

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

AYDIN İLİ KÖPEKLERİNDE  
*EHRLİCHIA CANIS*' İN MİKROSKOBİK  
VE PCR İLE SAPTANMASI

NİZAMETTİN BİNGÖL  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Hasan EREN

AYDIN – 2019

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nizamettin BİNGÖL tarafından hazırlanan “Aydın ili köpeklerinde *Ehrlichia canis*'in mikroskopik ve PCR ile saptanması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: ..../..../2019

Üye (T.D.) :

Üye :

Üye :

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün ..... tarih ve ..... sayılı oturumunda alınan ..... nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit KUM  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarına yön veren, bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve gerçekleşmesi aşamalarında değerli fikirlerini ve tecrübelerini benimle paylaşan, karşılaştığım sorunlarda çözüm üreten ve destek olan tez danışmanım, sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Hasan EREN' e, moleküler çalışmamın gerçekleşmesinde yardımını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Metin PEKAĞIRBAŞ' a, her zaman desteklerini hissettiğim Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı akademik personeline, tez sürecinde benden desteğini bir an için bile esirgemeyen değerli arkadaşım Muhammed Veli DEMİRBİLEK' e, tezimin yazım aşamasında yardımcı olan sevgili ev arkadaşım Mert Can SAYINER' e, tezim sürecince bana güven ve sabır aşıl原因an sevgili hayat arkadaşım Pelşin AKKOYUN'a, maddi ve manevi destekleriyle güç ve güvenlerini her zaman hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük katkıya sahip sevgili aileme, sonsuz şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ .....	iv
RESİMLER DİZİNİ .....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ÖZET .....	vii
ABSTRACT.....	viii
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Etiyoloji .....	2
2.2. Hastalığın bulaşma seyri - Patogenez .....	4
2.3. Klinik bulgular .....	7
2.4. Teşhis .....	8
2.4.1. Laboratuvar bulguları.....	10
2.5. Epidemiyoloji.....	12
1.8. Sağaltım ve korunma .....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Hayvan materyali .....	16
3.2. Laboratuvar muayeneleri .....	16
3.2.1. DNA Ekstraksiyonu .....	17
3.2.2. PCR uygulaması .....	17
3.2.3. Mikroskopik inceleme .....	19
3.3. İstatistiksel değerlendirme .....	19
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA .....	23
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	25
KAYNAKLAR .....	26
ÖZGEÇMİŞ .....	38

## SİMGELER VE KISALTMA DİZİNİ

ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
aPTT	: Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzim-linked Immunosorbent assay
IFAT	: İndirekt fluoresan antikor testi
Ig G	: İmmun globülin G
Ig M	: İmmun globülin M
MPV	: Ortalama trombosit hacmi
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi
KME	: Köpek Monositik Ehrlichiosis
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
Dk	: Dakika
ssRNA	: Small subunit RNA
tRNA	: Taşıyıcı RNA

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> <i>Ehrlichia canis</i> ' in kanda görünümü.....	3
<b>Resim 2.</b> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	5
<b>Resim 3.</b> <i>E.canis</i> ' in yaşam döngüsü .....	6
<b>Resim.4.</b> <i>E.canis</i> morulası.....	9
<b>Resim 5.</b> ECC/ECB primerleri kullanılarak yapılan ve pozitif olduğu saptanan örneklerin jel görüntüsü (Kuyu 1-7: Örnekler, K8: Negatif kontrol, K9: Pozitif kontrol .....	20
<b>Resim 6.</b> <i>Ehrlichia</i> sp (+) olarak saptanan ve ECAN5/HE3 primerleri kullanılarak yapılan Nested PCR jel görüntüsü .....	21

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> <i>Ehrlichia</i> 'nın taksonomisi (Fishbein DB, 1990). .....	3
<b>Tablo 2.</b> <i>Ehrlichia</i> genusundaki türler ve farklılıkları (Ristic M, 1990).....	4
<b>Tablo 3.</b> <i>Ehrlichia canis</i> ile ilgili Türkiye'de yapılan çalışmalar.....	14
<b>Tablo 4.</b> Kan alınan köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımı.....	16
<b>Tablo 5.</b> Köpeklerde <i>E.canis</i> 'in mikroskopik ve moleküler (PCR) bakı sonuçları .....	20
<b>Tablo 6.</b> Moleküler (PCR) ile pozitif saptanan köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımı.....	21
<b>Tablo 7.</b> Yaşın <i>E. canis</i> enfeksiyonuna etkisi .....	22
<b>Tablo 8.</b> Cinsiyetin <i>E. canis</i> enfeksiyonuna etkisi.....	22

## ÖZET

### AYDIN İLİ KÖPEKLERİNDE *EHRLICHIA CANIS*' İN MİKROSKOBİK VE PCR İLE SAPTANMASI

**Bingöl N. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji (Veteriner) Programı, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.**

Bu çalışma Aydın ilindeki köpeklerde *Ehrlichia canis*' in mikroskopik ve moleküler olarak PCR ile yaygınlığını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi hayvan hastanesine getirilen 100 köpekten kan örnekleri toplanmıştır. Toplanan kan örneklerinden hem kan frotisi hazırlanarak mikroskopisine bakılmış hem de DNA izolasyonu ile PCR analizi yapılmıştır. Neticede mikroskopik bakıda etken görülmemiş, PCR ile 7 köpekte (%7) moleküler *E. canis* saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışmada Aydın ilindeki köpeklerde zoonoz özellik taşıyan *Ehrlichia canis*' in epidemiyolojisine katkı sağlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aydın, *Ehrlichia canis*, PCR.



## ABSTRACT

### DETECTION OF *EHRlichIA CANIS* IN DOGS IN AYDIN REGION BY MICROSCOPY AND PCR

**Bingöl N. Aydın Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Parazitology (Veterinary) Program, Master's Thesis, Aydın, 2019.**

This study was planned to determine the prevalence of Ehrlichia canis by microscopic and molecularly PCR in dogs in Aydın. For this purpose, blood samples were collected from 100 dogs brought to the animal hospital of Veterinary Faculty of Aydın Adnan Menderes University. Blood smears were prepared from the collected blood samples and microscopy was performed and PCR analysis was performed by DNA isolation. The resulting no agent was seen on microscopic examination, molecular E. canis was detected in 7 dogs (7%) by PCR. In conclusion, this study contributed to the epidemiology of Ehrlichia canis which has zoonotic characteristics in dogs in Aydın province.

**Keywords:** Aydın, *Ehrlichia canis*, PCR.

# 1. GİRİŞ

Hayvan sağlığı açısından enfeksiyöz hastalıklar oldukça önemlidir. İnsanla en yakın hayvan olan köpeklerde çok sayıda enfeksiyöz hastalık bulunmaktadır. *Rhipicephalus sanguineus* kenesinin vektörlüğünü yaptığı *Ehrlichia canis*, köpeklerde “Köpek Monositik Ehrlichiosis (KME)’ in etkenidir. KME, kan sistemini etkileyerek tüm vücuda yayılan yüksek morbiditeye ve mortaliteye sahip zoonoz bir hastalıktır. Hastalığın vektörü olan *Rhipicephalus sanguineus* kenesi yaz aylarında görülmektedir. Bu nedenle *E.canis*'in yaygın olması vektörün yaygınlığıyla da doğrudan ilgili olmaktadır (Harrus ve ark, 1997; Leib ve Monrea, 1997; Perez ve ark, 2006).

Dünyada tropik ve subtropik olmak üzere geniş yayılım gösteren hastalık; Avrupa, Asya, Amerika ve ülkemiz de dahil Avrupa kıtalarından sıklıkla bildirilmektedir. (Waner ve ark, 1996, Waner ve ark, 2001, Ünver ve ark, 2001, Suto ve ark, 2001; Tsachev, 2006). Türkiye' de çeşitli araştırmacılarca (Batmaz ve ark, 2001; Erdeğer ve ark, 2003; Karagenç ve ark, 2005; Ünver ve ark, 2005; Tuna, 2008) değişik yöntemlerle *E.canis*' in varlığı tespit edilmiştir.

*Ehrlichia canis*' in Aydın ilindeki köpeklerde mikroskopik ve PCR ile yaygınlığını belirlemek amacıyla çalışma planlanmıştır. Bu amaçla köpeklerden toplanacak kan numulerinden hem kan frotisi hazırlanarak mikroskopisine bakılacak hem de DNA izolasyonu elde edilip, PCR analizine tabi tutulacaktır. Elde edilecek sonuçlar, *E. canis*' in Aydın ilindeki yaygınlığı ile ilgili bilgiler vererek, hastalığın epidemiyolojisine katkı sağlayacaktır. Ayrıca ehrlichiosisin tanı ve tedavi prosedürlerinin geliştirilmesi açısından sonuçların katkı sağlayacağı düşünölmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Vektörlerle bulaşan hastalıklar, insan ve hayvan sağlığını etkileyen özellikle az gelişmiş ülkelerde önemli bir sağlığı sorunudur. *Ehrlichia* infeksiyonlarında vektörlerle bulaşan ve zoonoz önem taşıyan hastalık etkenlerinin içerisinde yer almaktadır. *Ehrlichiosis*, sebep olan bakteri etkeni lökositlerin (akyuvarların) sitoplazmalarına yerleşir. Etken *Ehrlichia* soyuna dahil olup, insanlar da dahil olmak üzere köpek, inek, koyun, keçi, at gibi çeşitli memeli hayvanlar için patojendirler. Köpeklerde, ehrlichiosiste oluşan hematolojik bozukluklar neticesinde ölüm meydana gelmektedir (Tuna, 2008; Özata, 2012).

### 2.1. Etiyoloji

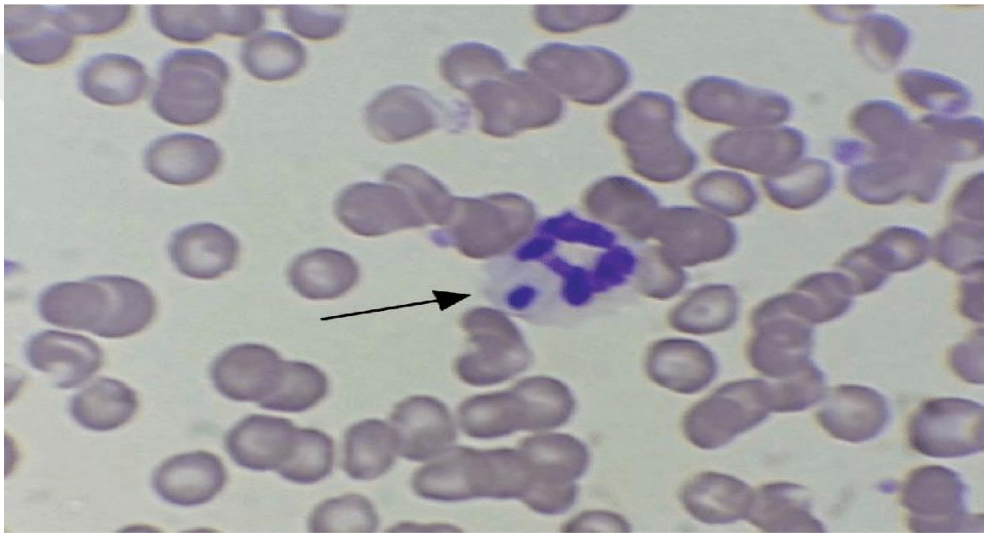
*Ehrlichia canis* gram negatif bakteridir. Hareketli formu yoktur ve zorunlu hücre içi parazitidir. *Ehrlichia canis*'e ait halkasal kromozomda 1.315.030 tane nükleotit bulunur (Mavromatis ve ark, 2006). Etkenler monositlerde sitoplazma içinde morula şeklinde görülürler. Eritrositlerde görülmezler. Boyutları, 0.2-0.4 mikrometre çapında başlayıp neticede 4-6 mikrometre çapında büyük inklüzyon cisimciklerine kadar artabilir. Mikroskopi ile yapılan incelemelerde etkene Romanowski boyası, Machiavello boyası ve gümüş boyaları ile bakılır. Bu boyalarda sırasıyla mavi, açık kırmızı ve kahverengi-siyah renkte görünürler (Taylor ve ark, 2013).

Yapılan çalışmalarda *Ehrlichia*' ların riketsiyalara klamidyalardan daha çok benzediği, Weisburg ve arkadaşlarının 16s RNA bölgesini çoğaltmayı hedefleyen çalışmaları ile ortaya konmuştur. *Ehrlichia* 'ların yaşam döngüleri klamidyalarınkine benzerdir. (Ristic ve Huxsoll, 1984).

Amerika'da 1992' de *E. ewingii* sp. adında yeni tür saptanmıştır ve bu türün *E. canis* ve *E. chaffeensis*' e antijenik yönden yakın olduğu belirtilmiştir (Anderson ve ark, 1992). İlerleyen süreçlerde köpeklerde yapılan farklı bir çalışmada *E. ewingii*' nin insanlarda hastalığa neden olan zoonoz bir tür olduğu bildirilmiştir (Greig ve ark, 1996)

*Ehrlichia canis* enfeksiyonu daha çok kenelerin fazla ve aktif olduğu sıcak aylarda görülmektedir. Çünkü kene bu parazitin vektörüdür. Hastalığın tedavisinde uygun dozda kullanılan doksisisiklin veya tetrasiklin'in hastalığın akut ve subklinik dönemlerinde iyileşme sağladığı birçok çalışma bulunmaktadır (Harrus ve ark, 1999).

Köpek ehrlichiozisi, dünyanın her yerinde yaygındır. Tropikal ve subtropikal bölgelerde çok daha fazla görülen bir hastalıktır (Buhles ve ark, 1974; Rikihissa ve ark, 1991; Dumler ve ark, 2001; Faria ve ark, 2010). Köpek ehrlichiozisi konusunda Brezilya' da yapılan bir çalışmada 2553 köpekte %19,8 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (Labarthe ve ark, 2003).



**Resim 1.** *Ehrlichia canis*' in kanda görünümü

**Tablo 1.** *Ehrlichia*'nın taksonomisi (Fishbein, 1990).

<b>ALT SINIF</b>	<i>Rickettsiales</i>
<b>FAMİLYA</b>	<i>Rickettsiaceae</i>
<b>GENUS</b>	<i>Ehrlichia</i>
<b>TÜRLER</b>	<i>E.canis</i> (Karnivorların ehrlichiosis'i) <i>E.sennetsu</i> (Sennetsu fever) <i>E. risticii</i> (Potomac horse fever, Atların monositik ehrlichiosis'i ) <i>E. equi</i> (Tek tırnaklıların ehrlichiosis'i ) <i>E. phagocytophila</i> ( Koyunlarda tick – borne fever)
<b>ŞÜPHELİ TÜRLER</b>	<i>E. bovis</i> <i>E. platys</i> (Köpeklerde enfeksiyöz siklik trombositopeni) <i>E. ovina</i> <i>E. kurlovi</i>

**Tablo 2.** *Ehrlichia* genusundaki türler ve farklılıkları (Ristic, 1990)

Türler ve buldukları yerler	Hastalık	Deneysel Konakçıları	Coğrafik Dağılımları
<b>MONOSİT</b>			
<i>E. canis</i>	Karnivorların ehrlichiosis'i	Karnivorlar	Tüm Dünya
<i>E. sennetsu</i>	Sennetsu fever	Köpek, fare, maymun	Japonya, Malezya
<i>E. ristici</i>	Atların monositik ehrlichiosis'i	Fare, Köpek, kedi, maymun	Fransa, Amerika, Kanada
<b>GRANÜLOSİT</b>			
<i>E. equi</i>	Tek tırnaklı ehrlichiosis'i	Eşek, koyun, keçi, maymun, kedi köpek	Amerika, İsviçre
<i>E. phagocytophyla</i>	Tick-borne fever	Kobay, fare	İngiltere

“*Rhipicephalus sanguineus*” adı verilen ve kahverengi köpek kenesi olarak anılan keneler ehrlichiosis etkenlerini taşıyarak bulaştırmaktadır. Etken, enfekte olmuş kenenin konağınından kan emme sırasında tükrükleri ile beraber aktarılmakta veya enfekte köpekten alınan kanın başka hayvanlara nakledilmesi ile oluşabilmektedir (Breitschwerdt, 1999). Doberman, Pinscher ve Alman Çoban köpeklerinde, bu hastalık ırk ve yaş predispozisyonu göstermemesine rağmen daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Brouqui ve ark, 1991). Hastalığın, köpeğe etkenin kene tarafında verilmesinden 8 ile 21 gün sonra başladığı ve inkubasyon periyodununun 14 gün ile 6 ay arasında değiştiği bildirilmiştir (Neer ve Harrus, 2006). Köpeklerde ehrlichial etkenlerden; *E. canis*'in sebep olduğu “köpek monositik ehrlichiosis” ve *E. ewingii*'nin sebep olduğu “köpek granulositik ehrlichiosis” gibi iki farklı hastalık tablosu bulunmaktadır.

## 2.2. Hastalığın Bulaşma Seyri - Patogenez

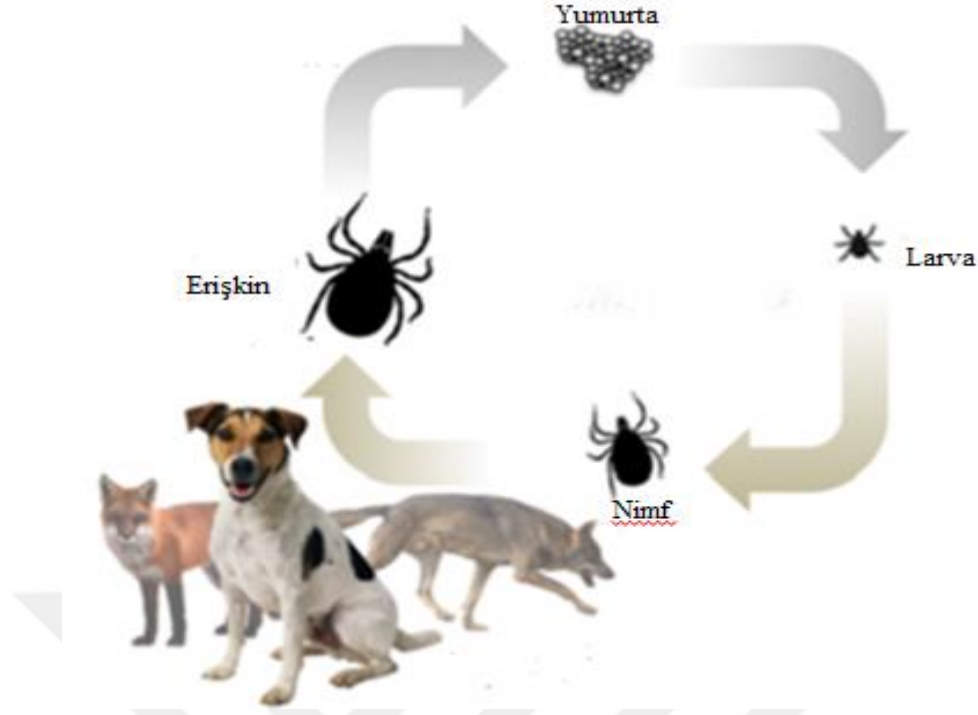
Hastalığın etkeni olan *Ehrlichia canis*, *Rhipicephalus sanguineus* (Resim 2.) kenesi ile nakledilen, kan tablosunda bozukluklarla ortaya çıkan, ateşli, sistemik, mortalitesi yüksek olan olan “Köpek Monositik Ehrlichiosis (KME) adı verilen hastalığa neden olur (Harrus ve ark, 1997; Waner ve Harrus, 2000). Bu hastalığın adı; köpek rickettsiosis, köpeklerin hemorajik ateşi, köpeklerin kene tifosu, Nairobi kanama bozukluğu ve tropikal

pansitopeni gibi farklı isimlerle de bilinmektedir (Waner ve Harrus 2000). Cezayir’de 1935’ de yapılan bir çalışmada etken ilk belirlenmiş olup, tüm köpeklerde yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmektedir (Ristic ve ark 1993).



**Resim 2.** *E. canis*’ in vektörü *Rhipicephalus sanguineus*.

*Ehrlichia canis*; farklı memeli hayvanlarda (insan, at, koyun, keçi, köpek gibi) farklı kan hücrelerine girerek enfekte eder ve enfeksiyona sebep olabilmektedir (Donatien ve Lestoquard 1937; Groves 1975). *E. canis* ile enfekte ilk insan vakası 1986’ da bildirilmiş, 1990 yılında yeni bir tür izole edilmiş, bunu türün *E. canis*’e benzeyen ve bulunduğu yerin adından dolayı da *E. chaffeensis* adı verilmiştir (Anderson ve ark, 1991, 1992).



**Resim 3.** *E. canis* ' in yaşam döngüsü.

( [https://www.fecava.org/wp-content/uploads/2019/03/CVBD\\_Ehrlichiosis\\_190225.pdf9](https://www.fecava.org/wp-content/uploads/2019/03/CVBD_Ehrlichiosis_190225.pdf9))

Ehrlichiosizin klinik bulguları geniş dağılım göstermekte ve bu dağılım etkenin patojenitesi, köpeğin ırkı, ikincil enfeksiyonlar ve köpeğin immün sistemi gibi birçok faktöre bağlı olmaktadır. *E. canis*; vektör keneler tarafından nakledilen diğer protozoer etkenlerden *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* ile birlikte ko-enfeksiyonlara sebep olabilmekte ve hastalığın klinik seyrinin kötüleştiği bildirilmiştir (Diniz ve ark, 2008; Mylonakis ve ark, 2010; Harrus ve Waner 2010).

*Ehrlichia canis* enfeksiyonunda bağışıklık sistemi oldukça etkilenmektedir. Enfekte köpekler' de; trombositlerde farklı durumlar ve rahatsızlıklar görülmüştür (Baneth, 2010). Ehrlichiosis kanda trombosit azalması yani trombositopeniye de sebep olmaktadır. Bu hastalıkta trombositlerin dalağa sekresyonu ve dalakta kan göllenmesi gibi farklı nedenleri olabilmektedir. Trombositopeni' den başka, ehrlichiosisli bir köpekte trombositlerin görevinin yerine getirememesinden, mevcut trombositlerin fonksiyon eksikliği sorumlu tutulmaktadır (Baneth, 2010).

### 2.3. Klinik Bulgular

Akut, subakut ve kronik olarak üç farklı evresi bulunan ve inkubasyon süresi 7 ile 21 gün arasında değişen hastalık, birçok farklı sistemi etkileyerek ciddi tabloların oluşmasına sebep olur (Woody ve Hoskins, 1991; Waner ve ark, 1999).

Hastalığın akut fazı, enfekte olmuş kenelerin etkeni nakletmesinden 10 -15 gün içinde başlar ve 15-30 gün arası sürer. Bu dönemde ciddi olmayan klinik bulgular olabilirken zaman zaman hayati tehlike yaratabilecek durumlarda olabilmektedir. Bu dönemde etken karaciğer, dalak ve lenf nodülleri ile dolaşımdaki tek çekirdekli hücreler içine yerleştikten sonra kanla akciğer, böbrek, bağırsak, pankreas ve beyin gibi diğer organlara da ulaşır, bu organların damar endoteline invaze olarak vaskulitise sebep olur (Harus ve ark, 1997; Feldman ve ark. 2000). Başka klinik bulgular ise; kusma, topallık, ataksi ve nefes darlığıdır. Çoğu vakada klinik belirti tedaviye başlanılmadan önce kaybolmakta ve subklinik evreye geçilmektedir (Codner ve Farris-Smith 1986; Waner ve ark, 1997). Akut fazda tedavi gerçekleşmez ise hastalık diğer faz olan subklinik faza geçer.

Hastalığın subklinik fazı etkenin alınmasından 6-9 hafta sonrasında oluşmaktadır. Subklinik faz 1 aydan 4 aya kadar sürebilmekte, bazen 5 yıla kadar da uzayabilmektedir. Kanda etkene karşı şekillenen antikor düzeyi, enfeksiyonun alımından 7 ile 21. Günler arasında tespit edilebilir düzeyde olduğu ve subklinik dönem boyunca da antikor seviye artışı devam ettiği bildirilmiştir (Rikihisa ve ark, 1992, Rand, 1996). Subklinik dönemde trombostopeni yavaş seyrederek ve hiperglobulinemi şekillenir (Harrus ve ark, 1999). Yeterli bağışıklık cevap oluşan köpeklerde subklinik evrede etken ortadan kalkabilmektedir (Waner ve ark, 1997).

Akut veya subklinik dönemlerde tedavi edilmeyen hastalığın, yıllar içinde kronikleştiği ve uzun yıllar devam ettiği, bu evrede bazı köpeklerde hastalık seyrinin asemptomatik olarak devam ettiği, bazılarında ise akut fazdaki klinik belirtilerden daha ağır tablolara sebep olduğu bildirilmiştir. Hastalığa ait klinik belirtilerin şiddeti hayvanın ırkı, yaşı ve vücutta bulunan olası sekonder enfeksiyonun varlık durumuna göre değişmektedir (Rand 1996, Breitschwerdt, 1999). Sinirsel belirti gösteren bazı köpeklerin serebrospinal sıvılarında az da olsa morularlar görülebilmektedir (Taylor ve ark, 2013). Hastalığın kronik dönemindeki klinik bulgularının akut fazdakine benzediği hatta daha şiddetli seyrettiği bildirilmiştir (Harrus ve ark, 1997; Harrus ve Waner, 2011).

Hastalıkta en çok görülen klinik bulgular, anoreksi, ileri derecede kaşeksi, mukozal membranlarda solgunluk, depresyon, kilo kaybı, laterji, hipoplastik kemik iliği, yüksek



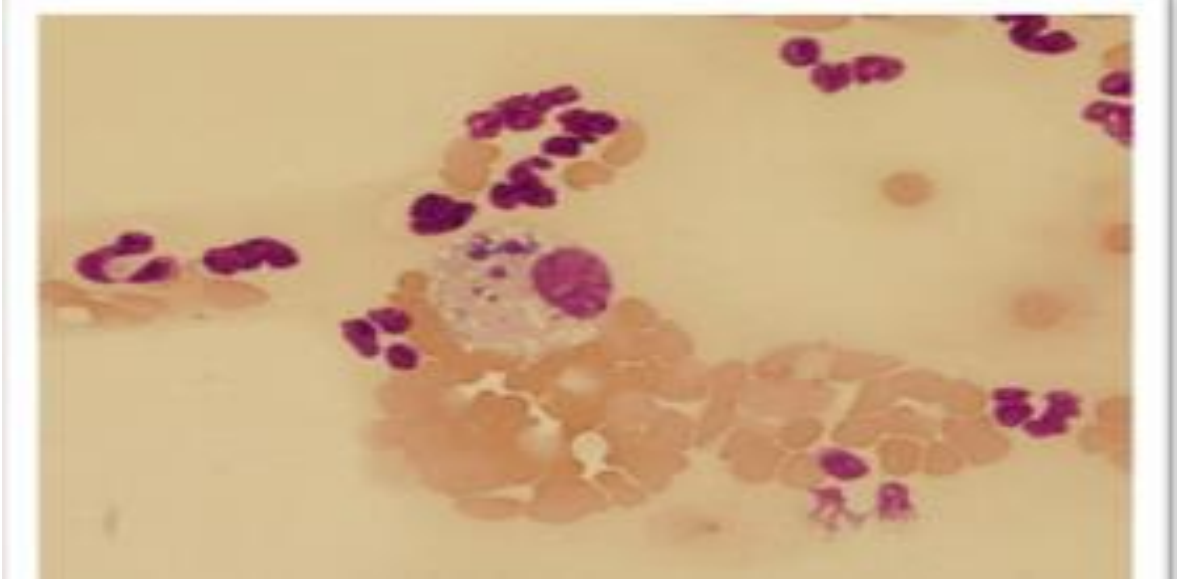
ateş, deri ve mukozalarda trombostopeniden dolayı kanama ve epistaksisdir (Huxsoll ve ark, 1970; Smith ve ark, 1975). Kılırlarda matlık, burun akıntısı, perivasküler hücre infiltrasyonu gözlenebilir (Breitschwerdt, 1999; Dodurka ve Bakırel, 2002). Hastalığın kronikleştiği dönemde meydana gelen; süresi uzamış östrus kanamaları, infertilite, abort (düşükler) ve doğum sonrası ölümler gibi reproduktif sisteme ait bozukluk ve kayıplar bildirilmiştir (Price ve Sayer, 1983; Rikihisa ve ark, 1992; Rand, 1996; Breitschwerdt, 1999).

*Ehrlichia canis* ile infekte köpeklerde, akut *E. canis* enfeksiyonu, *E. canis*' e maruz kalma, aktif enfeksiyon ve etkene hiç maruz kalmamış köpekler olmak üzere dört farklı sınıflandırma bulunmaktadır (Diniz ve ark, 2008).

#### 2.4. Teşhis

Klinik bulguların kesin teşhis için yeterli olmaması nedeniyle tanı zordur. Çoğunlukla pansitopeni olması ehrlichiosisi düşündürmekte iken, serolojik testler ile özellikle direkt mikroskopi ile etkenin direkt olarak görülmesine yönelik testler ile kesin tanıya gidilebilmektedir (Ristic ve ark, 1972).

*Ehrlichia canis*' in mikroskobik teşhisinde morula formu ve inklüzyon cisimlerine, lenf düğümü ile dalak aspirasyonlarında ve buffy coat'ta saptanmaktadır. (Elias, 1991; Mylonakis ve ark 2003; Faria ve ark, 2010). Serolojik olarak IFAT ile etkene karşı oluşan antikor (O' connor ve ark, 2006) ve etkene ait DNA' yı göstermek amacı ile PCR metodu kullanılmaktadır (Nakaghi ve ark, 2008). Köpek monositik ehrlichiosis'in tanısında, kan sürme frotilerinde mikroskobik incelemede tipik *E. canis* morula dönemini görmek mümkündür. Ancak incelenen örneklerin sadece %4'ünde morula safhasının tespit edilebildiği ileri sürülmüştür (Hildebrandt ve ark, 1973; Woody ve Hoskins, 1991; Harrus ve Waner, 2011). Mylonakis ve ark. (2003) çalışmalarında tipik morula dönemlerini, 1000 adet kemik iliği sürme frotisinin % 66 sında, Harrus ve Waner (2010) ise %34' ünde saptadıklarını belirtmişlerdir.



**Resim 4.** *E.canis morula evresi.*

KME ile infekte köpeklerde etken eritrosite yerleşmez bu nedenle eritrositlerin morfolojisi birçok olguda değişmemektedir (Harrus ve ark, 2007). Yapılan bir çalışmada Wright-Giemsa ile boyanan preparatlarda 200 lenfositin %50'ye yakınında azurofil granüller şekillenmiştir.Hastalığı teşhis edenler farkında olmadan lenfositik lösemi teşhisi koyabilmektedirler (Harrus ve Waner, 2011).

KME' nin tespit edilmesinde çok sayıda serolojik yöntem vardır. *E. canis* antijenlerine karşı şekillenen *E. canis* antikorlarının tespit edilmesinde IFA testi oldukça önem taşımaktadır. Bu testle ortaya konan *E. canis* ile enfekte köpeklerdeki IgM'nin kandaki seviyesinin düzensiz artışının yanlış sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir (Mc Bryte ve ark, 2003). Buna karşın IgG titresi  $\geq 1/40$  ve üzeri titrelerde pozitif olan köpekler *E. canis* ile enfekte olarak immun cevap oluşturmuş olarak kabul edilmektedir. IFA testinde özellikle yakın zaman aralıkları ile kontrol edilmesi önerilen antikor titrelerindeki 4 kat ya da üzeri bir yükselme hayvanda akut eneksiyonu gösterebilmektedir (Harrus ve Waner, 2011). Ehrlichia'ya karşı oluşan antikor cevabı hayvan tedavi edilse dahi aylar veya yıllarca tespit edilerek konağın persiste olduğunu gösterebilmektedir (Bartsch ve Greene, 1996 ).

IFA testinden başka kanin monositik ehrlichiosisin teşhisinde ELİSA testi de kullanılabilir (Harrus ve ark, 2002). Dot-ELİSA yöntemi kullanılarak hazırlanan ticari kitler ile *E. canis*'e karşı oluşan antikor cevapları teşhiste kullanılmaktadır. Ayrıca *E. canis*'e ait P30 ile P30-1 proteinlerinin tespitine dayanan ELISA tabanlı Snap3Dx (Hegarty ve ark, 2009) ve Snap 4 DX test kitleri de enfeksiyonun teşhisinde kullanılmaktadır (Harrus ve ark, 2002; Carrade ve ark, 2011). İsrail'de yapılan bir çalışmada SNAP 3 DX hızlı tanı kitlerinin *E. canis* için yüksek duyarlılık ve özgüllük taşıdığını bildirmişlerdir.

#### **2.4.1. Laboratuvar Bulguları**

KME' nin tanısında tam kan sayımının yapılması önemlidir. Orta dereceden şiddetliye kadar değişen trombositopeni hastalığın akut evresinde kendini gösteren önemli hematolojik bir bulgudur. *E. canis* ile enfekte olan köpeklerde 10-21. günler arasında belirginleşen trombositopeni sonucu trombosit sayıları 20.000 ile 52.000/ $\mu$ l arasında değişmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda trombosit hacimleri 6. günden itibaren artmaya başlamaktadır. Akut dönemde meydana gelen trombositopeniden başka anemi ve lökopeni gibi hematolojik değişikliklerde meydana gelebilmektedir (Assarasakorn ve ark, 2008; Mylonakis ve ark, 2010; Harrus ve Waner, 2011).

Klinik bulgular olmadan da hastalığın subklinik fazında hafif trombositopeni meydana gelebilmektedir (Mylonakis ve ark, 2010; Harrus ve Waner, 2011). Yapılan bir deneysel çalışmada köpeklerin trombosit sayılarının %42'ye kadar azaldığı gözlenmiştir (Waner ve ark, 1997; Harrus ve ark, 1998). Lökosit ve eritrosit seviyeleri de hafif düzeyde de olsa azalabilmektedir. (Waner ve ark, 1997). Trombositopeni hastalığın kronik evresinde çoğu zaman hafif düzeyde olup tabloya anemi ve lökopeni de eşlik edebilmektedir. Hastalığın kronik devresinde şiddetli pansitopeni tablosu da görülmektedir (Harrus ve ark, 1997).

*E. canis*' e ait morula evrelerinin sürme frotilerde monositler içinde görülmesi KME' nin tanısında önemli bir yer tutmaktadır. Morula evresi; zara bağımlı kofullar şeklinde bakterilerle bir arada bulunurlar. Ancak mikroskopta görülebilirler (Hildebrandt ve ark, 1973). *E. canis* morulalarının saptanma oranını arttırmak için fazla sayıda sürme

froti hazırlanması gerekmektedir. Ehrlichial inkluzyon cisimcikleri; farklı materyallerle ile *E. chaffeensis*, *Neorickettsia risticii* ve *Ehrlichia ruminantium* gibi diğer Anaplasmatacea ailesinde bulunan ve monositleri enfekte eden diğer etkenlerle de karışabilmektedir (Kelly ve ark, 1994, Breitschwerdt ve ark, 1998).

Epidemiyolojik bilgiler ve ehrlichial patojenlerin vektör türlerinin epidemiyolojik dağılımı ve prevalansı dikkate alındığında hastalığın ayırıcı tanısında bölgelere göre farklılıklar olacağı göz önünde tutulmalıdır. Bu nedenle moleküler karakterizasyonu belirlemek için PCR uygulamaları ile sekans analizleri sağlanmalıdır. Bu sayede etkene ait DNA'nın varlığı ve identifikasyonu yapılabilmektedir (Breitschwerdt ve ark, 1998).

Monositik Ehrlichiosis'in tanısında kan sürme frotilerinde, preparatların değerlendirilmesiyle monositler içinde görülen *E.canis* morulaları ile tanı konulabilir. (Woody ve Hoskins, 1991; Harrus ve Waner, 2011).

KME'nin tanısında antijenik tanı amacıyla PCR yöntemi kullanılmaktadır (Nakaghi ve ark, 2008). PCR hastalığın tanısında kullanılan önemli moleküler yöntemlerdendir (De La Fuente ve ark, 2005; Torina ve ark, 2007). Diğer yöntemlere göre PCR yönteminin alet, ekipman, deneyimli personel gerektirme gibi handikaplarına rağmen yapımının nispeten hızlı ve çoklu örnek çalışmaya uygun olması nedeniyle *E.canis*'in doğrudan moleküler teşhisi için uygun bir tekniktir (Harrus ve ark, 2002). Belirtilen gereksinimlerinden dolayı etken kültürü ve PCR gibi metotlar temelde araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır(Nyindo ve ark, 1971; Regnery, 1990).

IFAT, Western immunoblotting ve ELISA yöntemleri etkenin erken teşhisi için yararlanılan yöntemlerdendir (Waner ve Harrus, 2000). IFAT en geçerli sayılan *E. canis*'in tespitinde "altın standart" olarak değerlendirilen ve sıklıkla kullanılan serolojik testtir. Pozitif olarak değerlendirilen IFA testi sonucu aktif bir reaksiyona işaret edebildiği gibi daha önce geçirilmiş enfeksiyonları da gösterebilir (Baneth ve ark, 1996; Harrus ve ark, 1999). Subklinik ehrlichiosisin IFA testi sayesinde erken teşhis edilmesi ile hastalık kronik evreye geçmeden saptanması ve başarılı bir tedavinin gerçekleşmesi sağlanır (Waner ve ark, 1997). Hastalığın akut döneminde antikor titreleri hızlı bir artış göstermektedir. IFA testinde; ortaya konan antijenik olarak yakın yapıların (özellikle endemik bölgelerde *E. ewingii*, *E. equi*, *E. risticii* ve *Anaplasma phagocytophila*) ortaya çıkardığı immunojenik cevabın ortaya koyacağı çapraz reaksiyon nedeni ile yanlış pozitif ya da negatif sonuçlar

ortaya çıkabilmektedir. Deneysel olarak gerçekleştirilen bir çalışmada *E. canis* ile *E. equi* arasında enfeksiyondan 4 ay sonra dahi çapraz reaksiyon geliştiği gösterilmiş ve *E. equi* antikor titresinin *E. canis*'e kıyasla çok daha düşük olduğu görülmüştür. *E. canis*'in, *E. platys* ile arasında serolojik olarak çapraz reaksiyona neden olabilecek antijenik bir bağlantı olmadığı bildirilmiştir (Rikihsa ve Perry, 1985).

## 2.5. Epidemiyoloji

*Ehrlichia canis*'in görülme sıklığı ve coğrafi yayılımı vektör olan *Rhipicephalus sanguineus*un biyolojisi ve yaygınlığı ile yakın ilişkilidir. Çoğunlukla vakalar kenelerin aktif olduğu yaz aylarında görülmektedir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde hastalık insidensi armaktadır (Harrus ve ark, 1997; Leib ve Monrea 1997; Waner ve ark, 1996; Waner ve ark, 2001; Ünver ve ark, 2001; Suto ve ark, 2001). Çeşitli ülkelerde, *E. Canis* enfeksiyonunun prevalansı üzerine köpeklerde pek çok çalışma yapılmıştır (Sainz ve ark, 1996; Baneth ve ark, 1996). Yapılan bazı çalışmalarda endemik bölgelerde sağlıklı görünen köpeklerin çoğunun *E. canis* açısından seropozitif olduğu bildirilmektedir (Botros ve ark, 1995; Baneth ve ark, 1996). Endemik bölgede yaşayan ya da buralara seyahat eden köpeklerde hastalık riski bulunmaktadır (Taylor ve ark, 2013).

Hastalık; Asya, Avrupa, Afrika, Avustralya ve Amerika'da bildirilmiştir (Tsachev, 2006). *Rhipicephalus sanguineus* keneleri çoğunlukla tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak bulunur ancak Avrupadaki Akdeniz ülkelerinde İspanya, Portekiz, Fransa, İtalya, Türkiye (Beugnet ve Marie, 2009), Balkan bölgesi (Christova ve ark, 2003) ve Sırbistanda da (Milutinovic ve Radulovic, 2002) bulunduğu bildirilmiştir. Dünya çapında serolojik ve moleküler olarak *E. canis* bildirilmiştir; Güney Amerika ülkelerinde, Venezuela, Kolombiya, Şili, Peru, Brezilya, Meksika (Vargas Hernandez ve ark, 2012); Afrika ve Asya ülkelerinde, Tunus, Mısır, Çad, Zimbabwe, Senegal, İsrail, Japonya (Ndip ve ark, 2005) ve son olarak Akdeniz ülkeleri, İspanya, Portekiz, Fransa, İtalya ve Türkiye'de hastalık bildirilmiştir (Trotz- Williams ve ark, 2003). Yine yapılan bir başka araştırmada, sağlıklı görünen çok sayıda köpekte kapsamlı seroepidemiolojik çalışmalar yapılmış, en yüksek prevalans Bulgaristan da % 37,5 (Tsachev ve ark, 2006), sonra

Romanya’ da % 2,1 (Mircean ve ark, 2012) ve en son Macaristan’da %0,16 (Farkas ve ark, 2014) seropozitiflik saptanmıştır.

Zimbabve’de *E. canis*’ in prevalans çalışmasında, 105 köpekten %52’si pozitif bulunmuştur (Matthewman ve ark, 1993). Kuzey-batı İspanya’da incelenen 308 köpekten canine ehrlichiosis seroprevalansı  $19,2 \pm 2,24$  olarak saptanmıştır (Sainz ve ark, 1996). İsrail’de 410 köpekten alınan kan serumlarının bakısı sonucu seroprevalansın sahipli köpeklerde % 23,9 ve sokak köpeklerinde % 37,5 olduğu bildirilmiştir (Baneth ve ark, 1996). ABD’de % 15,4 olarak *E. canis* pozitif bulunmuştur (George ve ark, 1998). ABD’ de yapılan başka bir araştırmada oran %21 olarak bulunmuştur (Suksawat ve ark, 2000). Amerika’nın kuzey doğusunda yapılan bir çalışmada, 60 köpek kan serumu incelenmiş ve % 11,7’ sinde *E. canis* pozitif bulunmuştur (Magnerelli ve ark, 1993). Yapılan diğer çalışmalarda da Portekiz’de %50 (Bacellar ve ark, 1995), Tunus’da %42,8 (Ghorbel ve ark, 2001), Polonya’da % 8, Fildişi sahilleri’ nde % 67,8, Gabon’da % 3,1 (Davoust ve ark, 2006) ve Brezilya’da % 44,7 oranında *E. canis* pozitif olarak rapor edilmiştir (Costa ve ark, 2007). Japonya’da yapılan bir çalışmada 150 köpekte % 18 *E. canis* pozitif saptanmıştır (Watanabe ve ark, 2004). Köpek monositik ehrlichiosisin seroprevalansı farklı coğrafyalarda genelde % 20-50 arasında değişmektedir (Aguiar ve ark, 2007; M’ghirbi ve ark, 2009).

Türkiye’de Köpek Monositik Ehrlichiosis üzerine sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar genellikle antikor belirlemeye yönelik çalışmalardır (Batmaz ve ark, 2001; Aslantas ve ark, 2005; Unver ve ark, 2005; Cihan ve ark, 2010; Yağcı ve ark, 2010; Icen ve ark, 2011; Güneş ve ark, 2012; Özata, 2012). Batmaz ve ark. (2001), Balıkesir, Bursa, İzmir, Antalya, Adana, Şanlıurfa illerinde yapılan bölgesel olarak en kapsamlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Yapılan çalışmada 284 köpeğin 59’unda etken pozitif bulunup, prevalans %20,8 olarak rapor edilmiştir. En yüksek prevalansa sahip iller Adana %65,3 ve İzmir %40,6’ dır. Ankara, Aydın, Muğla illerinde 239 köpekte yapılan çalışmada 162 köpeğin *E. canis* yönünden pozitif olduğu ve prevalansın % 67,8 olduğu bildirilmiştir (Erdeğer ve ark, 2003).

Türkiye’de konvansiyonel ve nested PCR tekniği ile Köpek Monositik Ehrlichiosis üzerine yapılmış moleküler çalışmalar da mevcuttur (Aysul ve ark, 2012). Düzlü ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada köpeklerde ehrlichiosisi Türkiye’de ilk kez Real Time PCR ile 400 köpekte *E. canis*’ i araştırarak pozitifliği %14,5 olarak bildirilmişlerdir.

Egede; Manisa, Muğla, Marmaris, Selçuk, Aydın, Bodrum merkezlerde farklı ırk ve yaşlardaki 371 köpekte nested PCR ile yapılan çalışmada 154 köpekte *E. canis* pozitif saptanmış ve hastalığın prevalansı % 41,5 olarak bildirilmiştir ( Karagenç ve ark, 2005).

Ayrıca 239 köpek ile yapılan bir çalışmada 162 köpekte IFA testi ile %67,8 ve 37 tanesinde dot-ELISA ile % 53,3 seropozitiflik saptanmıştır (Erdeğer ve ark, 2002). Ünver ve ark. 2005, Ankara ilinde 12 köpek üzerinde yaptıkları çalışmada 3 tanesinde PCR ile *E. canis*'in pozitif olduğunu saptamıştır. Yine Sinop'ta yapılan bir çalışmada klinik olarak sağlıklı görünen köpeklerin %18,28' inde ELISA ile *E. canis* antikoru saptanmıştır (Güneş ve ark, 2011).

**Tablo 3.** *Ehrlichia canis* ile ilgili Türkiye'de yapılan çalışmalar

Hayvan Adedi	Kullanılan Metot	Prevelans Değeri	Kaynak
284	IFAT	%20,8	Batmaz ve ark.2001
239	IFAT	%67,8	Erdeğer ve ark. 2003
371	PCR	%41,5	Karagenç ve ark.2005
224	IFAT	%36,2	Tuna 2008
122	IFAT	%14,75	Yağcı ve ark. 2010
82	Snap3Dx	%4,8	Icen ve ark. 2011
100	Snap3Dx	%1	Sarı ve ark. 2012
400	qpcr (Real Time PCR)	%14,5	Düzlü ve ark.2014

### 1.8. Sağlık ve Korunma

Köpek Monositik ehrlichiosis' inin sağaltımında ilk kullanılacak ilaç doksisisiklidir. Bu ilacın akut dönemde çok daha etkili olduğu, subklinik ve klinik *E. canis* enfeksiyonunda etkisinin şüpheli olduğu ileri sürülmüştür ( Wen ve ark, 1997; Breitschwerdt ve ark, 1998; Harrus ve ark, 1998; Harrus ve ark, 2004; Eddlestone ve ark, 2006; Schaefer ve ark, 2008). Doksisisiklin' in 4 hafta günde iki kez 5 mg/kg oral dozu uygundur (Neer ve ark, 2002). Kronik dönemde ilaç uzun süre kullanılabilir ancak bazen yan etkileri ortaya çıkar (Harrus ve ark, 1999).

*E. canis* enfeksiyonunda diğer tetrasiklin türevlerinin tedavi için kullanımı ile ilgili fazla bilgi yoktur (Mylonakis ve ark, 2010; Eddlestone ve ark, 2006). Ayrıca rifampin oral olarak günde iki kez 15 mg/kg dozda etkili olduğu belirtilmiştir (Schaefer ve ark, 2008).

Dengeli kristaloid solüsyonlar ve/veya tam kan nakli *Ehrlichia canis* ile enfekte olmuş köpeklerde, yaşama şansını artırmak için sağaltım da uygulanabilmektedir. Ayrıca trombosit komponentlerinin nakli de yapılabilmektedir. Kan nakli ile 20 kg lık bir köpekte trombosit sayısı 20.000 ila 30.000/ µl yükseltilebilmektedir (Lewis, 2000).

*Ehrlichia canis* ile enfekte olmuş trombositopenik ve kanaması olan 3 köpekte 1 µg/kg derialtı hergün bir kere, toplamda 3 kez uygulanan desmopressin asetatin trombosit sayısı ve fibrinojen miktarında belirgin bir artma sağladığı, pT ve aPTT de ise belirgin bir azalmaya yol açtığı ve neticede KME etkeninin neden olduğu kan tablosuna ilişkin değişikliklerin giderildiği bildirilmiştir (Giudice ve ark, 2010).

Yine *E. canis* ile enfekte köpeklerde şiddetli (nötrofil sayısı < 1000/µl) ve persistent (2 haftadan daha uzun süre) nötropenik durumlarda, koruyucu olarak antibiyotiklerin bakteriyel infeksiyonların ortaya çıkmasını azaltmaktadır (Abrams-Ogg, 2000).

KME ile enfekte bir köpekte kuruyucu tedaviye rağmen ateş devam ederse, antibiyotik seçimine kültür ve duyarlılık testleri uygulanmalı, bunlar uygulanamazsa intravenöz florokinolon ve herhangi bir betalaktam (sefazolin 30mg/kg 8 saatte bir intravenöz veya intramuskuler vb gibi) verilmesi uygundur. İki gün içerisinde hala ateş düşmezse metronidazol (15 mg/kg 8 saatte bir intravenöz) verilmesi belirtilmiştir (Myolonakis ve ark, 2010). Yine enfekte köpeklerde Glukokortikoidler hastalığın immun kökenli klinik bulgularını azaltmada tercih edilmektedir (Myolonakis ve ark, 2010; Shipov ve ark, 2008).

Hastalıktan korunmak için yapılması gereken köpeklerde oluşan kene enfestasyonlarına karşı önlem almak ve yaz aylarında kene mücadelesi yapmaktır (Groves ve ark, 1975; Stephen, 2011; Güneş ve ark, 2011). Köpeklerin uluslararası seyahatı dikkatle izlenmeli, iklim ve ekolojik değişikliklerin önemli olduğu unutulmamalıdır (Düzlü ve ark, 2014).

Köpekleri kenelerden korumak için de çeşitli ilaçlar, kremler ( dioxathion, propoxur, fibronil veya carbaryl etken maddeli sprey) veya kene ve pire tasmaları kullanılması gerekmektedir (Stephen, 2011). Ayrıca kenelerin olduğu bölgelerden uzak durulmalı ve kenelerin eldiven yardımı ve doğru teknikler ile kenelerin köpeklerden uzaklaştırılması da hastalığın bulaşını engelleyerek hastalıktan korunmaya katkı sağlayacaktır (Lee, 1980; Costa ve ark, 2007; Stephen, 2011).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvan Materyali

Çalışmaya ait materyal örnekleri, Mart 2018 ve Temmuz 2019 tarihleri arasında sahipleri tarafından tedavi amacıyla Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi kliniklerine getirilmiş farklı ırklardan, değişik yaş ve cinsiyetteki köpeklerden toplanan 100 adet kan örneği oluşturmuştur.

**Tablo 4.** Kan alınan köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımı

Kanı Alınan Köpek Sayısı	Yaş Grubu		Cinsiyet	
	0-3 yaş	3 yaş üstü	Dişi	Erkek
100	55	45	53	47

#### 3.2. Laboratuvar Muayeneleri

Köpeklerin *Vena cephalica antebrachii*'den etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile kaplanmış tüplere yaklaşık 5 ml kan alınmıştır. Kan örneği alınan köpeklerin cinsiyet, yaş, ırk, vücut kondüsyonları, kliniğe getiriliş sebebi ve kene hikayesi olup olmadığı, düzenli antiparazit uygulaması yapıp yapılmadığı kayıt edilmiştir. Mikroskopik muayene için, toplanan kan örneklerinden hızlıca froti hazırlanmıştır. Froti kuruduktan sonra 5 dakika metanol ile fizkasyon işlemine tabi tutulup 5% May-Grunwald Giemsa ile 30 dakika boyanmış ve lamalar mikroskop altında incelenmiştir (Matsuu, 2004). Antikoagulanlı kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Ayrıca toplanan tüm köpek kan örneklerinin genomik DNA izolasyonları yapılmış olup, elde edilen genomik DNA' larda *E.canis* tanısı için uygun primerler kullanılarak PCR yapılmıştır.

### 3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA, her bir EDTA'lı kan örneğinin 200 µl'si ticari bir kit kullanılarak firmanın bildirdiği prosedür uygulanarak elde edilmiştir (İnvitrogen by life Technologies by Thermo Fisher Scientific USA). Bu prosedüre göre kısaca ; Her bir kan örneğinden 200 µl steril 1,5 ml'lik ependorf tüplerine kondu. Üzerlerine 20 µl Proteinase K eklendi ve 20 µl RNase eklenerek vortexlendi ve oda sıcaklığında 2dk inkubasyona bırakıldı. Daha sonra 200 µl PureLink Genomic Lysis /Binding Buffer eklendi ve homejen olana kadar vortexlendi. Daha sonra 55 °C' ye ısıtılmış olan sıcak blokta 10 dk bekletildi. Bloktan alınan örneğin üzerine 200 µl saf etanol eklendi ve vortexlendi. Toplamda yaklaşık 640 µl lizat Pur Link™ Spin Column'a alındı ve 10.000 x g'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atılarak üstteki filtrede kalan kısım yeni ve temiz bir ependorfa geçirildi. Üzerine 500 µl kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonu 1 eklendi ve 1 dk 10.000 x g' de santrifüj edildi. Daha sonra altta kalan kısım yine atıldı ve üstteki filtre yeni bir ependorfa geçirilerek 500 µl yıkama solüsyonu 2 eklenerek 14500 x g'de 3 dk santrifüj edildi. Üstteki filtre yeni bir ependorfa alınarak 100 µl Pure Link Genomic Elution eklendi 14500 x g'de 1 dk santrifüj edildi. Alttaki kısım atılarak üstteki filtre alındı ve DNA'nın saklanacağı yeni bir ependorfa geçirildi 1dk 14500 x g'de santrifüj edildi ve DNA PCR yapılma kadar - 20 °C de saklandı.

### 3.2.2. PCR Uygulaması

Alınan kan örneklerinden PCR yapılmak üzere ticari bir kit (GeneAll® Exgene™ Cell SV Korea) kullanılarak, firmanın bildirdiği prosedüre uyularak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA ların ölçümü Multiskan GO Microplate Spectrophotometer cihazında yapılmıştır. Daha sonra *Ehrlichia* cinsine ait 16 sRNA bölgesini çoğaltan spesifik primerler ECC F(5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3' ve ECB R(5'CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA3') kullanılarak cins düzeyinde PCR yapılmıştır. Tür düzeyinde belirleme yapılması amacıyla nested PCR için ECAN5 F(5'-CAATTATTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') HE3 R(5'TATAGGTACCGTCATTATCTCCCTAT- 3') primerleri kullanılmıştır (Makino ve ark, 2016). Amplifiye olmuş DNA fragmentlerinin büyüklüğünün ölçümü standart marker ile birlikte 1,5 gr agaroz 100 ml 1X TAE (50XTAE; 1 litreye, 242 g Tris,

0.5 M EDTA 100 ml, pH:8) 5 µl Red Safe™ Nucleic Acid Staining Solution (İntron Biotechnology, Korea) kullanılarak yapılmıştır. Bir'er µl Loading Dye 6X Concentrated (Geneaid, New Taipei City, Taiwan ) her bir PCR ürününden 9 µl olacak şekilde loading dye ile karıştırılmıştır. PCR ürünlerinin kaç bp aralığında olduğunu saptamak için 5 µl 100 bp DNA Ladder (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) ilave edilmiştir. Agaroz jeldeki PCR ürünleri 90 volt doğrusal akımda 1 saat elektroforeze tabi tutulmuştur. Bu işlemden sonra jel görüntüleme cihazında (UV transluminatör, UVP EC3 ChemiHR 410 Imaging System) görüntüleri elde edilmiştir. Oluşan bantlar DNA marker ile karşılaştırılarak değerlendirilerek ~458 bp büyüklüğünde görünen bantlar *Ehrlichia* spp. pozitif , ~398 bp büyüklüğünde bant görülmesi durumunda *E. canis* yönünden pozitif olarak değerlendirilmiştir.

PCR şartlarında ise;

95 °C 5 dk başlangıç denatürasyon aşaması

1 siklus;

94 °C 30 s denatürasyon,

57 °C 30 s primer annealing,

34 siklus

72 °C 90 s ekstensiyon aşamaları;

72 °C 5 dk final ekstensiyon aşaması 1 siklus uygulandı.

Her reaksiyona pozitif ve negatif kontrol DNA örnekleri de eklenerek çalışma yapılmıştır. Pozitif DNA örneği daha önce *Ehrlichia canis* olduğu Parazitoloji Anabilim Dalı'nda Nested PCR ile daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen örnekler kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri safe view içeren %1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak PCR ürünlerinin büyüklük ve yüklerine göre ayrılması sağlandı. Jel ultraviyole (UV) ışık altında incelenerek, örneklerin pozitiflikleri kontrol edilmiştir.

### 3.2.3. Mikroskopik İnceleme

EDTA bulunan tüp içinde saptanan kan örneklerinden, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında her bir hayvana ait 2'şer adet sürme preparat hazırlandı. Preparatlar havada kurutularak, metanolde (Merck, Germany) 5 dakika tespit edildi. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında pH: 7.2 olan Giemsa'nın boya tamponu (Gurr, buffer tablets pH: 7.2, BDH, England) ile hazırlanmış %5'lik Giemsa boya solüsyonu (Merck, Germany) içinde 45 dk. süreyle boyandı. Daha sonra preparatlar aynı tampon solüsyonu ile yıkanarak havada kurutuldu ve immersiyon yağı damlatılarak x1000 büyütmede ışık mikroskopunda (Nikon, Japonya) incelendi. Her bir preparat hakkında en az 50 saha gezilerek karar verildi.

### 3.3. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS 22 (Statistical Package for the Social Sciences 22) programı ile yapılmıştır. *E. canis* enfeksiyonunun görülme sıklığı yaş ve cinsiyete göre çapraz tablolar kullanılarak verilmiştir. Gruplar arasında bu sıklıklar bakımından fark bulunup bulunmadığı Fisher Testi ile karşılaştırılmış ve P değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirilmiştir (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1993).

## 4. BULGULAR

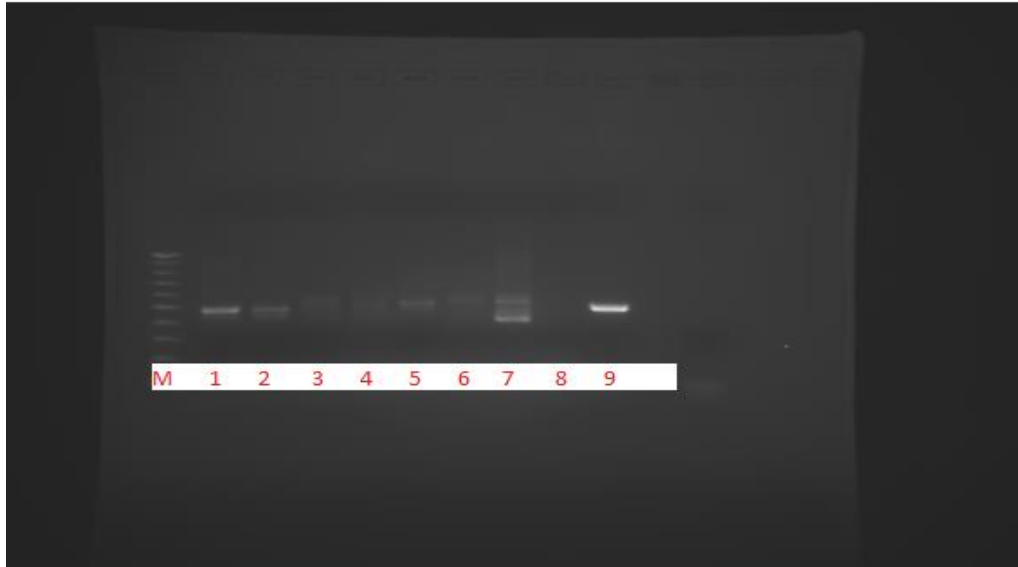
Çalışma sonunda; *Ehrlichia* ile enfekte hayvanları tespit etmek için ECC/ECB primerleri ile genus düzeyinde, ECAN5/HE3 primerleri ile tür düzeyinde PCR'ları yapılan 100 köpeğe ait kan örneklerinin 7'si (%7) pozitif olarak saptanmıştır. Aynı örneklerden hazırlanan sürme kan preparatlarından yapılan mikroskopik incelemelerde ise *Ehrlichia* spp.'a ait herhangi bir gelişme dönemine rastlanılmamıştır (Tablo 2). Ayrıca çalışmaya dahil edilen ve klinik incelemesi yapılan hiçbir köpeğin üzerinde kene tespit edilmemiştir.

**Tablo 5.** Köpeklerde *E.canis*' in Mikroskopik ve Moleküler (PCR) Bakı Sonuçları

Köpek Sayısı	Mikroskobik Bakı	Moleküler Bakı (PCR)
100	-	7

### PCR Bulguları

*Ehrlichia* sp. genus spesifik primerleri kullanılarak yapılan PCR sonunda, 100 köpeğin 7 (%7)' sinde *Ehrlichia* sp.'ye ait DNA tespit edilmiş ve pozitif olarak kaydedilmiştir. (Resim 4-5).



**Resim 5.** ECC/ECB primerleri kullanılarak yapılan ve pozitif olduğu saptanan örneklerin jel görüntüsü ( M: Marker Kuyu 1-7: Örnekler, K8: Negatif kontrol, K9: Pozitif kontrol )

*Ehrlichia canis* tür spesifik primerleri kullanılarak uygulanan Nested-PCR sonucu 7 pozitif sonuç elde edilmiş ve 7 kan örneğinin de *Ehrlichia canis* olduğu saptanmıştır.



**Resim 6.** *Ehrlichia* sp (+) olarak saptanan ve ECAN5/HE3 primerleri kullanılarak yapılan Nested PCR jel görüntüsü

PCR ile *Ehrlichia* pozitif olduğu saptanan köpeklerin yaş ve cinsiyetlere göre dağılımları Tablo 3’de verilmiştir.

**Tablo 6.** Moleküler (PCR) ile pozitif saptanan köpeklerin yaş ve cinsiyet dağılımı

Kulak No	Yaş	Cinsiyet
K-4	10 yaşlı	Dişi
K-20	2 yaşlı	Dişi
K-45	5,5 yaşlı	Dişi
K-52	3 yaşlı	Dişi
K-65	3 aylık	Erkek
K-87	10 aylık	Erkek
K-94	2 yaşlı	Dişi

**Tablo 7.** Yaşın *E. canis* Enfeksiyonuna Etkisi

		Yaş		Total	X <sup>2</sup>	P
		≤ 3 yaş	> 3 yaş			
<i>E. canis</i>	Var	5 <sup>a</sup> (%71,4)	2 <sup>a</sup> (%28,6)	7 (%100,0)	0,821	0,365
	Yok	50 <sup>a</sup> (%53,8)	43 <sup>a</sup> (%46,2)	93 (%100,0)		

**Tablo 8.** Cinsiyetin *E. canis* Enfeksiyonuna Etkisi

		Cinsiyet		Total	X <sup>2</sup>	P
		Erkek	Dişi			
<i>E. canis</i>	Var	2 <sup>a</sup> (%71,4)	5 <sup>a</sup> (%28,6)	7 (%100,0)	1,803	0,179
	Yok	51 <sup>a</sup> (%53,8)	42 <sup>a</sup> (%46,2)	93 (%100,0)		

Yaş ve cinsiyetin, *E. canis* enfeksiyonu üzerine etkisinin incelendiği analizde gözlenen ve beklenen değerlerin benzer olduğu tespit edilerek, yaşın ve cinsiyetin *E. canis* enfeksiyonu üzerine etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Köpek kenesi tarafından taşınan *Ehrlichia canis*' in neden olduğu hastalık, dünyada geniş dağılım göstererek özellikle tropik ve subtropik bölgeler olmak üzere farklı kıtalarda görülmektedir. Türkiye'de *Ehrlichia* spp. üzerine yapılan ve farklı yöntemleri kullanarak *E. canis*'in varlığını ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır. (Waner ve ark, 1996; Waner ve ark, 2001; Ünver ve ark, 2001; Suto ve ark, 2001; Batmaz ve ark, 2001; Erdeğer ve ark, 2003; Karagenç ve ark, 2005; Ünver ve ark, 2005; Tsachev, 2006; Düzlü ve ark, 2014).

Türkiye'de Köpek Monositik Ehrlichiosis üzerine sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar genelde antikor belirlemeye yöneliktir (Batmaz ve ark, 2001; Aslantas ve ark, 2005; Ünver ve ark, 2005; Cihan ve ark, 2010; Yağcı ve ark, 2010; ; Icen ve ark, 2011; Güneş ve ark, 2012). Balıkesir, Bursa, İzmir, Antalya, Adana, Şanlıurfa illerinde yaptıkları çalışmada, 284 köpeğin 59'unda etken saptanmış olup, prevalans % 20,8 olarak rapor edilmiştir. En yüksek prevalansa sahip iller Adana % 65,3 ve İzmir % 40,6' dır (Batmaz ve ark, 2001). Ankara, Aydın, Muğla illerinde 239 köpekte yapılan diğer bir çalışmada ise köpeklerin 162' sinde *E. canis*' in pozitif olduğu ve prevalansın % 67,8 olduğu belirlenmiştir (Erdeğer ve ark, 2002).

Türkiye'de konvansiyonel ve nested PCR tekniği ile Köpek Monositik Ehrlichiosis üzerine yapılmış moleküler çalışmalar mevcuttur (Aysul ve ark, 2012). Düzlü ve ark, 2014 yaptıkları çalışmada köpeklerde ehrlichiosis Türkiye'de ilk kez Real Time PCR ile araştırmış ve 400 köpekte *E. canis* % 14,5 olarak bildirilmiştir. Ege bölgesinde, Manisa, Muğla, Marmaris, Selçuk, Aydın, Bodrum il ve ilçelerinde değişik ırk ve yaştaki 371 köpekte Nested PCR ile yapılan çalışmada 154 köpekte *E. canis*' in pozitif olduğu bildirilmiştir, prevalans % 41,5 olarak saptanmıştır ( Karagenç ve ark, 2005).

Türkiye' de IFAT, dot-ELISA, Snap3dx test kiti ile yapılan serolojik çalışmalarda %4,8 ile %67,8 oranları arasında seropozitiflik saptanmıştır (Batmaz ve ark, 2001; Erdeğer ve ark, 2003; Aslantaş ve ark, 2005; Tuna, 2008; Yağcı ve ark, 2010; İcen ve ark, 2011; Güneş ve ark, 2012; Sarı ve ark, 2013 ). Yine Türkiye' de yapılan moleküler çalışmalarda (Karagenç ve ark, 2005; Ünver ve ark, 2005; Düzlü ve ark, 2014; Çetinkaya ve ark, 2016 ) PCR ile bölgelere göre değişen %11,75 ile % 41,5 oranları arasında *E.canis* saptanmıştır. Bu çalışmada moleküler olarak PCR ile %7 oranında köpeklerde *E.canis*



saptanmış olup bu oran serolojik ve moleküler olarak saptanan oranların alt sınırına yakındır.

Karag n  ve ark, (2005) Ege bölgesinde inceledikleri 371 köpekte Nested-PCR ile %41,5 oranında moleküler pozitiflik belirlemiŐlerdir. Tuna (2008) ise Aydın yöresindeki köpeklerde *Ehrlichia canis*'i serolojik olarak IFAT ile %36,2 oranında saptamıştır. Bu  alıŐmada Aydın yöresindeki köpeklerde %7 oranında PCR ile moleküler pozitiflik saptanmış olup, bu değerin düşük olmasının sebebi, bu çalıŐmadaki köpeklerin sahipli olması ve bunlarda kene mücadelesinin etkili bir Şekilde yapılmış olmasıdır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kenelerin vektörlük yaptığı *Ehrlichia canis*, köpeklerde Köpek Monositik Ehrlichiosis (KME) adı verilen zoonoz karakterli morbidite ve mortalitesi yüksek bir hastalık etkenidir. Tropikal ve subtropikal bölgelerde çok daha fazla görülen bir hastalıktır.

Türkiye’ de köpeklerde yapılan birçok serolojik ve moleküler çalışmalarda *E.canis*’in değişik bölgelerde farklı oranlarda yaygın olduğu saptanmıştır.

Bu çalışma, Aydın ili köpeklerinde *E.canis*’ in mikroskopik ve moleküler (PCR) yaygınlığını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Mart 2018 ve Temmuz 2019 tarihleri arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi hayvan hastanesi kliniklerine getirilen farklı ırklardan değişik yaş ve cinsiyetteki 100 köpekten kan alınmıştır.

Moleküler incelemede 7 köpek (%7)’ te *E.canis* pozitif bulunmuştur. Mikroskopik incelemede ise etken görülmemiştir.

Bu sonuçlar *E.canis*’ in Aydın ilindeki yaygınlığına, köpek ehrlichiosisinin, epidemiyolojisine katkı sağlamıştır. Köpek dış parazit mücadelesi, vektör kaynaklı hastalıklardan korunmada önemli olup, *E.canis*’in bölgedeki vektör kenelerde yaygınlığının araştırılarak, hastalığın tanı ve tedavi prosedürlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

**Abeygunawardena IS, Ristic M, Kakoma I, Smith RD.** In vivo and in vitro studies on platelet migration inhibition factor (PMIF) in canine ehrlichiosis. *Sri Lanka Veterinary Journal* 1990; 37, 33–34.

**Abrams-Ogg A. Neutropenia.** In: Day, M, Mackin, A, Littlewood, J. (Eds): Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. *BSAVA, Hampshire* 2000; 117-129.

**Aguar DM., Cavalcante GT., Pinter A., Gennari SM., Camargo LM., Labruna MB.** Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology* 2007; 44, 126-32.

**Anderson BE, Dawson JE, Jones DC, Wilson KH.** *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29, 2838–2842.

**Anderson S, Burstein SA, Downs T, Friese P, Lynam S, Henthorn J, Epstein RB, Savage K.** Thrombocytopoiesis in normal and sublethally irradiated dogs: response to human interleukin-6. *The American Society of Hematology* 1992; 80, 420–428

**Assarasakorn S, Kaewthamasorn M, Manachai N.** A retrospective study of clinical use of recombinant human erythropoietin for treatment in anemic dogs with canine monocytic ehrlichiosis from an animal hospital in Bangkok, Thailand. *Comparative Clinical Pathology* 2008; 17, 237-243.

**Aysul N., Ural K., Cetinkaya H., Kuşkuç M., Toros G., Eren H., Durum C.** Doxycycline-chloroquine combination for the treatment of canine monocytic ehrlichiosis. *Acta Scientiae Veterinariae* 2012; 40 (2), 1031.

**Aslantaş O., Kılıç S., Caya H.** Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies in Turkey. *Indian Veterinary Journal* 2005; 82, 1246-1247.

- Bacellar F., Dawson JE., Silveira CA., Filipe AR.** Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European Journal of Public Health* 1995; 3(2), 100–102.
- Baneth G, Waner T, Koplak A, Weinstein S, Keysary A** Survey of *Ehrlichia canis* Antibodies among Dogs in Israel, *Veterinary Record* 1996; 138, 257–259.
- Baneth G.** Ehrlichia and Anaplasma Infections. *35th World Small Animal Veterinary Association. 2010 World Small Animal Veterinary Association Congress.*
- Bartsch RC, Greene RT.** Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1996; 10, 271–274.
- Batmaz H, Nevo E, Waner T, Senturk S, Yilmaz Z, Harri S.** Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey. *Veterinary Record* 2001; 148, 665– 666.
- Beugnet F., Marie JL.** Emerging arthropodborne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology* 2009; 163(4), 298-305.
- Botros BA, Elmolla MS, Salib AW, Calamaio CA, Dasch GA, Arthur RR.** Canine ehrlichiosis in Egypt: seroepidemiological survey. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1995; 62, 41–43.
- Breitschwerdt EB.** Rickettsial Disease in Dogs. 1998; [<http://nbb.embory.edu/saint/RickettsialDisease.html>].
- Breitschwerdt EB** *Rickettsial Disease in Dogs.* 1999; [<http://nbb.embory.edu/saint/RickettsialDisease.html>].
- Buhles WC, Ruxsoll DL, Ristic M.** Tropical canine pancytopenia: clinical, haematologic and serologic response of dogs to *E. canis* infection, tetracycline therapy and challenge inoculation. *Journal of Infectious Disease* 1974; 130, 358-367.
- Carrade D., Foley J., Michael S., Foley W., Sykes E.** Spatial distribution on seroprevalance for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Dirofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon and California. *Veterinary Clinical Pathology* 2011; 40(3), 293-302.

**Christova I., Van De Pol J., Yazar S., Velo R., Schouls L.** Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group *Rickettsiae* in ticks from Southeastern Europe. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 2003; 22(9), 535-542.

**Cihan H., Temizel EM., Davoust B.** Silent threat: subclinical canine monocytic ehrlichiosis in stray dogs in Turkey. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2010; 29, 15-19.

**Codner EC, Farri-Smith LL.** Characterization of the subclinical phase of Ehrlichiosis in dogs. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 1986; 189(1), 47–50.

**Costa LM., Rembeck K., Ribeiro MFB., Beeltz P., Pfister K., Maria L., Passos F.** Sero-prevalence and risk indicators for canine Ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. *Veterinary Journal* 2007; 174, 673-676.

**Çetinkaya H, Matur E, Akyazı İ, Ekiz EE, Aydın L, Toparlak M.** Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace Region of Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2016; 7 (5), 706-714.

**Daniel B. Fishbein, MD; Jacqueline E. Dawson, MS; Laura E. Robinson, DVM, MS.** Human Ehrlichiosis in the United States, 1985 to 1990. *Annals of Internal Medicine* 1994; 120 (9), 736-743.

**Davoust B., Bourry O., Gomez J., Lafay L., Casali F., Leroy E.** Daniel Parzy Surveys on Seroprevalence of Canine Monocytic Ehrlichiosis among Dogs Living in the Ivory Coast and Gabon and Evaluation of a Quick Commercial Test Kit DotELISA. *Annals of New York Academy of Science* 1078: 2006; 464–469.

**De la Fuente J, Massung RF, Wong SJ.** Sequence analysis of the *msp4* gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43, 1309–1317.

**Diniz PP, de Moraes HS, Bretschwerdt EB, Schwartz DS.** Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22, 1136-1143.

**Dodurka T., Bakirel U.** Bir köpekte ehrlichiosis olgusu. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2002; 28(1), 11-16.

**Donatien A, Lestoquard F.** State of the present knowledge concerning rickettsiosis of animals. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie Institut Pasteur d'Algérie* 1937; 15, 142–187.

**Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51, 2145–2165.

**Düzlü Ö, İnci A, Yildirim A, Önder Z, Çilolu A.** Köpeklerde kene kaynaklı bazı protozoon ve rickettsial enfeksiyonların Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2014; 61, 275282.

**Eddlestone S, Neer T, Gaunt S, Corstvet R, Gill A, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt E.**(2006). Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced *E. canis* infection in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 840-844.

**Elias E.:** Diagnosis of Ehrlichiosis from the Presence of Inclusion Bodies or Morulae of *E. canis*. *Journal of Small Animal Practice* 1991; 33, 540-543.

**Erdeğer J, Sancak A, Ataseven L.** Köpeklerde *Ehrlichia canis*'in indirekt Floresan Antikor (IFA) Testi ve Dot-ELISA ile Saptanması, *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2003; 27, 767–773.

**Faria JLM, Munhoz TD, Joao CF, Vargas-Hernandez G, Andre MR, Pereira AB, Machado RZ, Tinucci-Costa ME.** *Ehrlichia canis* (Jaboticabal strain) induces the expression of TNF-  $\alpha$  in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 2010; 20(1), 71-74.

**Farkas R., Gyurkovszky M., Lukacs Z., Aladics B., Solzmosi N.** Seroprevalence of some vectorborne infections of dogs in Hungary. *Vector-Borne Zoonot*, 2014 14(4), 256-260.

**Fecava Federation of European Companion Animal Veterinary Associations,** Working Group on Canine vector borne diseases, Ehrlichiosis in dogs. 2019; Erişim [[https://www.fecava.org/wp-content/uploads/2019/03/CVBD\\_Ehrlichiosis\\_190225.pdf](https://www.fecava.org/wp-content/uploads/2019/03/CVBD_Ehrlichiosis_190225.pdf)].

**Feldman BF, Zinkl JG, Jain CN.** Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: *Lippincott Wilkins* 2000; 5, 1344.

**George LM., Ewingb SA., Whitwortha LC., Foxb JC., Kocanb AA.** A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary Parasitology* 1998; 79, 325–339.

**Ghorbel A., Ben Am., Diwani E., Ghram A., Landolsi F., Messaadi I., Zrelli S., Chabchoub A.** Incidence and seroprevalence of canine Ehrlichiosis in the Medjez El Bab region Northwestern Tunisia during 1994, 1995 and 1996. *Arch Inst Pasteur Tunis* 2001; 78(1–4), 41–47.

**Giudice E, Giannetto C, Gianesella M.** Effect of desmopressin on immune-mediated haemorrhagic disorders due to canine monocytic ehrlichiosis: a preliminary study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2010; 33(6), 610-4.

**Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ.** Geographic, clinical, serologic, and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34, 44–48.

**Groves MG, Dennis GL, Amyx HL, Huxsoll DL.** Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *American Journal of Veterinary Research* 1975; 36, 937-940.

**Güneş, T., Poyraz, Ö., Babacan, A.** Sinop yöresinde, klinik olarak sağlıklı görülen köpeklerde *Ehrlichia canis* ve *Rickettsia conorii*'nin seroepidemiolojik araştırılması. *Cumhuriyet Tıp Dergisi* 2012; 34, 17-22.

**Harrus S, Bark H, Waner T.** Canine Monocytic Ehrlichiosis: An Update. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 1997; 19, 431–441.

**Harrus S., Waner T., Aizenberg I., Bark H.** Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monositic ehrlichiosis: evaluation of a 6 week course. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36, 2140-2142.

**Harrus S, Waner T, Aizenberg I, Jongegejan F, Cornelissen AWCA.** Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37, 2745–2749.

**Harrus S., AllemaN A., Bark H., Mahan S., Waner T.** Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Microbiology*, 2002; 86(4): 361-368

**Harrus S, Waner T.** Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Veterinary Journal* 2011; 187, 292–296.

**Hegarty BC, de Paiva DPP, Bradley JM, Lorentzen L, Breitschwerdt E.** Clinical relevance of annual screening using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine ehrlichiosis. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2009; 45, 118–124.

**Hildebrandt PK and Nyindo MBA.** Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescen. *Infection and Immunity* 1973; 6, 226–231.

**Huxsoll DL., Hildebrandt PK., Nims RM., Walker JS.** Tropical canine pancytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1970; 15, 1627-1632.

**Icen H., Sekin S., Simsek A., Kochan A., Celik OY., Altas MG.** Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* infection in dogs from Diyarbakir in Turkey. *Asian Journal Animal and Veterinary Advances* 2011; 6, 371-378.

**Johnson, EM, Ewing SA, Barker RW, Fox JC, Crow DW and Kocan K.** Experimental transmission of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) by *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 1998; 74, 277–288.

**Karageneç T., Hoşgör M., Bilgiç H.B., Paşa S., Kırılı G., Eren H.** Ege Bölgesinde Köpeklerde *E. canis*, *A. phagocytophilum* ve *A. platys*' in Prevalansının Nested-PCR ile Tespiti, 14. *Ulusal Parazitoloji Kongresi*, İzmir, 2005; 18-25 Eylül 2005.

**Kelly PJ., Matthewman LA., Mahan SM., Semu SM., Mason PR., Bruce D., Brouqui P., Roullet D.** Reactivity of sera collected from dogs in Mature, Zimbabwe to antigens of *Ehrlichia canis* and *Cowdria ruminantium*. *Veterinary Record* 1994; 134, 498-499.



**Lee HC, Kioi M, Han J.** *Anaplasma phagocytophilum* induced gene expression in bMPV human neutrophils and HL-60 cells. *Genomics* 2008; 92, 144–151.

**Leib MS, Monroe WE.** Ehrlichiosis, *Practical Small Animal Internal Medicine*. W.B. Saunders, 1997; p: 864–869, Philadelphia.

**Lewis DC.** Disorders of platelet number. In: Day, M., Mackin, A., Littlewood J. Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. *The British Small Animal Veterinary Association Hampshire* 2000; 183-195.

**Magnerelli la, Anderson JF.** Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in Northeastern United States. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31, 2857-2860.

**Matthewman LA, Kelly PJ, Mahan SM, Semu D, Tagwira M, Bobade PA, Brouqui P, Mason PR, Raoult D** Western blot and indirect fluorescent antibody testing for antibodies reactive with *Ehrlichia canis* in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe, *Journal of the South Africa Veterinary Association* 1993; 64(3), 111-115.

**Mavromatis K, Doyle CK, Lykidis A, Ivanova N, Francino MP, Chain P, Shin M, Malfatti S, Larimer F, Copeland A, Detter JC, Land M, Richardson PM, Yu XJ, Walker DH, McBride JW, Kyrpides NC.** The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *Journal of Bacteriology* 2006; 188, 4015–4023.

**Milutinović M., Radulović Z.** Ecological notes of ticks (Acari: Ixodidae) in Serbia (Central regions). *Acta Veterinaria Belgrad* 2002; 52(1), 49-58.

**Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides LS, Kontos V, Papadopoulos O, Rallis T, Fytianou A,** Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology* 2003; 91, 197–204.

**Mylonakis ME, Siarkou VI, Koutinas AF.** Myelosuppressive canine monocytic ehrlichiosis (*E. canis*): an update on the pathogenesis, diagnosis and management. *Companion Animal Clinic and Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases* 2010; 65(4).

- M'ghirbi Y., Ghorbel A., Amouri M., Nebaoui A., Haddad S., Bouattour A.** Clinical serological, and molecular evidence of ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Tunisia. *Journal of Parasitology Research* 2009; 104, 767-774.
- Nakaghi HCA, Machado ZR, Costa TM, Andre RM, Baldani DC.** Canin ehrlichiosis: clinical, hamatological, serological and molecular aspectes. *Ciencia Rural Santa Maria* 2008; 38(3), 776-770.
- Ndip LM., Ndip RN., Esemu SN., Dickmu VL., Fokam EB., Walker DH., Mcbride JW.** Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and Ehrlichia ewingi. *Veterinary Microbiology* 2005; 111(1-2), 59-66.
- Neer, T., Breitschwerdt, E., Green, R., Lappin, M.** Consensus statement on ehrlichial diseases of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. *The Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16, 309-315.
- Neer MT, Harrus S.** Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis and wolbachia infection. In: *Greene, C.E. Infectious diseases of the dog and cat* 2006; 203-216.
- Nyindo MBA, Ristic M, Huxsoll DL, Smith AR** Tropical canine pancytopenia: in-vitro cultivation of the causative agent- *Ehrlichia canis*, *American Journal of Veterinary Research* 1971; 32, 1651–1658.
- Nyindo M, Huxsoll DL, Ristic M, Kakoma I, Brown JL, Carson CA, Stephenson EH.** Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *E. canis*. *American Journal of Veterinary Research* 1980; 41, 250–254.
- O'Connor TP, Hanscom JL, Hegarty BC, Groat RG, Breitschwerdt EB.** Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. *American Journal of Veterinary Research* 2006; 67, 206–210.

**Özata F.** *Ehrlichia canis* ve *Anaplasma phagocytophilum* ile infekte köpeklerde trombosit indeksleri; plateletkrit, ortalama trombosit hacmi ve trombosit dağılım genişliği. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2012.

**Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y.** Human Infection with *Ehrlichia canis* Accompanied by Clinical Signs in Venezuela. *Annals of New York Academy of Science* 2006, 1078, 110-117.

**Price JE, Sayer PD** Canine ehrlichiosis. Kirk RW (Ed): Current Veterinary Therapy VIII. WB Saunders Co, 1983; pp: 1197–1202, Philadelphia.

**Rand MS.** Infectious Disease of Cat and Dogs. University of Arizona, Erişim: [[http://Microvet.arizona.edu....s/MIC443/notes/rand/cat\\_dog.html](http://Microvet.arizona.edu....s/MIC443/notes/rand/cat_dog.html)], 1996; p: 20–21.

**Regnery R** Use of DNA probes for differentiation of spotted fever group and other rickettsiae. *Annals of New York Academy of Science* 1990; 590, 422–429.

**Rikihisa Y, Perry BD.** Causative ehrlichial organisms in Potomac horse fever, *Infection and Immunity* 1985; 49(3), 513–517.

**Rikihisa Y, Ewing SA, Fox JC, Siregar, Pasaribu FH, Malole BM.** Analyses of *Ehrlichia canis* and Canine Granulotic Ehrlichia infection, *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30, 143–149.

**Ristic M, Huxsoll DL, Weisiger RM, Hildebrandt PK and Nyindo MBA.** Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescenc, *Infection and Immunity* 1972; 6: 226–231.

**Ristic M , Abeygunawardena IS, Kakoma I, Smith RD** In vivo and in vitro studies on platelet migration inhibition factor (PMIF) in canine ehrlichiosis, *Sri Lanka Veterinary Journal* 1990; 37, 33–34.

**Ristic M** Woldehiwet Z (eds) Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals, 1993; Oxford: Pergamon p: 169.

**Sarı B, Taşçı GT, Kılıç Y.** Seroprevalance of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Iğdır Province, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2013, (19)5, 735-739.

**Sainz, A., Delgado, S., Amusatogui, I., Tesouro, M., Carmanes, P.** Seroprevalance of Canine Ehrlichiosis in Castilla-Leon (North-West Spain). *Preventiye Veterinary Medicine* 1996; 29, 1-7.

**Schaefer JJ, Kahn J, Needham GR, Rikihisa Y, Ewing SA, Stich RW.** Antibiotic clearance of *Ehrlichia canis* from dogs infected by intravenous inoculation of carrier blood. *Annals of New York Academy of Science* 2008; 1149, 263-269.

**Shipov A, Klement, E, Reuveni-Tager, L, Waner T, Harrus S.** Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology* 2008; 153, 131-138.

**Smith R, Ristic M, Huxsoll D, Baylor R.** Platelet kinetics in canine Ehrlichiosis: Evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia. *Infection and Immunity* 1975: 1216-1221.

**Solano-Gallego L, Trotta M, Razia L, Furlanello T, Caldin M.** Molecular Survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from Blood of Dogs in Italy Ann. N.Y. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 1078, 515–518.

**Suksawat J., Hegarty BC., Breitschwerdt EB** Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, and *Ehrlichia risticii* in sick dogs from North Carolina and Virginia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2000; 14(1), 50–55.

**Suto Y, Suto A, Inokuma H, Obayashi H, Hayashi T.** First confirmed canine of *Ehrlichia canis* infection in Japan, *Veterinary Record* 2001; 148, 809-811.

**Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V.** Biyoistatistik 4.baskı, Özdemir Yayıncılık Ltd. Şti, Ankara 1993.

**Taylor MA., Coop RL., Wall RL.** *Veterinary Parasitology. 3. Baskı. Çeviren: Yıldız K Medipress Yayıncılık Ltd. Şti, Malatya* 2013; s, 388-390.

**Torina A, Vicente J, Alongi A.** Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003–2005. *Zoonoses Public Health* 2007; 54, 8–15.

**Trotz-Williams LA., Trees AJ.** Systematic review of the distribution of the major vector borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Record* 2003; 152(4), 97105.

- Tsachev I.** Detection of Antibodies Reactive with *Ehrlichia canis* in a Kennel in Bulgaria. *The Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2006; 30, 425-426.
- Tuna G.** Trombositopenili köpeklerde *Ehrlichia canis* ve *Babesia canis* enfeksiyonlarının prevalansı. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye. 2008.
- Unver A, Ohashi N, Tajima T, Stich R, Grover D, Rikihisa Y.** Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of *Ehrlichia canis* in dogs, ticks, and cell at different temperatures, *Infect Immun*, 2001; 69, 6172–6178.
- Unver A, Rikihisa Y, Borku K, Ozkanlar Y, Hanedan B.** Molecular detection and characterization of *Ehrlichia canis* from dogs in Turkey Berlin München Tierärztl Wochenschr. 2005; 118(7/8), 300–304.
- Vargas-Hernández G., André MR., Faria JLM., Munhoz TD., Hernandez-Rodriguez M., Machado RZ., Tinucci-Costa M.** Molecular and serological detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in dogs in Colombia. *Veterinary Parasitology* 2012; 186(3-4), 254-260.
- Waner T, S Harrus DJ, Weiss H, A Keysary.** Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1995;48, 177–182.
- Waner T, Rosner M, Harrus S, Naveh A, Zass R, Keysar A.** Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute *Ehrlichia canis* infection, *Veterinary Parasitology* 1996; 63, 331–335.
- Waner T, Harrus S, Bark H, Bogin E, Avidor Y, Keysary A.** Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology* 1997; 69, 307-317.
- Waner T, Harrus S, Jongejan F, Bark H, Keysary A.** Cornelissen AW: Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*, *Veterinary Parasitology* 2001; 95, 1–15.
- Waner, T., Keysary, A., Bark, H., Sharabani, E., Harrus, S.:** Canine Monocytic Ehrlichiosis-An Overview. *Israel Journal Veterinary Medicine* 1999; 54, 103-107.

**Waner T., Harrus S.** Anemia of inflammatory disease, Schalm's Veterinary Hematology, Ed. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2000; p, 205-209.

**Watanabe M., Okuda M., Tsuji M. and Inokuma H.** Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Veterinary Parasitology* 2004; 124, 101–107.

**Wen, B., Rikihisa, Y., Mott, J., Greene, R., Kim, H., Zhi, N., Couto, G., Unver, A., Bartsch, R.** Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35, 1852-1855

**Woody BJ, Hoskins JD.** Ehrlichial diseases in dogs *Veterinary Clinics of North America* 1991; 21, 75-98.

**Yağcı BB., Duru SY., Yıldız K., Ocal N., Gazyağcı AN.** The spread of canine monocytic ehrlichiosis in Turkey to central Anatolia. *Isr J Vet Med*, 2010; 65: 15-18. Detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35, 1852-1855

**Woody BJ, Hoskins JD.** Ehrlichial diseases in dogs. *Veterinary Clinics of North America* 1991; 21, 75-98.

**Yağcı BB., Duru SY., Yıldız K., Ocal N., Gazyağcı AN.** The spread of canine monocytic ehrlichiosis in Turkey to central Anatolia. *Isr J Vet Med*, 2010; 65: 15-18.

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : BİNGÖL NİZAMETTİN  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum Yeri ve Tarihi**: BAHÇELİEVLER / 01.10.1991  
**Telefon** : 0505 798 18 58  
**E-mail** : ronaybnl@gmail.com  
**Yabancı Dil** : İngilizce

### EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi	2013

### İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Unvan
2013-2015	Aydın Fen Bilimleri Dersanesi	Biyoloji Öğretmeni
2015-2016	Final Temel Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2016-2018	Değişim Özel Öğretim Kursu	Biyoloji Öğretmeni
2018-	Ege Alfa Özel Öğretim Kursu	Kurucu