

Köpeklerde kene kaynaklı bazı protozoon ve rickettsial enfeksiyonların Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları

Önder DÜZLÜ, Abdullah İNCİ, Alparslan YILDIRIM, Zuhâl ÖNDER, Arif ÇİLOĞLU

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Özet: Bu çalışma, Kayseri yöresinde köpeklerden toplanmış 400 kan örneğinde *Babesia canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* ve *Anaplasma phagocytophilum*'un Real Time PCR'la araştırılması ve izolatların moleküler karakterizasyonları amacıyla yapılmıştır. Real Time PCR sonuçlarında; *E. canis*, *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis* ve *B. canis vogeli* prevalansı sırasıyla %14,5, %12,0, %9,0, %7,8, %5,3 ve %2,3 bulunmuş olup *B. canis rossi*'ye rastlanmamıştır. Örneklerin 182'si (%89,7) tek türle, 21'i (%10,3) iki türle enfekte saptanmıştır. *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* izolatlarının 18S rRNA gen bölgesine ait sekanslarının dünyadaki aynı türden diğer izolatlarla ikili kıyaslamalarında %1,4±0,2, %0,3±0,2 ve %0,9±0,3 genetik farklılık saptanmıştır. *E. canis* için 16S rRNA gen bölgesi yönünden üç izolatın kendi aralarında %100 identik olduğu, dünyadaki izolatlarla ise %0,1 farklılık gösterdiği; *A. phagocytophilum* için ankA gen bölgesi yönünden üç izolatın kendi aralarında %99,8±0,2 identik olduğu, dünyadaki izolatlarla ise %0,9±0,3 farklılık gösterdiği; *H. canis* için 18S rRNA geni yönünden iki izolatın kendi aralarında %100 identik olduğu, dünyadaki izolatlarla ise %0,2±0,1 farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmayla Kayseri yöresinde köpeklerde kene kaynaklı protozoon ve rickettsial enfeksiyonların moleküler prevalansları saptanmış ve enfeksiyonlara yol açan türlerin çeşitli gen bölgeleri analiz edilerek moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Tüm izolatların Genbank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Anaplasmosis, babesiosis, ehrlichiosis, hepatozoonosis, köpek, moleküler karakterizasyon, Real Time PCR.

The investigation of some tick-borne protozoon and rickettsial infections in dogs by Real Time PCR and the molecular characterizations of the detected isolates

Summary: This study was conducted to investigate *Babesia canis vogeli*, *B. canis canis*, *B. canis rossi*, *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* species, and to determine the molecular characterizations of the isolates in totally 400 whole blood samples of dogs in Kayseri region. According to the Real Time PCR results, the prevalence of *E. canis*, *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis*, and *B. canis vogeli* was detected as 14.5%, 12.0%, 9.0%, 7.8%, 5.3%, and 2.3%, respectively while *B. canis rossi* was not detected in the examined samples. 182 (89.7%) out of the 400 samples were found to be infected with a single parasite species, and 21 (10.3%) were found to be infected with two species. According to the pairwise comparisons of 18S rRNA gene region of the isolates under *B. canis canis*, *B. canis vogeli* and *B. gibsoni*, 1.4±0.2%, 0.3±0.2%, and 0.9±0.3% genetic distance were detected with the other similar isolates from the world, respectively. Based on the 16S rRNA gene sequence alignments, 100% identity was found among the 3 isolates of *E. canis* while 0.1% genetic difference was determined with the isolates from the world. With respect to ankA gene region of *A. phagocytophilum*, 99.8±0.2% identity and 0.9±0.3% genetic difference were found among the 3 isolates obtained from Kayseri region and the isolates from the world, respectively. The 2 *H. canis* isolates were showed 100% identity to each other and 0.2±0.1% genetic difference were determined with the other isolates from the world with respect to 18S rRNA gene region. In conclusion, the molecular prevalence of tick-borne protozoon and rickettsial infections in dogs in Kayseri region was determined and the molecular characterizations of the obtained isolates were performed by analyzing the various gene regions in this study. All isolates were recorded to GenBank.

Key words: Anaplasmosis, babesiosis, dog, ehrlichiosis, hepatozoonosis, molecular characterization, Real Time PCR.

Giriş

Kene kaynaklı patojenler, tüm dünyada yaygın olup evcil ve yabani hayvanlarda klinik ve subklinik enfeksiyonlar oluşturarak ölüm ve verim kayıplarına neden olmaktadır. Bunlardan kenelerle nakledilen babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis

köpek enfeksiyözleri içerisinde önemli yere sahiptir. Gelişen dünyada pet hayvanlarının bir aile ferdi gibi sahiplenilme eğilimi artmaktadır. Özellikle tropikal iklim kuşağında yer alan ülkelerde artış gösteren bu eğilim kenelerle nakledilen enfeksiyonların yayılışını kolaylaştırmakta ve halk sağlığı açısından önem kazanmaktadır.

Diğer yandan uluslararası turizm ve seyahat aktivitelerinin artması ve yaygınlaşması köpeklerde “emerging infectious diseases” olarak ifade edilen kene kaynaklı enfeksiyonlar üzerindeki ilgiyi artırmıştır. Son yıllarda köpeklerde bu hastalıkların moleküler epizootiyolojileri ile ilgili önemli bilgilerin elde edildiği ve birçok yeni etkenin tanımlandığı görülmektedir (12, 24, 36, 38). Türkiye’de köpeklerde kenelerle nakledilen babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis, ehrlichiosis’in varlığı, etiyojisi ve moleküler epidemiyolojileri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışma, Kayseri yöresinde köpeklerin periferel tam kan örneklerinde *B.canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossii*, *B. gibsoni*, *H. canis*, *A.phagocytophilum* ve *E. canis*’in Real Time PCR’la moleküler olarak araştırılması, pozitif örneklerin çeşitli gen bölgelerinin sekanslanıp filogenetik analizlerinin ve GenBank kayıtlarının gerçekleştirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Hayvan materyali ve kan örnekleri: Çalışmanın materyalini, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon (ERÜBAP) Biriminin VA-05-04 ve TÜBİTAK’ın 1040302 kodlu projeleri kapsamında Kayseri’nin çeşitli bölgelerindeki köpeklerden toplanmış ve -20°C’de muhafaza edilen toplam 400 adet EDTA’lı periferel kan örneği oluşturmuştur. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’ndan (12.01.2011 tarihli ve 11/07 sayılı karar) etik kurul onayı alınmıştır.

Genomik DNA ekstraksiyonu: Köpek kanlarından DNA ekstraksiyonu otomatik DNA/RNA ekstraksiyon sisteminde (Bioneer Exiprep™ 16) gerçekleştirilmiştir. Son konsantrasyon 50µl olarak ayarlanmış, genomik DNA yoğunluğu nanodrop spektrofotometrede (ACT

Gene ASP-3700) ölçülmüş ve ekstraktlar analize tabi tutulana kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Real Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) analizleri: Real Time PCR analizlerinde kullanılan primer ve prob lar Tablo 1’de gösterilmiştir. *Babesia canis vogeli* ve *B. canis canis* için heat shock protein 70 (hsp70), *B. canis rossii* ve *H.canis* için 18S rRNA, *B. gibsoni* için thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), *E. canis* için 16S rRNA ve *A. phagocytophilum* için merozoite surface protein-2 (msp2) gen bölgelerine özgü primer ve prob lar kullanılmıştır.

Primer ve prob lar qPCR master mixleri ile hazırlanıp genomik DNA’lar eklenmiş ve final master mix 20µl hacimde Real Time PCR (Stratagene, Mx-3005P) cihazında işlenmiştir. Sonuçlar MxPro™ ET QPCR (Stratagene, 401467) yazılımında değerlendirilmiştir. Real Time PCR için termal profil 95 °C 2dk 1 siklus ve 45 siklus, 94 °C 10sn, 55-59 °C 30s, 72 °C 20s olarak ayarlanmıştır. Her reaksiyon için pozitif kontrol olarak referans genomik DNA’lar, negatif kontrol olarak da steril deiyonize su kullanılmıştır. Real Time PCR ile örneklerdeki pozitiflikler ve kantitatif değerler, amplifikasyon eğrileri ve Ct (dR) (eşik değer siklusu) verilerine göre hesaplanmış ve değerlendirilmiştir.

Sekans ve filogenetik analizler: *Babesia* türleri yönünden pozitif belirlenen izolatların analizinde 18S rRNA gen bölgesi için Bab7 ve Bab9 (15), *E. canis* 16S rRNA gen bölgesi için EC16-F2 ve EC16-R2 (20), *A. phagocytophilum* ankA gen bölgesi için LA6 ve LA1 (48) ve *H. canis* 18S rRNA gen bölgesi için HepF ve HepR (22) primerleri kullanılarak PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon için pozitif kontrol olarak referans genomik DNA’lar, negatif kontrol olarak da steril deiyonize su kullanılmıştır. Jel üzerinde uygun konsantrasyonda belirlenen ampikonlar jelden pürifiye

Tablo 1. Real Time PCR’da kullanılan tür spesifik primer ve işaretli prob lar.
Table 1. Species specific primers and probes.

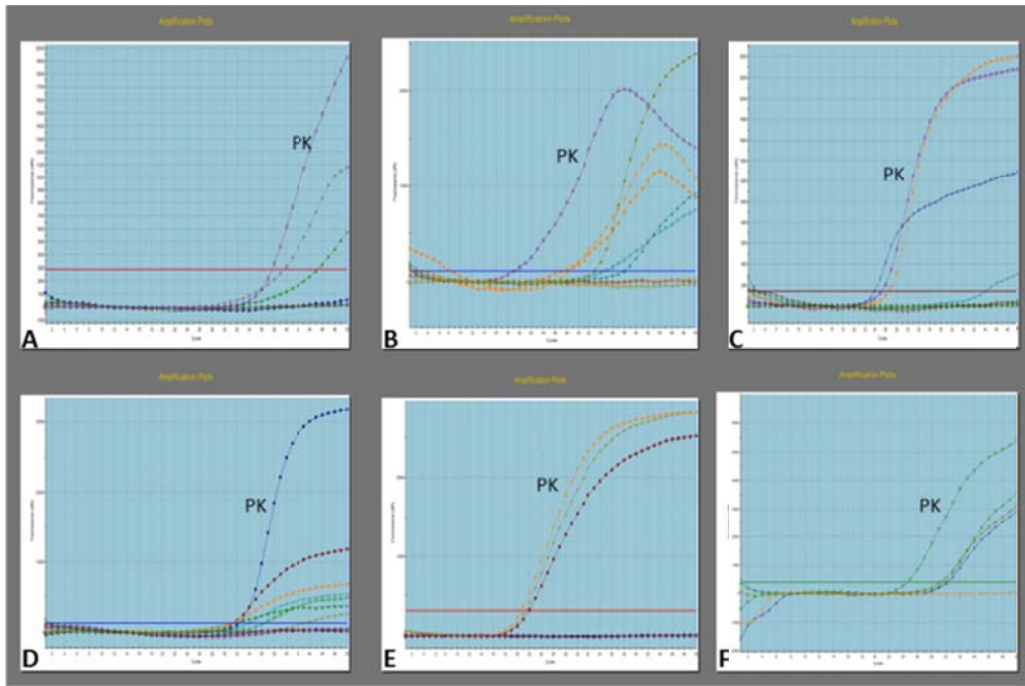
	Primer	Prob	Kaynak
<i>B. canis vogeli</i>	HSP70 F 5'-GTCATCACTGTGCCTG CGTACT-3' HSP70 R 5'- GCATGACGTTGAGA CCGCAAT-3'	HSP70 P 5' FAM-AGCGCCAGGC CACCAAGGACGCT-3'-BHQ1	36
<i>B. canis canis</i>	HSP70 F 5'-ACGCCAACGGTAT CTTGAAC -3' HSP70 R 5'- CAACCATACGCTC AATGTCG -3'	HSP70 P 5' HEX-ATCACCAACGAC AAGGGTCGTCTCA -BHQ1	(orijinal dizayn)
<i>B. canis rossii</i>	18S F 5'-AGGTCGTCGTTTGTGTT GACC-3' 18S R 5'- TTTCAGCCTTGCGACC ATAC -3'	18 S P 5' CY3-ATCAAAGTCTTTGG GTTCCCTGGGGG-3'-BHQ2	(orijinal dizayn)
<i>B. gibsoni</i>	TRAP F 5'- TGTACCCAAACCACGA CAGA -3' TRAP R 5'- TCTTCCCAATGTCC AGAG -3'	TRAP P ROX 5'- ROX-GTGAGT GACAGTGCAGTGGC-3' BHQ2	(orijinal dizayn)
<i>E. canis</i>	16S F 5'- TCGCTATTAGATGAGC CTACGT-3' 16S R 5' GAGTCTGGACCGTATC TCAGT-3'	16S P 5' FAM-GTCTGAGAGGAC GATCAGCCACACT-3'- BHQ1	36
<i>H. canis</i>	18S F 5'-CGCGAAATTACCCAATT-3' 18S R 5'- CAGACCGGTTACTTTTYA GCAG-3'	18S P HEX 5'-TATCAATTGGA GGGCAAGTCTGGTGC-3'- BHQ1	12
<i>A. phagocytophilum</i>	ApMSP2 F 5'-ATGGAAGGTAGT GTTGGTTATGGTATT-3' ApMSP2 R 5'-TTGGTCTTGAAGC GCTCGTA-3'	ApMSP2 P HEX 5'-TGGTGCCAG GGTTGAGCTTGAGATTG- 3' BHQ1	11

edilmiştir. Pürifikasyon sonrası her tür için ilgili primer çiftleriyle sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen izolatların Geneious (14) yazılımı ile forward ve revers dizilimlerin hizalamaları yapılarak final dizilimler elde edilmiştir. Sekansların blastn analizleri yapılmış ve identiklik oranlarına göre benzer diğer izolatlarla Mega 5.0 (40) ve Geneious 6 (14) yazılımlarında ClustalW algoritmasıyla çoklu hizalamaları gerçekleştirilmiştir (42). Filogenetik ağaçların oluşturulmasında Mega 5.0 (40) yazılımında neighbor-joining metodu kullanılmış ve “bootstrap” değeri 1000 replikasyon olarak alınmıştır. Nükleotid farklılıklarına göre evrimsel uzaklıkların belirlenmesinde “Kimura-2 parameter” modeli kullanılmıştır (41).

Bulgular

Real Time PCR sonuçları ve enfeksiyonların prevalansı: Toplam 400 köpekten 203’ü (%50,7) bir veya birden fazla protozoon ve/veya rickettsial enfeksiyonlar yönünden pozitif bulunmuştur (Şekil 1). Pozitiflerin araştırma merkezlerine göre dağılımı Tablo 2’de verilmiştir.

E. canis %14,5 ile en yaygın tür belirlenmiş olup bunu sırasıyla %12,0, %9,0, %7,8, %5,3 ve %2,3 ile *B. canis canis*, *B. gibsoni*, *A. phagocytophilum*, *H. canis* ve *Babesia canis vogeli* takip etmiş, *B. canis rossii*’ye rastlanmamıştır. Pozitif örneklerin 182’si (%89,7) tek türle, 21’i (%10,3) iki türle enfekte saptanmıştır. Pozitiflerin 12’si *B. gibsoni*+*B. canis canis*, 4’ü *H. canis*+*B. canis canis*, 3’ü *A. phagocytophilum*+*H. canis*,



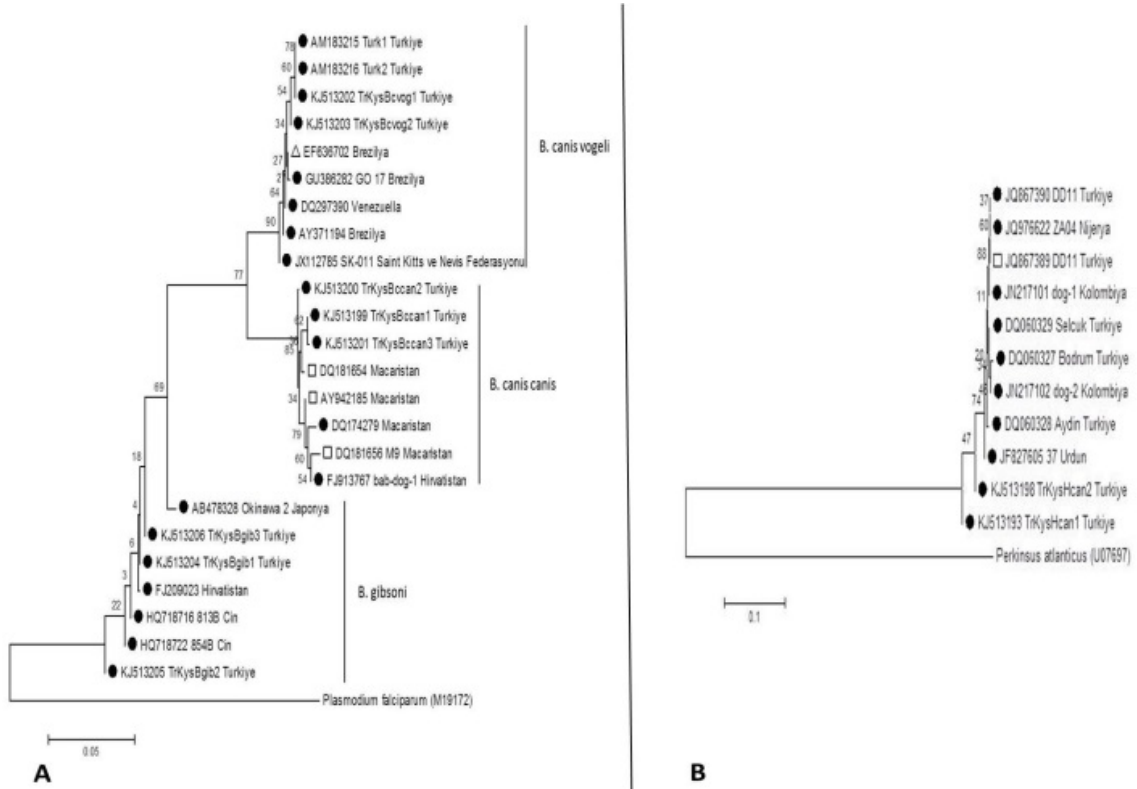
Şekil 1. Real Time PCR analiz sonuçları, (A) *B. canis canis*, (B) *B. canis vogeli*, (C) *B. gibsoni*, (D) *E. canis*, (E) *A. phagocytophilum*, (F) *H. canis*, PK: Pozitif Kontrol.

Figure 1. The results of Real Time PCR analyses (A) *B. canis canis*, (B) *B. canis vogeli*, (C) *B. gibsoni*, (D) *E. canis*, (E) *A. phagocytophilum*, (F) *H. canis*, PK: Positive control.

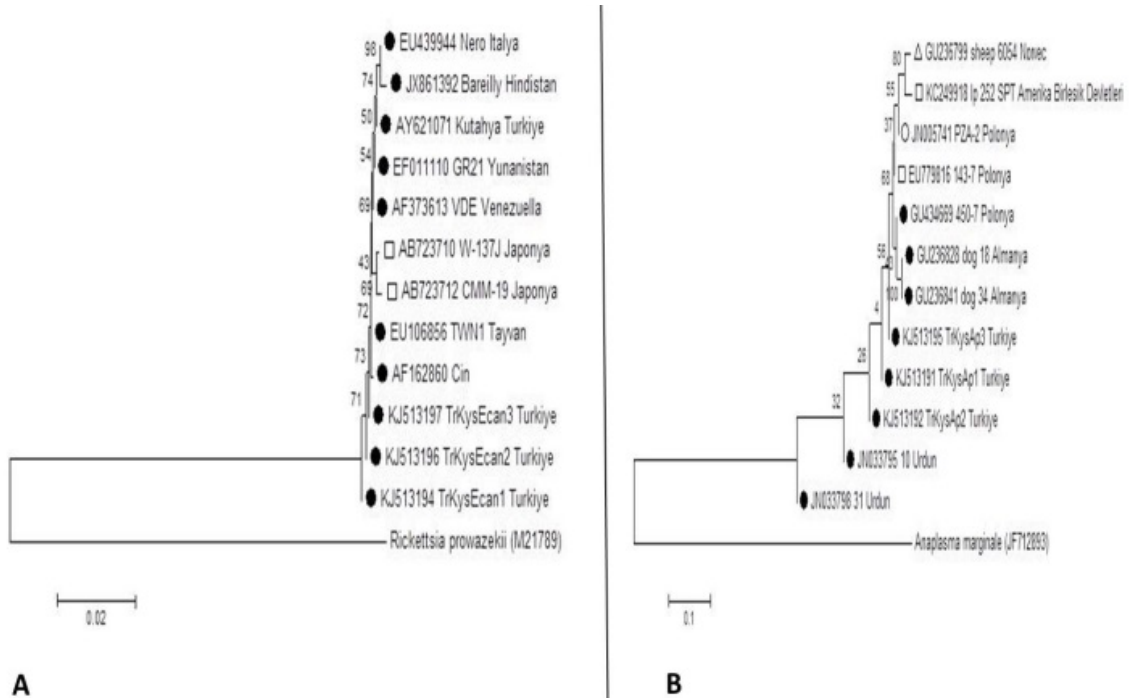
Tablo 2. İncelenen köpeklerde kene kaynaklı protozoon ve rickettsial enfeksiyonlar yönünden pozitif belirlenen örneklerin araştırma merkezlerine göre dağılımı.

Table 2. The prevalence of tick-borne protozoon and rickettsial infections in dogs according to the localizations.

Araştırma Merkezi	Hyv sysı	Protozoon ve Rickettsial Türler														TOPLAM	
		<i>H. canis</i>		<i>B. gibsoni</i>		<i>B. canis canis</i>		<i>B. canis vogeli</i>		<i>B. canis rossii</i>		<i>E. canis</i>		<i>A. phagocytophilum</i>			
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Kayseri Merkez	200	12	6,0	17	8,5	22	11,0	3	1,5	0	0	34	17,0	18	9,0	106	53,0
İncesu	49	3	6,1	6	12,2	8	16,3	2	4,1	0	0	6	12,2	4	8,2	29	59,1
Pınarbaşı	26	0	0,0	3	11,5	4	15,4	1	3,8	0	0	3	11,5	2	7,7	13	50,0
Felahiye	25	2	8,0	2	8,0	3	12,0	0	0,0	0	0	3	12,0	2	8,0	12	48,0
Talas	46	2	4,3	3	6,5	4	8,7	1	2,2	0	0	5	10,9	3	6,5	18	39,1
Tomarza	24	0	0,0	2	8,3	3	12,5	0	0,0	0	0	3	12,5	0	0,0	8	33,3
Yahyalı	30	2	6,7	3	10,0	4	13,3	2	6,7	0	0	4	13,3	2	6,7	17	56,7
TOPLAM	400	21	5,3	36	9,0	48	12,0	9	2,3	0	0	58	14,5	31	7,8	203	50,7



Şekil 2. Köpeklerde saptanan *Babesia* izolatları (A) ile *H. canis* izolatlarının (B) GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatlarla filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli), Semboller; □: Kene, ●: Köpek, Δ: Kedi
Figure 2. The phylogenetic relationships of *Babesia* isolates (A) and *H. canis* isolates (B) with the other similar isolates deposited in GenBank (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter model), Symbols; □: Tick, ●: Dog, Δ: Cat



Şekil 3. Köpeklerde saptanan *E. canis* izolatları (A) ile *A. phagocytophilum* izolatlarının (B) GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatlarla filogenetik akrabalıkları (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter modeli), Semboller; □: Vaşhi kedi, ●: Köpek (A), □: Kene, ●: Köpek, ○: Vaşhi ruminant, Δ: Koyun, ■: Yaban domuzu (B).
Figure 3. The phylogenetic relationships of *E. canis* isolates (A) and *A. phagocytophilum* isolates (B) with the other similar isolates deposited in GenBank (Neighbour Joining - Kimura 2 Parameter model), Symbols; □: Wild cat, ●: Dog (A), □: Tick, ●: Dog, ○: Wild ruminant, Δ: Sheep, ■: Wild boar (B).

2'si *E. canis*+*B. gibsoni* miks bulunmuştur. *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni*, *E. canis*, *A. phagocytophilum* ve *H. canis* pozitif belirlenen örnekler için Ct (dR) değerleri sırasıyla 32,2±0,8, 31,6±2,2, 33,4±0,9, 34,0±0,8, 34,2±1,0 ve 34,4±1,1 olarak belirlenmiştir.

Sekans ve filogenetik analiz sonuçları: Jelde amplifikasyon gösteren ve uygun konsantrasyonda belirlenen *B. canis canis* için 3 (TrKysBccan1-3), *B. canis vogeli* için 2 (TrKysBcvog1-2), *B. gibsoni* için de 3 (TrKysBgib1-3) izolatın sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. TrKysBccan1-3, TrKysBcvog1-2 ve TrKysBgib1-3 izolatlarının ilgili gen bölgelerine göre ikili kıyaslamalarında kendi aralarında ve dünyadaki izolatlarla aralarında sırasıyla %1,4±0,2, %0,3±0,2 ve %0,9±0,3 genetik farklılık saptanmıştır. *B. canis canis* ve *B. canis vogeli* grupları arasında %5,9±1,1, *B. canis canis* ve *B. gibsoni* grupları arasında %14,1±1,7 ve *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* grupları arasında ise %14,9±1,4 genetik farklılık saptanmıştır. *H. canis* TrKysHcan1 ve TrKysHcan2 izolatlarının 18S rRNA gen bölgesi açısından kendi aralarında %100 identik oldukları, dünyadaki izolatlarla aralarında ise %0,2±0,1 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Köpeklerde saptanan *Babesia* izolatları ile *H. canis* izolatlarının Dünyadan filogenetik analizlere dahil edilen diğer izolatlarla neighbor joining metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri Şekil 2'de verilmiştir.

E. canis TrKysEcan1-3 izolatlarının 16S rRNA gen bölgesine göre kendi aralarında %100 identiklik gösterdiği, dünyadaki izolatlarla aralarında %0,1 farklılık bulunduğu saptanmıştır. *A. phagocytophilum* TrKysAp1-3 izolatları, ankA gen bölgesine göre kendi aralarında %99,8±0,2 identik bulunmuş, dünyadan filogenetik analizlere dahil edilen diğer izolatlarla ise aralarında %0,9±0,3 genetik farklılık saptanmıştır. *E. canis* izolatları ile *A. phagocytophilum* izolatlarının filogenetik ağaç üzerinde yerleşimleri Şekil 3'de verilmiştir. Tüm protozoon ve rickettsial pozitif izolatların GenBank kayıtları gerçekleştirilmiş olup GenBank aksesyon numaraları filogenetik ağaçlar üzerinde Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde köpeklerde kene kaynaklı patojenlerin varlığı ve yaygınlıklarının bilinmesi, gerekli tedavi, kontrol ve korunma tedbirleri için moleküler epizootiyolojilerinin ortaya konması önemlidir. Özellikle uluslararası seyahat aktivitelerinin artması, insanların seyahatlerinde köpeklerini yanlarında götürmeleri, iklim ve ekolojik değişiklikler enfeksiyonların global yayılmasına imkan sağlayarak risk potansiyelini artırmaktadır. Bu çerçevede köpeklerde klinik ve subklinik seyirli babesiosis, hepatozoonosis, anaplasmosis ve ehrlichiosis gibi kenelerle

nakledilen enfeksiyonların takipleri gereklidir (12, 24, 36, 38).

Köpek babesiosis'inin teşhisinde günümüze kadar konvansiyonel PCR, Nested PCR, PCR-RFLP gibi moleküler yöntemler kullanılmıştır (7, 12, 13, 18, 23, 28, 34, 43). Real Time PCR sahip olduğu yüksek sensitivite, DNA'nın başarılı ve tekrarlanabilir olarak ölçülebilmesi gibi avantajlarıyla son yıllarda birçok patojenin teşhisinde kullanılmaya başlamıştır. Dünyada köpek babesiosis'inin teşhisinde Real Time PCR ile sınırlı çalışma yapılmıştır (1, 10, 30, 37). Bu çalışmalarda köpek babesiosis etkenlerinin 18S rRNA ve internal transcribed spacer (ITS) gen bölgelerine yönelik Real Time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Mevcut çalışmamızda köpeklerde bazı *Babesia* türlerinin TaqMan prob tabanlı Real Time PCR ile identifikasyonu için HSP70 gen bölgesi hedef olarak seçilmiştir. HSP70 geni sahip olduğu yüksek düzeyde korunmuşluk özelliğiyle filogenetik çalışmalarda hedef bölge tercih edilmiştir (39, 51). Nitekim çalışmamızda bu gen bölgesinden dizayn edilen türe özgü prob dizilerinin *B. canis canis*, *B. canis rossi* ve *B. gibsoni* için Real Time PCR'da tür spesifik reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu sonuçlar sekans analizleriyle de teyit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada *B. canis canis* %12,0, *Babesia gibsoni* %9,0 ve *B. canis vogeli* %2,3 tespit edilmiş olup *B. canis rossi*'ye rastlanmamıştır. Çalışmada *Babesia* türleriyle miks enfeksiyonlar da belirlenmiştir. Türkiye'de köpek babesiosis'inin moleküler teşhisinde konvansiyonel PCR ve reverse line blotting (RLB) yöntemleriyle sınırlı çalışmalar yapılmıştır (4, 5, 17, 18, 31). Mevcut çalışmamızda saptanan *B. canis vogeli* prevalansının, Aydın'dan bildirilen (5) sonuçlarla paralel olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda uygun konsantrasyondaki izolatların sekans ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. *B. canis canis*, *B. canis vogeli* ve *B. gibsoni* izolatlarının pairwise kıyaslamalarında kendi aralarında ve dünyadaki benzer izolatlarla aralarında sırasıyla %1,4±0,2, %0,3±0,2 ve %0,9±0,3 genetik farklılık saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen *B. canis canis* TrKysBccan1 ve TrKysBccan3 izolatları, en yüksek identikliği %99,5 ile Macaristan'da bir köpekte *Dermacentor reticulatus*'tan izole edilen *B. canis canis* izolatıyla (DQ181656); TrKysBccan2 izolatı ise %99,7 ile hem bir önceki Macaristan izolatı (DQ181656) hem de Macaristan'da diğer bir köpektan çıkarılmış *D. reticulatus*'tan izole edilen diğer bir *B. canis canis* izolatıyla (AY942185) gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada izole edilen *B. canis vogeli* TrKysBcvog1 izolatı, İstanbul'da iki köpektan izole edilen Turk1 (AM183215) ve Turk2 (AM183216) izolatları ile %100 identiklik gösterirken; TrKysBcvog2 izolatı ise en yüksek identikliği %99,8 ile Brezilya'da bir köpek (AY371194) ve kediden (EF636702), Venezuela'da bir köpektan (DQ297390) ve Saint Kitts ve Nevis Federasyonu'nda bir köpektan

(JX112785) izole edilmiş *B. canis vogeli* ile vermiştir. Ayrıca bu çalışmada *B. gibsoni* TrKysBgib2 ve TrKysBgib3 izolatları, Çin'de iki köpekten izole edilmiş *B. gibsoni* 813B (HQ718716) ile 854B (HQ718722) ve Hırvatistan'da bir köpekten elde edilmiş *B. gibsoni* (FJ209023) izolatlarıyla %100 identik bulunmuşlardır. TrKysBgib1 izolatu ise ilgili izolatlarla [Çin (HQ718716, HQ718722) ve Hırvatistan (FJ209023) izolatları] %99,8 identik bulunmuştur.

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) etkeni *E. canis*'in tropik ve subtropik bölgelerde sıklıkla görüldüğü rapor edilmiştir (16). CME'nin teşhisinde son zamanlarda PCR tabanlı moleküler teknikler kullanılmış olup *E. canis*'in farklı genotiplerinin ayırımında en yaygın 16S rRNA gen bölgesinin kullanıldığı bildirilmiştir (49). Türkiye'de CME üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup bunlar ağırlıklı olarak antikör saptamaya yönelik olmuştur (2, 6, 9, 19, 21, 44, 50). Bunun yanında, Türkiye'de konvansiyonel ve nested PCR teknikleri kullanılarak CME üzerine yapılmış birkaç moleküler çalışma da rapor edilmiştir (3). Mevcut çalışmamızda köpeklerde ehrlichiosis Türkiye'de ilk kez Real Time PCR ile araştırılmış ve 400 köpekte *E. canis* %14,5 ile en yaygın tür belirlenmiştir. Bu sonuç, Türkiye'deki bazı serolojik çalışmalarda (2, 19, 50) bildirilen prevalans oranlarına paralel bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada *E. canis* için ortalama Ct (dR) değeri 34,0±0,8 olarak bulunmuş olup bu değer *E. canis* enfeksiyonlarının yüksek parazitemi ile seyretmediğini göstermiştir. Çalışmamızda 16S rRNA gen bölgesine göre *E. canis* izolatları arasında nükleotid farklılıklarının oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. *E. canis* izolatlarının (TrKysEcan1-3) ikili kıyaslamalarında kendi aralarında %100 identiklik, dünyadan diğer izolatlarla aralarında ise %0,1 genetik farklılık bulunmuştur. TrKysEcan1-3 izolatlarının Venezuela (AF373613), Türkiye (AY621071), Yunanistan (EF011110), Tayvan (EU106856) ve İtalya'da (EU439944) köpeklerden bildirilen izolatlarla %100,0 identik olduğu görülmüştür.

Köpeklerde granülositik anaplasmosis etkeni *A. phagocytophilum*'un teşhisinde 16S rRNA gen bölgesi en yaygın kullanılan bölge olarak rapor edilmiştir (27). Türkiye'de köpeklerde *A. phagocytophilum* moleküler prevalansı üzerine tek bir konvansiyonel PCR çalışması yapılmış ve 10 köpeğin 4'ünde pozitiflik bildirilmiştir (35). Mevcut çalışmamızda ise, Courtney ve ark. (11) tarafından msp2 gen bölgesinden dizayn edilmiş primerler ve TaqMan probu kullanılmış olup *A. phagocytophilum* prevalansı %7,8 bulunmuştur. *A. phagocytophilum*'un filogenetik analizleri için kullanılan Anka gen bölgesinin konak nötrofillerini manüple etme yeteneğine sahip olması ve konservatif yapı göstermesi dolayısıyla filogenetik çalışmalarda en çok tercih edilen gen bölgelerinden biri olduğu rapor edilmiştir (8, 29, 33). Çalışmamızda belirlenen izolatların (TrKysAp1-3) Anka

gen bölgesine göre filogenetik analizinde kendi aralarında %99,8±0,2 identiklik, dünyadaki diğer izolatlarla ise %0,9±0,3 genetik farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. TrKysAp1 ve TrKysAp2 izolatlarının Polonya'da vahşi bir ruminanttan izole edilen PZA-2 izolatıyla (JN005741), TrKysAp3 izolatının Almanya'da köpekten, Polonya'da yaban domuzundan ve Ürdün'den köpeklerden izole edilen sırasıyla dog-34 (GU236841), 450-7 (GU434669), 10 (JN033795) ve 31 (JN033798) izolatlarıyla en yüksek identikliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Canine hepatozoonosis'inden (CH) sorumlu *H. canis*'in teşhisinde en yaygın kullanılan gen bölgelerinin başında 18S rRNA gen bölgesi gelmektedir (32, 46). Türkiye'de köpeklerde *H. canis* üzerine çeşitli mikroskopik çalışmalar yapılmıştır (25, 26, 35, 47). Öte yandan konvansiyonel PCR tabanlı yapılan tek çalışmada (25) ise prevalansın %25,8 olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmamızda köpeklerde *H. canis*'in varlığı Türkiye'de ilk kez Real Time PCR yöntemiyle araştırılmış ve pozitiflik %5,3, Ct (dR) değeri 34,4±1,1 bulunmuştur. Bu değer, *H. canis* enfeksiyonlarının yüksek parazitemi ile seyretmediğini göstermiştir. Çalışmamızda 18S rRNA gen bölgesine göre *H. canis* (TrKysHcan1-2) izolatlarının ikili kıyaslamalarında kendi aralarında %100 identiklik, dünyadan diğer izolatlarla aralarında ise %0,2±0,1 genetik farklılık bulunmuştur. TrKysHcan1-2 izolatlarının Ürdün (JF827605), Türkiye (JQ867390, DQ060327) ve Nijerya'da (JQ976622) köpeklerden bildirilen izolatlarla %100,0 identik oldukları görülmüştür.

Sonuç olarak bu çalışmayla Türkiye'de ilk kez, Kayseri yöresinde köpeklerin kene kaynaklı protozoon ve rickettsial enfeksiyonlarının moleküler prevalansları Real Time PCR'la belirlenmiş ve enfeksiyona yol açan bazı türlerin çeşitli gen bölgelerinin filogenetik analizleri yapılarak GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Teşekkür

Araştırmacılar, TSA-11-3439 kod numaralı proje desteği için ERÜBAP Birimi'ne, pozitif kontrol temini için İtalya Zooprofilattico Sperimentale Enstitüsü'ne, Adnan Menderes Üniversitesi ve Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dallarına teşekkür ederler. Bu çalışma 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (29 Eylül-5 Ekim 2013, Denizli) sunulmuştur.

Kaynaklar

1. Adaszek L, Winiarczyk S (2008): *Molecular characterization of Babesia canis canis isolates from naturally infected dogs in Poland*. Vet Parasitol, **152**, 235-241.
2. Aslantas O, Kilic S, Caya H (2005): *Seroprevalence of Ehrlichia canis antibodies in Turkey*. Indian Vet J, **82**, 1246-1247.
3. Aysul N, Ural K, Cetinkaya H, Kuşkuç M, Toros G, Eren H, Durum C (2012): *Doxycycline-chloroquine combination for the treatment of canine monocytic ehrlichiosis*. Acta Sci Vet, **40**, 1031.

4. **Aysul N, Ural K, Ulutaş B, Eren H, Karagenc T** (2013): *First detection and molecular identification of Babesia gibsoni in two dogs from the Aydın Province of Turkey.* Turk J Vet Anim Sci, **37**, 226-229.
5. **Aysul N** (2006): *İstanbul ile köpeklerinde bulunan Babesia türlerinin teşhisinde mikroskopik ve PCR-RLB bulgularının karşılaştırılması.* Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
6. **Batmaz H, Nevo E, Waner T, Sentürk S, Yılmaz Z, Harrus S** (2001): *Seroprevalence of Ehrlichia canis antibodies among dogs in Turkey.* Vet Rec, **148**, 665-666.
7. **Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB** (2003): *Development and evaluation of a semi-nested PCR for detection and differentiation of Babesia gibsoni (Asian genotype) and B. canis DNA in canine blood samples.* J Clin Microbiol, **41**, 4172-4177.
8. **Caturegli P, Asanovich KM, Walls JJ, Bakken JS, Madigan JE, Popov VL, Dumler JS** (2000): *ankA: an Ehrlichia phagocytophila group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats.* Infect Immun, **68**, 5277-5283.
9. **Cihan H, Temizel EM, Davoust B** (2010): *Silent threat: subclinical canine monocytic ehrlichiosis in stray dogs in Turkey.* UÜ Vet Fak Derg, **29**, 15-19.
10. **Costa LM Jr, Zahler-Rinder M, Ribeiro MF, Rembeck K, Rabelo EM, Pfister K, Passos LM** (2012): *Use of a Real Time PCR for detecting subspecies of Babesia canis.* Vet Parasitol, **188**, 160-163.
11. **Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF** (2004): *Multiplex real-time PCR for detection of anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi.* J Clin Microbiol, **42**, 3164-3168.
12. **Criado-Fornelio A, Rey-Valeiron C, Buling A, Barba-Carretero JC, Jefferies R, Irwin P** (2007): *New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain.* Vet Parasitol, **144**, 261-269.
13. **De Sa´ AG, Cerqueira AMF, O´dwyer LH, Macieria DB, Abreu FS, Ferreira RF, Pereira AM, Velho PB, Almosny NRP** (2006): *Detection and molecular characterization of Babesia canis vogeli from naturally infected Brazilian dogs.* Int J Appl Res Vet Med, **4**, 163-168.
14. **Drummond AJ, Ashton B, Buxton S**, Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com> (11.11.2013).
15. **Duarte SC, Parente JA, Pereira M, Soares CM, Linhares GF** (2011): *Phylogenetic characterization of Babesia canis vogeli in dogs in the state of Goiás, Brazil.* Rev Bras Parasitol Vet, **20**, 274-280.
16. **Ewing SA** (1972): *Geographic distribution and tick transmission of Ehrlichia canis.* J Med Entomol, **9**, 597-598.
17. **Gökçe E, Kırmızıgül AH, Taşçı GT, Uzlu E, Gündüz N, Vatansever Z** (2012): *Köpeklerde Babesia canis canis'in klinik ve parazitolojik olarak tespiti: Türkiye'den ilk rapor.* Kafkas Univ Vet Fak Derg, **19**, 717-720.
18. **Gülanber A, Gorenflot A, Schettters TP, Carey B** (2006): *First molecular diagnosis of Babesia vogeli in domestic dogs from Turkey.* Vet Parasitol, **139**, 224-230.
19. **Güneş T, Poyraz Ö, Babacan A** (2012): *Sinop yöresinde, klinik olarak sağlıklı görülen köpeklerde Ehrlichia canis ve Rickettsia conorii'nin seroepidemiolojik araştırılması.* Cumhuriyet Tıp Derg, **34**, 17-22.
20. **Hsieh YC, Lee CC, Tsang CL, Chung YT** (2010): *Detection and characterization of four novel genotypes of Ehrlichia canis from dogs.* Vet Microbiol, **146**, 70-75.
21. **Icen H, Sekin S, Simsek A, Kochan A, Celik OY, Altas MG** (2011): *Prevalence of Dirofilaria immitis, Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi infection in dogs from Diyarbakir in Turkey.* Asian J Anim Vet Adv, **6**, 371-378.
22. **Inokuma H, Okuda M, Ohno K, Shimoda K, Onishini T** (2002): *Analysis of the 18S RNA gene sequence of a Hepatozoon detected in two Japanese dogs.* Vet Parasitol, **106**, 265-271.
23. **Inokuma H, Yoshizaki Y, Matsumoto K, Okuda M, Onishi T, Nakagome K, Kosugi R, Hirakawa M** (2004): *Molecular survey of Babesia infection in dogs in Okinawa, Japan.* Vet Parasitol, **121**, 341-346.
24. **Irwin PJ** (2009): *Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control.* Parasites and Vectors, **2**, 51-54.
25. **Karagenc TI, Pasa S, Kirli G, Hosgor M, Bilgic HB, Ozon YH, Atasoy A, Eren H** (2006): *A parasitological, molecular and serological survey of Hepatozoon canis infection in dogs around the Aegean coast of Turkey.* Vet Parasitol, **135**, 113-119.
26. **Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C, Seyrek K** (2005): *Dogs with Hepatozoon canis respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide.* Vet Parasitol, **131**, 15-21.
27. **Kirtz G, Meli M, Leidinger E, Ludwig P, Thum D, Czettel B, Kölbl S, Lutz H** (2005): *Anaplasma phagocytophilum infection in a dog: identifying the causative agent using PCR.* J Small Anim Pract, **46**, 300-303.
28. **Martin AR, Dunstan RH, Roberts TK, Brown GK** (2006): *Babesia canis vogeli: a novel PCR for its detection in dogs in Australia.* Exp Parasitol, **112**, 63-65.
29. **Massung RF, Owens JH, Ross D, Reed KD, Petrovec M, Bjoersdorff A, Coughlin RT, Beltz GA, Murphy CI** (2000): *Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae.* J Clin Microbiol, **38**, 2917-2922.
30. **Matsuo A, Ono S, Ikada H, Uchida T, Imamura S, Onuma M, Okano S, Higuchi S** (2005): *Development of a SYBR green real-time polymerase chain reaction assay for quantitative detection of Babesia gibsoni (Asian genotype) DNA.* J Vet Diagn Invest, **17**, 569-573.
31. **Müller H, Aysul N, Liu Z, Salih DA, Karagenc T, Beyer D, Kullmann B, Ahmed JS, Seitzer U** (2010): *Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid diagnosis of Babesia canis infections.* Transbound Emerg Dis, **57**, 63-65.
32. **O'Dwyer LH** (2011): *Brazilian canine hepatozoonosis.* Rev Bras Parasitol Vet, **20**, 181-193.
33. **Park J, Kim KJ, Choi KS, Garb DJ, Dumler JS** (2004): *Anaplasma phagocytophilum Anka binds to granulocyte DNA and nuclear proteins.* Cell Microbiol, **6**, 743-751.
34. **Passos LMF, Geiger SM, Ribeiro MFB, Pfister K, Zahler-Rinder M** (2005): *First molecular detection of Babesia vogeli in dogs from Brazil.* Vet Parasitol, **127**, 81-85.
35. **Paşa S, Kiral F, Karagenc T, Atasoy A, Seyrek K** (2009): *Description of dogs naturally infected with Hepatozoon canis in the Aegean region of Turkey.* Turk J Vet Anim Sci, **33**, 289-295.

36. **Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S** (2010): *Multiplex real-time qPCR for the detection of Ehrlichia canis and Babesia canis vogeli*. Vet Parasitol, **173**, 292-299.
37. **Schaarschmidt D, Trächsel M, Achermann R, Hartelt K, Oehme R, Müller W** (2006): *Importance of PCR for the diagnostics of canine babesiosis*. Schweiz Arch Tierheilkd, **148**, 633-640.
38. **Shaw ES, Day MJ** (2005): *Arthropod-borne infectious diseases of the dogs and cats*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 1-150.
39. **Skotarczak B** (2008): *Babesiosis as a disease of people and dogs. Molecular diagnostics: a review*. Vet Med Czech, **53**, 229-235.
40. **Tamura K, Peterson D, Peterson N** (2011): *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*, Molecular Biology and Evolution.
41. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007): *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, **24**, 1596-1599.
42. **Thompson JD, Plewniak F, Poch O** (1999): *A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs*. Nucleic Acids Research, **27**, 2682-2690.
43. **Trapp SM, Messick JB, Vidotto O, Jojima FS, Morais HSA** (2006): *Babesia gibsoni genotype A ' sia in dogs from Brazil*. Vet Parasitol, **141**, 177-180.
44. **Unver A, Rikihisa Y, Borku K, Ozkanlar Y, Hanedan B** (2005): *Molecular detection and characterization of Ehrlichia canis from dogs in Turkey*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, **118**, 300-304.
45. **Vargas-Hernandez G, André MR, Munhoz TD, Faria JM, Machado RZ, Tinucci-Costa M** (2012): *Molecular characterization of Hepatozoon canis in dogs from Colombia*. Parasitol Res, **110**, 489-492.
46. **Vojta L, Mrljak V, Curkovic S, Zivicnjak T, Marinculić A, Beck R** (2009): *Molecular epizootiology of canine hepatozoonosis in Croatia*. Int J Parasitol, **39**, 1129-1136.
47. **Voyvoda H, Pasa S, Uner A** (2004): *Clinical Hepatozoon canis infection in a dog in Turkey*. J Small Anim Pract, **45**, 613-617.
48. **Walls JS, Caturegli OP, Bakken JS, Asanovich KM, Dumler JS** (2000): *Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using epank1 genes of Ehrlichia phagocytophila-group ehrlichiae*. J Clin Microbiol, **38**, 354-356.
49. **Warner CK, Dawson JE** (1996): *Genus and species-level identification of Ehrlichia species by PCR and sequencing*. 100-105. In: Persing DH (ed.), PCR protocols for emerging infectious diseases. ASM Press, Washington, DC.
50. **Yağci BB, Duru SY, Yildiz K, Öcal N, Gazyağci AN** (2010): *The spread of canine monocytic ehrlichiosis in Turkey to central Anatolia*. Isr J Vet Med, **65**, 15-18.
51. **Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, Shaw SE, Aktas M, Yabsley MJ, Yamato O, Maede Y** (2007): *Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of Babesia parasites from dogs*. Vet Parasitol, **145**, 217-227.

Geliş tarihi: 20.01.2014 / Kabul tarihi: 10.04.2014

Yazışma adresi:

Yrd. Doç. Dr. Önder Düzlü
Erciyes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Parazitoloji Anabilim Dalı
Melikgazi, Kayseri
e-mail: onderduzlu@erciyes.edu.tr