



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2019; 33 (3): 147 - 150
http://www.fusabil.org

Şafak BAYIRLIOĞLU^{1, a}
Özer AKGÜL^{2, b}
Yaşar Ali ÖNER^{2, c}

¹ İstanbul Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
İstanbul, TÜRKİYE

² İstanbul Aydın Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
İstanbul, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0003-4377-9141

^b ORCID: 0000-0002-3802-3270

^c ORCID: 0000-0001-7397-6539

Geliş Tarihi : 06.08.2019
Kabul Tarihi : 01.11.2019

Yazışma Adresi Correspondence

Özer AKGÜL
İstanbul Aydın Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim
Dalı,
İstanbul – TÜRKİYE

akgulozer@hotmail.com

İstanbul İlindeki Barınak Köpeklerinde *Leishmania infantum*'un Real-Time PCR ile Araştırılması

Amaç: Zoonoz olan visseral leishmaniasis (VL) *Leishmania infantum* (*L. infantum*) tarafından oluşturulan, dünyada yaygın olarak görülen, ülkemizin Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde endemik, diğer bölgelerinde ise sporadik görülen bir infeksiyon hastalığıdır. Çalışmanın amacı insanlarda görülen visseral leishmaniasis için rezervuar olduğu bilinen kanin visseral leishmaniasis (KanVL)'in ülkemizdeki epidemiyolojik durumu belirlemek ve KanVL'yi deteksiyon limiti daha yüksek olan moleküler yöntemler ile değerlendirmek olarak belirlenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada İstanbul ilindeki iki sahihsiz hayvan barınağındaki 93 köpekten tam kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak *L. infantum* varlığı açısından değerlendirilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen toplamda 93 sokak köpeğinin 5'inde (%5.4) real-time PCR yöntemi ile *L. infantum* saptanmış ve bu köpekler KanVL açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: İnsanlardaki VL prevalansının azalmasının, KanVL'in etkin yöntemler ile saptanması ve sonrasında gerekli önlemlerin alınması ile direkt ilişkili olduğu düşünülmektedir. İnsan ve köpeklerdeki gerçek leishmaniasis yaygınlığının belirlenmesi için özellikle ülkemiz gibi endemik bölgelerde daha ileri araştırmalar yapılmalıdır.

Ahtar Kelimeler: *Leishmania infantum*, kanin visseral leishmaniasis, real-time PCR

Investigation of *Leishmania infantum* using Real-Time PCR in Shelter Dogs in Istanbul Province

Objective: Visceral leishmaniasis (VL), which is a zoonotic disease, is an infectious disease caused by *Leishmania infantum* (*L. infantum*), commonly seen in the world, and is endemic in the Aegean and Mediterranean regions of our country and sporadic in other regions. The aim of this study was to determine the epidemiological status of canine visceral leishmaniasis (CanVL), which is known to be a reservoir for visceral leishmaniasis in humans and to evaluate CanVL with more specific molecular detection methods.

Material and Method: In the present study whole blood samples were collected from 93 dogs in two shelters in Istanbul. Blood samples were evaluated for the presence of *L. infantum* by using real-time polymerase chain reaction (PCR) method.

Results: A total of the 93 stray dogs were included in the study. *L. infantum* was detected by real-time PCR method in 5 (5.4%) dogs and these dogs were diagnosed with CanVL.

Conclusion: The decrease in VL prevalence in humans is directly related to detection of CanVL by effective methods and also taking necessary precautions. In order to determine the true incidence of leishmaniasis in humans and dogs, further investigations should be performed, especially in endemic areas like our country.

Key Words: *Leishmania infantum*, canine visceral leishmaniasis, real-time PCR

Giriş

Leishmaniasis, memelilerin zorunlu hücre içi parazitleri olan *Leishmania* cinsi protozoonların infekte *Phlebotomus* veya *Lutzomyia* cinsi kum sinekleri tarafından kan emme işlemi sırasında bulaşıp, retikuloendotelial sistem (RES) organlarına yerleşerek meydana getirdiği bir zoonotik hastalıktır (1). Leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 6 önemli tropikal hastalıktan biri olarak kabul edilen bir paraziter infeksiyondur. Günümüzden 60 yıl öncesine kadar sadece belirli bölgelere sınırlı olduğu düşünülen bu hastalık, bugün Avustralya ve Antarktika hariç bütün kıtalarda saptanmaktadır (2). Toplamda 98 ülkede 12 milyon insanı etkileyen ve yaklaşık 350 milyon insan için de risk oluşturduğu düşünülen bu hastalığın yıllık ölüm oranının 57.000 civarında olduğu düşünülmektedir (3). Köpekgiller *Leishmania* türleri için rezervuar olarak oynamakta ve bunlarda görülen hastalığa ise Kanin leishmaniasis (KanL) adı verilmektedir.

Leishmaniasis ağırlıklı olarak *L. infantum*'un etken olduğu iç organ leishmaniasisi (Visseral leishmaniasis, VL) ve *L. tropica* ile oluşan kutanöz leishmaniasis (KL) olmak üzere iki klinik durumda gözlenmektedir (4, 5). VL kliniğinde majör olarak splenomegali, sürekli/düzensiz ateş, hepatomegali ve pansitopeni görülmekte ve hastalık tedavi edilmediğinde yüksek ölüm oranları gözlenebilmektedir. Ülkemizde İzmir, Aydın, Denizli,

Manisa, Muğla gibi kıyı illerinin yanı sıra Bilecik, Karabük, Kars, Tokat, Kastamonu ve İstanbul gibi farklı illerde de VL olgularının belirlenmiş olması bu hastalığın subtropikal iklimde yer alan ülkemizin her bölgesinde görülebileceğini düşündürmekte ve her yıl ortalama 40 yeni olgu bildirilmektedir (6, 7).

VL tanısında klinik bulgular ön tanıda rol oynasa da, kesin tanı parazitolojik ve serolojik laboratuvar testleri ile konulmaktadır. Hastadan alınan örneklerden (kemik iliği, kan, biopsi, abse) yapılan yayma preparatların boyanarak direkt mikroskopik tanı ve/veya NNN (Novy MacNeal Nicolle) besiyerine ekilerek promastigotların görülmesi ile tanı konulabilir. Ayrıca indirekt tanıda serolojik yöntemlerden ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), IFAT (İndirekt Floresan Antikor Test) ve rK39 hızlı tanı testi kullanılmaktadır. Nükleik aside dayalı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemleri de hızlı ve güvenilir olmaları nedeniyle laboratuvar tanısında yer almaktadır (8, 9).

Bu çalışmada İstanbul ilinde bulunan iki sahihsiz hayvan barınağındaki 93 köpek *L. infantum* varlığı açısından, real-time PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Gerçek ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve Etik Kurul Onayı:

Çalışma İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmaya etik kurul onayı alındıktan sonra İstanbul Büyükşehir Belediyesine bağlı Hasdal ve Üsküdar sahihsiz hayvan barınaklarındaki toplam 93 köpek randomize olarak dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpekler numaralandırılarak yaş, cinsiyet ve klinik muayene verileri kaydedilmiştir. Köpeklerin ön kolu alkol ile silinerek aseptik hale getirilmiş ve *vena cephalica antebra*chid' den 2 mL kan EDTA'lı tüplere alınmıştır. Toplanan örnekler çalışma gününe kadar -20°C'de saklanmıştır.

Genomik DNA (gDNA) Ekstraksiyonu: *L. infantum*'a ait gDNA ekstraksiyonu için Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Almanya) üretici firma önerileri doğrultusunda standardizasyonu sağlamak amacıyla QIACube (QIAGEN GmbH, Almanya) kapalı sisteminde gerçekleştirilmiştir.

Real-time PCR Amplifikasyonu: Elde edilen gDNA'lar real-time PCR yöntemiyle Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Almanya) cihazında amplifiye edilmiştir. Gerçekleştirilen literatür taramasında Glucose-6-phosphate isomerase (GPI)'ın *L. infantum* saptamak için iyi hedef sekans bölgelerinden biri olduğu görülmüş ve GPI ile uyumlu olduğu için seçilen primer ve probe sekansları kullanılmıştır (Tablo 1). Amplifikasyon döngüsü üretici firmanın önerileri ve literatür verileri doğrultusunda Tablo 2'de gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir (10).

Tablo 1. *L. infantum* saptanması için kullanılan primer ve probe sekansları (10)

Forward primer 5 → 3	Reverse primer 5 → 3	Probe 5 → 3
CCAGATGCCG ACCAAAGC	CGCGCACGTGA TGGATAAC	FAM-ATCGGCAGGTTCT- TAMRA

Tablo 2. *L. infantum* real-time PCR döngüsü

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Pre-inkübasyon	95°C	15 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Uzama ve okuma	60°C	30 saniye	

Bulgular

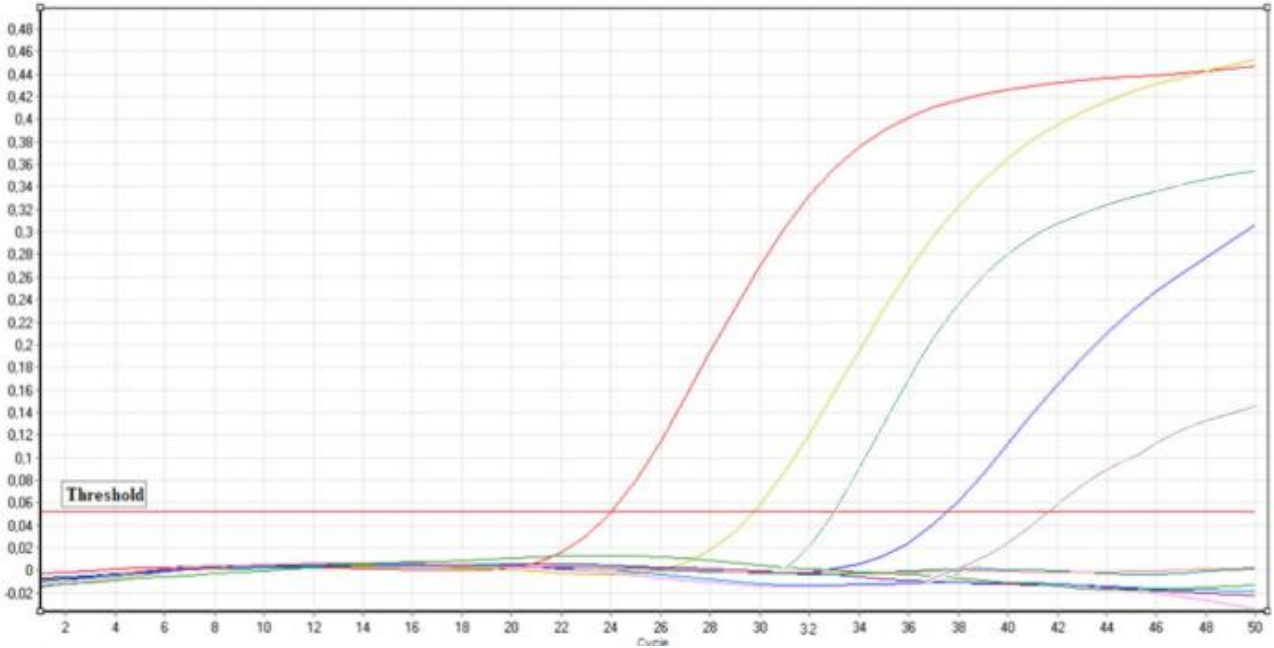
İstanbul ilindeki iki sahihsiz hayvan barınağından 49 (%52.7)'u erkek; 44 (%47.3)'ü dişi cinsiyetten olan toplamda 93 köpek çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen köpeklerin en küçüğünün 1 en büyüğünün ise 9 yaşında olduğu görülmüş ve köpeklerin ortalama yaşlarının 3.27±2.14 yıl olduğu belirlenmiştir.

Çalışmaya dahil edilen sahihsiz hayvan barınağındaki erkek köpeklerin yaş ortalamalarının 3.55±2.15 yıl; dişi köpeklerin ise 2.95±2.09 ortalama yaş değerinde olduğu hesaplanmıştır. Çalışmaya alınan köpeklere ait yaş ve cinsiyet verilerinin gösterildiği sosyodemografik veriler Tablo 3'de sunulmuştur.

Çalışmaya dahil edilen 93 köpekten alınan tam kan örnekleri real-time PCR ile KanVL tanısının konması amacıyla *L. infantum* varlığı açısından incelenmiştir. Totaldeki 93 kan örneğinin 5 (%5.4) tanesinde *L. infantum* DNA'sı saptanmış, pozitif saptanan köpeklerin fiziksel muayenelerinde herhangi bir patolojik görünüm dikkati çekmemiştir. PCR çalışmasında pozitif saptanan örneklerde ait amplifikasyon eğrileri Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Çalışmaya dahil edilen köpeklerin sosyodemografik verileri

n (%)	Yaş (yıl)				
	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
Cinsiyet	Erkek				
	49 (%52.7)	3.55	2.15	3	1 9
	Dişi				
44 (%47.3)	2.95	2.09	2	1 9	
Toplam					
93 (%100)	3.27	2.14	3	1 9	



Şekil 1. *L. infantum* pozitif örneklerle ait real-time PCR amplifikasyon eğrileri

Tartışma

VL'in hem endemik hem de sporadik olarak görülmesi ve VL için rezervuar konumunda olan köpeklerde enfeksiyonun insanlara göre daha yüksek oranlarda saptanması köpeklerdeki ayırıcı *L. infantum* tanısının önemini arttırmaktadır. Dünyada VL üzerine yapılan çalışmalar genellikle Akdeniz havzasında yoğunlaşmaktadır. İspanya'da 2005-2007 yılları arasında Hayvan Kan Bankasına gelen fiziksel olarak sağlıklı, *L. infantum* açısından seronegatif toplamda 92 kan kantitatif real-time PCR ile incelenmiş ve seronegatif olan bu kan örneklerinde %19.2 oranında KanVL pozitifliği bulunmuştur (11). *L. infantum*'un endemik olduğu güney Fransa'da, köpeklerdeki asemptomatik taşıyıcılığı belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmaya toplam 140 köpek dahil edilmiş ve KanVL tanısı ELISA ile 1 (%0.71), Western Blot (WB) ile 19 (%14) köpeğe konurken; real-time PCR yöntemi ile *L. infantum* pozitifliğinin 58 (%41.4) köpekte belirlendiği bildirilmiştir (12).

Ülkemizde VL hastalarının bulunduğu Manisa, Muğla, Kuşadası, Karaburun, Urla gibi bölgelerde köpekler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, köpeklerde insan VL'i ile kıyaslanmayacak ölçüde yüksek oranlarda (%3.8-%27) seropozitiflik belirlenmiş ve bu durum tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de köpeklerin VL için bir rezervuar konumunda olduğunu doğrular nitelikte bir veri olarak değerlendirilmiştir (13-15). Kocaeli'nde yapılan bir çalışmada 65 sokak köpeğinden alınan serum örnekleri IFAT ve ELISA ile değerlendirmiş ve iki yöntemde de 2 (%3.07) köpek KanVL açısından seropozitif olarak belirlenmiştir (16). Çanakkale'de 2007 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada, toplamda 27 köpek serumu IFAT ile değerlendirilmiş ve hiçbir köpekte seropozitiflik tespit edilmemiştir (17). Antalya il sınırlarındaki dört köpek

barınağında yapılan çalışmada IFAT ile incelenen toplamda 176 köpek serum örneğinin KanVL açısından 14 (%7.95) tanesi seropozitif, 24 (%13.63) tanesi sınırda seropozitif, 138 (%78.42) tanesi ise negatif olarak saptanmıştır (18). Yapılan bu çalışmada ise İstanbul Büyükşehir Belediyesine bağlı iki sahihsiz hayvan barınağındaki 93 köpekten toplanan kan örneklerinin 5'i (%5.4) real-time PCR yöntemi ile *L. infantum* açısından pozitif bulunmuş ve KanVL tanısı konmuştur.

Duyarlılık ve özgüllük oranları görece daha düşük olmasına rağmen, serolojik yöntemler endemik alanlarda bulunan insan ve köpeklerdeki leishmaniasis insidansını ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için rutinde sıklıkla kullanılmaktadır. IFAT ile pozitif bulunan köpeklerin tedavisi veya ortamdan uzaklaştırılmasının insanlar için potansiyel riski azaltacağı bildirilmektedir. IFAT ve konvansiyonel ELISA testlerinin kullanıldığı çalışmalarda asemptomatik köpeklerde spesifik antikorların bulunduğu ve konfirme edilmiş testler arasındaki uyumun %81.25 ile %96.66 arasında değiştiği belirtilmiştir (19). Türkiye'de VL ve KL tanıları rutinde sırasıyla kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik incelenmesi ile konulmaktadır. Parazit izolasyonu için NNN besiyeri, mikrokültür yöntemleri, in-house olarak hazırlanan IFAT tekniği ile ticari olarak satılan rK39 hızlı tanı test kiti de *L. infantum* tanısında kullanılan diğer yöntemlerdendir. Ancak moleküler tanı yöntemleri henüz sıklıkla araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır (13). Bu çalışmada da, KanVL için ülkemizdeki epidemiyolojik verilere katkı sağlanması ve güncel bir yaklaşım olan real-time PCR ile diyagnostik bir yaklaşımın ortaya konulması amaçlanmıştır.

VL tanısında serolojik yöntemlerden özellikle IFAT ve rK39 hızlı tanı testleri yüksek duyarlılık ve özgüllük

oranlarına sahiptir (4). Ancak bu testlerde hesaplanan eşik değerinin altındaki bazı olgularda direkt bakıda parazit görülebilmekte ya da PCR ile parazit DNA'sı saptanabilmektedir. Buna karşın nadiren de olsa uygun örnek alınamamasına ve örnekteki PCR inhibitörlerine bağlı olarak PCR ile yalancı negatif sonuçlar da alınabilmektedir. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde ssrRNA (küçük alt ünite ribozomal RNA) gen sekansı temelli uygulanan PCR ile kültür yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada, yalnızca bir örnekte PCR ile yanlış negatif sonuç alındığı ve bunun da örneğin uygun olarak alınamamasına bağlı olabileceği bildirilmiştir (20). Bunun yanı sıra, PCR yöntemi ile parazitolojik yöntemleri (direkt mikroskopi ve kültür) karşılaştıran bir çalışmada yöntemlerin uyumluluklarını yüksek olduğu ancak özellikle ayırıcı tanı ve VL kontrol programlarında PCR yöntemlerinin kullanılmasının son derece önemli olabileceği vurgulanmıştır (21).

Kaynaklar

1. Mencke N. The importance of canine leishmaniasis in non-endemic areas, with special emphasis on the situation in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2011; 124: 434-442.
2. Varışlı AN. Kutanoz leishmaniasis'li Hastaların Tanı ve Takibinde Real Time PCR Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2005.
3. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. Lancet 2018; 392: 951-970.
4. Costa DNCC, Bermudi PMM, Rodas LAC, et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. Rev Saude Publica 2018; 52: 92
5. Shokri A, Fakhar M, Teshnizi SH. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. Acta Tropica 2017; 165: 76-89.
6. Ertabaklar H, Özkan TA, Özensoy S, et al. Çorum'da çocuklarda visseral leishmaniasis incelenmesi. Türkiye Parazitolojisi 2003; 27: 233-236.
7. Ok ÜZ, Balcioğlu İC, Özkan AT, et al. Leishmaniasis in Turkey. Acta Tropica 2002; 84: 43-48.
8. Polat E, Aygün G, Aslan M, et al. Bir Visseral leishmaniasis olgusu. Türkiye Parazitolojisi 2003; 27: 4-5.
9. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. PLoS Negl Trop Dis 2018; 12: e0006082.
10. Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, et al. Rapid identification of Leishmania complexes by a real-time PCR assay. Am J Trop Med Hyg 2005; 73: 999-1004.
11. Tabar MD, Roura X, Francino O, et al. Detection of Leishmania infantum by real-time PCR in a canine blood bank. J Small Anim Practice 2008; 49: 325-358.
12. Aoun O, Mary C, Roqueplo C, et al. Canine leishmaniasis in south-east of France: Screening of Leishmania infantum antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. Veterinary Parasitology 2009; 166: 27-31.
13. Özbel Y, Oskam L, Özensoy S, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in western Turkey: Comparison of serological, molecular biological and parasitological procedures. Acta Tropica 2000; 74: 1-6.
14. Özensoy S, Özbel Y, Turgay N, et al. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 363-369.
15. Özensoy Töz S, Özbel Y, Atay MG, et al. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde leishmaniasis tanısı için PZR uygulanması. Türkiye Parazitolojisi 2002; 26: 239-244.
16. Sönmez Tamer G, Polat E, Özensoy Töz S, et al. Kocaeli sokak köpeklerinde visseral leishmaniasis seroprevalansı. Türkiye Parazitolojisi 2008; 32: 183-186.
17. Tok H, Sevil N, Özensoy Töz S, et al. Çanakkale ili Ayvacı bölgesinde zoonotik visseral leishmaniasisin serolojik ve entomolojik olarak araştırılması. Türkiye Parazitolojisi 2009; 33: 109-113.
18. Balcioğlu İC, Ertabaklar H, Paşa S, et al. Antalya İli ve İlçelerindeki dört köpek barınağında leishmaniasis seroprevalansının araştırılması. Türkiye Parazitolojisi 2009; 33: 4-7.
19. Semião-Santos SJ, El-Harith A, Ferreria E, et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. Parasitology Research 1995; 81: 235-239.
20. Mathis A, Deplazes P. PCR and in vitro cultivation for detection of Leishmania spp. in diagnostic samples from human and dogs. J Clin Microbiol 1995; 33: 1145-1149.
21. Özcel MA. Moleküler Parazitoloji. İzmir: Meta Basım, 2009.