

Köpek Viseral Leishmaniozis'inde Böbrek Lezyonlarının Patogenezisinde IgG ve Komplement-3 Birikimlerinin Rolü

Fazilet Canset Özden, Nihat Toplu

Aydın Adnan Menders Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Işıkli, Aydın, Türkiye

Öz bilgi/Amaç: Kanin Viseral Leishmaniozis (KVL) zoonoz karakterde protozoal bir enfeksiyon olup, evcil ve yabani karnivorlarda lenfadenitis, osteomyelitis, hepatitis, dermatitis ve nefritis ile seyretmektedir.

Materyal ve Metot: Bu çalışma ile KVL'de böbrek hasarının olası immunpatolojik mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Araştırmada, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2002-2015 yılları arasında rutin incelemeye girmiş ve histopatolojik/immunohistokimyasal olarak KVL tanısı konulmuş köpek olgularının böbrekleri incelenmiştir. Bu amaçla, olguların böbrek dokusundaki histopatolojik lezyonlar tanımlanarak enfekte köpeklerin böbrek dokularında Leishmania amastigot antijeni, IgG ve komplement-3 (C3) birikimleri immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Böbrek glomerulus bazal membranlarında ve tubulus bazal membranlarında IgG ve C3 birikimlerini gösteren immun pozitif reaksiyonlar saptandı. Sonuç olarak, bu çalışma ile KVL'li böbreklerde IgG ve C3 birikimleri çok sayıda olguda görülmekle birlikte, bazı olgularda zayıf olarak kaydedilmiştir. Bu veriler böbrek lezyonların patogenezisinde IgG ve C3 birikimleri yanında farklı immunpatolojik mekanizmaların da rol oynayabileceği düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Leishmaniozis, Ig G, Komplement 3, histokimya, immunohistokimya.*

The Role of the Deposits of IgG and Complement-3 in the Pathogenesis of Kidney Lesions In Canine Visceral Leishmaniosis

Background/Aim: Canine Visceral Leishmaniosis (KVL) is a protozoal infection with zoonotic character which processes with lymphadenitis, osteomyelitis, hepatitis, dermatitis and nephritis in domestic and wild carnivores. This study aimed to illuminate the possible immunopathologic mechanisms of renal damage in KVL.

Materials and Methods: In this study, the kidneys of dogs cases diagnosed as KVL histopathologically / immunohistochemically were examined at Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology between 2002 and 2015. For this purpose, Leishmania amastigot antigen, IgG and Complement-3 (C3) deposits were specified immunohistochemically in the kidney tissues of infected dogs by determining histopathological lesions in kidney tissue of the cases.

Conclusion: Immunohistochemically, amastigote positive reactions were obtained in lymphocyte and kidney interstitium in macrophage cytoplasm. In addition to this, IgG positive reactions deposited in the kidney glomerulus basal membranes revealed C3 positive reactions deposited in the kidney glomerulus basal membranes and tubulus basal membranes. As a result, this study revealed that IgG and C3 immunohistochemical expressions are intense and severe compared to control group of animals in the form of immunocomplex deposits of infected dogs in kidney tissue, suggesting that KVL is mediated by immunocomplexes of the pathogenesis of renal lesions.

Key Words: *Leishmaniosis, IgG, Complement 3, histochemistry, immunohistochemistry.*

Coorespondence to: Nihat Toplu, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Aydın Adnan Menderes University, Işıkli, Efeler-Aydın, Türkiye.

Giriş

Leishmaniozis, *Leishmania* cinsi parazitler tarafından meydana gelen ve eroziv-ülseratif karakterde dermatit, lenfadenopati, anemi, hepatosplenomegali ve epistaksis bulgularını içinde barındıran zoonotik ve antropotik ölümcül bir hastalıktır (Pumarola ve ark, 1991; Salman ve ark, 1999; Rallis ve ark, 2005).

Hastalıkta etkilenme yüzdelerinde en büyük oran köpekler, insanlar, kediler ve rodentlerdir (Pugliese ve ark, 2006). Daha az oranda atların, tilkilerin, kurtların da etkilendiğini bildiren vakalar mevcuttur. Toplu ve ark (2007) bir fokta parapoxvirus enfeksiyonu ile birlikte viseral leishmaniozisi bildirmişlerdir.

Hücre içi bir parazit olup kamçıli bir yapıya sahip olan *Leishmania* paraziti insana kan emici *Lutzomyia* ve *Phlebotomus* cinsi sineklerle bulaşmaktadır. Leishmaniozis köpeklerde gösterdiği klinik-patolojik semptomlar insan vakalarına çok benzerlik gösterir (Ciaramella ve ark, 1997). *Leishmania* retikuloendotelial sistem dediğimiz karaciğer, dalak, kemik iliği ve lenf nodlarına yerleşir ve çoğalır (Rioux ve ark, 1990; Barrouin-Melo ve ark, 2006). Leishmanianın toplam 2 formu vardır. Son konak yani insan, köpek gibi canlılarda görülen amastigot formu ve biyolojik vektörü olan *Lutzomyia* veya *Phlebotomus* cinsi sineklerde olan promastigot formudur (Özderem, 1992; Özbel ve ark, 2000). Deriye inoküle olan parazit retikuloendotelial sistemdeki histiositlere amastigot formda girer. Hücre içinde bulunan amastigotlar konak hücrenin ölümüyle yayılımına devam eder (Reis ve ark, 2006b).

Leishmania cinsine bağlı patojenler Eski Dünya (Asya, Afrika, Avrupa) ve Yeni Dünya (Kuzey, Güney, Orta Amerika) gibi coğrafik dağılımlara göre 2 önemli cinse ayrılmaktadır (Tablo 1). Eski Dünya ve Yeni Dünya'da viseral leishmaniozisin ve kutanöz leishmaniozise neden olan parazit alt tipi değişmektedir. (Eski Dünyada'da *L.infantum* ve *L. donovani*- Yeni Dünya'da *L. chagasi* viseral leishmaniozisin en sık etkenidir. Kutanöz Leishmanianın Eski Dünya'da *L. Tropica*, Yeni Dünya'da ise *L. braziliensis* ve *L. Mexicana* en sık kaydedilen serovarlarıdır.

Amastigot ve promastigot formlar arasında bazı farklar bulunmaktadır. Giemsa boyamada amastigot form 2-4 mm büyüklüğünde yuvarlak bir şekildedir. Sitoplazma soluk mavi renkteyken çekirdek ve granüllere koyu kırmızı renk hakimdir. Amastigot formu kamçısı olmadığından dolayı hareketsizdir. Promastigot formu ise amastigot formuna göre daha büyük olup yaklaşık 14-28mm boyunda 2-4mm enindedir. Promastigot formun silindir veya iğ gibi şekillerde hareketli tek kamçısı bulunur. Amastigot ve promastigot arasında farklılıklar bulunmasına rağmen doku örneklerinde morfolojik özelliklerine göre ayırt edilemez. Doku örneklerinde birbirlerinden ayrımlarını sağlamak için izoenzimler, antijenler ve nükleik asit bileşimleri gibi spesifik belirteçlere bakmak gerekmektedir (Shaw, 1994; Solano-Gallego ve ark,2004).

Doğal koşullarda, kan emici sinekler az sayıda (100–1000 adet) promastigot taşırlar ve bu miktar da duyarlı konakçıda hastalık oluşturmak için yeterlidir (Deplazes ve ark, 1995). Parazitlerin çoğu, komplement faktörleri tarafından yok edilirler, fakat bazıları değişik yollar kullanarak canlılığını sürdürürler (Killick-Kendrick ve ark, 1994). Canlı kalan promastigotlar hızlı bir biçimde monosit/makrofaj hücrelerine bağlanırlar. Canlı kalan promastigotlar hızlı bir biçimde monosit/makrofaj hücrelerine bağlanırlar (Campino ve ark, 2000). Komplement sistem bileşenlerini etkenlerin plazma membranına bağlayan en önemli bağlanma reseptörleri Tip I (CR 1, CD 35) ve Tip III (CR 3 , CD 11b / CD 18) olarak bilinen komplement sistem reseptörleridir (Fondevila ve ark, 1997; Fernandez-Perez ve ark, 2003). Bu bağlanmayı taki-

ben makrofajların fagositozu yoluyla parazitlerin sitoplazmaya alınması izler. Fagolizozomlar içerisinde pH'nın ani bir şekilde 5'e düşmesiyle birlikte promastigotlar hareketsiz amastigot formlarına dönüşürler. Buna ilaveten, etkene ait yüzey antijeni olan Gp 63 (promastigot yüzey proteazı)'ün proteolitik aktivitesi fagolizozom içerisindeki amastigotların canlılıklarını devam etmesini sağlar (Campino ve ark., 2000). Parazitlerin, deri içine inokulasyonu lokal bir yangısal yanıtı neden olur (Chang ve ark, 2003). Başlangıçta, reaksiyonda hakim hücreler nötrofil ve eozinofil lökositlerdir. Bunu takiben bu alana doğru yoğun makrofaj infiltrasyonu görülür. Ayrıca, bu dönemlerde doğal katil hücreler (Natural Killer,NK) de dikkati çeker. Hastalık ilerledikçe lenfositler de reaksiyona katılırlar ve yangı granülatöz bir hal alır (Gonzalez ve ark, 1988; Tafuri ve ark, 2001; Lima ve ark, 2004).

Hastalığın kritik safhası deriden yayılımdır. Dirençsiz olgularda, etkenler birkaç saat içerisinde hızla lenf yumrularına, dalağa ve kemik iliğine ulaşırlar (Fondevila ve ark, 1997). Dirençli olgularda ise, deride sınırlı kalırlar ya da lezyona yakın lenf yumrularına taşınırlar (Murray ve ark, 1997). Hastalığın savunma mekanizmasında asıl rol oynayan NK hücreleridir ve bu hücreler Interleukin-12 ve parazit antijenleriyle uyarılmalarının hemen ardından IFN- γ (interferon- γ) salgırlar. IFN- γ da, makrofajlarda nitrik oksit sentataz'ın potansiyel uyarıcısıdır (Murray, 1997; Killick –Kendrick, 2002).

Konakçı tarafından *Leishmania* etkenlerine karşı koruyucu immün yanıtın şekillenmesi karmaşık bir süreci gerektirir. Bu süreç zarfında, antijen sunan hücreler uygun antijenleri sunarlar, CD4 + Th 1 lenfosit sayısı artar ve parazitlerin etkin bir şekilde yok edilmesi için makrofajlar aktive edilirler. Makrofajlar, dendritik hücreler ve Langerhans hücreleri Leishmaniozis'de antijen sunan belli başlı hücrelerdir (Killick –Kendrick ve ark, 2002; Fernandez-Perez ve ark,2003).

Organizma antijenle ilk karşılaştıklarında salınan sitokinler aracılığı ile immün yanıtta T hücre tipi (Th 1 veya Th 2) tanımlanır. Bu yönden bakıldığında *leishmania* etkenlerine duyarlılıkta en önemli sitokin IL-4'dür (Chang ve ark, 2003; Fernandez-Perez ve ark, 2003). Leishmaniozis'e duyarlılıkta en önemli gösterge, IL-4 üretiminin erken dönemde yükselmesi ve daha sonraları IL-12'nin uyarılmasıdır. IL-12 bir reseptör kompleksine (IL-12 RB1 ve IL-12 RB2) bağlanır ve IL-4 , IL-12 reseptör salınımını düzenler (Reed ve Scott, 1993).

Leishmania enfeksiyonunda duyarlılığı ya da direncin gelişmesindeki en belirleyici unsur, enfeksiyonu izleyen 48 saatten kısa bir süre sonra CD4 T hücrelerinin IL-12'ye karşı duyarlı kalıp kalmaması olarak değerlendirilir (Deplazes ve ark, 1995). Ayrıca, IL-12 reseptörlerinin salgılanmasının sürekliliği de diğer önemli faktördür. IL-12, NK aktivitesini ve IFN- γ aktivasyonunun uyarılmasını kontrol ederek, hastalığın seyrinde çok önemli bir göreve sahip olduğu vurgulanmaktadır (Murray, 1997).

Duyarlı köpeklerde, klinik bulgular ile lezyonların ortaya çıkması enfeksiyonu izleyen 3 ay ile 7 yıl arasında değiştiği gözlemlenmektedir. Lenfoid organlarda T-lenfosit bölgelerinin tükendiği, B hücre bölgelerinin de proliferasyonu saptanmıştır. Aynı zamanda, generalize lenfadenomegali ve bazen hepatosplenomegaliyle sonlanan histiyosit ve makrofaj proliferasyonu da dikkati çekmektedir. Buna ilaveten, hastalığın klinik bulguları dolaşımdaki az sayıda CD4+ T lenfositlerle de bağlantılı olduğu belirtilmektedir (Killick-Kendrick, 2002; Chang ve ark, 2003).

Zayıflamış T-hücre regülasyonu ile birlikte aşırı derecede yükselen B-hücre aktivitesi çok miktarda CIC (sirküle immün

kompleks) oluşumuna yol açar. CİC'in kan damar duvarlarında birikimi vaskülit, poliartritis, üveitis ve glomerulonefrit'e neden olabilir. Ayrıca, eritrositlere, trombositlere ve nükleer proteinlere karşı otoantikör üretimin olduğu da bildirilmiştir (Ferrer ve ark, 1991; Lopez ve ark, 1998; Gonçaves ve ark, 2003).

KVL'li olgularda böbreklerde; fokal nonpurulent interstisyel nefritisten kronik nefritise kadar giden lezyonlar ile karşılaşılır (Duarte ve ark, 1983; Dutra ve ark, 1985; Killick-Kendrick ve ark, 1994). Ayrıca, hiperproteinemi ve antijen-antikör reaksiyonlarına (immunopatolojik mekanizmalar) bağlı, başlangıçta membranöz ya da membranoproliferatif, daha sonraları ise kronik glomerulonefritise giden lezyonlar şekillenebilmektedir (Nieto ve ark, 1992; Poli ve ark, 1991; Lopez ve ark, 1998). Kronik olgularda, sekonder glomerüler amyloidosis de gelişebilmektedir (Valliere ve ark, 2009; Daher ve ark, 2013).

Leishmania'da gözlenen böbrek lezyonları fokal segmental glomerüloskleroz, diffüz mezengial proliferatif glomerüloskleroz, diffüz membranoproliferatif glomerulonefrit, kresentik glomerulonefrit ve kronik glomerulonefrit (Poli ve ark, 1991; Van Alderwegen ve ark, 1997) olarak tanımlanmıştır.

Yukarıda tanımlandığı üzere Leishmania böbrek üzerinde çok değişik patolojik bulgular ve mikroskopik görüntülere sebep olabilmektedir. Leishmania, böbrek üzerine etkisini kendi antijenleri ile gösterdiği gibi TNF-alfa ve sitokinler, CD4 ve CD8 T hücreleri, ICAM-1 adı verilen adezyon molekülleri aracılığıyla da göstermektedir (Van Alderwegen ve ark, 1997; Costa ve ark, 2010).

Van Alderwegen ve ark (1997) yaptıkları çalışmada; KVL'li 6 köpekten 1'inde hiçbir böbrek lezyonu görülmez iken 5 tanesinde glomerüler, interstisyel ve tübüler değişiklikler gözlenmiştir. Böbrekte lezyonlar fokal segmental glomerüloskleroz, diffüz membranoproliferatif glomerulonefrit, diffüz mezengial proliferatif glomerulonefrit ve kresentik glomerulonefrit olarak tanımlanmıştır. Glomerüllerdeki ve interstisyumdaki yangısal infiltratta CD4 yardımcı T lenfosit ve CD8 sitotoksik T lenfositlerin varlığı belirlenmiştir. CD8 T hücreleri sadece bir hayvanın hem glomerül hem de interstisyel aralığında görülmüştür. CD4 T hücreleri çeşitli glomerulonefritis olgularında görülebilirken, CD8 T hücreleri sadece kresentik glomerulonefritiste saptanmıştır. CD4 T hücrelerinin CD8 T hücrelerine göre böbrek hasarında daha fazla rol aldığı görülmektedir. CD4 T hücreleri böbrek hasarına gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonları, sitolitik reaksiyonlar, major doku uyumu kompleks moleküllerinin anormal artışı veya B hücrelerinin aktivasyonu ile ilişkili immunopatolojik mekanizmaları yönettiği düşünülmektedir (Van Alderwegen ve ark, 1997; Costa ve ark., 2000; Costa ve ark., 2003).

Francisco Al Costa ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, KVL'li 26 köpeğin böbreklerinde immünglobulin ve kompleman C3 birikimlerini immunohistokimyasal olarak göstermişler ve enfekte olmayan köpekler ile kıyaslamasını göstermişlerdir. İmmünglobulin (IgG, IgM, IgA) ve C3b depositlerinin glomerüler kapiller duvarda gösterilmiş, ancak istatistik olarak enfekte olmayan köpekler ile anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali, 2000-2010 yılları arasında Aydın, Muğla ve İzmir illerinden ölüm nedeninin araştırılması için patoloji anabilim dalına getirilen toplam 13 köpekten (7 erkek, 6 dişi) oluşturuldu. Hayvanlardan 3'ü saf ırk iken, 10'u melez idi. Köpeklerin yaşları 2 ile 10 yaş arasında değişmekteydi. Anamnez bilgilerinde, sahipli köpeklerden 1'inde KVL'ye karşı bir tedavi öyküsü kaydedildi.

Sistemik nekropsi uygulamasını takiben, doku örnekleri %10 tamponlu formalin solusyonunda tesbit edildi ve bilinen yöntemlere göre takip edilerek parafinde bloklandı. Alınan seri kesitler (5 mm) hematoksilin-eozin (HE) ve immunohistokimyasal boyamalarda kullanıldı.

2.1 İmmünohistokimyasal İnceleme

Leishmania Amastigot Antijeni;

Leishmania parazit antijeninin tesbiti için, doku kesitlerine polymer tabanlı immunoperoksidaz (Thermo) kit uygulandı. Poly-L-lysine kaplı lamlara alınan kesitler (5 mm) ksilol serilerinde parafini giderildikten sonra, alkol serilerinde rehidre edildi. İmmunperoksidaz boyama için; dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla kesitler %70 methanoldeki %3'lük H₂O₂'te 30 dakika tutuldu. Dokular %0,1'lik proteaz K solusyonunda 37 °C'de 10 dakika inkube edildikten sonra phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.3) solusyonunda yıkandı. Nonspesifik boyanmaları gidermek amacıyla kesitler %2'lik normal keçi serumu ile 5 dakika inkube edildikten sonra 1/1000 sulandırmadaki fare anti-leishmania epitope monoklonal antikoru (Cedarlane Laboratories, Burlington, ON, Canada) ile 4 °C bir gece inkube edildi. PBS'de 10 dakika yıkanan dokular, primer antikör promotör ile 5 dakika inkube edildikten sonra, işaretli anti-fare IgG polymer horseredish peroksidaz ile oda ısısında 10 dak. inkube edildi. Tekrar yıkamadan sonra, kesitler diaminobenzidine (DAB) kromojenik substrat ile reaksiyon sonlandırıldı. Mayer hematoksilen ile çekirdek boyaması gerçekleştirildikten sonra, dokular alkol serilerinde dehidre edildi ve lamelle kapatıldı. Kontrol amaçlı, seri kesitler primer antikörün yerine normal fare antikoru kullanılarak aynı basamaklar izlendi.

C3 ekspresyonu için de yukarıda belirtilen polymer tabanlı immunperoksidaz testindeki aynı basamaklar uygulandı. Primer antikör olarak fare anti C3 poliklonal antikoru (1/250 sulandırma) kullanıldı. Kontrol amaçlı böbrek lezyonu içermeyen 3 köpek böbrek kesitine aynı basamaklar uygulandı.

IgG ekspresyonu için, biotin ile işaretli tavşan anti-dog IgG primer antikoru kullanıldı. Polymer tabanlı kit uygulamasında primer antikora kadar olan süreçteki basamaklar aynen tekrarlandı. Biotin ile işaretli tavşan anti-dog IgG antikoru bir gece inkube edildikten sonra PBS ile dokular yıkandı. Streptavidin peroksidaz konjugatı ile 15 dak. inkube edildikten sonra Leishmania amastigot antijeni belirlenmesinde kullanılan metottaki basamaklar, IgG için de aynen uygulandı. Primer antikör basamağında rabbit anti IgG antikoru kullanıldı. Tekrar yıkamadan sonra, kesitler diaminobenzidine (DAB) kromojenik substrat ile reaksiyon sonlandırıldı. Mayer hematoksilen ile çekirdek boyaması gerçekleştirildikten sonra, dokular alkol serilerinde dehidre edildi ve lamelle kapatıldı. Kontrol amaçlı olarak KVL negatif ve lezyon içermeyen 3 köpek böbrek kesitine aynı basamaklar uygulandı.

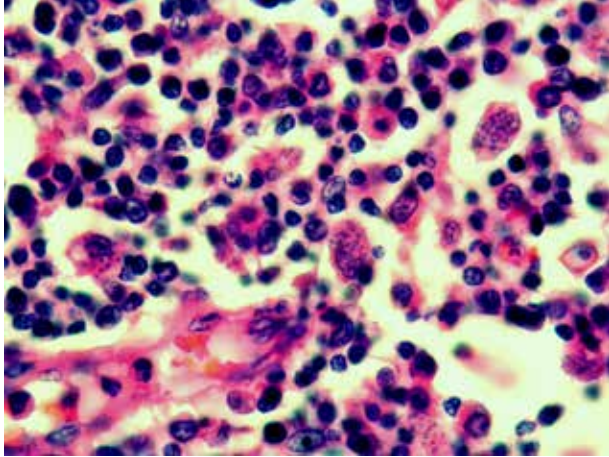
Bulgular

Histopatolojik Bulgular

Preskapular lenf yumrularında kapsülada lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları; kortikal ve medullar lenfoid folliküler hiperplazi; plazma ve makrofaj proliferasyonları ile karakterize kronik lezyonlar tanımlandı. Diğer taraftan histopatolojik olarak KVL'nin tanısında oldukça karakteristik bir bulgu olan makrofaj sitoplazmalarında amastigot formasyonları bütün olgularda görülmekle birlikte (Şekil 1) bazı vakalarda makrofajlardaki hemosiderin pigmentleri amastigot morfolojilerini gölgelediği dikkati çekti.

Böbreklerdeki doku hasarı ve yangısal yanıtlar glomeruluslar

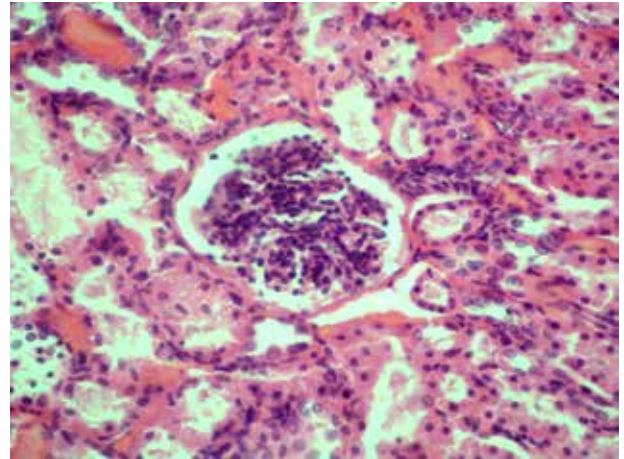
ve interstisyumda şekillendiği gözlemlendi. Glomeruluslardaki lezyonlar endotel, mezangial ve glomerüler bazal membran kalınlaşmaları ile karakterize membranoproliferatif yangısal yanıtın oluşmaktaydı. Bu lezyonlara bazı olgularda glomerüller atrofi ve glomerüloskleroz da dahil olmuştu. Yangısal yanıtın kronikleştiği olgularda interstisyel fibrozis de glomerüler lezyonlara eşlik etmişti. Genel olarak interstisyumdaki yangısal yanıt fokal/multifokal lenfosit ve plazma hücreleri ve makrofajlardan oluşmuştu.



Şekil 1. Lenf yumrusunda makrofajların sitoplazmalarında *Leishmania sp.* amastigotları.40X.H.E.

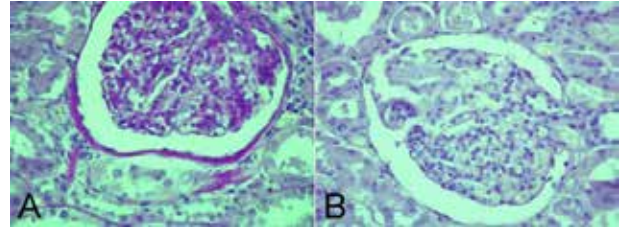
Figure 1. The amastigotes of *Leishmania sp.* within macrophages of the lymph node.40X.H.E.

On üç olgunun glomeruluslarında endotel ve mezangial hücre proliferasyonları (Resim 2) en göze çarpan bulgulardandı (Tablo 1). Bu lezyonlar 5 olguda (olgu no:2, 3, 4, 11, 12) şiddetli, 2 olguda (olgu no:7, 13) orta ve 4 olguda (olgu no:5, 6, 8, 10) hafif şiddette tanımlandı. PAS boyamalarda en çok göze çarpan bulgulardan diğeri de glomerulus bazal membran kalınlaşması (Resim 3); 7 olguda (olgu no:1, 2, 3, 4, 11, 12, 13) şiddetli, 2 olguda (olgu no:6, 10) orta ve 4 olguda (olgu no:5, 7, 8, 9) şiddetli idi. PAS boyamada, Bowman kapsülü kalınlaşması 6 olguda (olgu no:1, 2, 3, 4, 12, 13) şiddetli, bir olguda (olgu no:10) orta ve 5 olguda (olgu no:6, 7, 8, 9, 10) hafif şiddette tanımlandı (Şekil 4) Glomerüler atrofi 3 olguda (olgu no:1, 2, 11) şiddetli, 2 olguda (olgu no:3, 4) orta ve 7 olguda (olgu no:5, 6, 7, 8, 9, 10, 13) hafif şiddette saptandı (Şekil 5). Glomerüloskleroz 4 olguda (olgu no:1, 2, 3, 11) şiddetli, bir olguda (olgu no:4) hafif ve 5 olguda (olgu no:6, 8, 9, 10, 13) hafif şiddette belirlendi. Tubulus bazal membran kalınlaşması PAS boyamada, 3 olguda (olgu no:1, 3, 4) şiddetli, bir olguda (olgu no:2) orta ve 9 olguda (olgu no:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) hafif şiddette saptandı. İnterstisyel dokuda lenfosit infiltrasyonları ve plazma hücre proliferasyonları ile karakterize yangısal yanıt 11 olguda (olgu no:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 13) belirlendi (Şekil 6). Hematoksilin-eozin boyamada *Leishmania spp.*'nin amastigot formu 4 olgunun (olgu no:1, 6, 10, 13) böbrek interstisyumunda infiltrat makrofajların sitoplazmalarında saptandı. İmmunoperoksidaz metotta ise amastigot immunpozitif reaksiyonlar 9 olgunun (olgu no:1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13) böbreklerinde infiltrat makrofajların sitoplazmalarında belirlendi (Resim 7). İntertubuler bölgede fibroblast ve kolajen demet proliferasyonları 3 olguda (olgu no:4, 6, 12) hafif şiddette gözlemlendi.



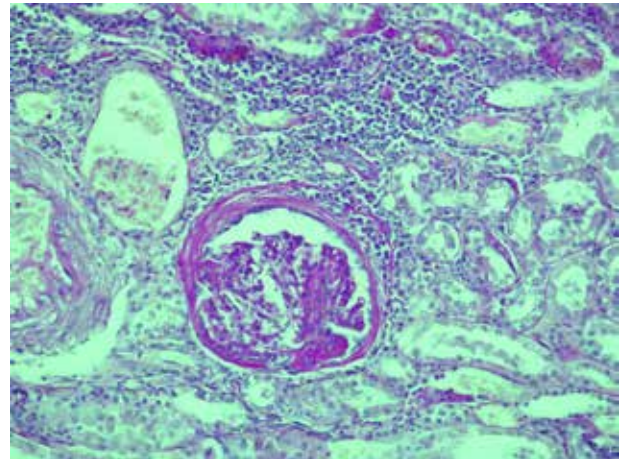
Şekil 2. Böbrek glomerüler kapillarlarında endotel ve mezangial hücre proliferasyonu ile karakterize lezyonlar. 20X.H.E.

Figure 2. The proliferation of Endothelial and mesangial cells in glomerular capillary of the kidney.20X.H.E



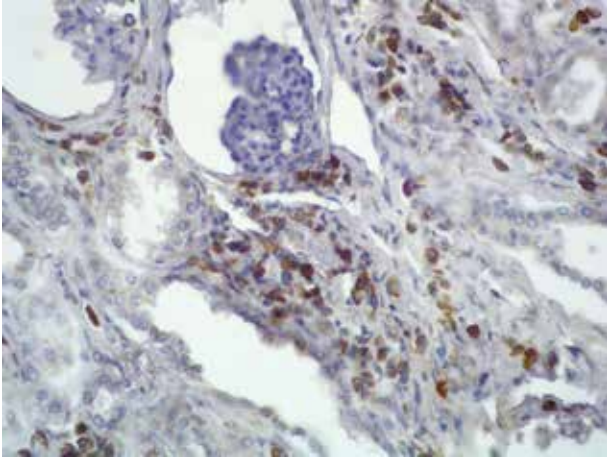
Şekil 3. A. KVL enfekte bir hayvanda Bowman kapsülü ve glomerüler bazal membranlardaki kalınlaşmalar. B. Normal Böbrek kesiti.40X.PAS boyama.

Şekil 3. A. The thickness of Bowman capsule and glomerular capillary in Kidney with canine viscreal leishmaniosis. B. Normal kidney tissue. 40X.PAS staining.



Şekil 4. A. KVL enfekte bir hayvanda Bowman kapsülü ve glomerüler bazal membranlardaki kalınlaşmalar ve buna bitişik interstisyel dokuda mononükleer hücre infiltrasyonları.20X.PAS boyama.

Şekil 4. The thickness of Bowman capsule and glomerular capillary and lymphocyte infiltrations in Kidney with canine viscreal leishmaniosis.20X.PAS staining.



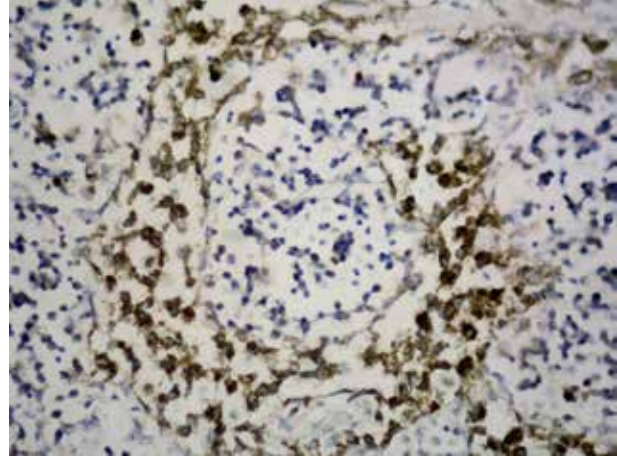
Şekil 5. Böbrek interstisyumunda makrofaj sitoplazmalarında amastigot pozitif immunreaksiyonlar.40X. Streptavidin peroksidaz metot.

Şekil 5. Amastigote immunolabelling in the infiltrated macrophages in the interstitial tissue of the kidney. 40X. Streptavidin peroxidase staining.

İmmunohistokimyasal Bulgular

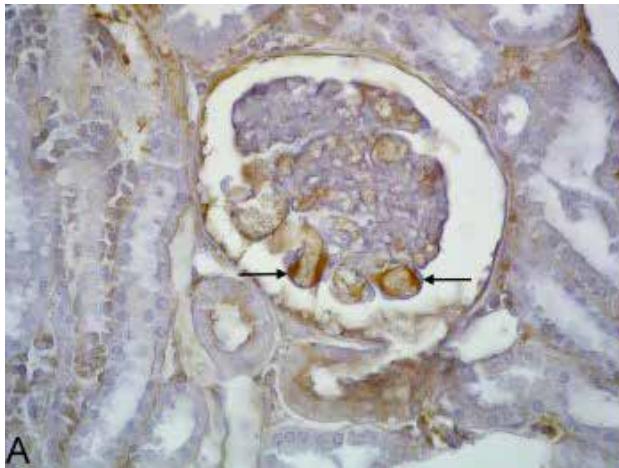
Preskapular lenf yumrularında amastigot immunpozitif reaksi-

kesitlerde immunpozitif reaksiyonlar görülmedi



Şekil 6. Lenf yumrusunda makrofaj sitoplazmalarında amastigot pozitif immunreaksiyonlar. 40X. Streptavidin peroksidaz metot.

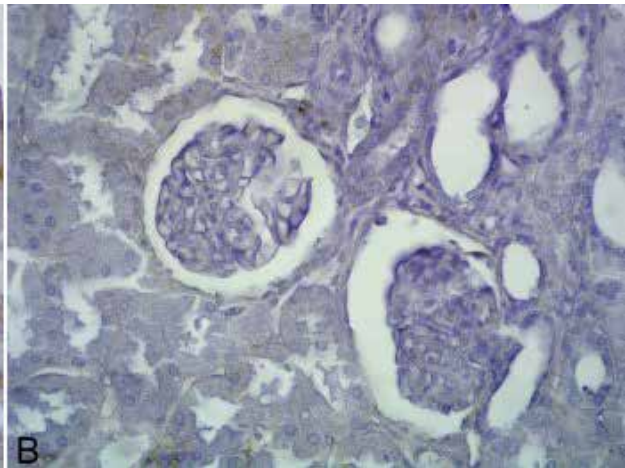
Figure 6. Amastigote immunolabelling in the cytoplasm of macrophages in the lymph node. 40X. Streptavidin peroxidase method.



yonlar kortikal ve medulla bölgedeki makrofaj sitoplazmalarında göze çarptı. Ayrıca amastigot pozitif reaksiyonlar kapsulaya infiltrere olmuş makrofajlarda da belirlendi (Şekil 8).

Glomeruluslarda IgG ve C3 birikimleri mezengial alanlarda ve glomerüler bazal membranlar boyunca belirlendi. Buradaki reaksiyonlar genellikle segmental ya da daha ender olarak da diffuz boyanmalar şeklinde görüldü. Glomeruluslarda IgG birikimi 3 olguda (olgu no:1, 5, 13) ve C3 birikimi de 6 olguda (olgu no:3, 5, 8, 10, 11, 13) gözlenmedi. IgG birikimi 3 olguda (olgu no:2, 4, 8) hafif, 3 olguda (olgu no:3, 9, 12) orta ve 4 olguda (olgu no:6, 7, 10, 11) şiddetli pozitif reaksiyonlar belirlendi (Resim 9). C3 birikimleri 3 olguda (olgu no:1, 9, 12) hafif, 3 olguda (olgu no:2, 4, 6, 7) orta şiddette reaksiyon görülürken, şiddetli pozitif reaksiyon gözlenmedi (Şekil 10).

Tubuluslardaki IgG ve C3 birikimleri tubulus bazal membranları boyunca dikkati çekti. Tubuluslardaki IgG birikimi 1 olguda (olgu no:1) ve C3 birikimi de 2 olguda (olgu no:6, 11) gözlenmedi. IgG birikimi 2 olguda (olgu no:6, 10) hafif, 5 olguda (olgu no:1, 2, 8, 12, 13) orta ve 4 olguda (olgu no:3, 4, 6, 9, 12) şiddetli pozitif reaksiyonlar belirlendi. C3 birikimleri 2 olguda (olgu no:6, 10) hafif, 5 olguda (olgu no:1, 2, 8, 12, 13) orta ve 3 olguda (olgu no:3, 4, 7, 9) şiddetli pozitif reaksiyon görüldü. Kontrol

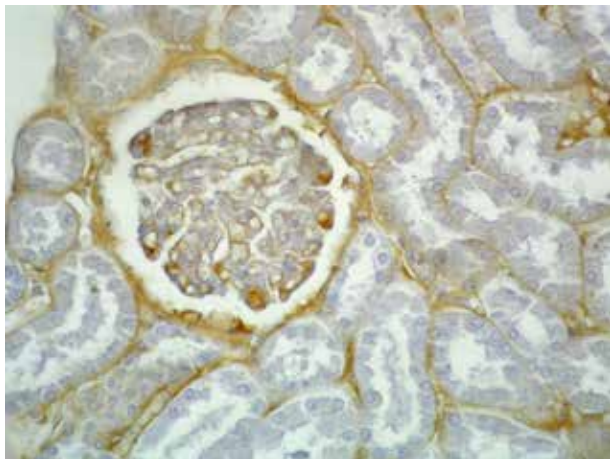


Şekil 7. A. KVL enfekte köpeğin böbrek glomerulus bazal membranlarında birikim göstermiş IgG pozitif reaksiyonlar (oklar). 40X.Streptavidin peroksidaz metot. B. Kontrol hayvanda IgG birikiminin yokluğu.

Figure 7. IgG immunopositive accumulations (arrows) in glomerular basement membrans of the kidney. 40X. Streptavidin peroxidase method. B. No positive reaction in control kidney section.

Tablo 1. Glomerül, Bowman Kapsülü ve Tubuluslerde IgG ve C3 brikimleri.
Table 1. IgG and C3 deposits in the glomeruli and tubulus of the kidneys.

Olgu No	Glomerulus		Bowman Kapsülü		Tubulus
	IgG	C3	IgG	C3	IgG
1	-	+	-	+	-
2	+	++	+	++	+
3	++	-	+++	-	+++
4	+	++	+	++	+++
5	-	-	-	-	+
6	+++	++	+	+	+++
7	+++	++	+++	++	++
8	+	-	+	-	++
9	++	+	++	+	+++
10	+++	-	+	-	++
11	+++	-	+++	-	+
12	++	+	++	+	+++
13	-	-	-	-	+



Şekil 8. A. KVL enfekte köpeğin böbrek glomerulus bazal membranlarında ve tubulus bazal membranlarında birikim göstermiş C3 pozitif reaksiyonlar (oklar). 40X. ABC metot.

Figure 8. IgG immunopositive accumulations (arrows) in the glomerular basement membranes and tubular basement membranes of the kidney. 40X. Streptavidin peroxidase method.

Tartışma

KVL'nin inkubasyon periyodu genellikle uzun bir süre alabilmekle birlikte, etkenin patojenitesi ve cinsi, konakçının yaşı, kondisyonu ve immun sistemin durumuna göre değişkenlik

gösterebilmektedir. Etken ve konakçı hayvan arasındaki bu etkileşimlere bağlı olarak klinik-patolojik bulgularda da farklılıklar tanımlanabilmektedir (Solano-Gallego ve ark, 2004; Reis ve ark, 2006a; Reis ve ark, 2006b). Birçok araştırmacı, doğal KVL olgularında şiddetli kilo kaybı, eksofoliyatif ya da eroziv-ülseratif dermatitis, lenfadenopati, splenomegali, hepatomegali ve kronik nefritis bulgularını tanımlamaktadırlar (Keenan ve ark, 1984; Ferrer, 1988; Tafuri ve ark, 2001; Lima ve ark, 2004; Pugliese ve ark, 2006). Bunun yanında bazı doğal olgularda yukarıda tanımlanan klinik-patolojik bulgulardan farklı olarak hepatosplenomegaliye ilişkin sinirsel bulgular; trombositopeni, trombositopeni, uzun pıhtılaşma süresi ve immun aracılı vaskülitisi içeren hemostatik değişikliklere ilişkin bağırsak ve idrar kesesinde gözlenen erosiv-ülseratif ve kanamalı lezyonlar ya da hemorajik diyatez gibi atipik KVL olguları tanımlanmıştır (Pumarola ve ark, 1991; Font ve ark, 1994; Blavier ve ark, 2001). Böyle atipik olgular, KVL'nin klinik-patolojik tanısını zorlaştırabilmektedir (Lamothe, 1997; Koutinas ve ark, 1999; Blavier ve ark, 2001; Pugliese ve ark, 2006). Sonuçta KVL'nin kesin tanısında parazitler antijeni immunohistokimyasal olarak ortaya koymak, klinik-patolojik ve histopatolojik bulgulara önemli katkılar sağlamaktadır (Toplu ve ark 2007).

Sunulan tez çalışmasında seçilen olgularda KVL tanısının kesinleştirilmesi amacı ile, lenf yumrularının histopatolojik ve immunpatolojik incelemeleri yapılmıştır. Diğer araştırmacıların (Keenan ve ark, 1984; Tafuri ve ark, 2001; Lima ve ark, 2004; Giunchetti ve ark, 2008) bildirdikleri gibi, sunulan çalışma olgu-

Tablo 2. Glomerül, Bowman Kapsülü ve Tubuluslardaki bulguların değerlendirilmesi (H&E ve PAS)
+: Hafif, ++:Orta şiddette, +++:Şiddette

Table 2. Histopathological sores in glomeruli, Bowman's capsula and tubulus of the kidneys.

Olgu No	Endotel, Mezengial Proliferasyon	Bowman Kapsül Genişlemesi	Glomerüler Bazal Membran Kalınlaşması	Glomerulosklerozis	Glomerüler Atrofi	İntersitisyel Yangı	Tubulus Bazal Membran Kalınlaşması	İntersitisyel Fibrozis	Amastigot (H&E)	Amastigot (IHC)
1	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	+	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	+++
3	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	-	-	-
4	+++	+++	+++	++	++	+	+++	+	-	++
5	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
6	+	+	++	+	+	+	+	+	++	+
7	++	+	+	-	+	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
9	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
10	+	+	++	+	+	+	+	-	+	++
11	+++	++	+++	+++	+++	-	+	-	-	-
12	+++	+++	+++	-	-	+	+	+	-	-
13	++	+++	+++	+	+	+	+	-	+	++

larında kapsüladaki lenfosit ve makrofaj infiltrasyonları; kortikal ve medullar lenfoid folliküler hiperplazi; plazma ve makrofaj proliferasyonları ile karakterize kronik lezyonlar tanımlanmıştır. Diğer taraftan histopatolojik olarak KVL'nin tanısında oldukça karakteristik bir bulgu olan makrofaj sitoplazmalarındaki amastigot formasyonları bütün olgularda görülmekle birlikte, bazı vakalarda makrofajlardaki hemosiderin pigmentleri amastigot morfolojilerini gölgelediği görülmüştür. Fare anti-leishmania epitope monoklonal antikor ile yapılan immunohistokimyasal incelemeler çalışmanın bütün olgularında KVL'nin tanısını kesinleştirmiştir.

Sunulan çalışma olgularındaki glomerüler ve interstisyel lezyonlar, daha önce kaydedilen KVL ve HVL (human visceral leishmaniozis) olgularındakilerle benzerlik göstermiştir (Duarte ve ark, 1983; Dutra ve ark, 1985; Poli ve ark,1991; Nieto ve ark, 1992; Lopez ve ark, 1998; Costa ve ark, 2000; Costa ve ark, 2003; Daher ve ark, 2013). Doğal enfekte köpeklerde, membranoproliferatif ve mezangial glomerulonefritis en belirgin bulgular olarak göze çarpar (Benderitter ve ark, 1988; Nieto ve ark, 1992, Costa ve ark, 2003). Benzeri şekilde, HVL'de en sıklıkla gözlenen lezyonlar da mezangial hücre proliferasyonu ve glomerulosklerozdur (Brito ve ark, 1975; Dutra ve ark, 1985). Bu değişiklikler, çalışma olgularında da interstisyel değişikliklerle birlikte en çok göze çarpan lezyonları oluşturmuştur. Glomerüler değişikliklerden endotel ve mezangial hücre proliferasyonu ile karakterize lezyonlar yalnızca iki olguda görülmez iken, olguların 5'inde şiddetli, 2'sinde orta ve 4 olguda da hafif şiddette belirlenmiştir. PAS boyamalarda tanımlanan glomerüler bazal membran kalınlaşması ise genel olarak endotel ve mezangial hücre proliferasyonunun artış gösterdiği olgular ile paralel bir seyir izlediği dikkati çekmiştir. Diğer taraftan ise çalışma olgularındaki interstisyel böbrek lezyonları ise 13 olgudan 11'inde fokal lenfosit ve plazma hücre proliferasyonları ile karakterize iken, yalnızca 3 olguda ise fokal bağ doku proliferasyonları dikkati çekmiştir. Histopatolojik incelemede fokal lenfosit kümeleri aralarında serpilmiş makrofajlarda *Leishmania sp.*'nin amastigot formu yalnızca 4 olguda göze çarpmıştır. Immunohistokimyasal incelemede ise amastigot immun reaksiyonlar 9 olguda (2 olguda şiddetli, 4 olguda orta ve 3 olguda hafif şiddette) pozitif görülürken 4 olguda ise hiç saptanmamıştır. Histopatolojik ve immunpatolojik değerlendirmeler birlikte ele alındığında, gerek daha önceki bildirimlerde ve gerekse sunulan

çalışma olgularında, böbreklerde amastigot lokalizasyonu ve dağılımının düşük düzeyde kaldığı görülmektedir. Bu durum bazı araştırmacılar tarafından böbreklerde gözlenen glomerüler ve interstisyel lezyonların yalnızca *Leishmania spp* parazitinin doku hasarı ilişkili olamayacağı kanısını oluşturmuştur (Dutra ve ark, 1985; Costa ve ark, 2003; Gonçalves ve ark, 2003; Costa ve ark 2010). Konu üzerine bazı araştırmacılar, glomerüllerde toplanan antikorlar/immunkompleksler C5a ve IL-8'i aracılığı ile nötrofilleri glomerüler kapillarlarlara çekmesi ile glomerüler hasarı tetiklemektedir. Nötrofiller salgıladıkları proteazlar aracılığı ile glomerül bazal membran yıkımına, oksijen kaynaklı serbest radikaller ile hücre hasarına ve araşidonik asit metabolitleri ile de glomerüler filtrasyon hızında azalmaya sebep olurlar (Brito ve ark, 1975; Tafuri ve ark, 1989; Poli ve ark, 1991; Nieto ve ark, 1992; Font ve ark, 1994). Benzeri mekanizma, KVL'li olguların akciğer ve bağırsaklarda oluşan histolojik değişikliklerin şiddeti ile parazit yükünün ters orantılı seyri için de düşünülmektedir (Duarte ve ark, 1986). Sonuçta bu hipotezi doğrulamak için yapılan birkaç immunpatolojik çalışma ile KVL olgularında böbrek lezyonlarının patogeneğinde immunkompleks birikimleri gösterilmiş ancak hala açıklığa kavuşturulması gereken noktalar olduğu görülmektedir (Duarte ve Corbett, 1984; Duarte ve ark, 1986; Ferrer ve ark, 1991; Nieto ve ark, 1992; Gonçalves ve ark, 2003; Lopez ve ark, 1998).

Sunulan çalışma olgularında böbrek lezyonların şekillenmesinde olası immunpatolojik mekanizmaların ortaya konması için, IgG ve C3 birikimlerini belirlemek için streptavidin/polimer tabanlı immunoperoksidaz metodundan yararlanılmıştır. Immunohistokimyasal sonuçlar IgG birikimlerinin 10, C3 depozitlerinin de 7 olgunun glomerüler bazal membran ve mezangial bölümlerde segmental ya da diffuz boyanmalar şeklinde olduğunu ortaya koymuştur. Proksimal ve distal tubuluslardaki IgG (12 olgu) ve C3 (11 olgu) birikimleri de tubulus bazal membranlarında bazı vakalarda da tubuluslarda gözlenmiştir. Sonuçta konu üzerine iki çalışmada belirtildiği gibi (Poli ve ark, 1991, Tafuri ve ark, 2004) IgG ve C3 birikimleri KVL'li birçok çalışma olgularında belirlenmiştir ve KVL'nin böbrek lezyonlarının patogeneğinde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir. Ancak, (Costa ve ark, 2010) C3 ve IgG birikimlerini KVL'li olgularda saptamasına karşın, kontrol hayvanlarda da bu birikimleri saptaması nedeni ile böbrek lezyonlarının olası immunpatolojik mekanizmasına şüpheli yaklaşmıştır. Sunulan çalışma olgularında IgG ve C3

ekspresyonlarının kontrol hayvanlara göre yoğun ve şiddetli olarak görülmesi ancak bazı olgularda hafif ya da gözlenmesi; KVL'nin böbrek lezyonlarının patogeneziinde yalnızca immunkompleksler aracılı olamayacağını göstermektedir. Van Alderwegen ve ark, 2009 vurguladığı gibi; Leishmania parazitiinin, böbrek üzerine etkisini kendi antijenik uyarımı ile TNF-alfa ve sitokinler, CD4 ve CD8 T hücreleri, ICAM-1 adı verilen adezyon molekülleri aracılığıyla da gösterdiği düşünülmektedir. KVL'nin patogeneziini tam olarak aydınlatılabilmek için, daha detaylı immunpatolojik ve biyokimyasal mekanizmaların ortaya konması için kontrollü deneysel çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

KVL'de klinik olgularda böbrek fonksiyon testlerinde saptanan üremi, yüksek kreatinin seviyesi, idrar testlerinde saptanan proteinüri gibi parametrelere ve ilerleyen süreçlerde böbrek yetersizliği ile sonuçlanan olgulara sıklıkla rastlanılmaktadır. Diğer taraftan ölen KVL'li olgularda membranoproliferatif glomeruloskleroza kadar giden glomerulonefritis olguları hemen bütün olgularda gözlemlenmektedir. Bu veriler böbrek lezyonlarının KVL'li olgularda önemli klinik semptomlara ve hatta hayvanın ölümüne neden olacak bir duruma yol açabileceği görülebilmektedir. KVL'de böbrek lezyonlarının açıklığı kavuşturulması ve bu mekanizmalar üzerinden böbrek lezyonlarının engellenmesi ya da tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekliliği doğmaktadır. Sunulan çalışma olgularındaki IgG ve C3 böbreklerde glomeruluslar ve tubuluslarda birikimi; böbrek lezyonlarının patogeneziinde parazitin direk etkisinden ziyade bu birimlerin sonucu immunpatolojik mekanizmaların tetiklendiğini göstermektedir. Sonuçta KVL'li olgularda IgG ve C3 birikimlerinin önüne geçilecek karşı mekanizmaların geliştirilerek böbrek fonksiyon bozukluklarının önüne geçilebilecek terapötiklerin geliştirilmesi sağlanabilir. Bu nedenle kompleks immunpatolojik mekanizmaların açıklığı kavuşturulması için deneysel çalışmalara önem verilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Ashford RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 2000, 30 (12-13):1269-1281.
- Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Fernando AA, Filho Trigo J, Julia FS, Franke CR, Aguiar PHP, Dos-Santos WLC, Carvalho LP. (2006). Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *The Veterinary Journal*, 171: 331-339.
- Benderitter TH, Casanova P, Nashkidachvili L, Quilici M. (1988). Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82,335-341.
- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL, Bourdoiseau G. Atypical forms of Canine Leishmaniosis. *The Veterinary Journal* 2001, 162:108-120.
- Brito T, Hoshino-Shimizu S, Amato Neto V, Duarte IS, Pena DO. (1975). Glomerular involvement in human kala azar: a light, immunofluorescent and electron microscopic study based on kidney biopsies. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 24: 9-18.
- Campino L, Cortes S, Pires R, Oskam L, Abranches P. (2000). Detection of Leishmania in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction, *European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 19(5):396-8.
- Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. (2003). Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathogenicity, *Acta Tropica*. 85: 375-390.
- Costa FAL, Guerra JL, Silva SMMS, Klein RP, Mendonça IL, Goto H. (2000). CD4+ T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* ,33: 1455-1458.
- Costa FAL, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology*, 40,6,, 677-684.
- Costa FAL, Priantri MG, Silva TC, Silva SMMS, Guerra JL, Goto H. (2010). T cells adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis, *BMC Infectious Diseases*, 10,112.
- Daher EF , Sampaio AM, Martiniano LVM, Viera APF, Junior GBS (2013). Acute kidney injury in visceral leishmaniasis: a cohort of 10 patients admitted to a specialized intensive care unit in northeast of Brazil. *Asian Pasific Jurnal of Tropical Disease*,3, 41-46.
- Deplazes P, Sith NC, Arnold P. (1995). Specific Ig1 and Ig2 antibody responses of dogs to Leishmania infantum and other parasites. *Parasite Immunology*, 17, 451-458.
- Duarte MIS, Silva MRR, Goto H, Nicodemo EL, Amato Neto V. Interstitial nephritis in human kala-azar, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1983, 77(4) , 531-537.
- Duarte MIS, Corbett CEP. (1984). Histopathological and ultrastructural aspects of interstitial pneumonitis of experimental visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78,683-688.
- Duarte MIS, Laurenti MD, Brandao Nunes VL, Rego Junior AF, Oshiro ET, Corbett CE. (1986). Interstitial pneumonitis in canine visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 28,431-436.
- Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H (1985). Renal involvement in visceral leishmaniasis. *American Journal of Kidney Disease*, 6,1,22-27.
- Fernandez-Perez FJ, Gomez-Munoz MT, Mendez S, Alunda JM. (2003). Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs, *Acta Tropica*, 86, 1, 83-91
- Ferrer L, Juanola B, Ramos JA. (1991). Chronic colitis due to Leishmania infection in two dogs. *Veterinary Pathology*, 28,342-343.
- Ferrer L. (1988). Skin lesions in canine leishmaniasis. *Journal of Small Animal Practice*, 29, 381-388.
- Fondevila D, Vilafranca M, Ferrer L. (1997). Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis, *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 56, 3-4, 319-327.
- 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.
- Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Marques MJ, Tafuri WL, Oliveira RC, Reis AB. (2008). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunol Immunopathology*, 121, 23-33.
- Gonçalves R, Tafuri WL, Melo MN, Raso P, Tafuri WL. (2003). Chronic interstitial pneumonitis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi-histopathological and morphometrical study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 45:1-12.
- Gonzalez JL, Rollan E, Novoa C, Castano M. (1988). Structural and ultrastructural hepatic changes in experimental canine leishmaniasis. *Histology and Histopathology*, 3,323-329.
- Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. (1984). Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Veterinary Pathology*, 21, 1,74-79.
- Killick -Kendrick R. (2002). Canine Leishmaniasis : moving towards a solution, *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum,2002, Sevilla, Spain*.
- Killick -Kendrick R, Killick- Kendrick M, Pinelli, E. (1994). A laboratory model of canine leishmaniasis : the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies . *Parasite*, 1, 311-318.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. 2005 W.B. Saunders Co. USA.
- Lamothe J. An illustration of the unusual clinical conditions of canine leishmaniosis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 1997, 21:103.
- Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, Tafuri WL. (2004). Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta*

- Tropica, 92,43-53.
- Lopez R, Lucena R, Novale M. (1998). Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed (B)*, 43, 469-474.
- Murray HW. (1997). Endogenous interleukin -12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 175, 1477-1479.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F, Redondo E. (1992). Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 45,1-2, 33-47.
- Özbel Y, Oksam L, Ozensoy S, Turgay N, Aklan MZ. A survey of canine leishmaniasis in western turkey by parasite , DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica* 2000 , 74 : 1-6.
- Özderem N. Kala-Azar (Visseral Leishmaniozis) Tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi , T.C DicleÜniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 1992,29.
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. (1991). Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, 57,4,444-52.
- Pugliese A, Di Pietro S, Giudice E. (2006). Clinical and diagnostic patterns of leishmaniasis in the dog. *Veterinary Research Communications*, 30:39-43.
- Pumarola M, Brevik L, Badiola Vargas J A, Domingo M, Ferrer L. (1991). Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 105, 279-286.
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A, Koutinas AF. (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology*, 132:145-152.
- Reed SG , Scott P. (1993). T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology*, 5,524-531.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Correa-Oliveira R. (2006a). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 81, 68-75.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA (2006b). Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112, 102-116.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E. (1990). Taxonomy of *Leishmania* Use of Isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* , 65: 111-125.
- Salman MS, Rubeiz NG, Kibbi AG. (1999). Cutaneous Leishmaniasis : Clinical features and diagnosis . *Clinics in Dermatology*, 17 (3): 291-296.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania* (1994). Present and future trends and their implications . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 471-478.
- Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. (2004). Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 130:7-12.
- Tafuri WL, De Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. (2001). Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 3,203-212.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Ricardo Goncalves Meloc MN, Michalick, MSM, Tafuri WL. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunology Methods*, 292,17- 23.,
- Toplu N, Aydoğan, A. (2011). An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 109,1051–1057.
- Toplu N, Aydogan A, Oguzoglu TB. (2007). Visceral leishmaniasis and parapoxvirus infection in a mediterranean monk seal (*Monachus monachus*). *Journal of Comparative Pathology*, 136, 283-287.
- Valliere SD, Mary C, Joneberg JE, Rotman S, Bullani Roberto Greub Gilbert Gillmore JD, Buffet PA, Tarr PE. (2009). AA-amyloidosis caused by visceral leishmaniasis in a human immunodeficiency virus-infected patient, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 209-212.
- Van Alderwegen IE, Bruijn JA, Heer E. (1997). T cell subsets in immunologically mediated glomerulonephritis. *Histology and Histopathology*, 12, 241-2