan patolojik bir bozukluğun varlığında kanın koagülasyonuna benzer şekilde gerçekleşir (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.4. Fibrin Oluşumunda Trombinin FIB' e Etkisi

Trombin proteolitik etkisi olan protein yapısındaki enzimdir. FIB üzerindeki etkisi ile FIB molekülünden dört düşük molekül ağırlıklı peptidi ayırır ve fibrin monomerini oluşturur. Fibrin monomeri diğer fibrin molekülleri ile kendiliğinden polimerleşme yeteneği gösteren moleküldür. Fibrin monomer molekülleri saniyeler içinde uzun fibrin iplikçiklerine polimerize olurlar ve bu yapı pıhtının retikulumunu oluşturur. Fibrin monomerleri aralarında zayıf non-kovalen hidrojen bağları oluşturur, fibrin iplikçikleri ise diğerleri ile çapraz bağlar yapmadığı için oluşan pıhtı zayıf ve kolayca çözünebilir yapıdadır. Normalde plazma globulinlerinde az miktarda bulunan fakat pıhtı içinde bulunan trombositlerden salınan fibrin stabilize edici faktör (fibrin retikulumunu güçlendirecek fonksiyonu olan madde) birkaç dakika içinde devreye girer. Fibrin stabilize edici faktör trombin tarafından aktive edilir. Bu faktör fibrin monomerleri arasında kovalen bağlar oluşumuna ve komşu fibrin iplikçiklerinin arasında çok sayıda çapraz bağlar oluşmasını sağlayan enzim görevi görür. Böylece oluşan pıhtıyı kuvvetlendirir (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.5. Pıhtı Retraksiyonu

Pıhtı oluşumu sonrası birkaç dakika içinde kasılmalar başlar ve ortalama 20–60 dakika sonra serum pıhtı içerisinden ayrılır. Trombositler fibrin stabilize edici faktörün salınımı ve farklı iplikçikleri birbirine bağlayabilecek şekilde fibrin iplikçiklerine bağlanabilme özelliğinden dolayı pıhtının retraksiyonuna katkıda bulunur ayrıca içlerinde

retrakte olabilir proteinleri içermesi (aktin-myozin) nedeniyle pıhtının retraksiyonunda direkt katkıda bulunur. Böylece pıhtının retraksiyonu sonucu damarda oluşan yırtık uçları birbirine doğru yaklaştırılmış olur ve hemostaz aşamasına katılır (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.6. Pıhtı oluşumunun kısır döngüsü

Kan pıhtısı oluşmaya başladığında pozitif feedback mekanizması ile çevresindeki kan dokusunda da koagülasyon şekillenir ve pıhtı genişler. Bu durumun en önemli nedeni trombinin birçok koagülasyon faktörleri üzerindeki etkisidir. Kritik miktarda trombin oluştuğunda daha fazla kanın koagülasyonu şekillenecek ve daha fazla trombin meydana gelmesine neden olacaktır. Böylece kanama durduruluncaya kadar bu kısır döngüde kan pıhtısı büyümeye devam edecektir. Örnek olarak trombin, protrombin üzerinde proteolitik etki göstererek daha fazla trombin oluşumuna bu durum da protrombin aktivatörü oluşumunda sorumlu pıhtılaşma faktörleri üzerinde etkindir (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.7. Pıhtının başlaması; protrombinin aktivatörünün yapımı

Damar duvarı ve onun komşu dokularının hasar alması ve kan dokusunun hasar alması sonucu protrombinin aktivatörünün yapımı başlatılır. Hasarlı endotel doku ve kollajen veya damar dışındaki dokular ile kanın teması sonucu protrombin aktivatörü oluşumuna neden olurlar. Bu da protrombinden trombin oluşumuna ve diğer koagülasyon aşamalarının gelişimine neden olur. Protrombin aktivatörü oluşumu; damar duvarının ve çevresindeki dokuların hasara uğraması (ekstresek yol) ve kan dokusunun kendi içinden hasara uğraması (intrensek yol) ile olur. Plazma proteinleri (pıhtılaşma faktörleri olarak tanımlanan) ekstrensek ve intrensek yol ile inaktif formdan aktif forma dönüşür ve bir seri koagülasyon basamakları şekillenir. Bunlar çoğunlukla inaktif proteolitik enzim formlarıdır (Guyton ve Hall, 2006).

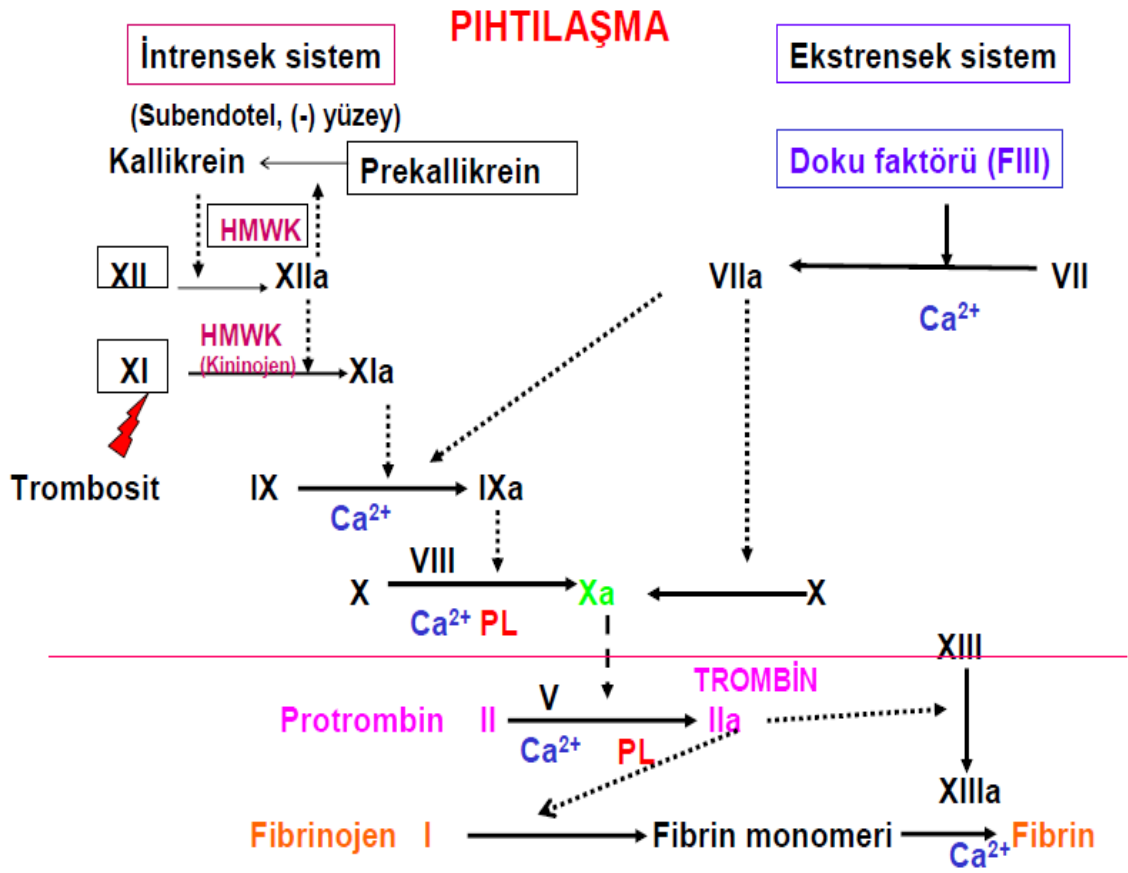
2.8.8. Koagülasyonun başlamasında ekstrinsek yol

Ekstrinsek yol damarın veya damar dışı dokuların hasarı sonucu aktive olur ve böylece protrombin aktivatörü oluşumunu başlatır. Bu aşamada; hasar gören dokudan doku faktörü veya doku tromboplastini adı verilen faktörlerin oluşturduğu bileşim salınır. Bu bileşim doku membranlarından fosfolipidler ile lipoproteinlerden (önemli proteolitik enzim içeren) oluşan kompleks yapıdır. Doku faktörünün lipoprotein kompleksi koagülasyon faktörü VII ile kompleks oluşturur. Bu durum Ca^{+2} iyonlarının varlığında faktör X üzerinde etki göstererek faktör X' nu aktifleştirir. (Faktör Xa) Aktif faktör X doku faktörünü oluşturan fosfolipidleri veya trombositlerden salınan fosfolipidler ile birlikte faktör V ile birleşir. Sonuçta protrombin aktivatörü kompleksini oluştururlar. Ca^{+2} iyonlarının varlığında protrombini trombine parçalar. Trombinin proteolitik aktivitesi ile faktör V aktifleşir. (faktör Va) Başlangıçta faktör V protrombin aktivatör kompleksi içinde inaktiftir fakat daha sonra aktifleşerek protrombin aktivasyonu hızlı ve güçlü bir şekilde gerçekleşir. Böylece son protrombin aktivatörü kompleksinde, aktif faktör X protrombini trombine çeviren gerçek proteaz görevi görür. Trombosit fosfolipidleri ise bu olayı daha da hızlandırır. İşlemler bir kez başladığında trombinin faktör V üzerinde pozitif feedback etkisi ile tüm olayı hızlandırır (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.9. Koagülasyonun başlamasında intrinsek yol

Protrombinin oluşumunu başlatan ya da koagülasyonu gerçekleştiren ikinci bir mekanizma intrinsek yol kan dokusunun kendisinin hasar görmesi yada kanın hasar görmüş damardan açığa çıkan kollajenle teması sonrası başlar. Kan dokusunun hasar görmesi faktör XII aktivasyonuna ve trombosit fosfolipidlerinin salınımına neden olur. Kan dokusunun hasarı veya damar duvarındaki kollajenle teması sonucu koagülasyon faktörlerinden iki tanesinde değişiklik meydana gelir. Bu faktörler; faktör XII ve trombositlerdir. Faktör XII' de moleküler değişim yaparak aktif faktör XII adı verilen proteolitik enzime dönüşür. Trombositlerinde hasarlanması sonucu trombosit faktör III olarak tanımlanan lipoprotein yapısındaki fosfolipidleri ortama salınımı gerçekleşir. Aktif faktör XII enzimatik reaksiyonları ile faktör XI' i aktive eder. Bu durum intrinsek yolun ikinci aşamasını oluşturur. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için yüksek moleküler ağırlıklı kininojen' e (HMWK) ihtiyaç duyulur. Prekallikrein ile de reaksiyon hızlandırılır. Bu

reaksiyonların sonucunda aktif faktör XI faktör IX' u aktive eder. Bununla birlikte aktif faktör XI, faktör VIII, trombosit fosfolipidleri ve hasarlı trombositlerden salınan faktör III ile birlikte faktör X aktive ederler. Faktör VIII hemofili hastalarında eksik olan faktördür. Bu nedenle antihemofilik faktör olarak ta adlandırılırlar. Aktif faktör X, faktör V ve trombosit veya doku fosfolipidleriyle birlikte protrombin aktivatörü kompleksini meydana getirirler. Bu kompleks kısa sürede (saniyeler içinde) protrombini trombine parçalar. Bu aşama ekstrinsek yolun son aşaması ile aynıdır (Guyton ve Hall, 2006).



Şekil 6. Pıhtılaşma Mekanizması (Çakır, 2007)

2.8.10. Kalsiyumu iyonlarının koagülasyondaki rolü

İntrensek yolun ilk iki basamağı hariç diğer tüm aşamalarında reaksiyonların meydana gelebilmesi ve hızlı olabilmesi için Ca^{+2} iyonlarına ihtiyaç vardır (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.11. Ekstrensek ve intrinsek yollar arasındaki etkileşim ile koagülasyon mekanizmasının özeti

Kan damarlarının hasarlarını takiben koagülasyon ekstrensek ve intrinsek sistemleri aynı anda başlatılır. Doku faktörü ekstrensek yolu, faktör XII ve trombositler intrinsek yolu başlatır. Aralarındaki önemli farklardan biri ekstrensek yolun başladıktan sonra gelişme hızıdır. Yalnızca hasarlanan dokulardan salınan doku faktörü ile kanda bulunan faktör X, VII, V düzeyleri ile sınırlandırılabilir. İntrensek yol da ise reaksiyonların hızı daha yavaştır (Guyton ve Hall, 2006).

2.8.12. Primer Hemostazis

Primer hemostasis primer trombosit plağı oluşturmada sorumlu evredir. Burada tepkiler vasküler endotelyum bileşenleri, trombositler ve von Willebrand faktörü ile (vWf) meydana gelir. Normal vasküler endotelyum nitrik oksit (NO) ve prostasiklin (PGI_2) dahil trombosit etkinleşmesinin antagonistlerinin sentezi tarafından olan koagülasyon sürecini engeller. Fakat vasküler hasardan sonra vazokonstriksiyon gelişir bu yüzden kan akışı yavaşlar ve kan kaybı gecikir. Trombosit adezyonu, etkinleşmesi ve agregasyonu sonrası primer trombosit plağı bozulmuş damar duvarında oluşur. Trombositlerin maruz kalmış subendotelyumdaki kollajen liflerine adezyonuyla, trombositler kollajene bağlanır (Anonim1).

Trombosit adezyonu akım hızından etkilenir. Yüksek akım hızı olan bölgelerde (küçük ve orta büyüklükteki arterler gibi), primer adezyon kollajen ve vWf yoluyla meydana gelir. Düşük akım hızı olan bölgelerde (venalar ya da büyük arterler gibi) trombosit adezyonu FIB ile aracılık yapar. Adezyon trombositleri etkinleştirir ve şekilleri yüzey temasına yol açar. Aktif trombositler diğer trombositlerin agregasyonunu uyarır. En

önemli agregasyon maddesi protrombinden (faktör II) koagülasyon yolu tarafından oluşturulan trombindir. vWf ve FIB birlikte aynı zamanda trombosit agregasyonunu uzlaştırırlar. Primer trombosit oluşur ve fibrin tarafından stabilize hale getirilmelidir. İlk olarak, sekonder hemostazisin hedefi trombinle fibrin oluşturmaktır (Anonim1).

2.8.13. Sekonder Hemostazis

Sekonder hemostazis koagülasyon ve geçici hemostatik trombosit plağının kalıcı hemostatik plak oluşumuna dönüşmesini kapsar. Koagülasyonun son ürünü olan trombosit plağı içinde ve etrafında fibrin bağlarının oluşumudur. Böylece plak daha da sağlamlaşır ve tekrar kanama ihtimali azalır. Koagülasyon kaskadı üç yol içerir bunlar; ekstrinsik, intrinsik, ortak yoldur (Anonim1). Koagülasyon kaskadının sınıflandırılması in vivo koşullara karşılık gelmemektedir, ancak laboratuvar testlerinin yorumlanması için yararlı olur (Brooks, 2000; Furie, 2000). Ekstrinsik olarak nitelenmesinin nedeni bu yolun komponentlerini ekstraselüler alandan sağlamasıdır (Anonim 1;Smith, 2010). Ekstrinsik yol bir travma tarafından başlatılır ve organ kapsülü ve mukoza zarı gibi farklı dokulardan doku faktörü (TF) salınımına yol açmaktadır. Bu durumda faktör IV (protrombin) aktive eder. Yangı gibi bazı patolojik durumlar diğer hücre tipleri tarafından doku faktörü salınımına neden olabilir (Smith, 2010). Aktive FVII (FVIIa)-TF kompleksi faktör X (FX) aktive eder. Bu durum ortak yolun ardından ekstrinsik yolun kesişme noktasıdır (Stokol). İn vivo olarak ekstrinsik sistem fonksiyonlarının faktör XI, VII ve V' i aktive etmek için eseri miktarda hızlı trombin sağladığı bildirilmektedir (Turgut, 2000). Ekstrinsik yol ile oluşturulan trombin (az miktarda) intrinsik yolun primer başlatıcısıdır (Anonim1).

Az miktarda trombin faktör XI aktivasyonu yolu ile intrinsik yolu başlatır. Faktör XI yüksek moleküler ağırlığa sahip kininojen-prekallikrein kompleksi (kontakt aktivasyon) tarafından faktör XII' nin aktivasyonu ile otomatik aktivasyon şekillenir. Bu durum, prekallikrein' nin kallikrenine dönüşümüne yol açar, daha sonra ise yüksek moleküler ağırlığa sahip kininojen' nin bradikinine dönüştürülmesinden sorumludur (Anonim1; Smith, 2010; Colman, 2006). Bradikinin doku plazminojen aktivatörü salınımına yol açar (Brown, 1999).

Bu aşamada koagülasyon etkisinden daha çok profibrinolitik ve antikoagülan etkisi önemlidir (Smith 2010). Faktör XI (FXI) aktivasyonu sonrasında aktive edilmiş faktör XI, faktör IX'u aktive eder. Faktör X' nun (intersection point) aktifleştirilmesi için aktive FIX

-aktifleştirilmiş faktör VIII (FVIIIa) kompleksi kalsiyum ve trombositler (tenase kompleksi) ile etkileşime girer. Kesişme noktasında ortak yol başlar ve aktive FX (FXa)- aktive edilmiş faktör V (FVa) kompleksi oluşturulur (Anonim1). Bu kompleks kalsiyum ve trombosit fosfolipid (protrombinaz kompleksi) ile etkileşime ve protrombinden trombinin gelişimi (büyük miktar) FIB' i fibrine dönüştürür (Anonim1; Smith, 2010). Faktör VIII ve trombinin birlikte aktivasyonu, bu durumda kalsiyum ile birlikte fibrin polimerleri çapraz bağlı fibrin polimerlerin oluşturulmasından sorumludurlar (Stokol, 2000). Fibrin polimerleri belirli bir miktarda ise sadece faktör VIII aktive olur. Kalsiyum ile birlikte fibrin polimerlerinden çapraz bağlı fibrin polimerlerinin oluşumundan sorumlu olan trombin aynı zamanda FVIII' i aktive eder (Anonim1). FVIII ancak belirli bir fibrin polimeri olduğunda aktive olur (Roberts ve ark, 2006).

Hemostaz için en önemli unsurlarından biri olan trombin, sadece koagülasyon için değil aynı zamanda anti-trombotik etkiyede sahiptir (Mann ve ark, 2003; Smith, 2010). Fibrin formasyonu için büyük miktarda trombin gereklidir. Bu durum intrinsik ve ekstrinsik yolun arasındaki bağlantı ile sağlanır (Wolberg, 2007). Trombinin plazmada yarılanma ömrü çok kısadır (Crawley, 2007; Smith, 2010).

Üçüncül hemostaz pıhtılaşmanın bir parçası olan fibrinolizdir. Bu sürecin amacı, pıhtının dağılması için plazmin oluşturmaktır (Wiman, 1977; Anonim1). Plazminojen doku plazminojen aktivatörü (tPA) tarafından plazmine dönüştürülür. Plazminojen pıhtıdaki fibrine bağlıdır. Kallikrein ve FVIIa plazminojeni doğrudan aktive eder ayrıca ürokinaz ve FXII de aktivatörlerdir (Smith, 2010; Anonim1). Aktive protein C (APC), plazmin aktivasyonunu uyarır. Plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) plazminin bir inhibitörüdür aktive protein C (APC) üzerindeki blokaj etkisi nedeniyle. Dolaşımdaki plazmin α_2 - antiplazmin (α_2 AP) tarafından inhibe edilir (Stockham, 2008). Plazminojen ile oluşan fibrin yıkımı sonucunda fibrin yıkımlama ürünleri meydana gelir. D-dimer sadece plazminojen ile yıkımı ile görünen FDPs' dir (Furie, 2000; De Laforcade, 2003).

2.9. Hemostatik bozukluk testleri

Hemorajik diatezin nedeni olan hemostaz bozukluğunun ortaya çıkarılması, için laboratuvar incelemelerine gereksinim vardır. Bu amaçla uygulanan basit hemostatik bozukluk testleri mevcuttur (Turgut 2000).

2.9.1. Trombosit Sayımı

Trombosit sayımı trombositopeninin şiddetinin belirlenmesinde önemlidir. Hastalığın prognozunu, şiddetini ve sağaltıma olan cevabın durumunun değerlendirilmesinde yararlı olur. EDTA antikoagüle edilen kanlarda sayım yapılan elektronik sayıcılarda seyrek olarak psödotrombositopeni saptanabilir. Ayrıca çok büyük trombositler, ya da trombositlerin oluşturduğu küçük kümeler bu elektronik sayıcılarda trombosit olarak sayılmadıkları gibi çok küçük eritrositler de trombosit olarak sayılabilir. Bu nedenlerle de periferik kan yaymasının incelenmesi önemlidir (Turgut 2000).

2.9.2. Aktive Edilmiş Parsiyel Tromboplastin Süresi (APTT)

Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin süresi intrinsik ve ortak yolları test eder. Sadece VII ve XIII faktörler değerlendirilmez. Genel olarak, Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin süresinin uzaması meydana gelmeden önce en az bir faktör normal konsantrasyonu %30' un altına düşmelidir. Bu test Aktive edilmiş pıhtılaşma zamanından daha duyarlıdır ve primer hemostatik bozukluklardan etkilenmez (Anonim 2).

APTT' yi bozan bazı patolojik durumlar şunlardır; (1) Yaygın damar içi koagülopati (DIC) (2) Heparin sağaltımı (3) Karaciğer hastalıkları (4) Pıhtılaşma inhibitörleri (lupus, edinsel faktör VIII) (5) Faktör I, VII, IX, X, Prekalikreinin kalıtsal eksikliği (6) Masif transfüzyon (7) Kan örnekleri alınırken heparin ile kontaminasyonu (Yavru, 2006).

2.9.3. Protrombin Süresi (PT)

Protrombin Süresi ekstrinsik ve ortak yolları test eder. Bu şekilde ekstrinsik yolun temel testidir. VII faktörünün yarılanma süresinin kısa olmasından dolayı bu test K vitamini eksikliği ya da antagonizme çok duyarlıdır. Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin süresinden daha az duyarlıdır (Anonim 2).

PT' yi bozan bazı patolojik durumlar şunlardır; (1) Karaciğer hastalıkları (2) K vitamini yoksunluğu (3) Antikoagülanların kullanımı (4) Non-steroid antiinflamatuarların

kullanımı (5) Hipofibrinojemi (6) Yaygın damar içi koagülopati (DIC) (7) Kalıtsal olarak Faktör V, X, VII yetersizliği (8) Masif transfüzyon (Yavru, 2006).

2.9.4. D-dimer

D-dimerler çapraz bağlı fibrin plazmin ile yıkımlandığında oluşan eşsiz FDPs' lerdir. Sadece plazmininin aktifleşmesini gösteren FDPs' lere kıyasla D-dimerler trombin ve plazminin aktifleşmesini gösterirler ve aktif pıhtılaşma ve fibrinolisis için spesifiktirler (Tripodi, 2011; Solak ve ark, 2003; Wakai ve ark, 2003). D-dimer' ların yarılanma süreleri kısadır (yaklaşık 5 saat). Bu şekilde, sadece yakın zamandaki ve devam eden fibrinolisisin tespit edilmesi için faydalıdır. D-dimer testi DIC için duyarlı bir testtir ve geleneksel FDPs analizlerine göre büyük olasılıkla üstündür. Ancak, D-dimer konsantrasyonu her zaman DIC' lı hastalarda yüksek değildir ve yükselmiş D-dimer seviyeleri kesinlikle DIC için özgün değildir. Yüksek konsantrasyon tromboemboli, neoplazi, hepatik hastalıklar, böbrek yetmezliği, kalp yetmezliği, iç kanama ve takip eden cerrahi prosedürleri olan köpeklerde meydana gelir (Anonim 2).

Plazma D-dimer seviyesi artmış koagülasyon aktivasyonunun (trombogenez) yanında indirekt olarak fibrinolitik aktivasyonun seviyesini de gösterir (Tokgözoğlu, 2002; Lee ve Gingsberg, 1998). Plazma D-dimer seviyeleri protrombotik durumun göstergesi olmanın yanında aynı zamanda tromboembolik riskin göstergesi olabilir (Tripodi, 2011). Venöz tromboembolide D-dimer seviyelerinin kontrollere göre yaklaşık 8 kat arttığı gösterilmiştir. Trombozun yaygınlığı ile plazma D-dimer tepe seviyeleri uyumlu olduğu saptanmıştır (Lip ve Lowe, 1995). Oral antikoagülan sağaltım alan hastalarda intravasküler fibrin sentezi ve trombüs oluşumu azalır. Sonuç olarak plazma D-dimer seviyeleri azalır. Antikoagülan sağaltımının D-dimer seviyelerini azaltması, antitrombotik ilaç uygulamalarının trombogenezini azaltmadaki etkinliğini yansıtır (Mitush ve ark, 1996; Li-Saw-Hee ve ark, 2000). Bu bulgu antikoagülan sağaltım altındaki hastalardaki düşük D-dimer seviyelerinin, yalnızca antiagregan dozda aspirin alan hastalarda gözlenmemesi ile desteklenmiştir. Bu durum tromboembolik riskin azalmasında kumadinin kanıtlanmış yararının, yalnızca aspirin sağaltımı ile gösterilmemesi ile de uyumludur. Sonuçta artmış D-dimer seviyeleri AF' li hastalarda yüksek tromboembolik riskin öngördürücüsü olabileceği gibi, bu grubun antikoagülan sağaltımından en fazla yarar göreceğini de gösterebilir. Kalp yetmezliği olan mekanik protez kapaklı hastalarda D-dimer ve von

Willebrand faktör yüksekliği bu hastaların embolik olaylar açısından izlenmesini gerektirir (Mastroroberto ve ark, 1996).

Tablo 3. Hemostatik test profillerinin yorumlanması (Turgut, 2000)

Hemostatik Test Profillerinin Yorumlanması	
Hemostatik Test Profil Örnekleri	Nedenleri
Trombositopeni ve Normal APTT, PT ve FDPs Testleri	<ul style="list-style-type: none">• Trombosit üretiminin olmaması• Trombosit yıkımının artması• Generalize kemik iliği hipoplazisi ve aplazisi• Kemik iliği neoplazisi
Trombositopeni ve APTT ve PT' de uzama ve Pozitif FDPs Testleri	<ul style="list-style-type: none">• Trombosit faktörlerinin eksikliği/ tüketilmesi• Koagülasyon faktörlerinin eksikliği/ tüketilmesi (DIC' en önemli nedeni)
Normal Trombosit Sayısı, APTT ve PT' de uzama ve Negatif FDPs Testleri	<ul style="list-style-type: none">• Multiple koagülasyon defektleri (rodentisit zehirlenmesi, karaciğer hastalıkları)• Herediter defekt• Heparinli kan örneklerindeki artefakt
Normal Trombosit Sayısı, PT, APTT Uzama ve Negatif FDPs Testleri	<ul style="list-style-type: none">• İntrinsik sistemde herediter defekt• Hemokonsatrasyon
Normal Trombosit Sayısı, APTT, PT Uzama ve Negatif FDPs Testleri	<ul style="list-style-type: none">• Ekstrinsik sistemde herediter defektler (Örn. faktör VII yetersizliği)• Vitamin K yetersizliğinin erken dönemi
Normal Trombosit Sayısı, APTT, PT Uzama ve Negatif FDPs Testleri ile Birlikte Hemorajik Diyatezin Olması	<ul style="list-style-type: none">• Vasküler hasar• Trombosit fonksiyon defekti• Herediter trombosit anormallikleri• von Willebrand Hastalıkları

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Materyal Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Araştırmanın hayvan materyalini 28' i *L. infantum* ile doğal enfekte (önceden hiçbir bir medikal sağıaltım uygulamasında bulunulmamış), diğeri 7' si ise sağılıklı kontrol olmak üzere toplam 35 köpek oluşturdu. Enfekte köpekler, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Küçük Hayvan Kliniğı' ne CVL ile uyumlu klinik bulgulardan (deri lezyonları, perioküleralopesi, hipotrikozis, kilo kaybı, onikogripozis, lenfadenopati) bir ya da birkaçını gösteren olgulardan seçildi. Klinik bulgular temelinde VL şüpheli tanısı konulan köpeklerde lenf yumrusu aspiratında amastigot görülmesi ve/veya kan örneğinde hızlı ELISA prensibiyle çalışın test kiti (Snap Leishmania, Idexx, USA) pozitifliğı ile CVL tanısı kesinleştirildi (Feroglio ve ark, 2007; Athanasiou ve ark, 2014). Bölgemizde hastalığın prevalansı dikkate alındığında yaklaşık 500 civarında köpeğın (Aydın bölgesindeki ön çalışınlarla % 8-10 prevalans beklendiğinden) CVL yönünden değıerlendirilmesi sonucu araştırmada kullanılacak yeter sayıda olguya ulaşılabileceğı hesaplandı. *L. infantum* ile enfekte olduğı saptanan köpeklerin vektörlerle nakledilen ve koagülatif hasara da yol açabilen *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrellia burgdorferi* ve *Dirofilaria immitis* ile koenfekte olup olmadıkları hızlı test kiti (SNAP 4Dx plus, Idexx, USA) ile araştırıldı ve yalnızca *L. infantum* ile enfekte köpekler çalışınmaya dahil edildi. Çalışınmaya dahil edilmesi uygun görülen VL' li köpekler, "LeishVet Çalışınma Grubu" nun serolojik, klinik ve laboratuvar bulgular temelinde önerdiğı evreleme (Tablo 4; Solano-Gallego ve ark, 2011) dikkate alınarak 4 farklı gruptan (her grupta n=7) birinde değıerlendirildi. Buna göre;

I. grupta CVL'in I. evresindeki olgular (hafif),

II. grupta CVL'in II. evresindeki olgular (orta şiddetli),

III .grupta CVL'nin III. evresindeki olgular (şiddetli) ve

IV. grupta CVL'nin IV. evresindeki olgular (çok şiddetli) olgular yer alacaktır

(Tablo 4).

Sağılıklı kontrol grubu, kliniğıe aşı veya sağılık kontrolü amacıyla getirilen, klinik ve laboratuvar değıerlendirilmelerinde herhangi bir anormallik saptanmayan her iki cinsiyetten ve VL' li gruplarına benzer yaş aralığındaki köpeklerden (n=7) oluşturuldu.

Tablo 4. CVL' de evreleme (Solano–Gallego ve ark, 2011)

Klinik Evre	Seroloji	Klinik Görünüm	Laboratuvar Bulguları
Hafif Şiddetli Olgular (Evre I)	Negatif veya düşük serum antikor titresi	Periferik lenfadenopati, papüller dermatitis	Genellikle laboratuvar bulgularında anormallikler tespit edilmez. Normal renal profil: Kreatinin < 1.4 mg/dL, non proteinürik, İPK < 0.5
Orta Şiddetli Olgular (Evre II)	Düşük veya yüksek serum antikor titresi	Evre I' deki bulguların dışında eksfoliyatif dermatitis, onikogripozis, ülserasyonlar, anoreksi, kilo kaybı, ateş ve epistaksis	Hafif düzeyde non-rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipalbuminemi Normal renal profil: Kreatinin <1.4 mg/dL; non-proteinürik, İPK <0.5 ya da Kreatinin < 1.4 mg/dL; İPK 0.5-1
Şiddetli Olgular (Evre III)	Orta veya yüksek serum antikor titresi	Evre I ve Evre II' deki klinik bulgular dahil olmak üzere, immün kompleks oluşumu; vaskülit, artrit, üveitis ve glomerulonefrit	Evre II' ye ilaveten, 1. derecede kronik böbrek yetmezliği* =İPK > 1 ya da 2. Derecede kronik böbrek yetmezliği*= kreatinin; 1.4–2 mg/dL
Çok Şiddetli Olgular (Evre IV)	Yüksek serum antikor titresi	Evre III' deki klinik bulgular dahil olmak üzere, tromboembolizm, nefrotik sendrom, böbrek hastalıklarının son evreleri gözlenir.	Evre II' ye ilaveten, 3.derecede kronik böbrek yetmezliği* kreatinin 2–5 mg/dL ya da 4. Derecede kronik böbrek yetmezliği* kreatinin > 5 mg/dL nefrotik sendroma bağlı proteinüri İPK > 5

* IRIS (Uluslararası Nefroloji Derneği sınıflandırılması – IRIS Staging of chronic renal disease)

VL tanısı konulan köpeklerde hastalığın evresinin belirlenmesi amacıyla klinik ve laboratuvar muayeneler gerçekleştirildi. Klinik muayenede; hastalığın evrelemede dikkate alınan klinik bulguların (Tablo 3) yaygınlığı ve/veya şiddeti kaydedildi.

3.2. Evrelendirmeye Yönelik Laboratuvar Analizleri

Evrelemeye yönelik laboratuvar muayeneler; serolojik, hematolojik ve biyokimyasal değerlendirmeleri kapsadı. Bu amaçla tüm olgulardan kan ve idrar örnekleri alındı. Kan örnekleri *Vena cephalica antebrachii*' den alınacak, idrar örnekleri gönüllü idrar numunesi olarak ya da kateterizasyonla toplandı. Anti-*Leishmania* antikor titresi, serum örneklerinde IFAT yöntemi (Paltrinieri ve ark, 2010; Solano–Gallego ve ark, 2011) ile belirlendi. Beş ml antikoagülsüz tüplere alınan kan örnekleri santrifüje edilerek serumları çıkartıldı ve CVL' in evrelendirilmesine ilişkin biyokimyasal analizlerin (serum total protein, albumin ve kreatinin konsantrasyonu) ölçümü gerçekleştirildi. İdrar örneklerinde (5 mL) total protein ve kreatinin konsantrasyonları ölçülerek, idrarda protein/kreatinin oranı hesaplandı. Sitratlı kan örneklerinde (2 ml) hiç vakit kaybetmeksizin hazırlanan plazmasında APTT, PTT, FIB ve D-dimer konsantrasyonları bekletilmeksizin anlık olarak ölçüldü. Hastaların evrelenmesinde dikkate alınacak IFAT analizi Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji A.B.D' da, ilişkili serum biyokimyasal ve idrar tahlilleri hizmet alımı şeklinde dış kalite kontrol programlarına üye laboratuvarlardan birisinde ölçüldü. Serum örnekleri hemoliz olmadan, analiz süresine kadar -20 °C' de, idrar örnekleri ise bekletilmeksizin soğuk zincirde günlük olarak ilgili laboratuvara nakledildi. Proje kapsamındaki laboratuvar parametreleriyle ilgili analiz ve bilgiler Tablo 5' de özetlenmiştir.

Tablo 5. Projede izlenen laboratuvar yöntemleri

Örnek	Parametre/Ölçüm	Yöntem/Cihaz
Serum	Anti- <i>Leishmania</i> antikor titresi	IFAT
	Total Protein	Enzimatik
	Albumin	Enzimatik
	Kreatinin	Enzimatik
İdrar	Protein	Kolorimetrik
	Kreatinin	Kolorimetrik
Plazma	D-dimer	Fluorescence Immunoassay Rapid Kantitatif Test
	APTT	Mikrokoagülometre
	PTT	Mikrokoagülometre
	FIB	Mikrokoagülometre

Çalışmada biyokimyasal parametrelerin ölçümü ile hematolojik değerlendirmeler bir kez gerçekleştirildi. Proje kapsamına alınacak olan köpekler, hasta sahipleri bilgilendirilerek gönüllülük esasıyla elde edildi. Çalışma öncesinde 14/08/2015 tarihinde 64583101/2015/086 sayılı Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır.

3.3. Hemostatik profil ve ilişkili analizler

3.3.1. Mikrokoagülometre test prosedürü

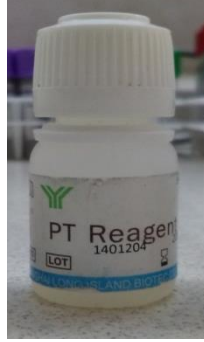
Yarı otomatik koagülometre cihazı (Beijing Precil 4 kanallı yarı otomatik koagülometre cihazı) (Resim 11) ile gerçekleştirilen ilgili analizlere ait test prosedürleri aşağıda anlatıldı.



Resim 12. Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları A.B.D' da mevcut Beijing Precil 4 kanallı yarı otomatik koagülometre cihazı

3.3.1.1. Protrombin Time Reaktifi (PT)

Protrombin süresinin (PT) belirlenmesi ve faktörlerin analizlerinin yapılması amacı ile kullanıldı.



Resim 13. PT reaktifi

Test prensibi; PT, tarama aracı olarak ve ekstrinsik ile ortak yollarda koagülasyon faktörlerinin kantitatif testi için kullanılmaktadır. Özellikle oral antikoagülan sağaltımının induksiyonu ve monitörizasyonu için uygundur. PT aynı zamanda karaciğer hastalıklarında, karaciğerin sentez yeteneğinin kontrolü içinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Rekombinant insan doku faktörü karışımı ve kalsiyum iyonları, plazmaya test etmek için ilave edilir böylece koagülasyon mekanizması başlatılmış olur. Fibrin pıhtısı oluşuktan sonra ölçülür.

PT reaktifi kompozisyonu (Resim 12), 1 mikrolitre/ml' den az insan doku faktörü, fosfolipid, kalsiyum klorid, buffer solüsyonu, tuz ve stabilizör. PT reaktifi kullanıma hazır. Saklama ve stabilizasyon koşulları; açılmayan şişeler +2 °C ile +8 °C arasında saklanıldı. Açılan numuneler ilk kullanımdan hemen sonra +2 °C ile +8 °C arasında tutularak, üretici firmanın belirttiği şekilde 30 gün süre içerisinde tüketildi ve asla dondurulmadı. Kullanım öncesi tersine çevrilerek karıştırıldı.

Alınan örneğin doku sıvıları ile kontaminasyonu ve hemolizin önlenmesi gerekmektedir. Örneklerin hacmi beklenenin % 90' nından az ise analiz gerçekleştirilmedi. Numuneler alındıktan sonra en kısa sürede 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Test hemen yapılacaksa plazma, çökmüş hücreler üzerinde kalabileceğinden ya da ayrılabilceğinden, plazmanın ayrılabilmesi için plastik transfer pipeti ile plastik tüplere aktarıldı. Testin yapılacağı zamana kadar buzdolabında tutuldu ve üretici firmanın belirttiği şekilde asla buz üzerinde tutulmamasına özen gösterildi. Örnekler alındıktan sonra en fazla

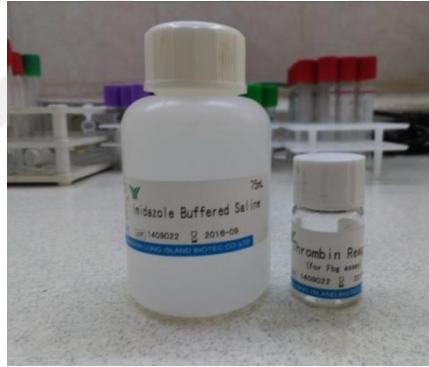
2 saat içerisinde testin yapılması sağlandı. Örneklerin 5 dakikadan fazla 37 °C' de beklememelidir.

Test prosedürü; PT reaktifinin 37 °C' ye ön ısıtma uygulandı. Test tüpüne 0.1 ml plazması eklendi ve 3 dakika boyunca 37 °C' de ön ısıtılmaya bırakıldı. Ön ısıtma uygulanmış PT reaktifinden 0.2 ml plasmaya eklendi ve karıştırıldı. PT reaktifi eklenmesi ile aynı anda kronometre başlatıldı ve koagülasyon zamanı belirlendi.

3.3.1.2. FIB Assay Kit

Plazma örneklerinde FIB' in kantitatif olarak belirlenmesi amacı ile kullanıldı.

Test prensibi; Trombin pıhtılaşma süresi FIB deneyi ilk olarak Clauss tarafından tarif edilen yöntemle dayandırıldı. Trombinin yüksek konsantrasyonlarındakilere plazmada koagülasyon için gerekli olan zaman koagülasyon zamanı ile ters orantılıdır.



Resim 14. Trombin reaktifi ve Imidazole saline buffer

İçerisinde bulunan bileşenler şu şekildedir;

- ✓ FIB Assay Kiti
- ✓ Trombin Reaktifi
- ✓ FIB Referans Kiti
- ✓ Imidazole Buffered Saline

Trombin reaktifi kompozisyonu olarak sığır trombin bufferi kullanıma hazırdır. Açılmayan şişeler (Resim 13) +2 °C ile +8 °C arasında saklanılarak muhafaza edildi. Kullanımdan sonra üretici firmanın belirttiği şekilde +2 °C ile +8 °C arasında saklanılarak 30 gün süre içerisinde tüketildi ve asla dondurulmadı. Kullanım öncesi tersine çevrilerek karıştırıldı. FIB referans plazması kompozisyonu olarak; sodyum sitratlı insan plazması içerir. 0.1 ml distile su ile sulandırıldı. Stabilize edici maddeler ile tampon maddeleri, liyofilizasyon öncesi ilave edildi. Çözülme tamamlanana kadar yavaşça çalkalandı. Sulandırılmış materyal +2 °C ile +8 °C arasında 8 saat stabil olarak kalabilir. Imidazole Buffered Saline kompozisyonu; pH 7.35 ±0.2 ve %0.1 sodyum azit koruyucu olarak bulunur.

Reaktiflerde dikkat edilecek noktalar şunlardır; sodyum azit asidik koşullar altında hidrazoik asit veren, son derece zehirli bir bileşiktir bu nedenle atılmadan önce akan su ile seyreltildi ve oluşabilecek birikim sonucu metal borularda patlayıcı koşulları geliştirebileceğinden bol miktarda su ile yıkandı. FIB referans plazma şişelerindeki vakum eksikliği, düzensiz değerler ya da üründeki renk değişimleri bozulma belirtisi olabileceğinden bu gibi durumlara dikkat edildi.

Alınan örneğin doku sıvıları ile kontaminasyonu ve hemolizin önlenmesi gerekmektedir. Örneklerin hacmi beklenenin % 90' nından az ise analiz gerçekleştirilmedi. Örnekler alındıktan sonra en kısa sürede 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Örnekler 22-24°C' de tutuldu ve örnekler alındıktan sonra en fazla 2 saat içerisinde testin yapılması sağlandı.

Test prosedürü; FIB referans plazma Imidazole buffer saline içinde en az beş farklı yoğunlukta hazırlandı ve plazmanın faktörler ile etkileşimini minimize edebilmek için en az 1/3 oranında dilue edildi. Plazma 1/10 oranında Imidazole buffer saline solüsyonu ile sulandırıldı. 0.2 ml' lik dilüsyon 37 °C' de 3 dakika ön ısıtma uygulandı ve sonra 0.1 ml' lik trombin reaktifi daha önceden ısıtılan dilüsyona ilave edildi. Trombin reaktifine ön ısıtma uygulaması gerekmediğinden bu işlem yapılmadı. Trombin reaktifi eklenmesi ile aynı anda kronometrenin başlatıldı ve koagülasyon zamanı belirlendi.

3.3.1.3. Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (APTT)

Aktive parsiyel tromboplastin zamanının (APTT) belirlenmesi ve ellajik asit aktivatörü kullanan diğer APTT faktörlerinin analizleri için kullanıldı.

Test prensibi; APTT, öncelikle intrinsik koagülasyon bozukluklarının değerlendirilmesinde ayrıca faktör 2, 5, 10 ve FIB' in fonksiyonlarındaki eksiklikleri de

belirlemek için kullanılan bir tarama aracı olarak önemlidir. APTT da yaygın heparin tedavisinin etkinliğini izlemek için bir araç olarak savunulmuştur. APTT testi, test örneğine plazma aktivatörü ve fosfolipidi içeren reaktif eklenerek gerçekleştirilir. Karışım uygun aktivasyon için 37 °C' de 3 dakika inkübasyona bırakılır. Daha sonra kalsiyum iyonları ilavesi koagülasyon işlemi başlatarak ve koagülasyon süresi ölçülür.



Resim 15. APTT ve PT reaktifleri ile kalsiyum klorid solüsyonu

Reaktifin kompozisyonu ellagik asit, buffer, tuzlar ve stabilizerler oluşur. APTT reaktiflerini kullanmadan önce kısa süreli çalkalanmalıdır.

Açılmayan şişeler +2 °C ile +8 °C arasında saklanılarak muhafaza edildi. Kullanımdan sonra üretici firmanın belirttiği şekilde +2 °C ile +8 °C arasında saklanılarak 30 gün süre içerisinde tüketildi ve asla dondurulmadı. Kullanım öncesi tersine çevrilerek karıştırıldı. Reaktif beklemeye bırakılırsa ellagik asit ve lipidlerden meydana gelen yeşil depozit şekillenebilir. Plazma ile kontaminasyon şekillenmemesine dikkat edildi.

Alınan örneğin doku sıvıları ile kontaminasyonu ve hemolizin önlenmesi gerekmektedir. Örneklerin hacmi beklenenin % 90' nından az ise analiz gerçekleştirilmedi. Örnekler alındıktan sonra en kısa sürede 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Plazmayı ayırabilmek için plastik transfer pipeti ile plastik tüplere aktarıldı. Testin yapılacağı zamana kadar buzdolabında tutuldu ve asla buz üzerinde tutulmadı. Örneğin alınmasından 2 saat içerisinde testin yapıldı. Örneklerin 5 dakikadan fazla 37 °C' de beklememesine dikkat edildi.

Test prosedürü; kalsiyum klorid önceden 37 °C' ye kadar ısıtıldı. 0.1 ml testi yapılacak plazma üzerine 0.1 ml APTT reaktifi ilave edildi ve sonra 37 °C' de 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Kalsiyum klorid eklenmesi ile aynı anda kronometre başlatıldı ve koagülasyon zamanı belirlendi.

3.3.2. D-dimer Seviyesinin Belirlenmesi

Finecare D-dimer hızlı kantitatif kiti ile birlikte Finecare FIA meter (Resim 15) tam kan veya plazmadan D-dimer' ın kantitatif ölçümü için kullanılan floresan immunoassay testidir.

Test materyali; test kartuşu, dedektör buffer, test kartuş ID çipi, otomatik transfer pipeti (10-100µL arasında) ve sodyum sitratlı kan örneğinden elde edilen plazma kullanıldı.

Saklama koşulları; dedektör buffer 4-30 °C arasında tutuldu ve bu şekilde 24 aya kadar dayanıklıdır. Test kartuşu son kullanma tarihine kadar ambalajı kapalı şekilde 4-30 °C arasında tutuldu. Çalışmamızda test kartuşu ambalajı açılmamış şekilde buzdolabından çıkarılarak en az 30 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra kullanıldı.

Örneklerin alınması ve hazırlanması; standart flebotomi prosedürü takip edilerek antikoagülanlı kan toplama tüpü (sodyum sitratlı kan tüpü) ile damardan tam kan örneği toplandı. Tam kandan plazma ayırma işlemi kısa süre içinde hemoliz oluşturmayacak şekilde yapıldı. Kan örneği alındıktan sonra oda sıcaklığında uzun süre bekletilmeden kısa süre içerisinde FIA testi uygulandı. Plazma örneklerine kısa sürede test uygulanmadığında ise 2 - 8°C' de en fazla 2 gün veya daha uzun süre -20°C ' de tutuldu.

Test Prosedürü; 15 µL plazma otomatik transfer pipeti ile buffer tüpünün içerisine ilave edildi. İçerisine plazma ilave edilen buffer tüpü bir dakika süre ile hafifçe alt üst edilerek karıştırıldı. Bu işlemi takiben buffer tüpünden 75 µL miktarında örnek transfer pipeti yardımı ile alınarak test kartuşundaki örnek haznesine konuldu. Test kartuşu Finecare FIA meter (Wondfo, Guangzhou) cihazındaki kartuş haznesine takıldı ve test başlatıldıktan sonra 3 dakika içerisinde D-dimer seviyesi belirlendi.



Resim 16. Wondfo Finecare FIA meter cihazı

3.4. İstatiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 15.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tezde kullanılan parametrelerin (PT, APTT, FIB) homojenite testi ve tanımlayıcı istatistikleri yapıldı. Shapiro wing testi sonuçlarına göre incelenen parametrelerdeki değerlerin gruplar içerisinde homojen olarak dağılmadığı belirlenerek Ln tabanına göre transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Transformasyon sonuçları değerlendirildiğinde söz konusu verilerin halen daha normal dağılım göstermedikleri belirlenerek non parametrik testlerden bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi kullanılarak istatistiksel karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Tüm test sonuçlarında $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu proje kapsamında alınan tüm köpekler Leishvet Çalışma Grubunun serolojik (IFAT titreleri, ilaveten ELISA testleri), klinik ve laboratuvar bulguları (özellikle TP, ALB ve İPK) dikkate alındığında 4 farklı grupta (evre I-IV) yer aldı. Evre I (düşük antikor titreleri; 1/64), ile evre IV (yüksek antikor titreleri; 1/1024-1/16000) mevcuttu. Evrelendirmeye ve literatüre (Solano-Galego ve ark, 2011) uygun olarak I. ve II. evrede normal renal profil, III. Evrede I. derece yada II. derece kronik böbrek yetmezliği ve IV. evrede III. derece ya da IV. derece kronik böbrek yetmezliği ile karşılaşıldı.

4.1. Olgulara Ait Demografik Bulgular

Olgular ilgili gruplara hematolojik, serum biyokimyasal ve evrelendirmeye ilişkin belirteçler doğrultusunda ayrıldıktan sonra grup bazında değerlendirme yapma olanağı doğmuştur. Bu bağlamda olgulara ait demografik bilgiler Tablo 6' da bildirildi.

Tablo 6. Projedeki olguların demografik bilgileri

Evre	Olgu	Cinsiyet	İrk	Yaş (Yıl)
I	1	E	Melez	2
	2	D	Spaniel Cooker	1
	3	E	Alman çoban	2
	4	D	Golden retriever	3
	5	D	Melez	4
	6	D	Melez	1
	7	E	Melez	3
II	1	E	Pointer	3
	2	E	Melez	6
	3	D	Melez	2
	4	D	Melez	1
	5	E	Melez	1
	6	E	Terrier	2
	7	E	Melez	4
III	1	E	Dogo Argentino	5
	2	E	Kangal	1,5
	3	E	Terrier	4
	4	E	Kangal	5
	5	E	Boxer	4
	6	D	Melez	12
	7	E	Dogo Argentino	3
IV	1	E	Dogo Argentino	3
	2	E	Golden Retriever	6
	3	E	Boxer	4
	4	D	Melez	4
	5	E	Spaniel Cooker	3
	6	E	Terrier	2,5
	7	E	Golden retriever	14
Sağlıklı	1	D	Alman Çoban	6
	2	E	Golden Retriever	6
	3	E	American Mastif	7
	4	D	Beagle	9
	5	D	Labrador retriever	7
	6	E	Beagle	2
	7	D	Labrador Retriever	6

E= Erkek, D= Dişi

4.2. Olgulara Ait Klinik Bulgular

Çalışmanın sağlıklı kontrol grubu (n=7) önceden belirlenen klinik ve laboratuvar parametrelere göre değerlendirilerek sağlıklı olduğu ortaya konuldu. Çalışmanın hasta grupları (I., II., III., ve IV.) ise yine aynı parametrelere göre evrelendirilerek klinik ve laboratuvar bulguları değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda (Sağlıklı Grup) herhangi bir klinik bulguya rastlanılmazken hasta gruplarda ise rastlanılan klinik bulgular Tablo 7’ de özetlenmiştir.

Tablo 7. Hasta gruplardaki belirtilen klinik bulguları gösteren olgu sayısı

Semptomlar	Gruplar				
	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	Sağlıklı
Yüksek vücut sıcaklığı	X	X	1 Olgu	2 Olgu	X
Lenfadenopati	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	X
Kilo kaybı	3 Olgu	5 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	X
Onikogripozis	2 Olgu	3 Olgu	3 Olgu	4 Olgu	X
Hipotrikozis	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	X
Perioküler alopesi	X	1 Olgu	1 Olgu	1 Olgu	X
Deri lezyonları	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	7 Olgu	X
Epistaksis	X	X	X	2 Olgu	X

Yüksek vücut sıcaklığı, I. ve II. gruplarda görülmezken, III. grupta 1 olguda, IV. grupta ise 2 olguda gözlemlendi. Çalışmadaki sağlıklı grup haricindeki bütün gruplardaki olgularda lenfadenopati gözlemlendi. Kilo kaybı, I. grupta 3 olguda, II. Grupta 5 olguda, III. ve IV. grupta ise bütün olgularda gözlemlendi. Onikogripozis, I. grupta 2 olguda, II. ve III. grupta 3 olguda, IV. grupta ise 4 olguda gözlemlendi. Hipotrikozis, sağlıklı grup haricindeki bütün gruplardaki olgularda gözlemlendi. Perioküler alopesi, I. grupta gözlemlenmezken, II., III. ve IV. grupta birer olguda gözlemlendi. Çeşitli deri lezyonları ise sağlıklı grup hariç bütün gruplardaki olgularda gözlemlendi. Epistaksis ise sadece IV. gruptaki 2 olguda gözlemlendi.



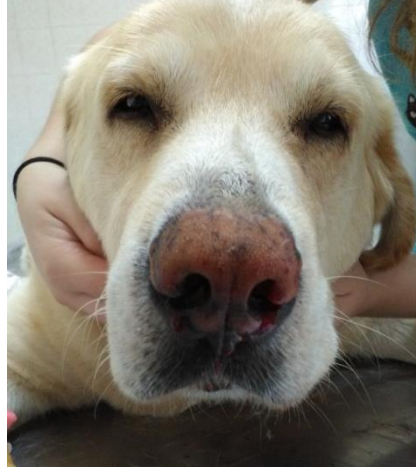
Resim 17. Evre I' e ait olguda ön bacakta bilek eklemi üzerinde atravmatik deri lezyonu



Resim 18. CVL' li olguda (A) kulak ucu dermatozu, (B) kulak kepçesinin içerisinde ve (C) bukkal mukozada hiperemi mevcut. Olguda (4.Evre olgu 4) APTT (27.4 sn), PT (9.69 sn), FIB (518.0 mg/dL) ve D-dimer (3.4 mg/L) olarak belirlendi.



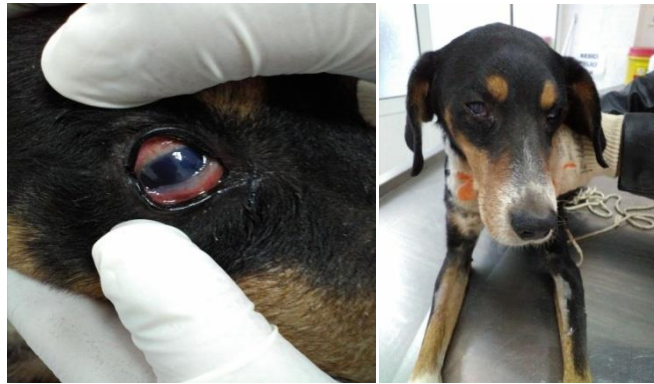
Resim 19. Evre III' e ait olguda baş bölgesinde deri lezyonları ve gözlerde üveitis



Resim 20. Evre IV' e ait olguda epistaksis mevcut. Olguda (4.olgu) APTT (22.7 sn), PT (9.22 sn), FIB (238.8 mg/dL) ve D-dimer (4 mg/L) seviyeleri tespit edildi.



Resim 21. CVL' li evre III 'e ait köpekte kulak ucu nekrozu



Resim 22. CVL' li evre II' ye ait köpekte üveitis

4.3. Olgulara Ait Laboratuvar Bulguları

4.3.1. Hematolojik analizler

4.3.1.1. IFAT bulguları

Çalışmadaki gruplar oluşturulurken klinik bulgular eşliğinde olgularda Leishmaniasis'e karşı üretilen antikor titresini (IFAT) dikkate alındı. Söz konusu bu laboratuvar verileri Tablo 8' de özetlenmiştir.

Çalışmanın sağlıklı kontrol grubundaki olgularda Leishmaniasise karşı ait üretilen herhangi bir Ig G antikor titresine rastlanılmamıştır. Çalışmanın evre I grubundaki olguların hepsinde IFAT değerleri 1/64 iken, evre II grubunda 2 olguda 1/512, diğer 5 olguda 1/128' olarak belirlendi. Evre III' te 4 olguda 1/256, diğer 3 olguda 1/512 iken, evre IV grubunda 1 olguda 1/1024, 1 olguda 1/2048 ve diğer 5 olguda ise 1/4096 düzeyinde titreye rastlanıldı.

Tablo 8. Çalışmadaki gruplara ait IFAT analiz (titrasyon) sonuçları

Gruplar	IFAT (Titre düzeyleri)						
	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Evre I	7	-	-	-	-	-	-
Evre II	-	5	-	2	-	-	-
Evre III	-	-	4	3	-	-	-
Evre IV	-	-	-	-	1	1	5
Sağlıklı	-	-	-	-	-	-	-

4.3.1.2. Serum biyokimyasal bulgular

CVL ile enfekte köpeklerde evrelendirmeye yönelik olarak gerçekleştirilen serum biyokimyasal analizlerden albumin, total protein ve kreatinin parametrelerine ait bulgular tablo 9' da gösterildi. Proje ve çalışma kapsamında koagülasyon profilinin değerlendirilmesi ana amaç olduğundan ve yalnızca gruplara yönelik değerlendirme için serum biyokimyasal analizler gerçekleştirildiğinden, anılan parametrelere yönelik istatistiksel yorumlama ya da incelemede bulunulmamıştır.

Tablo 9. Proje kapsamındaki CVL ile enfekte köpeklerin gruplara göre albumin, kreatinin ve total protein (minimum-maksimum) değerleri

	Gruplar				
	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	Sağlıklı
ALB (mg/dL)	2-2.86 (min-maks)	(1.84-3.16) (min-maks)	(1.3-2.76) (min-maks)	(1.3-2.1) (min-maks)	(2-2.5) (min-maks)
CREA (mg/dL)	(0.44-1.3) (min-maks)	(0.48-1.3) (min-maks)	(0.6-2.3) (min-maks)	(0.6-2.6) (min-maks)	(0.4-0.8) (min-maks)
TP (mg/dL)	(2.8-8.3) (min-maks)	(5.4-6.8) (min-maks)	(3.86-6.22) (min-maks)	(5.5-8.9) (min-maks)	(3.6-5.8) (min-maks)

ALB: Albumin, CREA: Kreatinin, TP: Total protein

Serum albumin düzeyleri sırasıyla evre I-IV ile enfekte CVL' li olgularda (minimum-maksimum) 2-2.86 mg/dL (evre I); 1.84-3.16 mg/dL (evre II); 1.3-2.76 mg/dL (evre III); 1.3-2.1 mg/dL (evre IV) ve 2-2.5 mg/dL (sağlıklı kontrol grubu) olarak saptandı.

Serum kreatinin düzeyleri ele alındığında (minimum-maksimum) evre I, 0.44-1.3 mg/dL; evre II, 0.48-1.3 mg/dL; evre III, 0.6-2.3 mg/dL; evre IV, 0.6-2.6 mg/dL ve sağlıklı kontrol grubunda ise 0.4-0.8 mg/dL olarak saptandı.

Serum total protein düzeyleri sırasıyla evre I-IV ile enfekte CVL' li olgularda (minimum-maksimum) 2.8-8.3 mg/dL (evre I); 5.4-6.8 mg/dL (evre II); 3.86-6.22 mg/dL (evre III); 5.2-8.9 mg/dL (evre IV) ve 3.6-5.8 mg/dL (sağlıklı kontrol grubu) olarak saptandı.

4.3.1.4. Koagülasyon bulguları

Tablo 11. Koagülasyon parametrelerinin olgu sayısı bazında değerlendirilmesi

Parametre	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV
APTT' de uzama	-	2	4	4
APTT' de kısalma	-	1	-	-
PT' de uzama	1	2	4	2
PT' de kısalma	-	1	2	1
FIB Düzeyinde artış	-	3	2	1
FIB Düzeyinde azalma	-	1	-	-
D-dimer seviyesinde artış	5	6	7	7

PT: Protrombin zamanı, APTT: Aktive parsiyel protrombin zamanı, FIB: Fibrinojen

Bu çalışmada evre I CVL ile enfekte 7 köpekte APTT' de uzama veya kısalma gözlenmedi. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 6, 7) APTT' de uzama, birinde (olgu1) kısalma görüldü. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 5, 7) APTT' de uzama görülürken, diğer olgularda kısalma gözlenmedi. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 4, 5) APTT'de uzama görülürken diğer olgularda değişim gözlenmedi. İlgili değişiklikler tablo 11' de gösterildi.

Evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin birinde (olgu 4) PT' de uzama görülürken hiçbir olguda kısalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 5, 6) PT' de uzama görülürken birinde (olgu 1) kısalma gözlenmiştir. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 4, 7) uzama görülürken ikisinde (olgu 1, 6) kısalma mevcuttu. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 1, 5) PT' de uzama görülürken birinde (olgu 7) kısalma belirgindi. İlgili değişiklikler tablo 11' de gösterildi.

Evre I CVL ile enfekte 7 köpekte hiçbir olguda FIB düzeyinde artma veya azalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin üçünde (olgu 1, 2, 5) FIB düzeyinde artış gözlenirken birinde (olgu 6) azalma gözlenmiştir. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin

ikisinde (olgu 1, 3) FIB düzeyinde artma gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmemiştir. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin birinde (olgu 4) FIB düzeyinde artma gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmemiştir. İlgili değişiklikler tablo 11’ de gösterildi.

Evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin beşinde (olgu1, 2, 3, 5, 6) D-dimer seviyesinde artış gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmedi. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin altısında (olgu 1, 2, 4, 5, 6, 7) D-dimer düzeyinde artış gözlemlenirken hiçbir olguda azalma görülmedi. Evre III ve evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin tamamında (olgu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) D-dimer seviyesinde artış gözlemlendi. Koagülasyon parametrelerinin olgu sayısı bazında değerlendirilmesi Tablo 11.’ de özetlendi.

Tablo 12. Projedeki CVL ile enfekte köpeklerin gruplara göre koagülasyon değerlerinin (ortalama±standart hata) karşılaştırılması

Parametre	Gruplar					P değeri
	Sağlıklı	Evre I	Evre II	Evre III	Evre IV	
PT(sn)	8,9 ±0,2 (7,9-9,8)	8,6 ±0,3 (7,9-10,3)	12,2 ±3,8 (7,5-35,2)	9,5± 0,6 (6,4-11,6)	9,2±0,3 (7,5-10,2)	0,507
APTT (sn)	13,0 ±0,7 (11,5-17,6)	13,3±0,4 (11,8-15,1)	15,9 ±2,6 (6,09-26,0)	19,1±2,9 (13,0-38,2)	19,9±1,8 (13,7-27,2)	0,009
FIB (mg/dL)	244,0 ±53,8 (119,0-502,1)	299,4±44,9 (168,3-518,0)	464,4 ±100,4 (96,5-762,9)	413,4 ±73 (209,8-720,3)	281,5 ±48,2 (164,7-518,0)	0,327
D-dimer (mg/L)	0,1 ±0,01 ^a (0,09-0,2)	1,5 ±0,7 (0,09-5,4)	2,3 ±1,3 (0,09-10)	1,8 ±0,6 ^b (0,4-5,1)	1,8 ±0,6 ^b (0,4-4)	0,009

PT: Protrombin zamanı, APTT: Aktive parsiyel protrombin zamanı, FIB: Fibrinojen

Bu çalışmada D-dimer seviyeleri (ortalama±standart hata) (mg/L) sağlıklı ve diğer enfekte (evre I-IV) gruplarda sırasıyla 0.1±0.01, 1,5±0.7, 2,3±1.3, 1,8±0,6 ve 1,8 ±0,6 olarak saptandı. APTT düzeyleri (ortalama±standart hata) (sn) sağlıklı ve diğer enfekte (evre I-IV) gruplarda sırasıyla 13,0±0,7, 13,3±0,4, 15,9±2,6, 19,1±2,9 ve 19,5±1,8 olarak saptandı. PT düzeyleri (ortalama±standart hata) (sn) sağlıklı ve diğer enfekte (evre I-IV)

gruaplarda sırasıyla $8,9\pm0,2$, $8,6\pm0,3$, $12,2\pm3,8$, $9,5\pm0,6$ ve $9,2\pm0,3$ olarak saptandı. FIB düzeyleri (ortalama \pm standart hata) (mg/dL) sağlıklı ve diğer enfekte (evre I-IV) gruplarda sırasıyla $244,0\pm53,8$, $299,4\pm44,9$, $464,4\pm100,4$, $413,4\pm73$ ve $281,5\pm48,2$ olarak saptandı.

Yukarıdaki tabloya göre APTT değerleri açısından sağlıklı grup ile evre IV grubu arasında istatistiksel bir fark olduğu ($p=0.009$) saptandı. APTT için ise sağlıklı ile evre IV grupları arasında $p=0,023$ düzeyinde farklılık söz konusuydu. PT ve FIB değerleri açısından gruplar arası farklılık yoktu. D-dimer düzeyleri açısından yapılan değerlendirmede sağlıklı grup ile evre III ve evre IV grupları arasında istatistiksel olarak belirgin farklılık ($p=0.009$) saptandı. D-dimer için gruplar arasındaki farklılıklar sağlıklı ile evre III arasında $p=0,016$ düzeyinde, sağlıklı ile evre IV arasında $p=0,022$ düzeyinde fark dikkati çekti.



5. TARTIŞMA

Leishmaniasis; *Leishmania* soyunda yer alan 20' nin üzerinde etkenin 100' e yakın farklı ülkede 350 milyon insan için tehdit oluşturduğu bir hastalıktır. Visceral leishmaniasis (VL), Eski Dünya ülkelerinde insan ve köpeklerde *L. infantum*' un neden olduğu benzer klinik tablo ile şiddetli, köpeklerde zaman zaman mortaliteye sebep olan sistemik bir hastalıktır. DSÖ, dünya genelinde çok fazla insanın VL riski altında bulunduğunu, 300 bin olgudan yıllık 20 bin insanın öldüğünü bildirmekte ve hastalığı “alarm veren aciller” arasında değerlendirmektedir (Candido ve ark, 2008). VL' de enfekte köpekler, etkenin doğal ana rezervuarı olarak görülmekte ve insanlara bulaşmada anathar rol oynamaktadır. *L. infantum*' dan ileri gelen CVL, özellikle Akdeniz ülkeleri ve Ortadoğu ülkelerinde endemik olup, prevalansı %67' ye kadar çıkabilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2001). Akdeniz ülkelerine benzer şekilde ülkemizde de Ege Bölgesinde hastalığa sık rastlanılmakta ve prevalansının % 1,6-28,26 arasında değiştiği rapor edilmektedir (Voyvoda ve ark, 2004; Atasoy ve ark, 2010).

CVL klasik olarak 2011 yılının başına kadar gerçekleştirilen tüm çalışmalarda basitçe 3 farklı dönemde incelenmiştir. *L. infantum* ile enfekte herhangi bir klinik bulgu göstermeyen olgular asemptomatik; CVL ile uyumlu klinik bulgulardan yalnızca birini gösterenler oligosemptomatik; multiple yada çok sayıda klinik bulgu gösterenler polisemptomatik olarak adlandırılmıştır (Ciaromella ve ark, 1997; Quinzel ve ark, 2001; Moreira ve ark, 2007).

Hastalığın patogenezinin daha detaylı olarak aydınlatılması için konuya ait çalışmalar hızla süregelmekte ve devinim göstermektedir. 2005 yılında İtalya' da gerçekleştirilen III. Dünya Leishmania Forumunda LeishVet grubunun temelleri atılmış, grup 2008'de İspanya merkezli olarak resmi ve yasal faaliyetlerine başlamıştır. Grubun asıl amaçlarından birisi veteriner pratisyen, akademisyen/araştırmacı ve öğrencilere yönelik olarak CVL' nin tanısında standart kriterlerin getirilmesidir. Bu bağlamda grubun resmi raporlarının yayınlandığı güncel literatur eşliğinde enfekte köpekler klinik ve laboratuvar bulguları baz alınarak hafif, orta, şiddetli ve çok şiddetli olarak sınıflandırılarak, evreye özgü sağaltım protokolleri önerilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2011).

Periferik lenfadenopati veya papuler dermatitis gibi klinik bulguların görülebildiği, hematolojik/serum biyokimyasal analizlerde anormallik belirlenmeyen ve normal renal profile sahip, negatif/düşük antikor titresi bulunan CVL' li köpekler hafif enfekte olarak sınıflandırılmaktadır (evre I). Evre I' de görülen klinik bulgular yanı sıra ekfoliyatif dermatitis, ateş, onychogryphosis, ülserasyon, anoreksi, kilo kaybı, ateş ve epistaksis gibi

klirik bulguların da görülebildiği, hafif non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemi belirlenen, kreatinin<1.4 ve non-proteinürük [idrarda protein/kreatinin oranı (İPK)<0.5] ya da kreatinin<1.4 mg/dl; İPK=0.5-1 olan ve düşük/yüksek antikor titresine sahip köpekler orta şiddetli enfekte olarak adledilmektedir (evre II). Evre I, II’ de görülen klinik bulgulara ilaveten vaskulitis, artrit, uveitis ve glomerulonefritis gibi immun kompleks bozuklukların saptandığı, non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemiye ilaveten I. derece kronik böbrek yetmezliği; İPK>1 ya da II. derece kronik böbrek yetmezliği; kreatinin=1,4–2 mg/dl bulgularıyla da karşılaşılan ve orta/yüksek antikor titresine mevcut köpekler şiddetli enfekte (evre III) olarak sınıflandırılmaktadır. Diğer evrelerdeki klinik bulgulara ilaveten pulmoner tromboembolizm, nefrotik sendrom, böbrek hastalıklarının son aşamasının tespit edilebildiği, laboratuvar bulgularında non–rejeneratif anemi, hipergamaglobulinemi, hipoalbuminemiye ilaveten kronik böbrek hastalıklarının ve nefrotik sendrom bulgularıyla karşılaşıldığı III. derece kronik böbrek yetmezliği (kreatinin 2–5 mg/dl) ya da IV. derece kronik böbrek yetmezliği (kreatinin>5 mg/dl) ve proteinuri (İPK >5) saptanan olgular eşlik eden yüksek antikor titresine ile birlikte çok şiddetli (evre IV) olarak değerlendirilmektedirler (Solano–Gallego ve ark, 2011). Hastalığın evrelendirilmesinde özellikle yukarıda sözü edilen IFAT sonuçları, serum biyokimyasal parametreler ile idrar analizleri yer tutmaktadır. Bizde bu çalışmada IFAT analizleri, serum biyokimyasal parametrelerden total protein, albumin ve kreatinin seviyeleri ile idrarda protein/kreatinin oranları baz alınarak 28 hasta köpek 4 farklı evrede değerlendirildi. Her grupta (n=7) yeterli sayıda olgu yer aldı.

Güncel literatür eşliğinde çeşitli atıf dizinleri incelendiğinde, grubun raporlarını dikkate alarak gerçekleştirilen ve CVL’ de koagülasyon bozukluklarını bu yönüyle değerlendiren başka herhangi bir çalışma bulunmaması, gerçekleştirilen bu projeyi daha da önemli kılmaktadır.

Leishmania türleri makrofajların içerisinde çoğalarak kronik bir yangıya neden olmaktadır (Blavier ve ark, 2001). CVL’ li birçok olguda kronik bir seyir izlemekte, kardiyovasküler sistemi ve koagülasyon bozukluklarını da içine alan hayati birçok organı ya da sistemi etkilemektedir (Torrent ve ark, 2005). Kronik makrofaj stimülasyonu, hiperfibrinojemiden sorumludur. CVL ve benzeri hastalıklarda, önceden bildirildiği gibi aktive makrofajlardan salgılanan IL-6, karaciğerden FIB sentezini arttırmaktadır (Di Minno ve Mancinin, 1992).Günümüzde özellikle insan hekimliğinde yapılan çalışmalarda Leishmaniasis’ in koagülasyon bozukluklarına ilişkin oluşturduğu değişikliklerin noninvaziv yöntemlerle anlaşılmasına ihtiyaç duyulmakta, ancak etik nedenlerden ötürü kısıtlı sayıda

gerçekleştirilebilmektedir. VL gerek insanlarda gerekse köpeklerde aynı etken tarafından oluşturulan benzer hastalık tablosuna sahip olduğundan, bu bağlamda VL' li insanlarda yapılacak çalışmalara rol model olarak köpekler mükemmel bir örnek olabilir (Hommel ve ark, 1995). Çıkış noktasındaki hedeflerimizden biri ilk olarak çalışmamızda elde edilecek sonuçların gerek Veteriner Hekimlik alanında gerekse Tıp Hekimliği alanında sonradan yapılacak çalışmalara ışık tutacağı ve yol göstereceği kanaatidir.

CVL' li köpeklerde hemostatik anormalliklerin değerlendirildiği bazı deneysel ve klinik çalışmalar (Ciaramella ve ark, 2005; Corona ve ark, 2004; Juttner ve ark, 2001; Moreno ve ark, 1999; Moreno ve ark., 1998; Pelagalli ve ark, 2004; Petanides ve ark, 2008; Valladares ve ark, 1998) literatürde yerini almıştır. Anılan çalışmalarda epistaksis ve benzeri klinik bulgulardan yola çıkılarak koagülasyon profili değerlendirilmiş ve anlamlı değişiklikler saptanmasına karşın, hiçbirisinde CVL' de klinik evrelendirme yapılmamış, D-dimer konsantrasyonları değerlendirilmemiştir. Yakın zaman diliminde literatürde yerini alan yalnızca Leishmaniasis' li 1 olguda evrelendirme yapılmaksızın hızlı kalitatif Latex testi ile D-dimer analizi yapılmış ve pozitif sonuç belirlenmiştir. Ancak anılan olguda kalitatif tayin nedeniyle titrasyon ya da kantitatif bir değer verilememiştir (Honse ve ark, 2013). Söz konusu çalışmalarda spontan kanama ya da kanama temayülünde artışa neden olarak trombositopeni, trombositopati ya da uzamış bukkal mukoza kanama zamanı gösterilmiştir (Corona ve ark, 2004; Juttner ve ark, 2001; Moreno ve ark, 1998; Valladares ve ark, 1998). CVL' in oluşturduğu koagülasyon bozuklukları çok önemli olmakla birlikte, hastalığın gidişatı, klinik bulguların varlığı yada yokluğu ve dönemiyle ilişkili olarak oluşan YDPB her zaman belirlenemeyebilmekte, dolayısıyla gözden kaçmaktadır. Bu bağlamda YDPB' na ilişkin lezyonların ya da laboratuvar bulgularının her her daim belirlenememesi nedeniyle enfekte hayvanlarda kanama temayülünün ortaya konulabilmesi ile trombozise zemin hazırlayan koagülasyon artışını saptamak amacıyla APTT, PTT ya da FIB tayininin yanı sıra ilave, daha da güvenilir analizlere ihtiyaç duyulmaktadır (Zabala ve ark, 2005). Bu çalışmada konvansiyonel rutin koagülasyon profili (PT, APTT, FIB) ile pro-trombotik durumun değerlendirilmesi için D-dimer analizleri gerçekleştirildi.

Yine yukarıda da sözü edildiği üzere *L. infantum* ile enfekte köpeklerde trombozise ya da tromboemboli geliştiğine dair çalışmalar literatürde (Font ve ark, 1993; Ciaramella ve ark, 1997; Ciaramella ve ark, 2002; Felix ve ark, 2008; Garcia-Sancho ve ark, 2010; Koutinas ve ark, 2014) yer alsa da, anılan çalışmalarda CVL' de evrelendirme söz konusu olmaksızın ve D-dimer analizleri gerçekleştirilmeksizin tanı konulmuştur.

Plazmada şekillenen fibrinolitik aktivitenin önemli bir belirteci olan D-dimer düzeyleri birçok klinik durumda artabilir. D-dimer çapraz bağlı fibrinin, plazmin vasıtası ile enzimatik yıkımına ait bir üründür (Sadosty ve ark, 2001; Wakai ve ark, 2003). Trombüsün ana komponenti olan fibrin, koagülasyonun aktive oluşuyla şekillenir (Wakai ve ark, 2003). Fizyolojik koşullar altında fibrin oluşumu ve fibrinin plazmin vasıtasıyla yıkılması dengelidir, böylelikle hemostazda anahtar rolü taşır (Kroneman ve ark, 1990; Rao ve ark, 1994; Lugovskoy ve ark, 2002). Fibrinin plazminojen kanalıyla çözünmesi, D-dimer' ı da içerisine alan spesifik yıkılma ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Marder ve Francis, 1983).

D-dimer çapraz bağlı bazı parçalar içerir ve bu parçalar plazmin enziminin aktive olmasıyla pıhtıdan salınırlar ve kan akımına katılırlar. D-dimer normal yara iyileşme süreci ve kanın pıhtı oluşumunun bir parçası olarak üretilir. Patolojik olarak herhangi bir neden bağlı pıhtılaşma meydana geldiğinde; D-dimer analizi istem dışı trombozisi gösteren değerli belirteç halini alır (Lee ve Gingsberg, 1998). Bu sebepten ötürü özellikle derin ven trombozu ya da YDPB olan olgularda teşhiste gittikçe önem kazanan parametrelerden birisidir (Caldin ve ark, 1998; Monreal, 2003; Nelson ve Andreasen, 2003). D-dimer analizi yüksek oranda duyarlılığa sahip olduğundan, normal D-dimer düzeyi damar içi fibrin oluşumu ve yıkımının varlığı için yüksek negatif tahmin değerine sahiptir (Angstwurm ve ark, 2004). D-dimer ile birlikte plazmada yıkılma ürünlerinin kantitatif ölçümü sayesinde, yüksek doğrulukla tromboembolik hastalık ekarte edilebilir (Angstwurm ve ark, 2004). Köpeklerde de CVL dışındaki hastalıklarda D-dimer analizlerinin önemi gösteren araştırma makaleleri literatürde yerini almaktadır (Caldin ve ark, 1997; Stokol ve ark, 2000; Griffin ve ark, 2003; Nelson ve Andreasen, 2003).

D-dimer analizi ve plazma seviyesindeki artışları, köpeklerde tromboembolik hastalıklarda ya da YDPB' da tanısal anlamda farkındalık yaratmaktadır (Caldin ve ark, 1997; Stokol ve ark, 2000; Griffin ve ark, 2003; Nelson ve Andersen, 2003). Ciddi organ ya da sistem bozuklukları olarak köpeklerde bu şekilde tromboembolik hastalıklarda erken tanı sayesinde antitrombotik sağaltım uygulanabilmekte, böylelikle mortalite azaltılmaktadır (Monreal, 2003). Köpeklerde tromboembolik bozukluklarda ya da YDPB' da; D-dimer seviyelerinin spesifik olarak değerlendirildiği 5 farklı çalışma mevcuttur (Caldin ve ark, 1998; Lanevski-Pietersma ve ark, 2003; Nelson ve Andersen, 2003; Hirschberger ve ark, 2004; Dewhurst ve ark, 2008). Ancak anılan çalışmalarda CVL değerlendirme dışı bırakılmış ya da anılan hastalığın varlığı ya da yokluğu değerlendirilmemiştir. D-dimer tayininde kullanılan insan monoklonal antikor testlerinin, köpeklerde de D-dimer seviyelerini rahatlıkla

belirleyebileceği bildirilmiştir (Caldin ve ark, 1998; Stokol ve ark, 2000; Griffin, 2003; Nelson ve Andersen, 2003; Hohenhaus, 2005).

YDPB, pıhtılaşma ve fibrin yıkımının aktivasyonu esnasında ve takiben tüketim koagülopatisine yol açan, enfeksiyon, sepsis, tümör, travma, ve ilişkili hastalıklar gibi altta yatan etmenlere bağlı gelişebilen kompleks bir sendromdur (Levi, 2005). YDPB tanısında D-dimer seviyesindeki artış önemli bir yer tutmaktadır. D-dimer analizlerinin yanı sıra PT artışı, trombosit sayısı ve FIB konsantrasyonu azalması tanıda diğer önemli belirteçlerdir (Taylor ve ark, 2001; Noyan, 2012). Bu çalışmada evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin beşinde, evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin altısında, evre III ve evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin tamamında D-dimer seviyesinde artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra FIB konsantrasyonunda azalma yalnızca bir olguda (evre II) belirlenirken, PT' de artış 9 olguda [sırasıyla 1 olgu (evre I), 2 olgu (evre II), 4 olgu (evre III), 2 olgu (evre IV)] mevcuttu.

L. infantum ile enfekte köpeklerde diğer paraziter enfestasyonlara benzer olarak çeşitli mekanizmalarla YDPB meydana gelmektedir (Honse ve ark, 2013). Koagülasyonun aktive oluşu ve ardışık fibrin depolanması; enfeksiyöz ajana karşı etkenin yayılımını ve yangısal yanıtı azaltma anlamında konakçı savunmasının bir parçasını oluşturmaktadır (Levi ve Ten Cate, 1999). Bu cevap şiddetli olarak meydana geldiğinde koagülasyon eğilimi artmakta böylelikle mikrovasküler trombozis, organ disfonksiyonu ve kanama meydana gelmektedir (Opal ve Esmon, 2003). Dolayısıyla CVL' de epistaksis (Moreno ve ark, 1998; Ciaramella ve Corona, 2003; Ciaramella ve ark, 2005), hematüri (Ciaramella ve Corona, 2003; Ciaramella ve ark, 2005; Binhazim ve ark, 1992), YDPB (Font ve ark, 1994; Moreno, 1999; Valladeres ve ark, 1998) meydana gelmektedir. Tüm bu klinik belirtiler, sorumlu protozoer etken olan *Leishmania sp.*' nin primer ve sekonder hemostazisin yanı sıra fibrinolizisi de etkilediğini göstermektedir (Honse ve ark, 2013). CVL' de şekillenen dolaşımdaki fibrin yıkımlanma ürünleri (özellikle de D-dimer), YDPB ile ilişkide olabilir (Honse ve ark, 2013). Nitekim CVL' de konsantrasyonu artmış olan fibrin yıkımlanma ürünleri; antitrombin III' ün renal kaybına ilişkin şekillenen hiperkoagübilite ve artan fibrinolizis (Font ve ark, 1993) ya da YDPB (Font ve ark, 1994; Valladares ve ark, 1998) ile yakın ilişkidir. Bu çalışmada 25/28 olguda artmış olan fibrin yıkımlanma ürünü olarak D-dimer seviyelerinin hiperkoagülobilite ya da fibrinolizise yorumlanabilir.

Önceki çalışmalarda (Herwaldt ve ark, 1999; Seaman ve ark, 1996; Werneck ve ark, 2003; Abdelmoula ve ark, 2003; Collin ve ark, 2004), özellikle de güncel literatürde (Costa ve ark, 2013) insanlarda Leishmaniasis ile ilişkili sistemik inflamatuvar cevap sendromunun, YDPB ve diğer klinik bulgulara neden olduğu bildirilse de köpeklerde bu konuda yok

denecek kadar az araştırma makalesi mevcuttur. VL' in şiddetli hastalık oluşturduğu durumlarda patogenezinin detaylı olarak anlaşılabilmesi, dolayısıyla da yetersiz/eksik sağıltım uygulanması gibi tüm faktörler klinisyenlerin hastalığın evrelerini incelemekten ve bilmeden serbest ilaç uygulamalarına, hastalığın aktif durumda seyretmesine, buna karşın mortalitenin gitgide artmasına mahal vermektedir (Harhay ve ark, 2011). Kala-azar nedeniyle yaşamını kaybeden insanlarda ileri derecede anemi, hepatit, pnömoni, nefritis, diyare ve özellikle de tanısız anlamda gözden kaçırıldığında ciddi mortaliteye neden olan YDPB' na rastlanılmaktadır (Herwaldt ve ark, 1999; Seaman ve ark, 1996; Werneck ve ark, 2003; Abdelmoula ve ark, 2003; Collin ve ark, 2004). Özellikle Kala-azar' ın ileriki evrelerinde meydana gelen sepsis, sıtma ya da Leptospirozis gibi hastalıklara benzer olarak sistemik inflamatuvar cevap sendromu ile ilişkilendirilmektedir (Devignot ve ark, 2010; Wagenaar ve ark, 2007; Bray, 2005; Clark ve ark, 2006). Costa ve ark. (2013) Kala-azar' lı ve kanama temayülünde artış saptadıkları insanlarda düşük trombosit sayısının, yüksek D-dimer konsantrasyonları ile ilişkide olduğunu, bu sebeple trombosit sayısı ile D-dimer konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu saptamışlardır. Lomtadze ve ark. (2005) VL' li 45 insanda koagülasyonun değerlendirilmesi açısından intravasküler aktif belirteçlerini sağıltım öncesi ve sonrası değerlendirmişler, hastalığın şiddetli ve ileriki formlarında D-dimer seviyelerinin % 95.6 oranında arttığını saptamışlardır. Son sözü edilen çalışmanın sonuçları irdelendiğinde VL' de özellikle hastalığın ileriki aşamalarında intravasküler koagülasyonun şekillendiği, D-dimer seviyelerinin diyagnostik ve prognostik öneme sahip olduğu, hastalığın erken safhalarında koagülasyon profilinin, özellikle D-dimer seviyelerinin dikkate alınarak sağıltıma başlanılmasının muhtemelen kompanse edilemeyen YDPB gelişimini de engelleyebileceği bildirilmiştir (Lomtadze ve ark, 2005) . Bizim çalışmamızda D-dimer seviyeleri (ortalama±standart hata) sağılıklı ve diğer enfekte (evre I-IV) sırasıyla 0,1 ±0,01, 1,5 ±0,7, 2,3 ±1,3, 1,8 ±0,6 ve 1,6 ±0,6 olarak saptanırken, evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin beşinde, evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin altısında, evre III ve evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin tamamında D-dimer seviyesinde artış gözlenmiştir. YDPB tanısında kullanılan diğer parametrelerdeki (PT, PLT ve FIB) değişimlerin olmayışı evre I-IV gruplarında yer alan 1 olgu hariç (evre IV) bu yönde değerlendirme yapmamıza olanak sağlamamıştır.

D-dimer analizi ile koagülopati ya da yangısal cevabın belirlenebileceği (Sumney ve Whitmean, 2010), bunun yanı sıra insanlarda vaskülozentrik ve/veya vaskülopati ile seyreden kutanöz yangısal bozukluklarda D-dimer' in kutanöz hastalık belirteci olarak kullanılması sayesinde vasküler endotel hasarın tespit edildiği saptanmıştır (Kirchhof ve ark, 2014).

Köpeklerde 500 ng/ml' nin üzerindeki D-dimer seviyesi kutanöz damarlarda trombozis gelişimine dair bir kanıt olduğu, dolayısıyla da kutanöz vaskülitli köpeklerde trombozis' in tanısında kullanılabileceği belirtilmektedir (Rosser, 2009). CVL' li köpeklerde deri lezyonlarının etiolojisinde rol oynayan vaskülit (Saridomichelakis ve Koutinas, 2014) göz önünde bulundurulduğunda, D-dimer analizi yukarıda da bahis edildiği üzere gerek trombozis gerekse kutanöz hastalık belirteci olarak tanıda yarar sağlayabilir. Tüm bunları destekler mahiyette CVL' li özellikle IV. evredeki köpeklerde şekillenen pulmoner trombozembolizm (Solano-Galego ve ark, 2011) ve önde gelen sebeplerinden derin ven trombozunun (Khurana ve ark, 2004; Giannini, 2008) tanısında yine D-dimer tayini aktif ve belirgin rol oynayabilir. Çalışmamızda evre IV köpeklerde D-dimer seviyeleri olgu sırasına göre (olgu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) sırasıyla 0.4, 4, 0.7, 3.7, 0.5, 0.7 ve 1.7 mg/L olarak belirlendi. Evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin beşinde (olgu 1, 2, 3, 5, 6) D-dimer seviyesinde artış gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin altısında (olgu 1, 2, 4, 5, 6, 7) D-dimer düzeyinde artış gözlemlenirken hiçbir olguda azalma görülmemiştir. Evre III ve evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin tamamında (olgu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) D-dimer seviyesinde artış gözlenirken diğer olguda azalma gözlenmemiştir. Ancak yine de söz konusu olgularda doppler-USG muayene gerçekleştirilemediğinden bu yönde değerlendirme yapılamamıştır.

Petanides ve ark (2008) doğal yolla oluşan CVL' de meydana gelen epistaksisin altta yatan patomekanizmalarının (hemostatik disfonksiyon, biyokimyasal değişiklikler, kronik rhinitis ve ko-enfeksiyonlar) açıklığa kavuşturulması için gerçekleştirdikleri bir çalışmada 51 leishmaniasisli köpeğin 24' ünde epistaksis varlığını belirlemişlerdir. Anılan çalışmanın sonuçları irdelendiğinde CVL ile ilişkisi epistaksisin trombositopati, hiperglobulinemi kaynaklı serum hiperviskozitesi ve nazal mukozada ülserasyon ile yakın ilişkide olduğu belirlenmiştir (Petanidas ve ark, 2008). Bu çalışmada evre IV CVL ile enfekte 2/7 olguda epistaksis ve trombositopeni dikkati çekti. Her 2 olguda da nazal mukozada ülserasyon dikkati çekmekteydi.

Epistaksis, hematüri ve hemorajik diyare gibi hemostatik bozukluklar CVL' de rapor edilmektedir (Ciaramella ve Corona, 2003). Leishmania enfeksiyonunda saptanan trombositopeni, trombositopati, uzamış trombin süresi (TT), uzamış aktive parsiyel thromboplastin süresi (APTT) ve artmış FIB/fibrin yıkılma ürünleri, bu protozoonun primer hemostazı, pıhtılaşmayı ve fibrinolisisi etkilediğini göstermektedir (Font ve ark, 1993; Font ve ark, 1994; Moreno, 1999). Leishmaniasisli 14 köpek üzerinde yapılan başka araştırmada klinik duruma bakılmaksızın bozulmuş trombosit agregasyonu belirlenmiştir (Ciaramella ve ark, 2002). Çalışmamızda toplam 5 olguda (2' si evre IV, 3' ü evre II)

trombositopeni saptandı. Olgularımızda beliren trombositopeni, parazitin kendisi tarafından oluşturulmayan ve sonuç olarak bağışıklığa dayalı süreci aktive ederek farklı trombosit membran reseptörlerine doğrudan hasar vermesi ile açıklanabilir. Enfeksiyonun ilk aşamasında Leishmania mikroorganizmasının "immün yapışma" olarak adlandırılan spesifik mekanizma aracılığı ile trombositler ile doğrudan etkileşime geçtiği ispatlanmıştır (Dominguez ve ark, 2001).

Hemostatik anormallikler epistaksisi bulunan ya da bulunmayan Leishmania enfeksiyonu mevcut köpeklerde incelenmiştir. Bu hayvanlarda oluşagelen trombositopeni, kendiliğinden şekillenen kanamayı tetiklemek için yetersiz şiddettedir, fakat hareketsiz trombosit agregasyonu veya uzamış BMBT (bukkal mukozal kanama zamanı) ile yansıyan trombositopati en tutarlı hemostatik anormallik olarak saptanmıştır (Moreno ve ark, 1998; Valladares ve ark, 1998; Juttner ve ark, 2001; Corona ve ark, 2004).

Dikkate değer ölçüde Leishmaniasisli semptomatik köpeklerde gözlenen renal hasar trombositlerin fonksiyonunda daha şiddetli azalmanın nedeni olabilir (Ciaramella ve ark, 2005). İnsanlarda kronik böbrek yetmezliğinde bildirildiği üzere, azalmış trombosit agregasyonu, biyokimyasal trombosit anomalileri sonucu olabilir ki prostasiklin ve nitrik oksit salgılanmasındaki artış trombosit cAMP' de artışa ve trombosit reaktivitesinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Kyrle ve ark, 1988; Noris ve ark, 1993). Çalışmamızda özellikle evre III ve IV grubu köpeklerde renal yetmezlik mevcuttu. Uluslararası nefroloji derneği (IRIS) ve literatür eşliğinde (Solano-Galego ve ark, 2011) serum kreatinin ile idrarda protein/kreatin değerleri baz alındığında evre III ve IV CVL ile enfekte köpeklerde değişen derecelerde renal yetmezlik belirlenmesi trombosit fonksiyonlarındaki bozulma ya da koagülasyon kaskadına ait değişikliklerden sorumlu olabilir.

Ciaramella ve ark (2005) CVL ile enfekte 33 köpekten belirgin derecede semptomatik 12 olguda APTT' deki uzama, artmış olan ALT aktivitesi ve azalan plazma albumin seviyelerini belirlemişlerdir. APTT' deki artış hepatik hasarı takip eden bir veya daha fazla pıhtılaşma faktörlerinin sentezindeki azalmaya bağlı olabilir (Moreno, 1999). Ancak, bu çalışmada semptomatik köpeklerde bulunan hepatik hasarın laboratuvar yansıması özellikle normal PT değerlerinin varlığında; APTT' deki artışı yeterince desteklememektedir. Bu farklılık ya köpek plazmasına uygulanan, ticari PT testlerinin koagülasyon faktör eksikliklerini belirlemede APTT' ye oranla daha düşük duyarlılığından ya da yangısal medyatörlerinin oluşumunda aktivatör olarak kullanılan intrinsik pıhtılaşma faktörlerinden bir ya da birden fazlasının daha hızlı tüketiminden kaynaklanmaktadır (Jimenez ve Fernandez,

2000). Yine de bizim çalışmamızda kullanılan ticari PT ve APTT test kitlerinin duyarlılıklarının önceki çalışmalarla belirlendiği üzere iyi olduğu söylenebilir.

Moreno (1999) CVL' de sekonder hemostazisi değerlendirirken hastalıklı köpeklerin FIB konsantrasyonunun normal düzeyde olduğunu ve renal ya da hepatik bozukluklar tarafından etkilenmediğini belirlemiştir. Leishmaniasis' deki hipofibrinojenemi, trombüs oluşumu sırasında aşırı FIB tüketimine bağlanmıştır (Font ve ark 1993). Hiperkoagülasyon durumu pro ve antikoagülan dengesini altüst eden protein ve anti-trombin III' ün kaybına ilişkin nefrotik sendromun sonucudur. İmmun komplekslerinin yüksek plazma konsantrasyonu leishmaniasisli köpeklerde rapor edilmiştir ve birikimlerinin glomerulonefritise neden olduğu ispatlanmıştır (Slappendel, 1988; Lopez ve ark, 1996). Ancak son sözü edilen araştırmada proteinürili köpeklerdeki muhtemelen hastalığın erken teşhisine bağlı olarak böbrek yetmezliği ile hipofibrinojenemi arasında gözle görülür bir ilişki belirlenmemiştir (Moreno, 1999). FIB' in konsantrasyonu üzerine hepatik hasarın etkisinin yetersiz kalması, karaciğerin FIB' i sentezlemek için sahip olduğu yüksek kapasiteyle ilişkide olabilir. Total sentez kapasitesindeki hasarın ilerleyişi ancak akut hepatik bozukluk veya dekompanze kronik hepatik hastalığın sonucu olarak meydana gelebilmektedir (Center 1997). Leishmaniasis' in kronikleşmesi ve bu hastalıktaki akut hepatik bozukluğun yaygın olmayışı CVL' li köpeklerde bulunan normal FIB seviyesinden sorumlu olabilir (Moreno, 1999). Nitekim bizim çalışmamızda 6 olguda hiperfibrinojenemi, yalnızca 1 olguda şekillenen hipofibrinojenemi dışında, 21 olguda FIB konsantrasyonlarının değişmemiş olması, yukarıda sözü edildiği üzere hastalığın özellikle ileriki evrelerde kronikleşmesi ya da akut hepatik hasarın bulunmayışı (Moreno, 1999) ile açıklanabilir. Altı olguda şekillenen hiperfibrinojeneminin gruplara dağılımı incelendiğinde ilginç olarak evre arttıkça FIB konsantrasyonunda yükselme olan olgu sayısının azaldığı dikkati çekmiştir.

Fibrin yıkımlanma ürünlerinin konsantrasyonundaki artış CVL' de rapor edilmiştir (Bernardini ve ark, 1980; Font ve ark, 1993; 1994). Moreno (1999)' nın araştırmalarında CVL' de normal ve hasta köpekler arasında fibrin yıkımlanma ürünlerinin seviyelerinde belirgin farklar saptanmamıştır. Bir köpekte rapor edilen fibrin yıkımlanma ürünlerindeki artış, antithrombin III' ün böbreklerden kaybını takip eden hiperkoagülasyon durumu ve fibrinolizisin artışına bağlanmıştır (Font ve ark, 1993). Başka bir vakada fibrin yıkımlanma ürünlerindeki artış bilinmeyen mekanizmalara bağlı YDPB ile ilişkilendirilmiştir (Font ve ark 1994). Bu durumun eksikliği ya da yüksek kreatinin seviyesi trombozise eşlik eden böbrek yetmezliğinin kendisinin hiperkoagülasyona yol açmadığını göstermektedir. Fibrin yıkımlanma ürünlerindeki artışlar, hepatik fonksiyon kötüleştikçe azalan antitrombin III

seviyeleri ve eşlik eden hiperkoagülasyon durumu ile artmış fibrinolizis ile ilişkilendirilmektedir. Ek olarak, karaciğer hasarı sonucu fibrin yıkılma ürünlerinin uzaklaştırılma oranında azalmaya bağlı olarak dolaşımdaki seviyeleri artar (Center, 1997). Hepatik hastalığın az sıklıkla gelişimi ve Akdeniz Havzasında CVL' nin erken tanısı gibi nedenlerden ötürü hepatik hasarın fibrinolizisteki değişikliklere olan etkisini en az seviyede olabilir (Moreno, 1999). Bu çalışmada fibrin yıkılma ürünü olarak değerlendirilen D-dimer konsantrasyonlarının gruplara dağılımı incelendiğinde evre III ve IV CVL ile enfekte 14 olgunun tamamında, genel toplamda 25/28 olguda artış belirlendi. İlgili artışların evre III ve IV' te rapor edilen tromboembolizm (Solano-Galego ve ark, 2011) ya da YDPB ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

Nitekim yukarıda son sözü edilen araştırma CVL' de kanama her zaman mevcut olmasa da hemostatik bozuklukların (APTT ve trombin süresi) tanısal testlerinin pozitif olabileceğini göstermektedir. Karaciğer bozukluğu, APTT' nin uzamasının patojenitesi ile ilgili olabilir. Önceki bildirimlere karşıt olarak ilgili çalışmada, FIB konsantrasyonu ve fibrin yıkılma ürünlerinin seviyeleri incelenen tüm köpeklerdeki normal seviyelerde saptanmıştır (Moreno, 1999).

APTT, intrinsik ve ortak yolları değerlendirmek için en yaygın kullanılan testtir. Önceki bir çalışmada, APTT yüksek plazma ALT aktivitesi olan hastalıklı köpeklerde hatırı sayılır bir şekilde daha uzundu. Daha önceden canine leishmaniasiste karaciğer fonksiyonu ve hemostazı değerlendiren hiçbir rapor bulunmadı ve karaciğer rahatsızlığı olan köpeklerin yüzde kaçının kanama bozuklukları olduğu bilinmemektedir (Center 1997). Font ve diğerleri (1994) leishmaniasisi ve hepatik parankimde birçok kanama odakları olan bir köpekte uzamış APTT rapor ettiler. CVL' deki hepatik bozukluk ALT aktiviteleri ve APTT arasındaki oldukça önemli gerileme tarafından gösterildiği gibi intrinsik yolla ilgili olan faktörlerin azalmış sentez oranıyla sonuçlanabilir. Anormal APTT değerlerine rağmen, hepatik hastalıklı hayvanlarda kanama yatkınlığı yaygın bir şekilde rapor edilmemiştir (Badylak, 1988). Plazma pıhtılaşma faktörlerinin konsantrasyonundaki ya da hafif hepatik hasar tarafından ortaya çıkan faktörlerin hareketliliğindeki az ile orta derecede değişiklikler aşırı kanamaya neden olmak için yetersiz olabilirler. Bu yüzden, leishmaniasisli köpeklerde kanamanın seyrek görünmesi endemik bölgelerde hastalığın erken teşhisine bağlı olabilir ve hastalığın daha ileri aşamalarında hepatik hasarın ilerlemesi sonunda hemostatik değişikliklere yol açabilir.

Epistaksis, hematüri ve hemorajik diyare gibi hemostatik bozuklukların CVL' de şekillendiği bildirilmektedir (Ciaramella ve Corona, 2003). Trombositopeni, trombositopati, uzamış trombin zamanı, uzamış APTT ve artan FIB/fibrin yıkımlanma ürünleri Leishmania enfeksiyonunda tespit edilmiş ve söz konusu protozoer etkenin primer hemostazisi, koagülasyonu ve fibrinolizisi bozduğu gösterilmiştir (Font ve ark, 1994; Font ve ark, 1993; Moreno, 1999). Leishmanialı 14 köpek üzerinde yapılan ön çalışmada, klinik durumuma bakılmaksızın trombosit agregasyonunda değişiklikler tespit edilmiştir (Ciaramella ve ark, 2002).

Önceden gerçekleştirilen bir çalışmada CVL' de, hem APTT hemde PT' nin belirgin şekilde uzadığı görülmüştür. Uzamış PT ekstrinsik ve ortak yollar ile ilişkili koagülasyon faktörlerinin azalması ya da YDPB' nin görülmesiyle açıklanabilmiştir (Honse ve ark, 2013). Ciaramella ve ark (2005) normal PT değerleri gözlemlemişlerdir ve bu durumu ya köpek plazması üzerinde yapılan ticari PT testlerinin düşük hassasiyetine ya da bir ya da daha fazla yangısal mediyatörlerin oluşumunda aktivatör olarak bulunan intrinsik yoldaki koagülasyon faktörlerinin daha hızlı tüketimine bağlamışlardır. Moreno (1999) aynı zamanda farklı hepatik hasar derecesi ve yaygın intravasküler koagülasyonun olmaması ile açıklanan muhtemel normal m-OSPT (modifiye tek aşamalı protrombin zamanı) olduğunu bildirmiştir. Badylak ve ark (1983) hepatik hasarlı (karaciğer enzimleri ölçülmeden) köpeklerde uzamış tek aşamalı protrombin zamanı belirlemişlerdir. Uzamış APTT, intrinsik ve ortak yollarla ilişkili koagülasyon faktörlerinin azalması ile yaygın intravasküler koagülasyonun görülmesi ile açıklanabilir (Badylak ve ark, 1983). Bu durum ilgili vakada böbrek ve karaciğer enzimleri ölçülmemesine rağmen senteze zarar vererek koagülasyon faktörlerinin eksikliğiyle sonuçlanabilecek renal ya da karaciğer yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir. Font ve ark (1994) hepatik parenkimde multiple kanama odağı olan CVL' li köpekte uzamış APTT rapor etmiştir. Moreno (1994) aynı zamanda hemorajinin sürekli olmamasına rağmen uzamış APTT tanımlamıştır. Valladares ve ark (1998) deneysel yolla oluşturulan leishmanialı köpeklerde normal PT ve APTT değerleri gözlemiştir. Ruiz de Gopegui ve ark (1994) göre referans aralıklarındaki PT ve APTT' nin erken ve kompanse YDPB' li hastalarda ortaya çıktığı gözlemiştir.

Bizim çalışmamızda evre I CVL ile enfekte 7 köpekte APTT' de uzama veya kısalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 6,7) APTT' de uzama, birinde (olgu 1) kısalma görülmüştür. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 5, 7) APTT' de uzama görülürken, diğer olgularda kısalma gözlenmemiştir. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 4, 5) APTT' de uzama görülürken diğer olgularda

kısalma gözlenmemiştir. Evre I CVL ile enfekte 7 köpeğin birinde (olgu 4) PT' de uzama görülürken hiçbir olguda kısalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 5, 6) PT' de uzama görülürken birinde (olgu 1) kısalma gözlenmiştir. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin dördünde (olgu 2, 3, 4, 7) uzama görülürken ikisinde (olgu 1, 6) kısalma gözlenmiştir. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 1, 5) PT' de uzama görülürken birinde (olgu 7) kısalma gözlenmiştir. APTT ve PT' de birlikte uzamanın yanı sıra, pozitif (uzamış) D-dimer testleri trombosit faktörlerinin eksikliği, tüketilmesi ya da koagülasyon faktörlerinin eksikliği (Turgut, 2000) ile ilişkilendirilebilir.

Bruno ve ark (2015) leishmaniasisli köpeklerde sağaltım öncesi ve sonrası tromboelastometrik yöntem ile hemostazisi değerlendirmiş, semptomatik olgular ile asemptomatik olgular arasında FIB konsantrasyonları açısından belirgin bir fark olduğunu bildirmektedir ($p=0.002$). CVL' ye ilişkin olarak sekonder hemostazisin ve fibrinolizisin bozulduğu bildirimini dikkate alındığında, bizim çalışmamızda FIB konsantrasyonlarında evreler arası ya da sağlıklı kontrollere göre bir farklılık olmadığı dikkati çekmiştir. Leishmaniasis' in klinik ilerleyişi hemorajik diyatez oluşumu ile yakından ilişkide olmakla beraber bu durum sadece parazit yükü ile ilişkide sınırlı kalmamakla birlikte meydana gelen yangısal proses bozulmuş olan immunolojik cevap yada hepatik ve/veya renal yetmezlikle yakından ilişkidir (Ciaramella ve ark, 2005). Leishmaniasisli köpeklerde gerçekleştirilen birçok çalışmada trombositopeni ve azalmış trombosit fonksiyonu belirlenmiştir (Moreno ve ark, 1998; Valladares ve ark, 1998; Ciaramella ve ark, 2005; Terrazzano ve ark, 2006; Cortese ve ark, 2009; Pelagalli ve ark, 2004). Buna karşın sekonder hemostazis ve fibrinolizis değişen derecelerde bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda artmış olan APTT belirlenirken, başka diğer çalışmalarda kompanze edilmiş YDPB' nin fibrin yıkılma ürünlerinde artışa karşın, normal plazma FIB konsantrasyonları ile seyrettiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda CVL' li köpeklerde FIB konsantrasyonunda değişim olmaması araştırmacıları bildirdiği üzere kompanze edilmiş YDPB ile açıklanabilir (Valladares ve ark, 1998; Ciaramella ve ark, 2005; Moreno ve ark, 1999).

Torres ve ark (2016) hepatik lezyonu bulunan veya bulunmayan köpeklerde PT' yi saniye cinsinden sırasıyla 8.12–20.62 olarak tespit etmişler, hepatik lezyonu bulunan köpeklerde PT' nin belirgin derecede ($p=0.04$) azaldığını bildirilmektedir. Aynı çalışmada CVL' li köpeklerin %23.33' ünde PT' de değişim %30' unda ise APTT' de değişim saptamışlardır. Bunu yanı sıra CVL' li köpeklerin %16.66' sında FIB konsantrasyonun azaldığı ve CVL ile kontrol grubu arasında FIB konsantrasyonları açısından belirgin istatistiksel fark ($p=0.005$) meydana geldiği görülmüştür (Torres ve ark 2016). Bu çalışmada evre I CVL

ile enfekte 7 köpeğin hiçbirinde FIB düzeyinde artma veya azalma gözlenmemiştir. Evre II CVL ile enfekte 7 köpeğin üçünde (olgu 1, 2, 5) FIB düzeyinde artış gözlenirken birinde (olgu 6) azalma gözlenmiştir. Evre III CVL ile enfekte 7 köpeğin ikisinde (olgu 1, 3) FIB düzeyinde artma gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmemiştir. Evre IV CVL ile enfekte 7 köpeğin birinde (olgu 4) FIB düzeyinde artma gözlenirken hiçbir olguda azalma gözlenmemiştir. Evre artışı ile FIB düzeyindeki değişimlerin arasında korrelasyon olmadığı dikkat çekmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaptığımız incelemelerde daha önce CVL' nin farklı evrelerindeki köpeklerde konvasiyonel rutin koagülasyon profili (PT, APTT ve FIB) ile fibrin yıkımlanma ürünlerinin (D-dimer) değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamış olması araştırmanın orijinalliğini ve önemini göstermektedir. Olgularda konvensiyonel koagülasyon parametrelerinin yanı sıra D-dimer seviyelerinin belirlenmiş olması, konuya ilişkin önceden yapılan sınırlı çalışmaların ötesinde YDPB' nun potansiyel bir belirteci olarak da tanının desteklenmesini, belkide ileride oluşturulacak sağaltım protokollerinin değişimine katkı ve etki sağlayacaktır. Bu kapsamda güncel ve yeni bir parametre olarak D-dimer seviyelerindeki değişikliklerin belirlenmesi ile literatürdeki önemli bir boşluğun doldurulması sayesinde ileride gerek Veteriner Hekimlik alanında gerekse insanlarda yapılacak çalışmalara yön verilmesi sağlanacaktır. CVL' de evre arttıkça FIB düzeylerinde başlangıçta artışın azaldığı, buna karşın D-dimer seviyelerinde artış görülen olgu sayısının arttığı gözlemlendi. Yine CVL' de evre arttıkça hastalığın kronik tabiatı iç organ yetmezliklerinin şekillenmesine ve APTT seviyelerinde uzama şekillenen olgu sayısındaki artışa neden olmaktadır. Bu bağlamda konvasiyonel rutin koagülasyon profilinde özellikle FIB konsantrasyonunda artış durumunda non-steroidal antiinflatuar sağaltımına, D-dimer seviyelerinde artış şekillendiği durumlarda ise düşük moleküler ağırlıklı heparin türevleri ile sağaltıma yön verilmesi gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelmoula MS, M'hamdi Z, Amri F, Tebib N, Ben Turkia H, Ben Dridi MF.** La leishmaniose viscerale chez l'enfant: facteurs pronostiques. *Journal Medical Tunisie* 2003, 81, 535-539
- Abranches P, Conceicao-Silva FM, Silva-Pereira MC.** Kalaazar in Portugal. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1984, 87, 197–200
- Abranches P, Lopes FJ, Fernandes PS, Gomes LT.** Leishmaniasis in Portugal. Attempts to find a wild reservoir. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1982, 85, 123–126
- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamin N, Campino L, Schnur L, Jaffe CL.** An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* 1991b, 13, 537–550
- 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
- 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* 1991a, 77, 557–561
- Acedo-Sanchez C, Martin-Sanchez J, Velez-Bernal ID, Sanchis-Marin MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas-Marquez F.** Leishmaniasis ecoepidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, Southern Spain). *International Journal for Parasitology* 1996, 25, 303–310
- Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HDFH.** Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010, 82(4), 591–596
- Akers IA, Parsons M, Hill MR, Hollenberg MD, Sanjar S, Laurent GJ, McAnulty RJ.** Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000, 278(1), 193-201

- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J.** Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clinical Microbiology Reviews* 1997, 10, 298–319
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J.** Canine leishmaniasis. *Advance in Parasitology* 2004, 57, 1–88
- Alvar J.** Las Leishmaniasis: de la Biología al Control. Salamanca, Laboratorios Intervet S.A 2001
- Amara A, Mrad I, Melki M, Ben M'rad M, Rejeb A.** Etude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2004, 160(1), 54–60
- Amara A.** Manifestations oculaires chez les chiens leishmaniens. *Point Veterinaire Impact Factor* 2003, 34, 50–55
- Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachon I, Canavate C, Alvar J.** Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *European Journal of Epidemiology* 1995, 11, 157–161
- Andrade HM, Toledo VPCP, Pinheiro MB, Guimarães TMPD, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandão RMSS, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML, Bartchewsky W, Monte SJH.** Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (*L. chagasi*) in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011, 181 (2–4), 83–90
- Angstwurm MW, Reininger AJ, Spannagl M.** D-dimer as marker for microcirculatory failure: correlation with LOD and APACHE II scores. *Thrombosis Research* 2004, 113(6), 353-9.
- Anonim 1.** Stokol T (ed). College of Veterinary Medicine. Hemostasis. Introduction, Tests of hemostasis, Disorders of hemostasis, Transfusion medicine. <http://ahdc.vet.cornell.edu/clinpath/modules/coags/coag.htm>. Erişim Tarihi:27.05.2015
- Anonim 2.** Susan G. Hackner (ed). bleeding disorders: diagnostic approach simplified <http://www.cuvs.org/pdf/article-bleeding-disorders-diagnostic-approach.pdf> Erişim Tarihi: 20.04.2015
- Arias JR, Monterio PS, Zicker F.** The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Disease* 1996, 2(2)
- Artemiev MM.** A revision of sandflies of the subgenus *Adlerius* (Diptera, Phlebotominae, Phlebotomus). *Zoologicheskii Zhurnal* 1980, 59 (8), 1177–1192

- Ashutosh Sander S, Goyal N.** Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. *Journal of Medical Microbiology* 2007, 56, 143-153
- 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
- Ateş F, Or E, Körpınar M A, Gönül R, Bahçeci T.** Leishmaniasisin Tedavisinde Antimon Bileşiklerinin Kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2011, 22 (1), 53–57
- Athanasiou LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS.** Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: a pilot open clinical trial. *Veterinary Parasitology* 2013, 192 (1–3), 91–97
- Badylak SF, Dodds WJ, Van Vleet JF.** Plasma coagulation factor abnormalities in dogs with naturally occurring hepatic disease. *American Journal of Veterinary Research* 1983, 44, 2336
- Badylak SF.** Coagulation disorders and liver disease. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 1988, 18(1), 87-93
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L.** Canine leishmaniosis new concepts and insights on an expanding zoonosis. *Trends Parasitology* 2008, 24(7), 324–330
- Baneth G, Shaw SE.** Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 2002, 106 (4), 315–324
- Benderitter T, Casanova P, Nashkidachvili L, Quilici M.** Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1988, 82, 335–341
- Benzouine B.** Anatomie et histologie du tube digestif du chien. Application a l'étude des lesions digestives chez les chiens leishmaniens. Thesis in veterinary medicine. Ecole Nationale de Medecine Veterinaire de Sidi Thabet 2000
- Bernardini S, Bick MD, Fekete IF.** Antithrombin III patterns in disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Clinical Pathology* 1980, 73, 577-583
- Bettini S, Pozio E, Gradoni L.** Leishmaniasis in Tuscany (Italy). Leishmania from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1980, 74, 77–83
- Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, Giroud L, Castagnaro M.** Administration of miltefosine and meglumine in healthy dogs:

clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicologic Pathology* 2009, 37 (6), 770–775

Binhazim AA, Chapman WL, Latimer KS, Styles M, Comer K. Canine leishmaniasis caused by *Leishmania leishmania infantum* in two Labrador retrievers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1992, 4(3), 299-305

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

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases Journal Impact Factor & Information* 2011, 5(4)

Bourdeau P, Groulade P. Results of an inquiry into leishmaniasis. *Pratique Medicale et Chirurgicale del Animale de Compagnie* 1988, 23, 5, 5–10

Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A, Puccini V. Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *European Journal of Epidemiology* 1992, 8, 273–276

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

Bray M. Pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Current Opinion in Immunology*. 2005, 17(4), 399–403

Brooks J. Coagulopathies and thrombosis. In Ettinger SJ, Felman EC. (Ed), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 5. Edition, Philadelphia, WB Saunders, 2000, 1829-1841

Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension*, 1999, 33, 1431-1435

Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. *Clinical and Experimental Immunology* 1985, 59, 427–434

Buracco P, Abate O, Guglielmino R, Morello E. Osteomyelitis and arthrosynovitis associated with *Leishmania donovani* infection in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 1997, 38, 29–30.

- Caldin M, Furlanello T, Berto D, Lubas G.** Preliminary investigations of D-dimers concentrations in normal dogs and in dogs with disseminated intravascular coagulation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1997, 11, 130
- Caldin M, Furlanello T, Lubas G.** Sensitivity and specificity of citrated plasma FDPs and D-dimer in the diagnosis of disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1998, 12, 236
- Candido TC, Perri SHV, Gerzoschkwitz TO, Luvizotto MCR, Lima VMF.** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology* 2008, 157, 175-181.
- Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N, Rodrigues M.** Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica* 2004, 91(2), 95-100
- Carrasco L, Chacón M de Lara F, Martin E, Hervás J, Molleda JM, Gómez-Villamandos JC, López R.** Acute haemorrhagic pancreatitis associated with canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Record* 1997, 141, 519-521
- Castro-Junior JG, Freire ML, Campos SPS, Scopel KKG, Porrozzini R, Da Silva ED, Colombo FA, Silveira RCV, Marques MJ, Coimbra ES.** Evidence of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection in dogs from Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil, based on immunochromatographic dual-path platform (DPPR) and PCR assays. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2014, 56 (3), 225–229
- Catarsini O.** Epidemiology and clinical manifestations of canine leishmaniasis. *Revista Parasitologica* 1981 42, 83–87
- Center SA.** Fisiopatologia diagnóstico clinicopatológico de los procesos hepatobiliares. In: Ettinger SJ, Feldman EH. (eds), *Tratado de Medicina Interna Veterinaria* 4th edition, Buenos Aires, Intermedica, 1997, 1525-1589
- Chamaille L, Tran A, Meunier A, Bourdoiseau G, Ready P, Dedet JP.** Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors* 2010, 3, 31
- Chaouch M, Mhadhbi M, Adams ER, Schoone GJ, Limam S, Gharbi Z, Darghouth MA, Guizani I, Benabderrazak S.** Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Leishmania infantum* in canine leishmaniasis based on cysteine protease B genes. *Veterinary Parasitology* 2013, 198(1–2), 78–84

Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002, 93–99

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 2003, 25(5), 358–368

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

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L, Persechino A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Journal* 2005, 169, 465–467

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L. Platelet aggregation response in canine leishmaniasis. *Platelets* 2002, 13, 331

Cirino G, Cicala C, Bucci M, Sorrentino L, Ambrosini G, DeDominicis G, Altieri DC. Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1997, 99(10), 2446-2451

Clark IA, Budd AC, Alleva LM, Cowden WB. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal* 2006, 5, 85

Collin S DR, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, Kipnetich S, Davies C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases* 2004, 38, 612-619

Colman W. Contact activation (kallikrein-kinin) pathway: Multiple physiologic and pathophysiologic activities. In: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins 2006, 107–130

Corlouer JP, Patat JL, Spilbauer JP. Case clinique: leishmaniose canine. *Point Veterinaire* 1983, 5, 75–76

Corona M, Ciaramella P, Pelagalli A. Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Research Communications* 2004, 28, 331–334

Cortese L, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazzano G, Mastellone V, Ciaramella P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 2009, 164(25), 778-82.

- Costa DL, Rocha RL, Carvalho RM, Lima-Neto AS, Harhay MO, Costa CHN, Barral, AP.** Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathogens and global health* 2013, 107(2), 78-87
- Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL.** Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired. *Veterinary Pathology* 2003, 40(6), 677-84
- Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonca IL, Goto H.** CD4-T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000, 33, 1455–1458
- Coşkun 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
- Coughlin SR.** How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999, 96, 11023-11027
- 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
- Crawley JT, Zanardelli, Chion CKNK, Lane DA.** The central role of thrombin in hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2007, 5, 95–101
- Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, Holdsworth SR, Tipping PG.** Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood* 1999, 94, 3413-3420
- Dantas-Torres F, Stefania Latrofa M, Otranto D.** Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 2011, 4(1), 56
- De Laforcade A, Freeman LM, Shaw SP.** Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003, 17(5), 674-679
- De Luna R, Vuotto ML, Lelpo MT, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D.** Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999, 70, 95–103
- Dereure J, Rioux JA, Khiami A, Pratlong F, Perieres J, Martini A.** Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. Presence, in dogs, of *Leishmania infantum* (Nicolle) and *Leishmania*

tropica (Wright) (Kinetoplastida–Trypanosomatidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 1991, 66, 252-255

Devignot S, Sapet C, Duong V, Bergon A, Rihet P, Ong S, Buchy P. Genome-wide expression profiling deciphers host responses altered during dengue shock syndrome and reveals the role of innate immunity in severe dengue. *PloS one* 2010, 5(7), 11671

Dewhurst E, Cue S, Crawford E, Papasouliotis K. A retrospective study of canine D-dimer concentrations measured using an immunometric "Point-of-Care" test. *Journal of Small Animal Practice* 2008, 49(7), 344-8

Di Minno G, Mancini M. Drugs affecting plasma fibrinogen levels. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 1992, 6(1), 25-7

Dominguez M, Torano A. Leishmania immune adherence reaction in vertebrates. *Parasite Immunology* 2001, 23, 259–265

Duchosal MA, Rothermel AL, McConahey PJ, Dixon FJ, Altieri DC. In vivo immunosuppression by targeting a novel protease receptor. *Nature* 1996, 380, 352-356

Dunan S. Interpretation des resultats biologiques dans les leishmanioses humaines et canines. *Recueil Medicale et Veterinaire* 1978, 154, 251–261

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada. *Emerging Infectious Diseases journal* 2006 12(3), 440-446.

Elbihari S, Cheema AH, El-Hassan AM. Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. Canine cutaneous leishmaniasis in the Eastern Province. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987, 81, 925–927

Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, Tirupathi C. Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1999, 274(19), 13718-13727

Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 1999, 84(3), 254-259

Esmon CT. Introduction: are natural anticoagulants candidates for modulating the inflammatory response to endotoxin? *Blood* 2000, 95, 1113-1116

Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *British Journal of Haematology* 2005, 131, 417–430

- Evans DA, Rebélo ME.** Hand Book of Visceral-Cutaneous Leishmaniasis in the Domestic Dog. Instituto de Protecção da Produção Agro-Alimentar Centro Nacional de Protecção e Controlo Zoo Sanitário 1996
- Farca AM, Miniscalco B, Badino P, Odore R, Monticelli P, Trisciuglio A, Ferroglio E.** **Canine leishmaniosis.** In vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. Parasitology Research 2012, 110 (6), 2509–2513
- Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, Heyderman RS.** Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. New England Journal of Medicine 2001, 345(6), 408-416
- Félix N, Mouro S, Vilela CL, Peleteiro MC, Ferreira AJ, Niza MMR.** Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2008, 18(5), 526-531
- Ferrer L, Rabanal R, Fondevila D, Ramos JA, Domingo M.** Skin lesions in canine leishmaniasis. Journal of Small Animal Practice 1988, 29(6), 381–388
- Ferrer L.** Leishmaniasis. In Proc. of the 16th World Small Animal Veterinary Association Congress, 2–5 October, 1991, Vienna, 52–54
- Ferrer L.** Leishmaniosis canina en Espana: datos para el clinico. Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica 1989, 7, 293–295
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera, C, Carrio J, Gallego J, Portus M.** Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain): the example of the Priorat focus. Veterinary Parasitology 1999, 83, 87–97
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M.** Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. Veterinary Parasitology 2001, 99, 105–111
- Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L.** Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. Veterinary Immunology and Immunopathology 1997, 56, 319–327
- Font A, Closa JM, Molina A, Mascort J.** Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniasis. Journal of Small Animal Practice 1993, 34, 466-470
- Font A, Gines C, Closa JM, Mascort J.** Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. Journal of the American Veterinary Medical Association 1994, 204, 1043–1044
- Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M.** Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. Journal of Small Animal Practice 2004, 45, 199–201

Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L. Canine mucosal leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1996, 32, 131–137

Fraser CM, Associarte AM. Visceral Leishmaniasis in part Generalized Conditions. *The Merck Veterinary Manual*. Merck & Corporation Edition 6, Rahway, New Jersey, 1986.

Freitas de E, Melo MN, Costa-Val da 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

Furie B, Furie BC. Molecular basis of blood coagulation. In Hoffman R. (Eds) *Hematology: Basic Principles and Practice*. New York, Churchill-Livingstone, 2000, 1783-1803.

Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S, Maisto A. Leishmaniosi viscerale in Italia. *Epidemiologia, clinica, terapia. Recenti Progressi di Medicina* 1994, 85, 340–347

Galati EAB. Flebotomíneos do Brasil. In: Rangel EF, Lainson R, (eds), *Fio Cruz*, Rio de Janeiro, Brazil, 2003, 23–51.

Galvao-Castro B, Sa Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 1984, 56, 58–66

Garcia-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C, Navarrete I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features of the central nervous system. *Parasite Immunology* 1996, 18, 539–546

García-Sancho M, Sainz A, Rodríguez-Franco F, Villaescusa A, Rodríguez-Bertos A. Pulmonary thromboembolism in a dog with inflammatory bowel disease. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 2010, 4(2), 78-86

Gharbi M, Mhadhbi M, Rejeb A, Jaouadi K, Rouatbi M, Darghouth MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 2015, 34 (2), 613-626

Giannini M, Rollo HA, Maffei FH, Carvalho LR. Advances in ultrasound techniques improve early detection of deep vein thrombosis. *International Angiology* 2008, 27(6), 466-474

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal* 2008, 175(1), 45–52

- Gomez-Nieto IC.** Epidemiologia y clinica de la leishmaniosis canina en Caceres. Doctoral thesis, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura 1990
- Gönül R, Arun SS, Dodurka T, Handemir E.** Bir köpekte leishmania infantum olgusu. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 2002, 26, 689-694
- 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
- Grant DI, Thoday KL.** The Skin. Canine Medicine and Therapeutics. London, Blackwell Scientific Publications, 3rd ed, 1991, 381.
- Greene CE.** Infectious diseases of the dog and cat, Saunders, 4th ed, St Louis, Missouri, 2012, 1376.
- Griffin A, Callan MB, Shofer FS, Giger U.** Evaluation of a canine D-dimer point-of-care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. American Journal of Veterinary Research 2003, 64, 1562-1569
- Griffiths WAD.** Old World cutaneous leishmaniosis. In: W. Peters and R. Killick-Kendrick (eds), The Leishmaniases in Biology and Medicine, London, Academic Press, 2nd ed, 1987, 617–636.
- Guyton, AC, Hall JE.** Hemostasis and coagulation. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Elsevier Health Books, Philadelphia, 2006.
- Hailu A, Dagne DA, Boelaert M.** Leishmaniasis. In: Gyapong J, Boatman B (Eds), Neglected Tropical Diseases-Sub-Saharan Africa. Springer International Publishing, Switzerland, 2016, 87-112
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH.** Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends in Parasitology. 2011, 27(9), 403-9
- Hernandez-Rodriguez SR, Gomez-Nieto C, Martinez-Gomez F, Gutierrez-Palomino P.** Aspectos clinicos de la leishmaniosis canina. Revista Iberica de Parasitologia 1987, 61–66
- Hervás Rodríguez J, Mozos E, Méndez A, Pérez J, Gómez-Villamandos JC.** Leishmania infection of canine skin fibroblast in vivo. Veterinary Pathology 1996, 33, 469-473
- Herwaldt BL.** Leishmaniasis. Lancet 1999, 354(9185), 1191-9
- Hirschberger J, Regal A, Krieger S, Kuchenoff H.** D-dimers and optimized prothrombin test for diagnosis of DIC in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 2004, 18, 440.

- Hohenhaus AE.** How good is D-dimer? The North American Veterinary Conference 2005 Proceedings. <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2005/SAE/155.pdf> Erişim Tarihi: 16.09.2016
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G.** Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995, 1, 55-73
- Honse CO, Figueiredo FB, de Alencar NX, Madeira Mde F, Gremião ID, Schubach TM.** Disseminated intravascular coagulation in a dog naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* from Rio de Janeiro - Brazil. *BMC Veterinary Research* 2013, 9, 43.
- Jimenez C, Fernandez F.** Inflammation, kinins, and complement. System interaction with haemostasis. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology*, fifth edition Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000, 549–551.
- Juttner C, Rodriguez SM, Rollan LE.** Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Veterinary Record* 2001, 149, 176–179
- Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ.** Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. *Veterinary Pathology* 1984, 21, 80–86
- Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson, AJ.** Visceral leishmaniasis in the German Shepherd dog. Infection, clinical disease and clinical pathology. *Veterinary Pathology* 1984, 21, 74–79
- Keskin-Kürklü M.** Leishmaniasisin endemik olduğu Aydın/Kuşadası'nda asemptomatik köpeklerde *Leishmania infantum* enfeksiyonunun araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı VİH-YL 2011-0002 Yüksek Lisans Tezi 2011 Danışman: Prof. Dr. Serdar PAŞA
- Khurana A, Tahir T.** Venous Thromboembolic Disease Presenting as Inferior Vena Cava Thrombus Extending into the Right Atrium. *Journal of Clinical Medicine Research* 2004, 2(2), 125–127
- 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 Veterinary 1999, 26–31
- Killick-Kendrick R.** The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology* 1999, 7(3), 279–289

- Kirchhof MG, Lee AY, Dutz JP.** D-dimer levels as a marker of cutaneous disease activity: case reports of cutaneous polyarteritis nodosa and atypical recurrent urticaria. *Journal of the American Medical Association Dermatology* 2014, 150(8), 880-4
- Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, Spanakos GK, Saridomichelakis MN.** Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Veterinary Dermatology* 2010, 21(6), 572–577
- Koutinas AF, Koutinas CK.** Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology* 2014, 51(2) 527-538
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG.** Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1999, 35(5), 376-383
- Kroneman H, Nieuwenhuizen W, Knot EAR.** Monoclonal antibody-based plasma assays for fibrinogen and derivatives, and their clinical relevance. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1990, 1(1), 91-112
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Carson CW, D'Angelo A, Della Valle P, Esmon CT.** Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus: lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes. *Blood* 1998, 91, 725-727
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ, Hidari N, Esmon CT.** Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma *Journal of Clinical Investigation Impact & Description* 1997, 100, 411-418
- Kyrle PA, Stockenhuber F, Brenner B.** Evidence for an increased generation of prostacyclin in the microvasculature and an impairment of the platelet alfa-granule release in chronic renal failure. *Thrombosis and Haemostasis* 1988, 60, 205–208
- Lainson R, Shaw JJ.** Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds), *The Leishmaniasis in biology and medicine*. Academic Press, London, 1987, 1-120
- Lane RP.** Sandflies (Phlebotominae). In: Lane DRP, Crosskey DRW (eds), *Medical insects and arachnids*. Springer, Dordrecht, Netherlands, 1993, 78–119

- Lanevski-Pietersma C, Bedard L, Kohlbrenner L.** D-dimer, thrombin-antithrombin complex and fibrinogen degradation product levels measured in dogs with different systemic diseases. *Veterinary Clinical Pathology* 2003, 32, 225.
- Lanotte G, Rioux JA, Perieres J, Vollhardt Y.** Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique finale épidémiologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1979, 54, 277–295
- Lee AY, Ginsberg JS.** Laboratory diagnosis of venous thromboembolism. *Baillieres Clin Haematol* 1998, 11, 587-604
- Lee AY, Ginsberg JS.** Venous Thrombosis of the Upper Extremities. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 2001, 3(3), 207-214
- Lester SJ, Kenyon JE.** Use of allopurinol to treat visceral leishmaniosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1996, 209(3), 615-617
- Levi M, Ten Cate H.** Disseminated intravascular coagulation. *The New England Journal of Medicine* 1999, 341(8), 586-92
- Levi M, Van der Poll T.** Inflammation and coagulation. *Critical care medicine* 2010, 38, 26-34
- Levi M.** Disseminated intravascular coagulation: What's new? *Critical Care Clinics* 2005, 21(3), 449-67.
- Lewis DJ, Young D, Fairchild GB, Minter DM.** Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology* 1977, (2), 319–332
- Lewis DJ.** A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bulletin of the British Museum (Natural History)* 1982, 45 (2), 121–209
- Lip GYH, Lowe GDO.** Fibrin–D-dimer; a useful clinical marker of thrombogenesis. *Clinical Science* 1995, 89, 205-14
- Li-Saw-Hee FL, Blann AD, Lip GY.** Effects of fixed low-dose warfarin, aspirin–warfarin combination therapy, and dose adjusted warfarin on thrombogenesis in chronic atrial fibrillation. *Stroke* 2000, 31, 828-33
- Lomtadze ML, Khochava MA, Shalamberidze IA, Shilakadze MA, Dzhokhtaberidze TG.** Functional status of haemostasis system in patients with visceral leishmaniasis. *Georgian medical news.* 2005, 128, 59-62
- Longstaffe JA, Guy MW.** Canine leishmaniasis: United Kingdom update. *Journal of Small Animal Practice* 1986, 27, 663–667

- Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martín E, Molleda JM.** Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 1996, 43, 469-474
- Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, Potempa J, Travis J, Mackie EJ, Pike RN.** Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS letters* 1998, 435(1), 45-48.
- Lucena R, Molleda JM, Ginel PJ, Novales M, Martín E, Lopez R.** Third component of complement serum levels in dogs with leishmaniasis. *Zentralblatt von Veterinarmedizin* 1994, 41, 48–52
- Lugovskoy EV, Kolesnikova IN, Gritsenko PG, Zolotareva EN, Gaffney P, Nieuwenhuizen W, Komisarenko SV.** A neoantigenic determinant in the D-dimer fragment of fibrin. *Thrombosis Research* 2002, 107(3-4), 151-6
- Luna RD, Vuotto ML, Lelopo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscatiello V, Ciaramella P, Scalone A, Gradoni L, Mancino D.** Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999, 70, 95-103
- Makni S, Ayed K, Ben Said M, Ben Rachid MS.** Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1989, 83, 349–355
- Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S.** Studies on canine leishmaniasis control. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1988, 82, 566–567
- Mancianti F, Poli A, Bionda A.** Analysis of renal immunodeposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia* 1989, 31, 213–230
- Mann KG, Brummel K, Butenas S.** What is all that thrombin for? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003, 1, 1504–1514
- Manzillo VF, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L.** Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Veterinary Parasitology* 2006, 142 (1–2), 142–145
- Marder VJ, Francis CW.** Plasmin degradation of cross-linked fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1983, 408, 397-406

- Martinetti L.** Dépistage, traitement et prévention de la leishmaniose canine en Corse; enquête auprès des vétérinaires praticiens de l'île. Thesis in veterinary medicine. École Nationale Vétérinaire de Toulouse 2013, 99
- Martinez-Moreno A, Martinez-Cruz MS, Blanco A, Hernandez-Rodriguez S.** Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* 1993, 51, 49–59
- Marty P, Pomares C, Michel G, Delaunay P, Ferrua B, Rosenthal E.** Leishmaniose viscerale mediterrannienne. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 2011, 195, 181–188
- Marzochi MC, Coutinho SG, De Souza WJ, De Toledo LM, Grimaldi G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, De Souza MA, Rangel FB, Tramontano NC.** Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977–1983). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 1985, 80, 349–357
- Mastroroberto P, Chello M, Perticone F.** Elevated circulating levels of von Willebrand factor and D-dimer in patients with heart failure and mechanical prosthesis. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 1996, 30, 77–81
- Mitush R, Siemens HJ, Garbe M, Wagner T, Sheikhzadeh A, Diederich KW.** Detection of a hypercoagulable state in nonvalvular atrial fibrillation and the effect of anticoagulant therapy. *Thrombosis and Haemostasis* 1996, 75(2), 219–23
- 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
- Molyneux DH, Ashford RW.** *The Biology of Trypanosoma and Leishmania, Parasites of Man and Animals.* London, Taylor & Francis 1983
- Monreal L.** Editorial: D-dimer as a new test for the diagnosis of DIC and thromboembolic disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003, 17, 757–759
- 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 P, Lucena R, Ginel PJ.** Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1998, 142, 81–83
- Moreno P.** Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record* 1999, 144, 169–171

Morgan LW, Kerlin RL, DeBoer DJ. Difficult dermatologic Diagnosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 1997, 210(2), 181-182

Morillas F, Benavides I, Gonzalez J, Reyes A, Valero A. Decouverte de *Leishmania sp.* dans le Rattus rattus de la province de Grenade (Espagne). Annales de Parasitologie Humaine et Compare 1985, 60, 768-770.

Morillas F, Sanchez-Rabasco F, Ocana J, Martin-Sanchez J, Ocana-Wihelmi J, Acedo C, Sanchiz-Marin MC. Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Ma' laga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. Parasitology Research 1996, 82, 569–570

Nelson OL, Andreasen C. The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 2003, 17, 830-834.

Nicholson AC, Nachman RL, Altieri DC, Summers BD, Ruf W, Edgington TS, Hajjar DP. Effector cell protease receptor-1 is a vascular receptor for coagulation factor Xa. Journal of Biological Chemistry 1996, 271(45), 28407-28413

Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. Veterinary Parasitology 1992, 45, 33–47

Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum*. Veterinary Journal 2014, 202 (3), 425–435

Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello S, Gaspari F, Todeschini M, Figliuzzi M, Remuzzi G. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: implications for platelet. Kidney International 1993, 44, 445–450

Noyan T. Klinik Tanı ve Laboratuvar Pratiğinde D-dimer Testi. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2012, 10(1), 35-40

Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 1994, 91, 9208-9212

Oliva G, Nieto J, Manzillo VF, Cappiello S, Fiorentino E, Di Muccio T, Scalone A, Moreno J, Chicharro C, Carrillo E, Butaud T, Guegan L, Martin V, Cuisinier AM, McGahie D, Gueguen S, Canavate C, Gradoni L. A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naive dogs exposed to two *Leishmania infantum* transmission seasons. PLOS Neglected Tropical Diseases 2014, 8 (10), 3213

Oliveira GG, Santoro F, Sadigursky M. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1993, 88, 243–248

- Opal SM, Esmon CT.** Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Critical Care* 2003, 7, 23-38
- Otranto D, Dantas-Torres F.** The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology* 2013, 29 (7), 339–345
- Owens SD, Oakley DA, Maryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schnatz P, Giger U.** Transmission of visceral leishmaniasis to anemic dogs through blood transfusions from infected foxhounds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001, 219, 1076–1083
- Özbel Y, Oksam L, Özensoy 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
- 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
- Özensoy Töz S, Özbel 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
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A.** Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2005, 104(3–4), 227–237
- Papapetropoulos A, Piccardoni P, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R, Cicala C, Altieri DC.** Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa–nitric oxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, 95(8), 4738-4742
- Pasa S, Toz SO, Voyvoda H, Ozbel Y.** Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology* 2005, 128(3), 243-249
- Pelagalli A, Ciaramella P, Lombardi P, Pero ME, Cortese L, Corona M, Avallone L.** Evaluation of adenosine 5'-diphosphate (ADP)-and collagen-induced platelet aggregation in canine leishmaniasis. *Journal of comparative pathology* 2004, 130(2), 124-129
- Persechino A, Oliva G.** Autoimmunity associated with leishmaniasis in dogs. *Acta Medica Veterinaria* 1986, 32, 117–124

- 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
- Peters W, Elbihari S, Evans DA.** Leishmania infecting man and wild animals in Saudi Arabia. *Leishmania arabica* sp. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986, 80, 497–502
- Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F.** Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 1997, 71, 263-271
- 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, 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
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF.** Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis: a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology* 2005, 132(2–3), 145–152
- Rao LV, Zivelin A, Iturbe I, Rapaport SI.** Antibody-induced acute factor X deficiency: clinical manifestations and properties of the antibody. *Thrombosis and Haemostasis* 1994, 72(3), 363-371
- Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F.** A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Tropica* 1995, 59 (3), 187–196
- Rhalem A, Sahibi H, Idrissi Guessous-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
- Rioux J.A, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J.** Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 1990, 65 (3), 111–125

Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Turner DP, Bailly M, Young CJ. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la. La leishmaniose viscérale canine: succès de la transmission expérimentale chien-phlébotome chien par la pique de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir 1921. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 1979, 54, 401–407

Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Seminars in Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2006, 32, 32-38

Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Todoli F, Alberola J. Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2013, 191(3-4), 363–366

Rosser EJ. Use of the D-dimer assay for diagnosing thrombosis in cases of canine cutaneous vasculitis. *Veterinary Dermatology* 2009, 20(5-6), 586-590

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

Røttingen JA, Enden T, Camerer E, Iversen JG, Prydz H. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 4650-4660

Ruf W, Mueller BM. Tissue factor signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 1999, 82, 175-182

Ruiz De Gopegui Y, Espada M, Vilafranca C, Cuadradas E, Fontcuberta F, Milla J, Ruzafa RA. Paraprotein-induced defective haemostasis in a dog with IgA (kappa-light chain) forming myeloma *Veterinary Clinic at Pathology*, 1994, 70–71

Sadosty AT, Goyal DG, Boie ET, Chiu CK. Emergency department D-dimer testing. *The Journal of Emergency Medicine* 2001, 21, 423-429

Saridomichelakis M.N. Koutinas A.F. The cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (*L. chagasi*). *Veterinary Dermatology* 2014, 25, 61-22

Seaman J, Mercer AJ, Sondorp HE, Herwaldt BL. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. *Annals of Internal Medicine* 1996, 124, 664–72

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

Shaw SE, Langton DA, Hillman TJ. Canine leishmaniosis in the United Kingdom. A zoonotic disease waiting for a vector? *Veterinary Parasitology* 2009.

- Silva BC, Rachid MA, Vieira FG, Figueiredo MM, Valle GR, Tafuri WL, Toledo-Junior JC, Ribeiro VM.** Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania chagasi* infected dog. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 2009, 2(2), 107-109
- Simmonds RE, Lane DA.** Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains. *Blood* 1999, 94, 632-641
- 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, 450-458
- Slappendel RJ.** Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 1988, 10(1), 16
- Smith AS.** Overview of hemostasis. In Weiss DJ, Wardrop KJ. (Eds), *Schalm's Veterinary Hematology*. 6.edition, Iowa, Blackwell Publishing, 2010, 635-653.
- Solak ZA, Telli CG, Kabaroğlu C, Doğan B, Bayındır Ü, Erdener D.** Pulmoner Emboli Tanısında D-dimer Testinin Yeri. *Solunum Hastalıkları* 2003, 14, 11-16
- 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 leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 2009, 165, 1-18
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L.** The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology* 2000, 90, 37-45
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasites & Vectors* 2011, 4, 86
- Solano-Gallego L, 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, Roura X, Baneth G.** Leishmaniasis. In: Day MJ (edt), *Arthropod-borne Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 2nd ed. CRC Press, Broken Sound Parkway New York, 2016, s 125-140
- Spreng D.** Leishmanial polyarthritis in two dogs. *Journal of Small Animal Practice* 1993, 34, 559-563

- Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Mitchell SE.** Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nature medicine* 2000, 6(2), 151-158
- Stockham SL, Scott MA.** Hemostasis. In *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2.edition. Ames, Blackwell, 2008, 223–257.
- Stokol T, Brooks MB, Erb HN, Mauldin GE.** D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Veterinary Research* 2000, 61(4), 393-8
- Sumney M, Whiteman K.** D-dimer: Past, present, and future. CE Connection available at: <http://www.nursingcenter.com>. Accessed: 10 October 2010.
- Swenson CL, Silverman J, Stromberg PC, Johnson SE, Wilkie DA, Eaton KA, Kociba GJ.** Visceral leishmaniasis in an English foxhound from an Ohio research colony. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1988, 193, 1089-1092
- 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. *The Journal of Small Animal Practice* 2008, 49(7), 325-328
- Tafuri WL, Rosa de Oliveira M, Melo MN, Tafuri WL.** Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2001, 96, 203-212
- Takken W, Knols BGJ.** Emerging pests and vector-borne diseases in Europe. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands 2007, 500
- Taylor FB, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M.** Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis And Haemostasis-Stuttgart* 2001, 86(5), 1327-1330
- Terrazzano G, Cortese L, Piantodosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, Ruggiero G, Ciaramella P.** Presence of antiplatelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, 110, 331-337
- Tokgözoğlu L.** Ateroskleroz Patogenezi. *Hiperlipidemi ve Ateroskleroz Dergisi* 2002, 22-27
- 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

- Torres MDM, Almeida ADBPF, Paula DAJD, Mendonça A J, Nakazato L, Pescador CA, Sousa VRF.** Hemostatic assessment of dogs associated with hepatic parasite load of *Leishmania infantum* chagasi. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 2016, 25(2), 244-247
- Tripodi A.** D-dimer testing in laboratory practice. *Clinical Chemistry* 2011, 57(9), 1256-62
- Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA.** Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1977, 41, 1-12
- Turgay N, Bayram Delibaş S, Dirim Erdoğan D, Özbel Y.** Şanlıurfa’da antroponotik kutanöz leishmaniasis hastalarının hücresel immun cevabı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2006, 30 (1), 7-10
- Turgut K.** Veteriner Klinik Laboratuar Teşhis. Konya, Bahçivanlar Basım Sanayi, 2000, 124-165.
- Tüzer E, Toparlak M.** Veteriner Protozooloji. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 1999, 105, 15-16
- Valladares JE, Riera C, Pastor J, Gállego M, Portús M, Arboix M.** Hepatobiliar and renal failure in a dog experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Record* 1997, 141, 574-575
- Valladares JE, Ruiz De Gopegui R, Riera C, Alberola J, Gállego M, Espada Y, Portús M, Arboix M.** Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Research in Veterinary Science* 1998, 64, 195–198
- 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
- Vergnolle N.** Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *The Journal of Immunology* 1999, 163, 5064-5069
- Vianna VL, Takiya CM, de Brito-Gitirana L.** Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. *Parasitology Research* 2002, 88, 829–836
- Vidor E, Dereure J, Pratlong F, Dubreui N, Bissuel G, Moreau Y, Rioux J.** Le chancre d’inoculation dans la leishmaniose canine à *Leishmania infantum*. Étude dune cohorte en région cévenole. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* 1991, 26, 133–137

- Vinuelas J, Garcia-Alonso M, Ferrando L, Navarrete I, Molano I, Miron C, Carcelen J, Alonso C, Nieto CG.** Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology* 2001, 101, 23–27
- 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
- Wagenaar JF, Goris MG, Sakundarno MS, Gasem MH, Mairuhu ATA, De Kruif MD, Van Gorp ECM.** What role do coagulation disorders play in the pathogenesis of leptospirosis? *Tropical Medicine & International Health* 2007, 12(1), 111-122
- Wakai A, Gleeson A, Winter D.** Role of fibrin D-dimer testing in emergency medicine. *Emergency Medicine Journal* 2003, 20, 319-325
- Web_1.** (2015). http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/ (01.11.2015)
- Werneck GL, Batista MS, Gomes JR, Costa DL, Costa CH.** Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Infection.* 2003, 31(3), 174-7
- Wiman B, Collen D.** Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature.* 1978, 272, 549-550
- Wolberg AS.** Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews* 2007, 21, 131-142
- World Health Organization (WHO).** Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March. WHO Technical Report Series Geneva 2010, 949, 186
- Wylie CE, Carbonell-Antonanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC, Solano-Gallego L.** A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis. Part I: vaccinations. *Preventive Veterinary Medicine* 2014, 117 (1), 7-18
- Yaşarol Ş.** Leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını* 1981, 2
- Yavru AH.** Pıhtılaşma sistemi ve monitörizasyonu. *Türk yoğun bakım derneği dergisi* 2006, (4) 2
- Yılmaz, K.** Paraziter Deri Hastalıkları. *Kedi ve Köpek Hastalıkları*, Ankara, Medisan Yayınevi, 1998, 265-266
- Young DG, Perkins PV.** Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae) (*Lutzomyia*). *Mosque News* 1984, 44 (2), 263–304

Zabala EE, Ramírez OJ, Bermúdez V. Leishmaniasis visceral em um canino. Facultad de Ciencias Veterinarias 2005, 46, 43-50

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

Zuckerman A, Lainson R. Leishmania. In: Kreier JP(edt), Parasitic Protozoa. San Francisco Academic Press, New York, 1977, 57-133



EKLER



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 14 Ağustos 2015

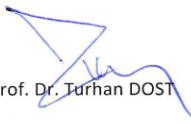
Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2015 Yılı VIII. Oturumu
Sayı : 64583101/2015/086
Proje Başlığı : Canine Visceral Leishmaniasis'in farklı evrelerinde konvensiyonel rutin koagülasyon profili ile D-dimer konsantrasyonunun değerlendirilmesi
Proje Yürütücüsü : Kerem URAL
Proje Ekibi : Serkan ÖZKAN


Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:


İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

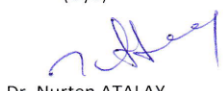
Hayvan Çalışması : İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.


Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.



Prof. Dr. Turhan DOST
(Başkan)
İzinli

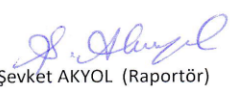

Prof. Dr. İbrahim CEMAL
(Üye)
İzinli
Vet. Hek. Ufuk SAYIN
(Üye)


Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL
(Üye)


Dr. Nurten ATALAY
(Üye)


Doç. Dr. Yücel KOCA
(Üye)


Vet. Hek. Serdar AKTAŞ
(Üye)


Şevket AKYOL (Raportör)

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÖZKAN, Serkan
Uyruk : TC
Doğum yeri ve tarihi : İZMİR/1985
Telefon : 0535 5152126
E-mail : serkan902@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları ABD (Veteriner)	
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2014

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
-----	-----------	-------

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

2. PROJELER

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler