

Kocaeli Sokak Köpeklerinde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı

Gülden SÖNMEZ TAMER¹, Erdal POLAT², Seray ÖZENSOY TÖZ³, Kemal ALTAŞ²

¹Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli,
²Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı , İstanbul,
³Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi , Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZET: Visseral leishmaniasis (VL) de en önemli rezervuar, köpeklerdir. Bu çalışmada, Kocaeli ili Köseköy beldesinde yaşayan ve Kocaeli dışına hiç çıkmayan bir yaşındaki erkek çocuğa VL tanısı konulduktan sonra bu bölgedeki köpeklerde leishmaniasis (KanL) prevalansının saptanması amaçlanmıştır. Altmış beş sokak köpeğinden alınan serum örnekleri indirekt fluoressan antikor testi (IFAT) ve ELISA ile değerlendirilmiştir. IFAT ve ELISA ile iki (%3,07) köpek seropozitif saptanmıştır. Bu iki köpektan alınan lenf aspirasyon materyallerinin birinde *Leishmania* amastigotları görülmüş, diğerinde görülmemiş ancak NNN besiyerine ekim sonrası üreme olmuştur. İlimizde KanL prevalansını saptamak amacıyla yapılan ilk çalışma olup bu konuya dikkat çekilmek istenmiş ve hastalığın kontrolü için gerekli önlemlerin alınması planlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Visseral leishmaniasis, köpek, tanı, Kocaeli

Seroprevalence of Visceral Leishmaniasis in Stray Dogs in Kocaeli

SUMMARY: Dogs are the most important reservoir of visceral leishmaniasis (VL). A male child who lives in Köseköy in Kocaeli was diagnosed with VL. Since this child had never been outside Kocaeli, serum samples of 65 stray dogs were analyzed for canine VL using the indirect fluorescence antibody test (IFAT) and ELISA. Two dogs (3.07%) tested positive with both ELISA and IFAT. *Leishmania* amastigotes were observed in the lymph aspiration material from one of them. Growth was observed in NNN medium inoculated with lymph aspiration material from the other dog. This was the first study investigating canine VL prevalence in our city and plans were made for control of the disease.

Key Words: Visseral leishmaniasis, dog, diagnosis, Kocaeli, Turkey.

GİRİŞ

Dünyada yaklaşık her yıl 500.000 yeni insan olgusunun eklendiği visseral leishmaniasis (VL) tropikal ve subtropikal bölgelerde endemik olarak görülmektedir (4). Ülkemizde insanlarda görülen VL'in doğadaki rezervuarlığını yapan köpekler hastalığın bir bölgede endemik veya sporadik olgularla devam etmesinde önemli rolü oynamaktadır (4, 5).

Kanin Leishmaniasisde (KanL) en sık görülen klinik bulgular; eksfoliyatif dermatit ve ülserasyon gibi non-pruritik deri lezyonları, lokal ve yaygın lenfadenopati, anoreksi, kilo kaybı, anemi, halsizlik ve okuler bozukluklardır (4). Bu belirtiler enfeksiyondan aylar veya yıllar sonra gelişebilmektedir (13).

KanL tanısında Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Direct Agglutination Test (DAT) ve Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT) gibi serolojik yöntemler ve direkt etkene yönelik tetkikler kullanılmaktadır (5, 7). Western blot analizi ise düşük antikor titreleri varlığında göz önünde tutulmaktadır. Özellikle 12, 14, 24, 29, 48 ve 68 kDa ağırlığındaki bantların tanıda değerli olduğu bildirilmektedir (22). Ayrıca tanıda *Leishmania* spp. DNA'sının Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespit edilmesi ve hızlı bir test olan rK39'un kullanılması da son derece değerlidir (12, 21).

İnsan VL olgularının görüldüğü bölgelerde köpeklerin serolojik ve parazitolojik testlerle taranarak incelenmesi, sonuçlara göre uygun yaklaşımın seçilmesi insan enfeksiyonlarında önemli derecede azalmalara neden olacaktır.

Bu çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde bir yaşındaki çocuğa VL tanısı konulması üzerine bu hastanın yerleşim bölgesi olan Köseköy çevresindeki köpeklerde bu enfeksiyonun prevalansının saptanması amaçlanmıştır.

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 23 Mayıs/23 May 2008

Düzeltilme tarihi/Revision date: 12 Haziran/12 June 2008

Kabul tarihi/Accepted date: 16 Haziran/16 June 2008

Yazışma /Corresponding Author: Gülden Sönmez Tamer

Tel: (+90) (262) 303 75 40 Fax: (+90) (262) 303 70 03

E-mail: guldensonmez@hotmail.com

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, farklı yaş ve cinsiyetten toplam 65 köpek değerlendirilmiştir. Altmış beş köpeğin 34'ü erkek, 31'i dişi olup, yaşları 0-14 arasında değişmekteydi. Köpeklerin tümü Köseköy çevresinden sağlanmıştır. Örneklerin toplanması, 1-30 Mayıs 2003 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Leishmaniasisin serolojik tanısı için her bir köpekten koagulanlı tüplere 5'er ml kan alınmıştır. Alınan kanlar oda ısısında 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmış ve daha sonra kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır. Bu serumlarda IFAT ve ELISA çalışılmıştır. IFAT'da antikor titresi 1/128 ve üzeri olan serumlar pozitif, 1/64 olanlar ise şüpheli pozitif olarak kabul edilmiştir (1). ELISA (Ridascreen Biopharm, Germany) kiti prosedürüne uygun olarak çalışılmıştır.

Seropozitif saptanan köpeklerin popliteal lenf bezlerinden aspirasyon örnekleri alınarak lam üzerine yayma ve NNN besiyerine ekim yapılmıştır. Lenfadenopati saptanan köpeklerin lenf bezinden aspirasyon yapılarak yayma preparat hazırlanmış ve Giemsa ile boyanarak amastigotlar araştırılmıştır. Ayrıca klinik bulgusu olan köpeklerin bilgileri not edilmiştir.

İstatistiksel analiz ise ki-kare ve Fisher'in kesin ki-kare testleri ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada 65 köpeğin IFAT ve ELISA ile anti-*Leishmania* antikorlarının araştırılması sonucu 2 köpeğin (%3,07) seropozitif olduğu tespit edilmiştir. İki köpeğin IFAT ile yapılan testinde anti-*Leishmania* antikor titrelerinin 1/128 ve 1/512 olduğu belirlenmiştir. İncelenen 65 köpeğin 5 (%7,69)'ünün IFAT 1/64 titrede şüpheli pozitif olduğu saptanmıştır. Tablo 1'de IFAT ve ELISA ile anti-*Leishmania* antikor seropozitifliği saptanan Köseköy yöresi sokak köpeklerinin cinsiyete ve yaşa göre dağılımı verilmiştir. Klinik bulgular 3 köpekte LAP, 1 köpekte LAP+deri lezyonları, 9 köpekte ise kepeklenme şeklinde saptanmıştır.

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre cinsiyetler yönünden anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Ayrıca seropozitif tanının konfirmasyonu amacıyla popliteal lenf bezi aspirasyon örneğinin yayma preparatlarının incelenmesi sonucu IFAT 1/512 titrede pozitif köpekte *Leishmania* amastigotları görülmüştür (Tablo 1). Diğer seropozitif örnek NNN besiyerine ekilmiş ve üreme olmuştur. Pozitif olarak saptanan iki köpekten bir tanesi herhangi bir klinik bulgu göstermezken, lenf bezi aspirasyon yayması pozitif olan köpekte deri lezyonları ve lenfadenopati bulguları belirlenmiştir.

TARTIŞMA

KanL ülkemizde genellikle Ege ve Akdeniz başta olmak üzere hemen tüm bölgelerimizde endemik veya sporadik olarak görülmektedir (3, 14-19, 23). Daha önce VL tanısı konan has-

ların buldukları bölgelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda köpeklerde seropozitifliğe rastlanmış ve bir bölümü de parazitolojik olarak doğrulanmıştır (16).

Tablo 1. IFAT ve ELISA ile anti-*Leishmania* antikorları seropozitif saptananlar

| Köpek No | Yaş | Cinsiyet | IFAT | ELISA | Yayma |
|----------|-----|----------|------|-------|-------|
| 1 | 3 | E | 128 | Poz | Neg |
| 2 | 2 | E | 512 | Poz | Poz |

Tablo 2. IFAT ve ELISA anti-*Leishmania* antikorları şüpheli seropozitif saptananlar

| Köpek No | Yaş | Cinsiyet | IFAT | ELISA | Yayma |
|----------|-----|----------|------|-------|-------|
| 1 | 2 | D | 64 | Neg | Neg |
| 2 | 3 | E | 64 | Neg | Neg |
| 3 | 2 | E | 64 | Neg | Neg |
| 4 | 2 | D | 64 | Neg | Neg |
| 5 | 3 | E | 64 | Neg | Neg |

Yurt dışında yapılan bir çalışmada Mancianti ve ark. (10) İtalya'nın Elba adasında IFAT ile 914 köpeğin 175'ini seropozitif olarak saptamışlardır. Brezilya'da KanL'in endemik olduğu bölgelerde hastalığın %1-67 arasında değiştiği bildirilmiştir (20). Ayrıca VL'in Fransa, Yunanistan, Portekiz, İtalya, Malta ve İsrail'de endemik olarak bulunduğu ve prevalansın %1,1 ile %37 arasında değiştiği saptanmıştır (24). Dünya Sağlık Örgütü tarafından Türkiye'de 1150 köpeğin %1,6'sında seropozitiflik bulunduğu bildirilmiştir (24). Özbel ve ark. (14) Manisa ve yöresinde KanL açısından yaptıkları epidemiyolojik bir çalışmada köpeklerin %7'sinde seropozitiflik saptamışlardır (14). Özbel ve ark. (15) yapmış oldukları bir diğer çalışmada 490 köpeğin 26'sında (%5,3) anti-*Leishmania* antikorlarını seropozitif olarak saptamışlardır. Seropozitif köpeklerin %19'unda klinik semptomların görüldüğü ancak seropozitiflik titresi ile klinik semptomlar arasında bir ilişki bulunmadığını belirttilmiştir (15). Kamburgil ve ark. (9) İstanbul'da 50 sokak köpeğinde IFAT ile seropozitiflik saptayamadıklarını belirtmişlerdir. İstanbul'da köpeklerde yapılan bir çalışmada da 152 serum örneği IFAT ile anti-*Leishmania infantum* IgG antikorları yönünden incelenmiş ve köpeklerin tamamı seronegatif bulunmuştur (6). Taylan ve ark. (23) Sakarya'da KanL prevalansını saptamak amacıyla 69 sokak köpeğinden aldıkları serum örneğini IFAT ile değerlendirmişler, 1 (%1,45) örneği 1/128 titrede pozitif, 3 (%4,35) örneği ise 1/64 titrede şüpheli pozitif olarak tespit edilmiştir. Klinik semptomların bu köpeklerde saptanmadığını ancak asemptomatik hayvanlarında hastalığın yayılımında rezervuar olabileceklerini belirtmişlerdir. Türkiye'de başlatılan rezervuarlarla ilgili çalışmalar kapsamında, İzmir ili Karaburun ilçesinde 55 sahipli köpekten alınan serum örnekleri IFAT, Whole-ELISA ve rK39-ELISA testleri ile *Leishmania* antikorları açısından

araştırılmıştır. Köpeklerin 7 (%23)'si seropozitif olarak tespit edilmiş ve tanı parazitolojik olarak lenf aspiratından hazırlanan yayma preparatlarda amastigotların görülmesiyle doğrulanmıştır. Urla'da klinik olarak KanL açısından şüpheli 90 köpekte yapılan bir çalışmada %27 oranında seropozitiflik saptanmıştır (19). Karabük'te 25 köpeğe IFAT, rK39 ELISA ve DAT uygulanmış, IFAT ile 5 köpek seropozitif olarak saptanırken DAT ile bu 5 köpeklerden 3 tanesinin, rK39 ELISA ile 2 tanesinin seropozitif olduğu belirlenmiştir. Her üç testte de pozitif bulunan iki köpekte yayma preparatlarda *Leishmania* amastigotları görülerek tanı parazitolojik olarak onaylanmış ve KanL prevalansı %8 olarak bildirilmiştir (16).

Ege bölgesi için rezervuar olduğu saptanan köpeklerden izole edilen *Leishmania* suşları Southern blot hibridizasyon yöntemi ile *Leishmania infantum* olarak saptanmıştır (14).

Coşkun ve ark. (3) Bursa'da köpeklerde VL seroprevalansını IFAT ile %4,3 olarak bildirmişlerdir. Urfa, Manisa ve Karabük'ten toplanmış 494 köpek serumunun 19'u (%3,85) rK39 ELISA, mikroskopik ya da kültür ile KanL açısından pozitif bulunmuştur (18).

KanL'in IFAT ile tanısında bazı araştırmacılar 1/40 ve yukarı titreleri pozitif kabul ederken (9, 11) bir kısmında 1/128 ve yukarı titreleri pozitif olarak değerlendirmişlerdir (1). Bizim çalışmamızda da 1/128 ve üzeri titreler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda IFAT ve ELISA ile anti-*Leishmania* antikorları araştırılan 65 sokak köpeğinden 2 (%3,07)'sinin seropozitif olduğu tespit edilmiştir. Köpeklerden ikisi IFAT 1/128 ve 1/512 titrasyonlarda pozitif (%3,07), beşi (%7,69) ise IFAT 1/64 titrasyonda şüpheli pozitif olarak saptanmıştır. Araştırmamızın sonuçları Akdeniz ülkelerinde yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Köpek VL'inde cinsiyete bağlı bir farklılığın olmadığı bildirilmektedir. Ancak yaşın ilerlemesine bağlı olarak köpeklerin enfektif vektörlere daha çok maruz kalmaları nedeniyle yaş ilerledikçe enfeksiyon oranının artabileceği belirtilmiştir (23). Bu çalışmada, cinsiyetler ve pozitif saptanan olgular arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır ($p>0.05$).

Özetle KanL'in tanısı aspirasyon ve biyopsi örneklerinde sitolojik ve histopatolojik olarak, doku örneklerinde parazitin görülmesiyle, anti-*Leishmania* antikorlarının serolojik olarak saptanmasıyla, parazitin kültürüyle veya *Leishmania* DNA'sının taze veya formalinle fikse dokularda veya enfekte hayvanın kan örneğinde PCR ile belirlenmesiyle konmaktadır (4). KanL'de erken tanı konulması hastalığın daha fazla yayılmasını engellemek açısından büyük önem taşımaktadır. *Leishmania* ile enfekte olan köpeklerin yaklaşık yarısında klinik bulguların bulunmadığı asemptomatik olan köpeklerin en az asemptomatik köpekler kadar enfektif oldukları gösterilmiştir (2).

Ülkemizin diğer bölgelerinde olduğu gibi Kocaeli'de de KanL'in rezervuarlığını köpeklerin yaptığı ve bu nedenle sporadik şekilde insan olgularının görüldüğü saptanmıştır. İlimizde bu amaçla yapılan ilk çalışma olup, bölgenin KanL

için endemik olduğu bilinen bölgelerin dışında olması nedeniyle, bu konuya dikkat çekilmek istenmiş ve hastalığın kontrolü için İl Sağlık Müdürlüğüne sonuçlar bildirilerek gerekli önlemlerin alınması planlanmıştır.

Teşekkür

Çalışmada köpeklerden örneklerin toplanmasında ve muayenelerinde yardımcı olan Veteriner Hekim Emin Yılmaz'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Abranches P, Silva Pereira MC, Concelcao Silva FM, Santos Gomes GM, Janz JG**, 1991. Canine leishmaniasis pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77: 557-561.
2. **Belazzoug S**, 1987. Canine leishmaniasis in Algeria. *Maghreb Veterinaire*, 3: 11-13.
3. **Coşkun Ş, Batmaz H, Levent A, Yılmaz F**, 1997. Türkiye'nin batısında köpeklerde *Leishmania* spp. enfeksiyonunun seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 13: 71-84.
4. **Gomes YM, Cavalcanti PM, Lira RA, Abath FGC, Alves LC**, 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Biotechnological advances. *Vet J*, 175(1): 45-52.
5. **Gradoni LM**, 1993. Canine reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis in the Mediterranean area: Epidemiology and control. Information Circular, WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre, Greece.
6. **Handemir E, Öncel T, Kamburgil K**, 2004. İstanbul sokak köpeklerinde visceral leishmaniasis seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 28(3):123-125.
7. **Harith, AE, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, De Korte P, Huigen E, Kolk AHJ**, 1989. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol*, 27: 2252-2257.
8. **Ikononopoulos J, Kokatas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG**, 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol*, 113: 99-113.
9. **Kamburgil K, Handemir E, Bıykoğlu G, Pişkin Ç**, 1998. İstanbul'un Kavacık Bölgesi sokak köpeklerinde İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ile visceral leishmaniasisin seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 22(4): 344-58.
10. **Mancianti F, Gradoni L, Gramiccia M, Pieri S, Marconcini A**, 1986. Canine leishmaniasis in the isle of Elba, Italy. *Trop Med Parasitol*, 37: 110-112.
11. **Mancianti F, Meciani N**, 1988. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence indirect hemagglutination counter immunoelectrophoresis. *Am J Vet Res*, 49: 1409-1411.
12. **Mohebbali M, Taran M, Zarei Z**, 2004. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick rK39 test and direct agglutination. *Vet Parasitol*, 121: 239-245.

13. **Oliva G, Scalone A, Foglia M, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L**, 2006. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic and nested PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44: 1318-1322.
14. **Özbel Y, Alkan ZM, Özensoy S, Turgay N, Kron NC, Schoone GJ, Oskam L, Balcıoğlu İC, Özbilgin A, Özcel MA**, 1998. Kala-Azar'lı hastalardan ve Manisa civarındaki köpeklerden izole edilen *Leishmania* suşlarının southern blot hibridizasyon yöntemi ile identifikasyonu. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 22(1): 1-4.
15. **Özbel Y, Oksam L, Özensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Özcel MA**, 2000. A survey canine Leishmaniasis in western Turkey by parasite DNA and antibody detection assay. *Acta Trop*, 74: 1-6.
16. **Özbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Babaođlu A, Özensoy Töz S, Babalođlu N**, 2002. Batı Karadeniz Bölgesinde zoonotik visseral leishmaniasis odağı: Karabük. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 26(4): 362-366.
17. **Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oskam L, Abranches P**, 1995. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol*, 89 (Suppl No:1) 89-93.
18. **Özensoy S, Özbel Y, Turgay N, Alkan M Z, Gul K, Gilman Sachs A, Chang KP, Reed SG, Özcel MA**, 1998. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, 59(3): 363-369.
19. **Özensoy Töz S, Korkmaz M, Balcıođlu C, Özbel Y, Ertabaklar H, Rastgeldi S**, 2002. Karaburun ve Urla bölgesinde zoonotik visseral leishmaniasis. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 26(3): 234-238.
20. **Solano-Gallego L, Morel P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L**, 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, 39: 560-563.
21. **Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G**, 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA dogs. *J Infect Dis*, 189: 1729-1733.
22. **Talmi-Frank D, Strauss-Ayali D, Jaffe C L, Baneth G**, 2006. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 13: 271-276.
23. **Taylan Özkan A, Babür C, Kılıç S, Örgen C, Özensoy Töz S**, 2003. Sakarya sokak köpeklerinde visseral leishmaniasisin indirekt fluoresan antikor (IFAT) yöntemi ile araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27(2):97-101.
24. **WHO**, 1993. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the mediteranean area MZCP/LEISH/93.3 Athens, Greece.