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

CANİNE MONOSİTİK EHRLİCHİOSİS'İN FARKLI EVRELERİNDE NT-PROBNP DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

SEZEN DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr. Kerem URAL

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-18027 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN–2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Sezen DOĞAN tarafından hazırlanan "**Canine Monositik Ehrlichiosis'in Farklı Evrelerinde NT-pro BNP Düzeylerinin Değerlendirilmesi**" başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/01/2019

İmza

Üye (T.D.):Prof. Dr. Kerem URAL, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Mehmet GÜLTEKİN, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU, Aksaray Üniversitesi

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. Ahmet CEYLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Başkanı

TEŞEKKÜR

Öncelikleher daim yanımda olan, çalışmalarıyla beni her zaman daha çok çalışmaya teşvik eden, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını, ilgisini ve bilimsel bilgisini hiçbir şekilde esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Kerem URAL'a,

Gerek Lisans eğitimim gerekse de Yüksek Lisans eğitimim boyunca hayata bakış açımı değiştiren ve beni her zaman doğru yönlendiren Doç. Dr. Deniz ALIÇ URAL ve Gamze GÜLTEKİN'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgilerini ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda yanımda olan Dr. Öğretim Üyesi Hasan ERDOĞAN'a, Doç.Dr. Mehmet GÜLTEKİN'e ve Araş.Gör.Dr. Songül ERDOĞAN'a,

Tez çalışmam sırasında hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görev yapan dönem arkadaşlarıma,

Hayatımın dününde, bugününde bir an bile benden tereddüt etmeyen, sayelerinde özgüvenimin geliştiği, bugünlere gelmemde en büyük özveriyi göstererek her zaman destekçim olan ve her kararımda yanımda olan, canımdan çok sevdiğim güzel aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY i

TEŞEKKÜR ii

İÇİNDEKİLER iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

RESİMLER DİZİNİ vii

TABLOLAR DİZİNİ viii

ÖZET ix

ABSTRACT xi

1.GİRİŞ 1

2.GENEL BİLGİLER 2

2.1. *Ehrlichia canis* 5

2.1.1.Prevalans 6

2.1.2.Patogenez-Enfeksiyonun Bulaşma Seyri 8

2.1.3. Klinik Bulgular 9

2.1.4. Laboratuvar Bulguları 10

2.1.5.Tanı 13

2.1.5.1. Canine Monocytic Ehrlichiosis ile ilişkide olabilecek bazı kardiyopulmoner belirteçler 15

2.1.5.1.1.Natriüretik Peptidler 15

3. GEREÇ VE YÖNTEM 20

3.1.Hayvan Materyali 20

3.2.Hayvan Muayenesi ve Sınıflandırma 20

3.3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Antijen Tespiti 20

3.4.Sınıflandırmada Kullanılan Laboratuvar Muayeneler 22
3.4.1.Hematolojik Muayeneler 23
3.4.2.NT-pro BNP Hızlı Kantitatif Test 23
3.4.2.1.Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması 23
3.4.2.2.Damar içinden tam kan için örnek toplanması 23
3.4.2.3.Serum ve Plazmanın Hazırlanması 24
3.4.2.4.Test Prosedürü 24
3.5. İstatistiksel Analizler 26
4.BULGULAR 27
4.1.Olgulara ait demografik ve analiz bulguları 27
5.TARTIŞMA 32
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 40
EKLER 52
ÖZGEÇMİŞ 54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	Mikrolitre
aa	Aminoasit
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
ANP	Atriyal Natriüretik Peptid
CME	Canine Monositik Ehrlichiosis
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E.canis	*Ehrlichia canis*
E.ewingi	*Ehrlichia ewingi*
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
H.canis	*Hepatozoon canis*
IFA	İmmun floresan antikor
IFAT	İmmun floresan antikor tekniği
IFN-g	İnterferon gama
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
mL	Mililitre
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
NP	Natriüretik Peptid
NTproBNP	N-terminal pro-B tipi Natriüretik Peptidi
^{o}C	Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. NT-pro BNP'nin sekresyon ve salınımının şematik gösterimi 18

Şekil 2. Independent-Samples Kruskall-Wallis istatistiksel analiz metodu ile gruplarda görülen referans aralığı dışındaki değişimler 30

Şekil 3. Canine Monositik Ehrlichiosis'li köpeklerde hastalık aktivitesi (enfekte, aktif, maruz kalma) ile NT-pro BNP düzeyleri arasındaki ilişki..... 31

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Yetişkin *Rhipicephalus sanguineus* kenesi 2

Resim 2. Nimf dönemindeki *Dermacentor variablis* kenesi 3

Resim 3. Köpeklerde Ehrlichiosis'in Dünya üzerindeki dağılım haritası 5

Resim 4. *E.canis* morulası 13

Resim 5. *E.canis* morulası 13

Resim 6. Snap 4Dx Plus test kiti ile belirlenmiş Ehrlichiosis enfeksiyonu 22

Resim 7. Transfer pipet ile serum örneğinin buffer tüpüne eklenmesi 23

Resim 8. Karışımın transfer pipet ile test kartuşuna aktarılması 24

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *E. canis* infeksiyonunun Türkiye'deki prevalansı 2

Tablo 2. NT-pro BNP değerlerinin yorumlanması 3

Tablo 3. Canine Monositik Ehrlichiosis'de evreleme 5

Tablo 4. Projede izlenilen laboratuvar yöntemleri 13

Tablo 5. Olgulara ait analiz sonuçları ve demografik bilgiler 13

Tablo 6. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplardaki proBNP değerleri 22

ÖZET

CANİNE MONOSİTİK EHRLİCHİOSİS'İN FARKLI EVRELERİNDE NT-PRO BNP DÜZEYLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Doğan S. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Bu tez çalışması ile Canine Monositik Ehrlichiosis'li köpeklerdefarklı evrelere ait kalpte oluşabilecek muhtemel hasar NT-pro BNP düzeyleri ile araştırıldı. Araştırmanın hayvan materyalini oluşturmak üzere Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Küçük Hayvan Kliniklerine ve Aydın ile İzmir illerindeki özel veteriner kliniklerine iştahsızlık, kilo kaybı, yüksek ateş, generalize lenadenopati, splenomegali, kas zafiyeti, deride ekimoz ve peteşi, epistaksis, bacaklarda ödem, dispne veya poliartiritis şikayetleri ile getirilen farklı ırk (4'er Terrier ve Golden Retriever, 3'er Rottweiler ve Airdale terrier, 2 Siberian Husky 1'er Türk Çoban Köpeği, Labrador retriever, Alman Çoban köpeği, Pointer ile 2 melez, yaş (2-7) ve her iki cinsiyetten 10 erkek, 12 dişi) 23 köpek araştırma kapsamında değerlendirmeye alındı. Yukarıda bahsi geçen klinik bulguların yanı sıra trombositopeni olan/olmayan 200'e yakın köpek tanı ve ayırıcı tanı amacıyla klinik muayene ve laboratuar testleri aracılığıyla muayene edildi. *E.canis* ile enfekte olduğu saptanan köpeklerin vektörlerle nakledilen ve kardiyak hasara yol açabilen *Ehrlichia canis/E.ewingii, Anaplasma phagocytophilum, Borrellia burgdorferri* ve *Dirofilaria immitis* ile koenfekte olup olmadıkları hızlı test kiti (SNAP 4Dx plus, Idexx USA) ile araştırılarak yalnızca *E.canis* (daha sonradan PCR analizi ile antijen belirlendiği üzere) ile enfekte köpekler, serolojik, klinik ve laboratuvar bulgular temelinde önerilen evreleme dikkate alınarak 3 farklı grupta (her grupta n=7) değerlendirildi. Buna göre; I. grup [akut *E.canis* infeksiyonu; antikor negatif ancak belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR pozitif]], II. grup [*E.canis*' e maruz kalma (belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR negatif] ancak *E.canis* seroaktif)], III. Grup [aktif infeksiyon (PZR pozitif ve *E.canis* seroaktif) ve IV. grup sağlıklı kontrol grubu [hiç *E.canis*' e maruz kalmamış köpekler (PZR negatif antikor negatif)] olmak üzere hastalıkla ilişkili 3 ayrı sınıflandırmaya tabi tutuldu. Sağlıklı kontrol grubu (IV.grup), kliniğe aşı veya sağlık kontrolü amacıyla getirilen, klinik ve laboratuvar değerlendirilmelerinde herhangi bir anormallik saptanmayan her iki cinsiyetten ve CME'li gruplarına benzer yaş aralığındaki köpeklerden (n=7) teşkil edildi. *Vena cephalica antebrachii'*den 0,5'er ml kan EDTA'sız tüplere aktarılarak, santrifüje edildi. Müteakip Wondfo Finecare Flörosan İmmunoassay cihazı ile NT-pro BNP düzeyleri belirlendi. Kontrol grubu olguların tamamında NT-pro BNP düzeyleri 18 pg/mL değerinden düşük olarak tespit

edildi. NT-pro BNP düzeyleri, Canine Monositik Ehrlichiosis'li Akut enfekte olgularda 43,08 ± 25,08, Aktif enfekte olgularda 27,29 ± 8,13, Maruz kalan olgularda 20,81 ± 2,81 ve kontrol grubunda 18 ± 0 pg/mL olarak tespit edildi. Gerçekleştirilen bu tez çalışması ile hastalığın farklı evrelerinde kardiyovasküler yanıta ilişkin klinikopatolojinin daha detaylı şekilde anlaşılabileceği, yine köpeklerde kardiyak tutulumlu vektör aracılıklı hastalıkların NT-pro BNP analizleri ile olan ilişkisinin belirlenmesiyle sağaltım protokollerinin değişebileceği, yüksek bütçeli araştırma projelerinin yapılması halinde artış gözlenen vakalarda NT-pro BNP düzeylerinin muhtemel miyokardiyal hasarın habercisi olarak kullanılması veya prognostik biyobelirteç olma yolundaki öneminin araştırılabileceği ve insan hekimliği (aynı hastalık etkenine ait olgular) alanına da katkı sağlayacağı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Ehrlichiosis, NT-pro BNP, DNA, Nested PCR.

ABSTRACT

EVALUATIONS OF NT-PRO BNP LEVELS IN DIFFERENT STAGES OF CANINE MONOCYTIC EHRLICHIOSIS

Doğan S. Aydın Adnan Menderes University Institute of Medical Sciences Internal Medicine (Veterinary) Department Master's Thesis, Aydın, 2019

In the present study, probable cardiac to those of injury different stages in Canine Monocytic Ehrlichiosis dogs was investigated with NT-pro BNP levels. Animal material of animal this research, involved dogs with anorexia, weight loss, high fever, generalized lenfadenopathy, splenomegaly, muscle weakness, ecchymosis and petechiae in the skin, epistaxis, edema in the legs, dyspnea or polyarthritis to those of different breeds (4 Terrier and 4 Golden Retriever, 3 Rottweiler and Airdale terrier, 2 Siberian Husky, 1Turkish Shepherd Dog, 1 Labrador retriever, 1 German Shepherd dog and 1 Pointer with 2 crossbred age of 2 to 7, from both sexes (10 male 12 female) were included in the study. In addition to the aforementioned clinical findings, nearly 200 dogs with and without trombocytopenia were examined by clinical examination and laboratory tests for diagnosis and differential diagnosis. Dogs infected with *E.canis* were analyzed with a test kit for *Ehrlichia canis/E.ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrellia burgdorferri* and *Dirofilaria immitis* that were transmitted with vectors and may cause cardiac damage, and only *E.canis*-infected dogs were evaluated in 3 different groups (n=7 in each group) considering the staging suggested on the basis of serological, clinical and laboratory findings. In context; group I [acute *E.canis* infection; antibody negative but detectable level of DNA [PCR positive]], group II [Exposure to *E.canis* (detectable DNA [PCR negative] but *E.canis* seroactive)], group III [active infection (PZR positive and *E.canis* seroactive)] and group IV [Dogs never exposed to *E.canis* (PCR negative antibody negative)] including the healthy control group were subjected to 3 different classification related to the disease. The healthy control group (IV.group), consisted of similar age range dogs (n=7) of both sexes and CME groups who were referred to the clinic for vaccination or health status, without any abnormality in clinical and laboratory evaluations. 0,5 ml of blood from the *Vena cephalica antebrachii* was transferred to tubes EDTA-free and centrifuged. Following NT-pro BNP levels determined by Wondfo Finecare Fluorescent Immunoassay device. NT-pro BNP levels were detected lower than 18 pg/mL value for all control group cases. NT-pro BNP levels were detected as 43,08 ± 25,08 in acute infected cases with Canine Monocytic Ehrlichiosis, 27,29 ± 8,13 in active infection, 20,81 ± 2,81 in exposed cases and 18 ± 0 pg/mL in control group. With this study, the clinicopathology of

cardiovascular response in different stages of the disease might be understood more detail in dogs and again the relationship of cardiac involvement diseases in dogs with NT-pro BNP analysis, it was thought that it might used biomarker of myocardial damage or investigate the importance the latter parameter as a prognostic biomarker and it was thought to contribute to the field of human medicine (the same disease agent cases).

Key words: Dog, Ehrlichiosis, NT-pro BNP, DNA, Nested PCR.

1. GİRİŞ

Köpeklerde Monositik Ehrlichiosis (CME) ilk olarak Donation ve Lestoquard tarafından 1965'te Cezayir'de tanımlanmıştır. Türkiye'de ise ilk klinik olgu 1997 yılında tespit edilmiştir. Daha sonra 2001 yılında 20 olgu saptanmıştır. Ülkemizdeki köpeklerde moleküler düzeydeki *E.canis* etkeni2005 yılında saptanmıştır. Günümüzde de Dünya çapında görülmekte olup köpeklerin önemli bir hastalığı olarak kabul edilmektedir.

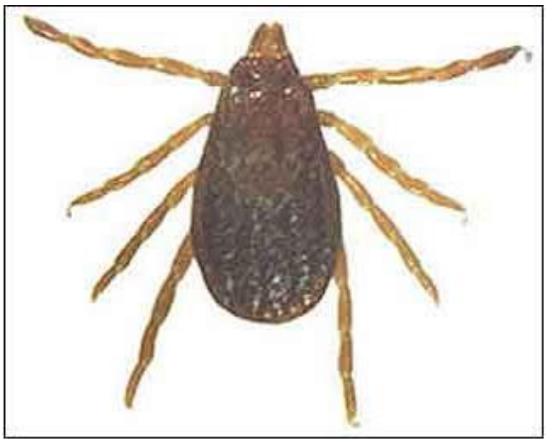
Tarafımızdan yapılan literatür taramalarda; Canine Monositik Ehrlichiosis enfeksiyonlarında multisistemik klinik bulguların görülebildiği bir enfeksiyon türü olduğu görülmüş olup, başta miyokartta olmak üzere birtakım kardiyak değişikliklerin meydana gelebileceği ve bu bağlamda hastalıklara ilişkin olarak kullanılacak ilaçlara yönelik kardiyotoksisite açısından risk alınmaması gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmada CME enfeksiyonunun patogenezine yönelik olarak köpeklerde NT-pro BNP düzeylerinin ortaya koyulması ve hastalığın farklı evrelerinde kardiyovasküler yanıtın değerlendirilmesiyle hastalığın klinikopatolojisinin daha detaylı şekilde anlaşılmasına ayrıca enfeksiyonun kontrol edilmesindeki rolünün de belirtilmesine olanak sağlanması amaçlanmıştır. Köpeklerde farklı ve seçilmiş diğer bazı kardiyak tutulumlu vektör aracılıklı hastalıkların NT-pro BNP analizleri ile olan ilişkisinin belirlenmesiyle sağaltım protokollerinin değişebileceği kanaatini taşımaktayız. Elde edilecek verilerin köpeklerde anılan hastalıkların muhtemel NT-pro BNP analiz sonuçları ile arasındaki ilişkinin saptanması sonucu literatürdeki bu boşluğun doldurulacağı ve mevcut çalışmalara ve daha sonra özellikle hastalığın prognozu, monitorizasyonu ve belki de sağaltım protokolleri ile ilgili yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı kanısındayız. Bunun yanı sıra elde edilebilecek pozitif sonuçların uluslararası literatüre katkı sağlayıp bu anlamda da önemli bir boşluğu gidereceği aynı zamanda Veteriner İç Hastalıkları ve insan hekimliği (aynı hastalık etkenine ait olgular düşünüldüğünde) alanına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Projenin sonuçlanmasıyla elde edilecek bilimsel verilerin değerlendirilmesi ile gerek ulusal gerekse de uluslararası arenada/kongrelerde sunumu yapılacak ve literatüre katkı sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Köpeklerde Monositik Ehrlichiosis (CME) ilk olarak Donation ve Lestoquard tarafından 1965'te Cezayir'de tanımlanmıştır. Günümüzde de Dünya çapında; tropikal ve subtropikal bölgelerde görülmekte ve köpeklerin önemli bir hastalığı olarak kabul edilmektedir.

CME'nin etkeni *Ehrlichia canis* adlı Gr (-), obligat, hücre içi, kok bakterileridir. *Rhipicephalus sanguineus* (Resim 1) adlı kene ana vektör olsa da *Dermacentor variablis* (Resim 2) de bu ajanı nakledebilmektedir. Etken trans-ovarial ve trans-stadial olarak aktarılabilir.

Resim 1. Yetişkin *Rhipicephalus sanguineus* kenesi (Görsel Companion Vector-Borne Disease- Kahverengi Köpek Kenesi bölümünden alınmıştır).



Resim 2. Nimf dönemindeki *Dermacentor variablis* kenesi (Görsel Companion Vector-Borne Disease- Amerikan Köpek Kenesi'nin Yaşam Siklusu bölümünden alınmıştır).

CME ile enfekte köpeklerde asemptomatik veya multisistematik klinik bulgular bulunmuştur. Akut veya kronik bulgulara örnek olarak letarji, bilinç kaybı, kilo kaybı, ateş, iştahsızlık, lenfadenopati, şiplenomegali ve kanama bozuklukları sayılabilir. Yapılan bir araştırmada *E.canis*'in akut enfeksiyonunu taşıyan köpeklerde artmış miyokardiyal hasar riski olduğu ortaya koyulmuştur. Monositik ehrlichiosis olgularının %84'ünde kalpte makroskobik ve mikroskobik kanamaların varlığı bildirilmiştir.

Hastalığın dünya üzerindeki dağılımı, çeşitli çalışmalarda gösterildiği gibi vektörün varlığını takip eder. Türkiye'de günümüzde ilk klinik olgu 1997 yılında tespit edilmiştir. Daha sonra 2001 yılında 20 olgu saptanmıştır. *E.canis* Türkiye'deki köpeklerde moleküler olarak 2005 yılında saptanmıştır. Anılan çalışmada serolojik olarak aynı yıl 284 köpeğin 59'unda *E.canis*'e karşı spesifik antikorlar belirlenmiştir. Daha yüksek seropozitivite saptanan diğer bir serolojik çalışmada ise Ayvalık bölgesinde sağlıklı köpeklerde indirekt florasan antikor tekniği ile (111/164) %69'unda seropozitivite saptanmıştır. Yurdumuzda *E.canis*'in epidemiyolojisi üzerine oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcut olduğundan gerçek anlamda bu hastalığın dağılımı ve seroprevalansı bilinmemektedir. İlk kapsamlı araştırmalardan birinde Akdeniz, Ege, Güneydoğu Anadolu bölgelerinde çok çeşitli illerde gerçekleştirilen bir çalışmada 284 köpeğin 59'unda %20,8 prevalans saptanmıştır (Batmaz ve ark 2001). Söz konusu çalışmaya dahil edilen illerden Adana (%65,3) ve İzmir (%40,6) en yüksek prevalansa sahip iller olarak dikkat çekmektedir. Önceki yıllarda ağırlıklı olarak münferit olgu sunumlarına rastlanılsa da moleküler düzeyde ilk çalışmalardan birisinde *E.canis* yönünden test uygulanan 239 köpekte İmmun flörasan antikor testi ve dot-ELISA ile sırasıyla 162 (%67,8) ve 39 (%53,3) köpekte seropozitivite belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan bir

başka moleküler ağırlıklı çalışmada Ankara ilindeki 12 köpeğin 3'ünde PZR ile *E.canis*'in pozitif olduğu bildirilmiştir.

Ege bölgesinde Manisa, Marmaris, Muğla, Selçuk, Aydın gibi il bazlı bir çalışmada, çeşitli yaş gruplarından ve ırklardan 371 köpekte Nested PZR ile teşhis edilen 154 olguda (%41,5) *E.canis*'in pozitif olduğunu bildirmektedirler. Diyarbakır ilinde yakın zamanda hızlı ELİSA test kitleri (Snap 3Dx) ile yapılan bir çalışmada 82 köpeğin yalnızca 4'ünde (%4,8) *E.canis* antikorları tespit edilmiştir. Ege bölgesinde yakın zamanda gerçekleştirilen bir projede köpeklerde Snap 4Dx ile %27,5 seroprevalans saptanmıştır. Köpek monositik ehrlichiosis (CME)'in etkeni olan *E.canis* monosit ve makrofajlara ilgi göstermektedir. Hastalığın akut fazında post infeksiyöz 8 ila 21 gün içerisinde başlamakta ve ateş, depresyon, dispne, anoreksi, hemoraji, ödem ve kilo kaybına eşlik eden trombositopeni ve lökopeni, hafif anemi ve hipergamaglobulinemi gibi laboratuvar bulgularıyla seyretmektedir. Hastalığın subklinik fazı yıllarca sürebilir ve bu da parazitin konakçıda oluşturduğu persiste infeksiyona işaret etmektedir. Kronik fazda ise kanama bozuklukları ve kemik iliği baskılanmasına eşlik eden pansitopeni hakimdir. *E.canis* tarafından oluşturulan immunopatolojik mekanizmalar köpeklerde tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Ancak granulositik ehrlichiosisli insanlarda yapılan çalışmalarda bazı sitokinlerin hastalığın klinik görünümünden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Ehrlichia ile parazitemininin düşük düzeyde olması ve oluşan klinik bulguların tabiatı, konakçının immun cevabının ve proinflamatuar sitokin üretiminin köpeklerde ehrlichiosis'in patogenezinde rol oynayan en önemli faktörler olduğu tespit edilmiştir. Obligat intraselüler bakteriler tarafından oluşturulan infeksiyonların büyük bir çoğunluğunda tam bir hücresel bağışıklık sağlanarak hastalıktan iyileşme ve re-infeksiyonlara karşı korunma sağlanmaktadır.

CME çeşitli teknikler kullanılarak teşhis edilebilir, örneğin; kan smearında intrasitoplazmik *E.canis* morulasının görülmesi, sitoloji, seroloji, izolasyon ve moleküler tespit yöntemleri kullanılabilir. Moleküler biyoloji, deneysel *E.canis* enfeksiyonunu belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yaklaşımını ortaya koymuştur. Bu moleküler teknik *E.canis* enfeksiyonunun kesin teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR tekniği ile *E.canis*'te DNA'nın saptanması, eş zamanlı ehrlichia enfeksiyonlarının saptanması için yüksek duyarlılık ve özgünlüğe sahiptir. En yoğun hedef genler p30 bazlı PCR ve 16S rRNA'dır.

Bununla birlikte p30 bazlı PCR testi 16S rRNA bazlı PCR analizinden daha duyarlıdır. *E.canis, Babesia spp ve Hepatozoon canis* de dahil olmak üzere köpeklerdeki kan parazitlerinin eş zamanlı olarak saptanabilmesi için tek bir reaksiyonla kan örneklerinden çoklu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmiştir. Bu çoklu PCR primerleri *E.canis* VirB9, *Babesia spp* 16S rRNA ve *H.canis* 16S rRNA'ya spesifiktir ve bu kan parazitlerinin dizileri %100 özdeşliğe sahiptir.

2.1. *Ehrlichia canis*

Küçük, pleomorfik biçimli ve zorunlu hücre içi gram negatif bir etken olan *Ehrlichia canis* farklı hayvan türlerini ve insanlarda değişik tipteki kan hücrelerini enfekte eder (Donatien ve Lestoquard 1937, Groves 1975). Etken 1,315,030 adet nükleotidin bir araya gelerek oluşturduğu tek dairesel kromozomdan meydana gelmiştir (Mavromatis ve ark 2006). Yapılan son çalışmalara göre Ehrlichial türler sınıflandırmada *Anaplasmatacea* ailesine eklenmiştir (Rikihisa 2003). Yeni sınıflandırmayla birlikte köpeklerde Ehrlichia türlerinin iki farklı lökotropik hastalığın nedeni olduğu ortaya koyulmuş olup bu hastalıklar köpek monositik Ehrlichiosis'i (*E.canis'* in neden olduğu) ve köpek granulositik Ehrlichiosis'idir (*E.ewingi*' nin neden olduğu) (Rikihisa 2003). *E.canis* tarafından oluşan enfeksiyon çoğunlukla vektör kenelerin aktif olduğu sıcak mevsimlerde görülmektedir. Doksisiklin veya tetrasiklin peraparatlarının gereken dozlarda ve uygun sürelerde kullanılmasıyla sağaltımı yapılan köpeklerin büyük çoğunluğunda enfeksiyonun akut ve subklinik aşamalarında olumlu sonuçlar alındığı kaydedilmiştir (Harrus ve ark 1999). Enfekte köpeklerden bazılarında hastalığın kronik fazına doğru bir ilerleme geliştiği ve bu olguların kötü prognozla seyrettiği görülmüştür (Mylonakis ve ark 2004).

Köpeklerde görülenmonositik ehrlichiosis keneler aracılığıyla aktarılan ve *Ehrlichia* genusundaki *Anaplasmatacea* ailesine ait gram negatif bir bakteri olarak tanımlanan *E.canis* kaynaklı bir hastalıktır (Buhles ve ark 1974, Dumler ve ark 2001, Diniz ve ark 2008). Enfeksiyonun akut fazı post enfeksiyöz olarak 8-21 gün süre içerisinde kendini göstermektedir ve 2-24 hafta arasında değişen sürelerde devam etmektedir (Neer ve Harrus 2006). Etken (*E.canis)* spesifik olarak monositlere ve makrofajlara yönelim gösterir ve diğer bakterilerde olduğu gibi zorunlu hücre içi ve lipopolisakkaritleri içermeyen özelliğe sahiptir. (Buhles ve ark 1974, Unver ve ark 2006).

Dünya genelinde yaygın şekilde görülen monositik ehrlichiosis tropik ve subtropik bölgelerde çok daha sık rastlanılan bir hastalıktır (Buhles ve ark 1974, Rikihisa ve ark 1991, Dumler ve ark 2001, Faria ve ark 2010). Hastalığa ilişkin olarak yapılan bir çalışmada 2553 köpekten %19,8' inin seropozitif olduğu ortaya koyulmuştur (Labarthe ve ark 2003).

2.1.1. Prevalans

E.canis etkeninin dünya üzerindeki yayılımına bakıldığında tüm kıtalarda görüldüğü ve yaygın olarak tropikal ve subtropikal bölgelerde görüldüğü bildirilmiştir (Resim 3 - Companion Vector-Borne Disease [CVBD], Canine Ehrlichiosis – from Acute Infection to Chronic Disease , No.7, Aralık 2010). Ülkemizde etkenin epidemiyolojk durumuna ilişkin olarak yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde oldukça sınırlı veriler elde edildiği görülmüş ve bu nedenle de hastalığın yayılımı ve seroprevalansı hakkında yeterli bilgi toplanamamıştır. Detaylı şekilde yapılmış çalışmalardan birinde Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerimizde farklı illerde ele alınan 284 köpekten 59 tanesinde %20,8 prevalans saptanmıştır (Batmaz ve ark 2001). Bahsi geçen çalışmada %65,3 ve %40,6 oranları ile sırasıyla Adana ve İzmir en yüksek prevalansın saptandığı iller olarak kaydedilmiştir. Geçmiş yıllarda çoğunlukla bireysel olgu sunumları yapılmış olsa da (Börkü ve ark, 2003) moleküler anlamda yapılmış ilk çalışmalara bakıldığında *E.canis*'i belirlemeye yönelik testin uygulandığı 239 köpekte Immun flörasan antikor testi ve dot-ELISA ile sırasıyla 162 (%67,8) ve 37 (%53,3) köpekte seropozitiflik saptanmıştır (Erdeğer ve ark 2002).

Resim 3. Köpeklerde Ehrlichiosis'in Dünya üzerindeki dağılım haritası

***1.**Asya-Pasifik, **2.**Avrupa, **3.**Latin Amerika

Moleküler anlamda sonraki yıllarda Ankara'da yapılan başka bir çalışmada ise 12 köpekten 3'ünde *E.canis* yönünden PZR pozitiflik belirlenmiştir(Unver ve ark 2006). Ege bölgesinde yapılan il bazlı (Manisa, Marmaris, Muğla, Selçuk, Aydın) bir çalışmada, farklı yaş ve ırka sahip 371 köpekteteşhisi Nested PZR metodu ile yapılmış 154 olguda (% 41,5) *E.canis*' in pozitif olduğunu bildirilmiştir (Karagenç ve ark 2005). Yakın geçmişte Diyarbakır'da hızlı ELİSA test kitleri (Snap 3Dx) ile yapılmış bir çalışmada 82 köpeğin sadece 4 tanesinde (%4,8) *E.canis* antikorlarının belirlenebildiği görülmüştür (İçen ve ark 2011). Yine yakın geçmişte Ege bölgesindeki köpekler üzerinde uygulanmış bir projede Snap 4Dx test kiti kullanılarak % 27,5 seroprevalans saptanmıştır (Ural ve ark 2012).

Tablo 1. *E. canis* infeksiyonunun Türkiye'deki prevalansı.

Bölge	Hayvan Sayısı	Yöntem	Prevalans	Kaynak
Ege Bölgesi (İzmir) Akdeniz (Adana, Antalya) Marmara (Bursa, Balıkesir) Güneydoğu Anadolu Bölgesi (Şanlıurfa)	284	IFAT	%20,8	Batmaz ve ark. 2001
İç Anadolu Bölgesi (Ankara) Ege Bölgesi (Muğla, Aydın)	239	IFAT	**%**67,8	Erdeğer ve ark 2002
Ege Bölgesi (Aydın, Muğla, İzmir, Manisa)	371	PZR	%41,5	Karagenç ve ark 2005
Ege Bölgesi (Aydın, İzmir, Muğla, Denizli, Manisa)	275	Snap4Dx	%27,5	Ural ve ark 2012

2.1.2. Patogenez - Enfeksiyonun Bulaşma Seyri

Ehrlichiosis enfeksiyonu, etkeni taşıyan kenenin kan emmesi sırasında tükürük yoluyla aktarılır ve kan transfüzyonu sonrasında bulaşmış olur.

Köpek monositik ehrlichiosis (KME)'inin etkeni olan *E.canis* daha önce de bahsedildiği gibi konak üzerindeki monosit ve makrofaj serisi hücrelere affinite duymaktadır. Akut fazda enfeksiyonu takip eden 8 ila 21 gün içerisinde hastalığın başlamakta olduğu (Neer ve Harrus 2006) ve ateş, depresyon, dispne, ödem, kilo kaybı, hemoraji ve anoreksi gibi laboratuvar bulguları ile seyrettiği görülmüştür (Buhles ve ark 1974, Rikihisa ve ark 1991, Harrus ve ark 1999, Waner ve ark 2008). Hastalıkta görülen subklinik faz yıllarca devam edebilmektedir ve bununla birlikte parazitin konakçıda persiste bir enfeksiyon oluşturduğuna da dayanak oluşturmaktadır (Harrus ve ark 1999).

Kronik faza bakıldığında ise kanama bozuklukları ve kemik iliği baskılanması ve buna eşlik eden pansitopeni öne çıkmaktadır (Harrus ve ark 1999). Etkenin oluşturmuş olduğu immunopatolojik mekanizmalara bakıldığında köpekler üzerindeki etki tam olarak netleştirilememiştir. Fakat granulositik ehrlichiozisi olan insanlar üzerinde yapılmış çalışmalarda hastalığa ilişkin klinik görünümden bazı sitokin türlerinin sorumlu tutulduğu ortaya koyulmuştur (Dumler ve ark 2000). Köpeklerde görülen Ehrlichiosis'in patogenezinde rol oynayan en önemli faktörlere gelindiğinde ise, oluşan paraziteminin düşük seviyede oluşu ve ortaya çıkan klinik tablonun yapısı, konak hücrenin verdiği immun yanıtın ve proinflamatuar sitokin üretiminin olduğu görülmektedir (Rikihisa 2003, Unver ve ark 2006, Faria ve ark 2010). Zorunlu hücre içi bakterilerin oluşturmuş olduğu enfeksiyonlara bakıldığında, enfeksiyonların çoğunluğunda tam anlamda hücresel bir bağışıklığın sağlanmış olduğu, hastalığın atlatıldığı ve yeniden hastalık oluşumuna karşı korunmanın sağlandığı görülmektedir (Rikihisa 2003, Baneth 2010).

Enfeksiyonun patogenezinde immun mediatörlerin kilit noktada olduğu bilinmektedir. *E.canis* ile deneysel metotlarla enfekte edilen köpeklerde en az 1 hafta geçtikten sonra anti-trombosit antikorlarının (APA) mevcudiyeti saptanmıştır. Enfekte köpeklerde trombositlerde agregasyon bozuklukları, coombs testinin pozitif sonuçlanması, eritrositlerde otoaglütinasyon ve dolaşımda immun komplekslerin varlığı belirlenmiş olup bu bulgular hastalık ile ilişkilendirilmiştir (Baneth 2010).

E.canis ile meydana gelen enfeksiyonda trombositopeni oluşumunda muhtemel bazı mekanizmaların olduğu bilinmektedir. Kemik iliğindeki üretimin az seviyede olması, hücresel aktivitede düşüş, antikor opsonizasyonuyla birlikte dolaşım içerisindeki trombositlerin yarılanma süresinde azalma, damar endotelindeki değişiklikler ve trombositlerin dalağa salgılanarak orada birikimi muhtemel mekanizmalar olarak sayılabilir. Sirkülasyondaki trombositlerin azalmasının yanında, monositik ehrlichiosisi olan köpeklerde trombosit fonksiyon eksikliği, yine trombositlerde meydana gelen fonksiyon bozukluğunun nedeni olarak bilinmektedir (Baneth 2010).

E.canis ile doğal enfekte olmuş veya deneysel olarak bu enfeksiyonun oluşturulmuş olduğu köpeklerde sıklıkla karşılaşılan hematolojik parametrelerden biri trombositopenidir (Waner ve ark 1995). Hastalığın fazlarına göre şekillenen trombositopeni değişik mekanizmalarla meydana gelmektedir.

Akut fazda; damar endotelinde meydana gelen yangıyla birlikte trombosit tüketiminin artması, dalaktaki trombosit salgısındaki yükseliş ve immünolojik yıkımlanmalar ya da meydana gelen disfonksiyon nedeniyle trombosit yaşam sürelerinin azalması patogenezden sorumlu mekanizmalar olarak gösterilebilir. *E.canis* ile meydana gelen enfeksiyonu takip eden sürede 4 ila 9 gün arasında değişen trombosit yaşam sürelerinin, 2-4 güne düştüğü bilgisi radyoizotop kullanılarak gerçekleştirilmiş çalışmalarda elde edilmiştir. Ayrıca, periferdeki kanda trombosit sayısındaki azalma ile karakterize ve trombosit kaybı veya durgunlaşması gibi olaylarda rolü olan trombosit göç inhibisyon faktörü ortaya koyulmuştur (Abeygunawardena ve ark 1990).

2.1.3. Klinik Bulgular

Klinik tabloya bakıldığında CME'li köpeklerde akut, subklinik ve kronik fazlarla kendini gösteren multisistemik bir enfeksiyonu oluşturduğu görülmektedir(Diniz ve ark 2008, Mylonakis ve ark 2010, Harrus ve Waner 2011). Hastalık etkeni tüm köpek ırklarındaenfeksiyon oluşturmakta olup özellikle de Alman Çoban köpeklerinin etkene duyarlılığının yüksek olduğu ve enfeksiyonun yüksek mortalite ile morbiditede seyir gösterdiği ortaya koyulmuştur (Nyindo ve ark 1980, Harrus ve Waner 2011). Yaş veya cinsiyete bağlı şekilde predispozisyon olduğuna dair herhangi bir kaynak mevcut değildir. Enfeksiyonda karşılaşılan klinik tablo, etkenin çeşitli suşlarının ve diğer patojenlerle ko-enfeksiyon oluşturup oluşturmamasına göre değişiklik göstermektedir. Özellikle enfeksiyonun

taşınmasında rol oynayan aynı vektör ile bulaştırılabilen *Babesia canis* ve *Hepatozoon canis* gibi patojenlerle ko-enfeksiyon oluşması durumunda ortaya çıkan monositik ehrlichiosis tablosunun çok daha şiddetli seyrettiği de bildirilmiştir (Gal ve ark 2007, Diniz ve ark 2008, Mylonakis ve ark 2010, Harrus ve Waner 2011).

Akut faz incelendiğinde yüksek ateş, depresif hal, letarji, anoreksi, splenomegali, lenfadenomegali ve çeşitli hemorajik bozukluklar ile karakterize olduğu görülmütür. Bahsi geçen hemorajik bozukluklar kanama eğiliminde artışın yanında ekimoz, peteşiler ve epistaksis gibi bulgularla klinik seyir göstermektedir. Çoğunlukla korioretinitis, pupillada ödem, retinal hemoraji, retinal dökuntüler ve anterior uveitis gibi oftalmolojik lezyonlarla karşılaşılmaktadır (Komnenou ve ark 2007). Kandaki viskozite artışıyla birlikte ortaya çıkan subretinal kanama ve retinal dökuntüler körlüğün gelişimine neden olmaktadır (Harrus ve ark 1998). Takip eden nörolojik bulgulara bakıldığında ise menengitis ve meningial kanamalar ile karşılaşılmaktadır (Harrus ve Waner 2011).

Subklinik fazda klinik bulgu gözlenmeyebilirken (Waner ve ark 1997, Mylonakis ve ark 2010), monositik ehrlichiosisli köpeklerin bazılarında kronik faza doğru ilerleme görülebilmektedir. Enfeksiyonun kronik fazında ortaya çıkan bulgular akut fazdaki klinik tablonun benzeri olup daha ağır seyir göstermektedir (Harrus ve ark 1997, Harrus ve Waner 2011). Kronik fazda mukoz membranlarda solgunluk, kas zafiyetleri, hemorajik bozukluklar ve belirgin şekilde kilo kaybı sıklıkla karşılaşılan bulgulardandır (Harrus ve ark 1997).

Serolojik metodlar ve PCR kullanılarak fazlar belirlenmeye çalışıldığında enfeksiyon ile 4 ayrı fazda karşılaşılmaktadır. *E.canis* ile şekillenen akut fazda; akut *E. canis* infeksiyonu (antikor negatif ancak belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR pozitif]), *E.canis*'e maruz kalmada (belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR negatif] ancak *E. canis* seroaktif), aktif enfeksiyon (PZR pozitif ve *E. canis* seroaktif) ve hiç *E. canis*' e hiç maruz kalmamış köpekler (PZR negatif antikor negatif) olmak üzere enfeksiyona ilişkin 4 ayrı tablo ile karşılaşılmaktadır (Diniz ve ark 2008).

2.1.4. Laboratuvar Bulguları

Tanıda ilk adımda mutlaka tam kan sayımı analizi yapılması gerekmektedir. Akut fazın en karakteristik bulgusu orta dereceden şiddetli derecelere kadar değişkenlik

gösterebilen trombositopeni tablosudur. Trombositopeni, sürme froti hazırlanılarak trombosit sayılarının değerlendirilmesi ile kesinlik kazanır. Deneysel metodlarla enfekte olmuş köpeklerde enfeksiyonun 10-21. günlerinde belirgin trombositopeni geliştiği gözlenlenmiş ve trombosit sayılarının da 20.000 ila 52.000/µl arasında değişmekte olduğu belirlenmiştir. Deneysel enfektelerde trombosit hacmindeki artışa bakıldığında ortalama olarak 6. günden sonra ortaya çıktığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada akut fazda karşılaşılan trombositopeni tablosuna hafif bir anemi ve lökopeninin eşlik ettiği görülmüştür (Assarasakorn ve ark 2008, Mylonakis ve ark 2010, Harrus ve Waner 2011).

Subklinik evrede klinik bulgulara rastlanılmasa da hafif trombositopeni tablosu ile karşılaşıldığı görülmüştür (Mylonakis ve ark 2010, Harrus ve Waner 2011). Trombosit sayılarının %42'ye ulaşan oranlarda azaldığı yine deneysel metodlarla enfekte olmuş köpeklerde ortaya koyulmuştur (Waner ve ark 1997, Harrus ve ark 1998). Lökosit ve eritrosit düzeylerindeki düşüşle de karşılaşılsa da bu değişiklikler hafif düzeyde ortaya çıkmaktadır (Waner ve ark 1997). Kronik fazda trombositopeni tablosu genel olarak hafif seyretmekte olup bu tabloya bariz bir anemi ve lökopeni tablosu eşlik etmektedir. Kronik formda karşılaşılan kemik iliği hipoplazisinin en muhtemel sebebi ise şiddetli pansitopeni bulgusudur (Harrus ve ark 1997).

Monositik ehrlichiosisin tanısında ve enfeksiyonun seyrinde dikkati çeken parametreler olarak; ortalama trombosit hacmi, platelekrit ve trombosit dağılım genişliği gibi belirteçlerdir (Harrus ve ark 1997).

Tanıda ışık mikroskobu altında incelenen sürme frotilerde monositlerin içerisinde tipik sitoplazmik *E.canis* morulalarının tespiti önemli bir işarettir. Bu morulalar ile membran bağımlı vakuol şeklinde bakterilerle iç içe geçmiş şekilde olan elektron mikroskobik cisimcikler şeklinde karşılaşılmaktadır (Hildebrandt ve ark 1973). Fakat morulaların mikroskop altında tespiti çok zor olup olguların yalnızca %4'lük bir kısmında tespit edildikleri görülmüştür (Woody ve Hoskins 1991). Bu anlamda çok sayıda froti hazırlanarak morulaların tespit edilme oranı yükseltilmektedir. 1000 adet immersiyon objektif alanı incelendiğinde sürme froti duyarlılığı yaklaşık olarak %66 oranında belirlenmiştir. Kemik iliğinden hazırlanan frotilerde ise bu oran %34 civarındadır. Dikkat edilecek nokta 1000 adet immersiyon sahası incelenmesinde 50-60 dk arasında değişen inceleme süresinin bilinmesidir (Mylonakis ve ark 2003, Harrus ve Waner 2010).

Mikroskop sahasında karşılaşılabilecek trombositler, fagositoza uğramış nükleer materyaller Ehrlichial inkluzyon cisimcikleri ile ayırt edilmelidir. Ayrıca etken ile aynı ailedeki diğer organizmalar monosit enfeksiyonuna da neden olmaktadırlar (Kelly ve ark 1994, Breitschwerdt ve ark 1998). Epidemiyolojik faktörler ve bulaşmada rol oynayan vektörlerin prevalansları dikkate alındığında iklimsel koşullara göre de birtakım farklılıklar meydana gelebileceğinden ayırıcı tanı dikkatli bir şekilde ele alınmalıdır. Bu nedenle moleküler düzeydeki spesifiteyi sağlamak amacıyla PCR uygulamalarının yapılması ve sadece uygulama ile mikroorganizmanın identifiye edilmesi ve karakterizasyonu ortaya koyulabilmektedir (Breitschwerdt ve ark 1998).

Akut fazda sıklıkla şiddetli bir trombositopeni, hafif ya da orta dereceli lökopeni ve normositik/normokromik/non-rejeneratif anemi ile karşılaşılmaktadır (Kuehn ve Gaunt 1985, Dagnone ve ark 2003, Castro ve ark 2004). Enfeksiyonu takip eden 10 ila 20. günlerde trombositopeni tablosu şekillenmekte ve bununla birlikte büyük, rejeneratif yapıdaki trombositler de artış göstermektedir. Hafif lökopeni tablosu enfeksiyon sonrasındaki 3-4 hafta boyunca görülmekte ve devamında lökositoz ve monositozis tabloları takip etmektedir (Kuehn ve Gaunt 1985, Dagnone ve ark 2003).

Subklinik fazda hafif trombositopeni tablosu ile karşılaşılmaktadır. Bu fazda nötropeni tablosu bildirilmiş olsa da eritrositlere ilişkin parametrelerde anlamlı bir etkilenmenin olmadığı ortaya koyulmuştur (Kuehn ve Gaunt 1985).

Kronik fazda sıkça karşılaşılan parametrelere bakıldığında ise ciddi derecedeki trombositopeni, lökopeni ve anemi tablosuyla karşılaşılmaktadır. Hiposelüler kemik iliğinin baskılanmasıyla birlikte pansitopeni tablosu ortaya çıkmaktadır (Breitschwerdt 2000). Monositozis ve lenfositozis gibi bulgularla da karşılaşıldığı vakalar mevcuttur. Sekonder olarak glukokortikoidlere verilen yanıta bakıldığında ise eozinopeni ve lenfopeni ile de karşılaşıldığı ortaya koyulmuştur (Breitschwerdt 2000, Wanner ve Harrus 2000).

Monositik ehrlichiosisli köpeklerde sıkça kullanılan biyokimyasal parametreler hipoalbuminemi, hiperglobinemi ve hipergamaglobulinemidir. Hastalığın seyri boyunca serum globülin konsantrasyonu bariz şekilde artış göstermektedir. Özellikle enfeksiyonu takip eden 1. ve 3. haftalarda bu artış sıklıkla şekillenmektedir (Wanner ve Harrus 2000). Pansitopeni tablosunun eşlik ettiği köpeklerde, aynı durumun görülmediği köpeklere oranla serum total protein ve özellikle gammaglobülin konsantrasyonlarının daha az seviyede olduğu

bildirilmiştir. Bu sonuç göz önünde bulundurulduğunda pansitopeni tablosunun eşlik ettiği vakalarda, sekonder enfeksiyon riskinin daha yüksek olmasının nedenlerinden biri olabileceği raporlanmıştır (Waner ve Harrus 2000).

Özellikle akut dönemde serumda alkalen fosfataz (ALP) ve alanin aminotransferaz (ALT) aktivitelerinde geçici de olsa hafif düzeyde bir artışın görülmesi söz konusudur (Breitschwerdt 2000). Deneysel olarak enfekte edilmiş vakalarda ise akut dönemde geçici bir proteinüri tablosu, glomeruluslarda immunkompleks birikimleri, minimal düzeyde de olsa kalıcı glomerüler hasar oluşumu ve membranoproliferatif bir glomerulonefritis tablosu olduğu belirlenmiştir (Codner ve Farri-Smith 1986, Codner ve Maslin 1992, Codner ve ark 1992, Iqbal ve Rikihisa 1994). Kronik döneme bakıldığında ise antijenik olarak sürekli uyarım nedeniyle glomeruluslarda biriken immunkompleks miktarında artış ve membranoproliferatif glomerulonefritis tablolarında ilerleme söz konusudur (Breitschwerdt 1995).

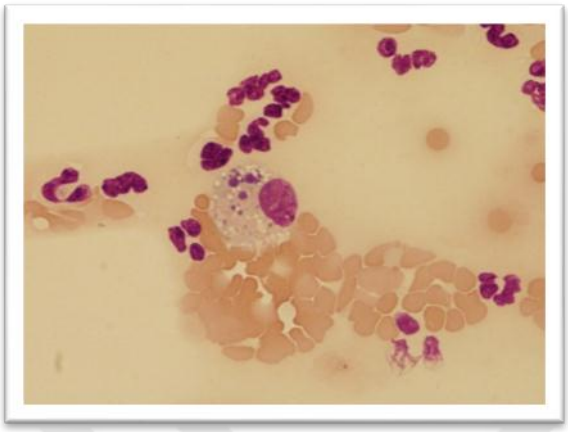
Ehrlichiosisli köpeklerin yaklaşık olarak %50'sinde proteinüri tablosu şekillenmektedir. Azotemi tablosu ise prerenal veya sekonder olarak renal hastalıkları sonucunda karşılaşılan bir durumdur. Renal azotemi temelde glomerulonefritis ve renal intersitisyel plasmositozis sonucunda meydana gelmektedir (Grene 1990).

2.1.5. Tanı

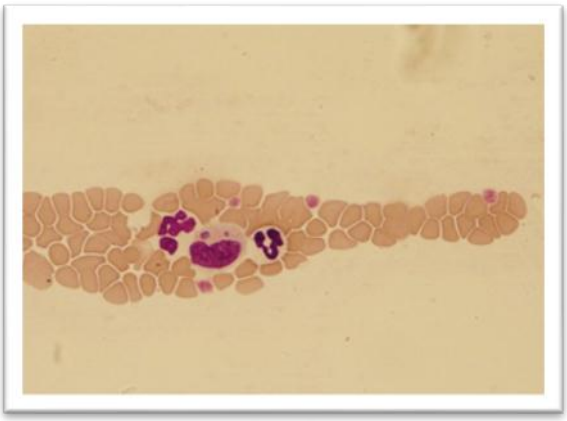
E.canis'in tanısına bakıldığında lenf nodülü aspiratında (Mylonakis ve ark 2003), dalaktan alınan aspirasyonlarda (Faria ve ark 2010) ve buffy coat (Elıas 1991)'ta etkenin morula formlarına ve inklüzyon cisimciklerine rastlanılmaktadır; spesifik olarak antikorların tespit edilmesi için ise indirekt IFAT (O' connar ve ark 2006) ve antijenik amaçlı tanı için PCR kullanılmaktadır (Nakaghı ve ark 2008).

Sürme kan frotilerinden elde edilen preparatların incelenmesi sonucu monositlerde tipik *E.canis* morulalarının tespit edilmesi enfeksiyonun tanısını güçlendirmektedir. Mikroorganizmalarda yoğunlaşmış şekilde görülen elekron mikroskobik cisimcikler, morula olarak adlandırılmaktadır (Hildebrandt ve ark 1973, Harrus ve Waner 2011). Morulaların mikroskobik olarak tespit edildiği vakalar, olguların %4'ünü oluşturmaktadır (Woody ve Hoskins 1991, Harrus ve Waner 2011). Bu nedenle olabildiğince çok miktarda sürme froti hazırlanılarak morulaların tespit edilme şansı arttırılmaktadır. 1000 adet immersiyon objektif alanı mikroskop altında incelendiğinde sürme kan frotilerinin duyarlılığı %66 gibi bir oranda

tespit edilmiştir. Kemik iliğinden alınarak elde edilen sürme frotilerde ise bu duyarlılık oranı %34 gibi bir orana sahiptir (Mylonakis ve ark 2003, Harrus ve Waner 2010).



Resim 4. *E. canis* morulası



Resim 5. *E. canis* morulası

*Resim 4 ve Resim 5 ADÜ Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Kliniği'ne ait arşivden alınmıştır.

Ehrlichiosisli köpeklerde, hazırlanan sürme preparatlarda trombofagositozis, monositlerde eritrofagositozis ve trombositler de görülebilmektedir. Eritrosit morfolojisine bakıldığında olgudan olguya değişiklik göstermediği gözlenmiştir (Harrus ve ark 2007). İlerleyen safhalarda granüler lenfositozisin yoğun şekilde olduğu bildirilmiştir. Wright-Giemsa kullanılarak boyanmış bir frotide 200 lenfositin nerdeyse yarısında azurofilik granül görüldüğü tespit edilmiştir. Bu hücrelerin çekirdekleri hasar görmüş veya olgun nükleer kromatinlerle yer değiştirmiş olup sonuçta granüler lenfositleri oluşturmuşlardır (Heeb ve ark 2003). İşte bu sebeple klinisyenler yanlışlıkla lenfosittik lökemi tanısını düşünmektedirler (Harrus ve Waner 2011).

Kan sürme frotilerinin incelenmesi Monositik Ehrlichiosis ile ko-enfekte olmuş diğer vektörlerden kaynaklanan patojenlerin ve hastalığa etki eden diğer etkenlerin tespit edilmesinde de faydalı bir uygulama haline gelmiştir (Gal ve ark 2007).

Enfeksiyonun teşhisinde çok sayıda serolojik metod olduğu bilinmektedir. Anti *E.canis* antikorlarının tespit edilmesinde temel metod indirekt immun florasan antikor testidir. Bu test ile belirlenen Ig M düzeylerinin *E.canis*'e maruz kalan köpeklerde söz konusu antikorun enfeksiyon sırasında kandaki düzeylerinin düzensiz şekilde artış göstermesi nedeniyle gerçek anlamda bir belirleyici olmamaktadır (Anonim 1). Buna karşılık *E.canis*'in saptandığı

köpeklerde IgG titresinin ≥ 1/ 40 değerinde olması pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir.

Akut enfeksiyon tablolarında 7-14 gün aralıklarla ardışık şekilde tekrarlanan IFA testinin uygulanması tavsiye edilmekte ve bu testin sonucunda antikor titrelerindeki 4 kata kadar veya daha fazla miktardaki artış bir enfeksiyon olduğuna işaret etmektedir (Harrus ve Waner 2011). Anti ehrlichial IgG antikorlarının enfeksiyondan iyileşme sağlandıktan aylar hatta yıllar sonra dahi persiste olarak kaldığı da yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (Bartsch ve Greene 1996).

Enfeksiyonun tanısında IFA dışında ELİSA testi de kullanılmaktadır (Harrus ve ark 2002). Etkene ait antikorların tespitinde Dot-ELİSA yönteminin kullanılması ile elde edilen ticari test kitleri de mevcuttur. ELİSA yöntemi ile çalışılan Snap3Dx (Hegarty ve ark 2009), Snap4Dx (Carrade ve ark 2011) test kitleri *E.canis*'in majör immunodominant proteinleri olan P30 ve P30-1'in tespit edilmesi prensibi ile çalışmaktadırlar (IDEXX laboratuvarları) (Harrus ve ark 2002). Ehrlichiosisli köpeklerde, İsrail'de daha önceden yapılmış bir çalışmada SNAP3DX testinin spesifitesinin ciddi derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bahsi geçen çalışmada araştırmacılar Dot-ELİSA test kitlerinin yüksek spesifite ve sensitiviteye sahip olduğunu da rapor etmişlerdir. Ayrı araştırma grubu antikorun belirlendiği ilk andan itibaren, geçen 1-2 hafta içerisinde tekrardan ELİSA testi yapılarak testin duyarlılığının daha da artacağını bildirmişlerdir (Harrus ve ark 2002). SNAP4DX test kitlerinin, etkenin yıllık takibinin sağlanması amacı ile yılda bir kere tekrarlanması gerektiği bildirilmiştir. Ancak teste ait sonuçların trombosit sayımları ve moleküler düzeydeki bulgularla birlikte ele alınmasının önemi de vurgulanmıştır (Hegarty ve ark 2009).

2.1.5.1. Canine Monocytic Ehrlichiosis ile ilişkide olabilecek bazı kardiyopulmoner belirteçler

2.1.5.1.1. Natriüretik Peptidler

Kardiyak bağlantısı olan hastalıklar vazoaktif maddelerin dolaşımdaki konsantrasyonunun yükselmesine neden olan çeşitli nöroendokrin yanıtlarla sonuçlanır. Bu maddelerin (kardiyak biyobelirteçler) dolaşımdaki konsantrasyonlarının ölçülmesi klinik anlamda pekçok fayda sağlayabilir. Çeşitli kalp hastalıklarında biyobelirteçlerin tespiti yapılmıştır fakat natriüretik peptidler; özellikle de beyin natriüretik peptid (BNP) ve N-

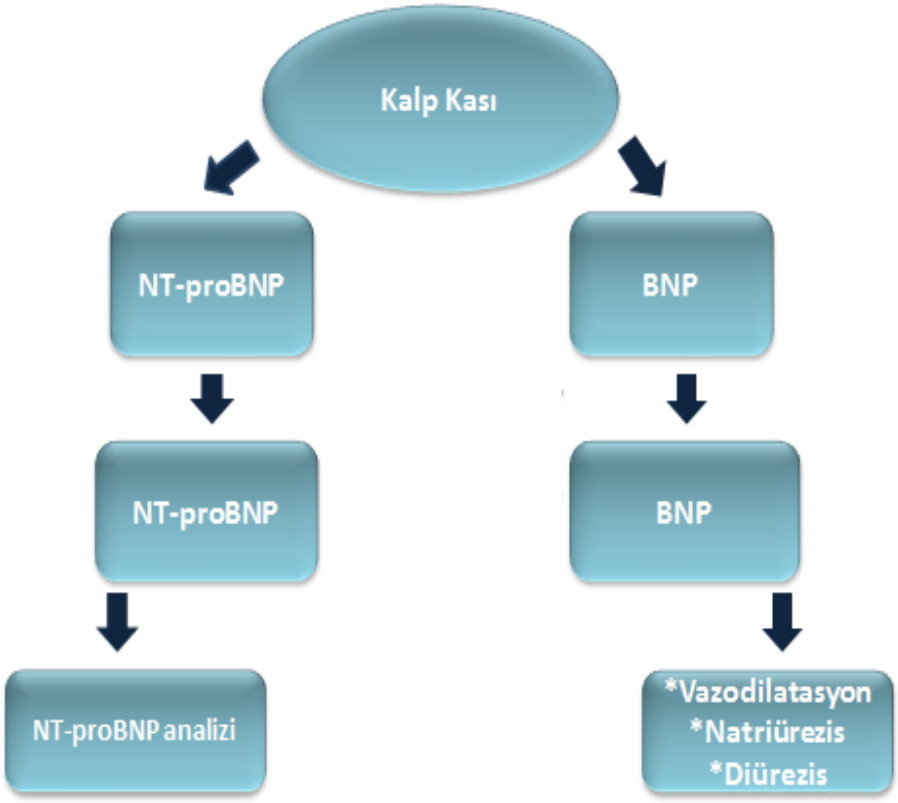
terminal pro-B tipi natriüretik peptid (NT-proBNP), insan hekimliğinde ve veteriner hekimlikte en faydalı biyobelirteç olarak bildirilmiştir (Sisson, 2004; Boswood, 2009; Haggstrom ve ark. 2009; Connolly, 2010; Oyama ve Singletary, 2010). Kardiyak NT-proBNP, BNP üretiminin bir yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 1). Natriüretik peptitler, atriyumdaki zara bağlı granüler şekilde depo edilir ve miyokartta anormal duvar gerginliğine yanıt olarak salınır. 6 farklı natriüretik peptid türü tanımlanmış olsa da kedi ve köpeklerde baskın olarak görülen kardiyak natriüretik peptidler; atriyal natriüretik peptid (ANP) ve B-tipi natriüretik peptid (BNP)'dir (vanKimmenade RR, Januzzi JL Jr. 2009). BNP ve ANP kalp kası dokusu tarafından üretilir ve hipertrofi, hipoksi gibi kalbe aşırı yük getiren durumlara yanıt olarak salınırlar. Ayrıca nöroepinefrin ve anjiyotensin II (Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. 2009) gibi diğer nörohormonal peptidlerin salınımı ile ilişkili olarak da açığa çıkabilirler.

BNP, ilk olarak 'beyin natriüretik peptidi' olarak bilinen, temelini domuz beyin dokusundan alarak oluşmuş ve böbreklerden sodyum atılımının (natriürez) artmasına neden olan bir peptittir. Ana kaynağı kalp ventrikülleri olan dolaşımdaki peptidler 'B tipi' natriüretik peptitler olarak yeniden adlandırılmıştır. İlk olarak prohormonlara (örn: proBNP, proANP) dönüşen, sonrasında ise olgun/aktif hormonlara dönüşen natriüretik peptidler miyokartta üretilirler. Ventriküler miyositlerden pro-BNP üretimi ve salınımı için mekanik stres ve kalp distansiyonu uyarısı esastır. Fizyolojik olarak BNP, ventriküllere kan dolduğunda sodyum ve sıvı ekskresyonunu arttırarak vasküler kan hacmini ve direnci düzenler. Böylece dolaşımdaki BNP düzeyleri konjesyonda olduğu gibi venöz basınç oluşturarak kimyasal barometre görevi görür. Ayrıca hipertrofi, iskemi veya nörohormonlara yanıt olarak da BNP salınımı meydana gelebilir. Sonuçta proANP ve proBNP, spesifik serum ve miyokardiyal proteazlar tarafından aktif bir korboksi-terminal fragmana (C-ANP, C-BNP) ve inaktif bir N-terminal yan ürününe (NT-pro ANP, NT-pro BNP) bölünür.Köpeklerde pre-pro-BNP öncelikle kardiyak ventriküler miyositler içinde 134 aminoasit peptidi (kedilerde 132 aa) olarak sentezlenir. Prekürsör molekülün (proBNP) proteolitik bölünmesi biyolojik açıdan aktif C-terminal BNP, 32 amino asit peptid ve biyolojik olarak inaktif olan 76 aminoasit N-terminal fragmanı (NT-proBNP) üretir. C-terminal natriüretik peptitlerin yarılanma ömrü kısadır (köpek proBNP için 1.57 dk; Thomas ve Woods, 2003). NT-proBNP dolaşımdan daha yavaş şekilde uzaklaştırılır ve yarılanma ömrü, C-terminal BNP'den önemli derecede daha uzun (ve plazma konsantrasyonu önemli ölçüde daha yüksektir), klinik uygulama için ise daha uygun bir biyobelirteçtir.

C-ANP ve C-BNP ağırlıklı olarak böbrek, akciğerler, damarlar ve adrenal bezlerde bulunan 2 ana natriüretik peptid reseptörüne bağlanır. Bu reseptörlerin aktivasyonu natriürezis ve vazodilatasyonla sonuçlanır, ayrıca antihipertrofik ve antifibrotik ektilerle sonuçlanır. Böylece natriüretik sistem renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin vazokonstriktif ve sodyum tutucu etkilerine karşı koymuş olur. Bu 2 sistem arasındaki denge konjestif kalp yetmezliğinin gelişimine neden olur (Potter LR, Yoder AR, Flora DR, et al. 2009, Mair J. 2008). Kardiyak kökenli hastalıklar şiddetlendikçe ve konjesyon bozuldukça BNP miktarı artarak salınmaya devam eder ve kan hacmini/basıncını normal seviyeye getirmeye çalışır. Bu sistem konjesyonu dengeli hale getirmeye çalışırken 'hemodinamik savunma reaksiyonu' diğer tüm parametrelerin rollerini de kullanır ve şiddetli kalp hastalığıyla birlikte bariz bir ödem tablosu ortaya çıkar. Bu durum BNP'nin kötüye giden kardiyak durum ile ilgili olarak arttığını göstermektedir.

Hayvanlarda insanlarda yapılan çalışmalara göre daha az kapsamlı çalışma yapılmış olmasına rağmen, kedi ve köpeklerde (Haggstrom ve ark. 2000; Prosek ve ark. 2007, DeFrancesco ve ark. 2007; Boswood ve ark. 2008; Fine ve ark. 2008; Oyama ve ark. 2008; Achen ve ark. 2009; Oyama ve ark. 2009; Tarnow ve ark. 2009) kalp hastalıklarını dispnenin diğer nedenlerinden ayırt etme konusunda kardiyak biyobelirteçler, özellikle de natriüretik peptitler yardımcı tanı testleri olarak kullanılmaktadır. Köpeklerde gizli kardiyomiyopatiyi tanımlamada natriüretik peptitlerin büyük ölçüde role sahip olduğu bilinmektedir (Chetboul ve ark. 2004; Oyama ve ark. 2007) ancak izole edilmiş bir test olarak sınırlı oranda fayda sağladığı belirlenmiştir (Baumwart ve Meurs, 2005; Wess ve ark. 2011). Mitral kapak hastalıkları, dilate kardiyomiyopati ve hipertrofik kardiyomiyopatiyi kapsayan dejeneratif kalp hastalıkları BNP üretiminin yükselmesiyle ilişkilidir ve bu yüzden NT-proBNP formasyonu da yükselmiş olur. NT-proBNP dolaşımda BNP'den daha kararlı seyretmektedir ve standart ELISA tabanlı teknoloji kullanılarak tespiti mümkündür. NT-proBNP, BNP formu ile 1:1 oranında üretilmektedir ve hem kedilerde hem de köpeklerde solunum kökenli etiyolojiye sahip kalp hastalıklarının belirlenmesinde yardımcıdır.

Biyolojik olarak aktif hormon aslında BNP'dir ve NT-proBNP, BNP'nin oluşumu sırasında açığa çıkan bir yan üründür. Yüksek kararlılığı sayesinde NT-proBNP molekülü tanısal anlamda test uygulanan biyobelirteç halina gelmiştir. (Oyama, 2010) (Şekil1)



Şekil 1. NT-proBNP'nin sekresyon ve salınımının şematik gösterimi.

Tablo 2. NT-pro BNP değerlerinin yorumlanması **(**Cardiopet proBNP, IDEXX Reference Laboratories).

NT-pro BNP değerlerinin yorumlanması	
<900 pmol/l	Respiratorik ve/veya egzersiz intoleransı gibi klinik bulguların kalp yetmezliğine bağlı olarak gelişme olasılığı düşüktür. Klinik bulguların kaynağının belirlenmesi için diğer nedenler göz önünde bulundurulmalıdır.
900–1800 pmol/l	Bu referans aralığı, klinik bulguların kalp yetmezliği veya diğer olgulardan kaynaklı olup olmadığına karar verme konusunda yetersizdir. Diyagnostik açıdan diğer durumlar incelenmelidir.
>1800 pmol/l	Respiratorik ve/veya egzersiz intoleransı gibi klinik bulguların kalp yetmezliğine bağlı olarak gelişme olasılığı yüksektir. Kardiyak tetkikler veya konsültasyonlar yapılması yardımcı olabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hayvan Materyali

Araştırmanın hayvan materyalini 21'i *E.canis* ile doğal enfekte (önceden herhangi bir sağaltım uygulaması yapılmamış), 7'si de sağlıklı olmak üzere toplam 28 köpek oluşturdu. Enfekte köpekler Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Küçük Hayvan Kliniği'ne CME ile uyumlu klinik bulgulardan (yüksek ateş, generalize lenfadenopati, iştahsızlık, splenomegali, kas zafiyeti, peteşi, epistaksis, bacak ödemi, dispne, poliartritis veya deride ekimoz) bir ya da birkaçını gösterdiği için getirilen olgulardan seçildi. Kontrol grubu hayvanlar hasta hayvanlar ile benzer yaş aralığından, her 2 cinsiyetten ve herhangi bir hastalık tablosu bulunmayan olgular arasından seçildi.

3.2. Hayvan Muayenesi ve Sınıflandırma

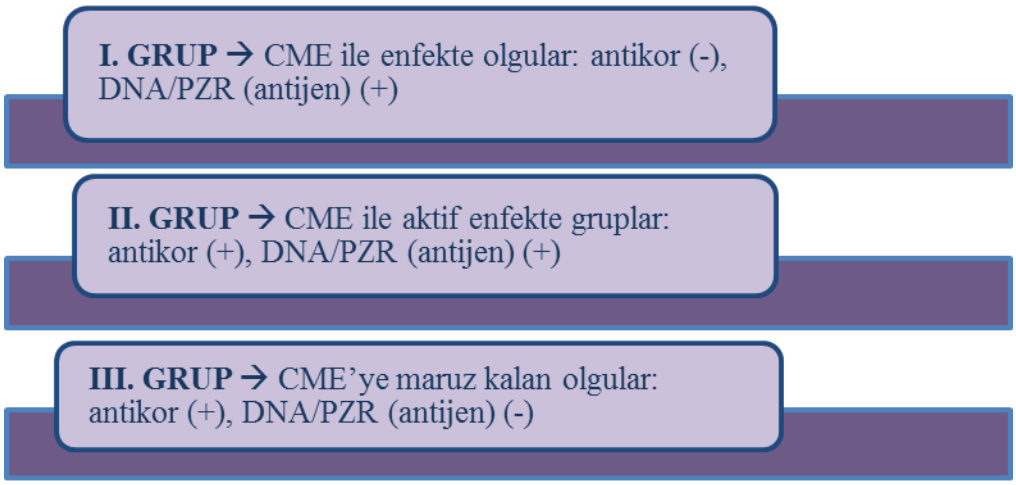
Klinik bulgulartemelinde CME şüpheli tanısı koyulan köpeklerde kan örneğinde hızlı ELİSA prensibiyle çalışan test kiti (Snap 4Dx plus, Idexx USA) pozitifliği ile CME tanısı kesinleştirildi. Bölgemizde hastalığın prevalansı dikkate alındığında yaklaşık 200-250 civarında köpeğin CME yönünden değerlendirilmesi sonucu araştırmada kullanılacak yeter sayıda olguya ulaşabileceği hesaplandı. *E.canis* ile enfekte olduğu saptanan köpeklerin vektörlerle nakledilen ve kardiyak hasara yol açabilen *Ehrlichia canis/E.ewingii, Anaplasma phagocytophilum, Borrellia burgdorferri* ve *Dirofilaria immitis* ile koenfekte olup olmadıkları hızlı test kiti (SNAP 4Dx plus, Idexx USA) ile araştırıldı ve yalnızca (daha sonradan PCR analizi ile antijen belirlenen) *E.canis* ile enfekte köpekler, serolojik, klinik ve laboratuvar bulgular temelinde önerdiği evreleme dikkate alınarak 3 farklı grup (her grupta n=7) altında değerlendirildi.

3.3 Polimeraz Zincir reaksiyonu ile antijen tespiti

E.canis etkeninin DNA'sının çekilmesi için DNA ekstraksyion kiti kullanıldı. Laboratuvara getirilen *E.canis*'le enfekte örnekler literatürde bildirilen (Alves ve ark, 2013) yöntem (Qiahgen DNeasy Blood & Tissue Kit, Germany, 69504) kullanılarak DNA

ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Elde edilen DNA'lar GO mikropleyt spektrofotometresinde ölçüldü. Nested PCR için ilk amplifikasyon adımında; ECC (5'AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') ve ECB (5′ CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3′) olmak üzere iki çift primer kullanıldı (Alves ve ark, 2013). İkinci aşama için kullanılan primerler ECAN5 (5′ CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3′) ve HE3(5′ TATAGGTACCGTCATTATCTTCCC TAT-3′) primerleriydi. Bu primerler sırasıyla 16S rRNA geninin 458 ve 398 bp'lik fragmanlarını çoğalttılar(Murphy ve ark. 1998). Her reaksiyon için 12.5 pmol ve her primer 0.625 birim Taq DNA polimeraz (Geneaid, New), PCR tamponu (50 mM KCl ve 20 mM Tris HCl) (Geneaid, New Taipei City Tayvan), 1 mM $MgCl_2$ (Geneaid, New Taipei City, Tayvan), dNTP karışımı (0.125 mM her biri) (Geneaid, New Taipei City, Tayvan), DNaz/RNaz'sız damıtılmış su (gibco thermo fisher scientific, Waltham, MA USA) ve 80-240 ng DNA örneği kullanıldı. Tepkime bir AB applied biosystems veriti olmak üzere termal sayklır üzerinde gerçekleştirildi. Reaksiyonun basamakları; 95^{o}C'de 2 dk ön denatürasyon, her çevrimde 95^{o}C'de 30 saniye boyunca denatürasyon, 60^{o}C'de 1 dakika tavlama, 72^{o}C'de 5 dakika uzatma şeklindeydi. Ardından da %1.5 agaroz jel hazırlandı. Agaroz jel PCR ürünleri, 90 volt lineer akımda 1 saat 30 dakika boyunca elektroforez uygulamasına tabi tutulmuştur. Bu işlem sonrası jel görüntüleme cihazında ''UV transilluminator UVP FC3 ChemiHP 410 Görüntüleme Sistemi'' görüntüleri elde edilmiştir. Ortaya çıkan bantlar, DNA markörleriyle karşılaştırma yoluyla değerlendirilmiştir. Buna göre; I. grup [akut *E.canis* infeksiyonu; antikor negatif ancak belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR pozitif]], II. grup [aktif infeksiyon (PZR pozitif ve *E.canis* seroaktif) III. grup [*E.canis*' e maruz kalma (belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR negatif] ancak *E.canis* seroaktif)], ve IV. grup sağlıklı kontrol grubu [hiç *E.canis*' e maruz kalmamış köpekler (PZR negatif antikor negatif)] olmak üzere hastalıkla ilişkili 3 ayrı sınıflandırmaya tabi tutuldu (Tablo 3). PZR uygulamalarında alanında uzman Dr. Öğretim Görevlisi Adnan AYAN'dan yadsınamaz destek alındı. Hastalıkta enfekte köpeklere yönelik değerlendirme yukarıda da sözü edildiği üzere antijen antikor ilişkisine göre tablo 3'te sunuldu.

Tablo 3. Canine Monositik Ehrlichiosis'de evreleme (Diniz ve ark, 2008).



Sağlıklı kontrol grubu (IV.grup), kliniğe aşı veya sağlık kontrolü amacıyla getirilen, klinik ve laboratuvar değerlendirilmelerinde herhangi bir anormallik saptanmayan her iki cinsiyetten ve CME'li gruplarına benzer yaş aralığındaki köpeklerden (n=7) oluşturuldu. *Vena cephalica antebrachii*'den 0,5'er ml kan EDTA'sız tüplere alındı.

3.4. Sınıflandırmada Kullanılan Laboratuvar Muayeneler

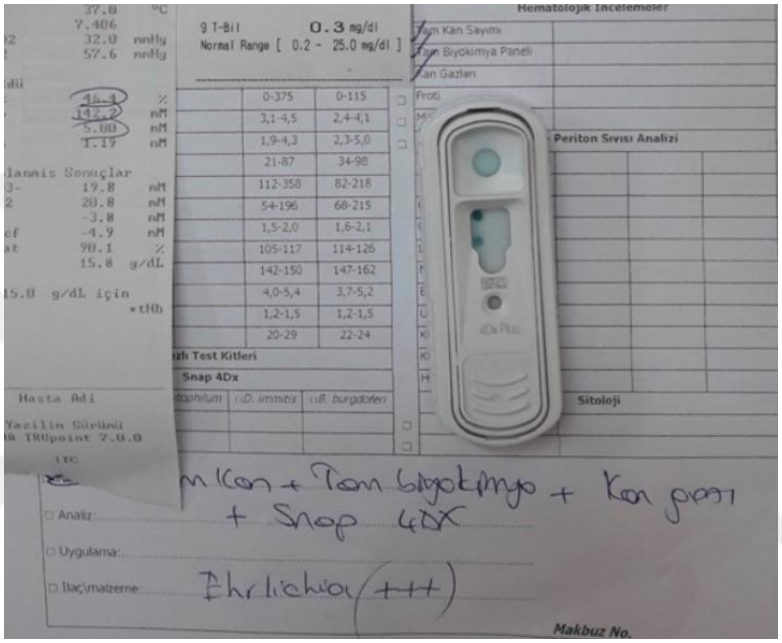
Evrelendirmeye yönelik hematolojik ve serolojik değerlendirmeleri kapsamaktaydı. Bu amaçla tüm olgulardan kan örnekleri alındı. Projenin uygulanması sırasında izlenilen laboratuvar yöntemlerini içeren yöntem/cihaz bilgileri Tablo 4'te gösterildi.

Tablo 4. Projede izlenilen laboratuvar yöntemleri.

ÖRNEK	Parametre/Ölçüm	Yöntem/Cihaz
SERUM	1) Kalp kurdu Hastalığı (Dirofilariazis), Ehrlichiosis, Lyme Hastalığı ve Anaplasmosis'in tespiti 2) NT-pro BNP	1) SNAP 4Dx plus, Idexx USA 2) Wondfo Finecare Flörosan Immunassay cihazı

3.4.1.NT pro BNP Analizi

Kan örnekleri *Vena cephalica antebrachii'*den alındı. Kalp kurdu Hastalığı, Ehrlichiosis, Lyme Hastalığı ve Anaplasmosis'in tespiti SNAP 4Dx plus (Idexx USA) test kiti ile belirlendi (Resim 6). Santrifüj cihazı kullanılarak elde edilen serum örnekleri Florasan Immunoassay metodu kullanılarak analiz yapan Finecare marka cihaz ile NT-proBNP düzeylerinin belirlenmesinde kullanıldı.



Resim 6. Snap 4Dx Plus test kiti ile belirlenmiş Ehrlichiosis enfeksiyonu.

3.4.2. NT-pro BNPHızlı Kantitatif Test

3.4.2.1.Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

Testin uygulanması serum, plazma veya tam kan ile yapılabilecek durumda idi.

3.4.2.2.Damar içinden tam kan için örnek toplanması

i.Standart kan alma prosedürü kullanılarak pıhtılaşmayı önleyici madde içeren kan tüpü kullanılarak damar içinden kan örneği toplandı. (EDTA'lı tüp kullanılması daha uygun olacaktır).

ii. Örneklerin hızlı bir şekilde test edilmesi önerilmektedir. Örnekler uzun süreli olarak oda sıcaklığı dışında saklanmamalıdır. Eğer örneklerin hızlı bir şekilde analizi yapılmıyorsa 2^oC-8^oC arasındaki sıcaklıklarda muhafaza edilmelidirler.

iii. Tam kan örnekleri 2 günden fazla 2^oC-8^oC arasındaki sıcaklıklarda bekletilirse test için uygunluğunu kaybedecekleri için bu hususa da dikkat edildi.

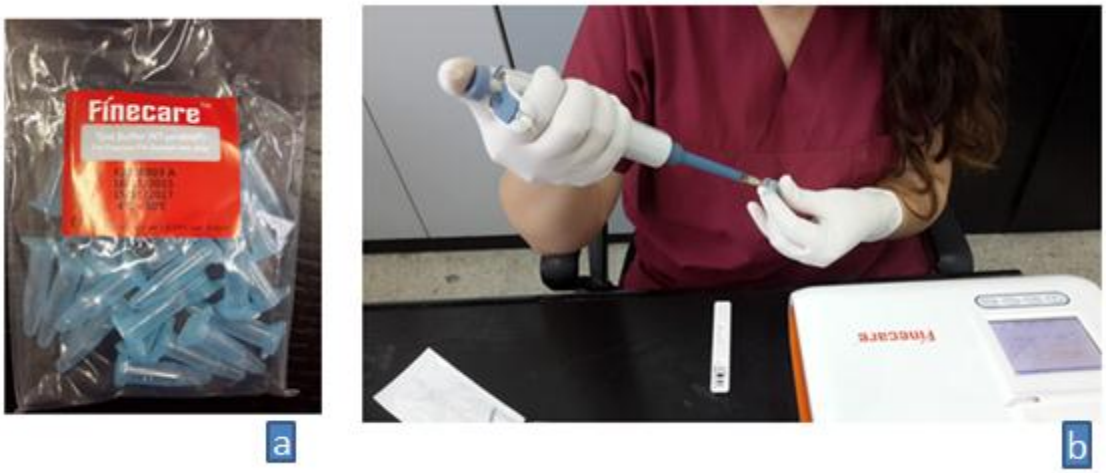
3.4.2.3. Serum ve Plazmanın Hazırlanması

Standart kan alma prosedürü kullanılarak kan tüpüne damar içinden tam kan örneği alındı. [Plazma kullanılacaksa kan tüpü antikoagülan özelliğe uygun olacak şekilde seçilmelidir (EDTA'lı tüp önerilmektedir)]. Serum ve plazmanın ayrımı hemolize engel olmak için en kısa sürede yapıldı. Kan örneklerinin toplanmasından hemen sonra örnekler analiz edildi. Örneklerin uzun süreli olarak oda sıcaklığı dışında saklanılmaması gerekmektedir. Örnekler 3 güne kadar 2^oC-8^oC'deki sıcaklıkta saklanabilir. Uzun süreli saklamada örnekler -20^oC'nin altında tutuldu.

3.4.2.4. Test Prosedürü

Hazırlık aşamasında: Teste başlamadan önce, seçilen örnek türünün kilidi açıldı. ID çipi kontrol edildi ve cihaza takıldı.

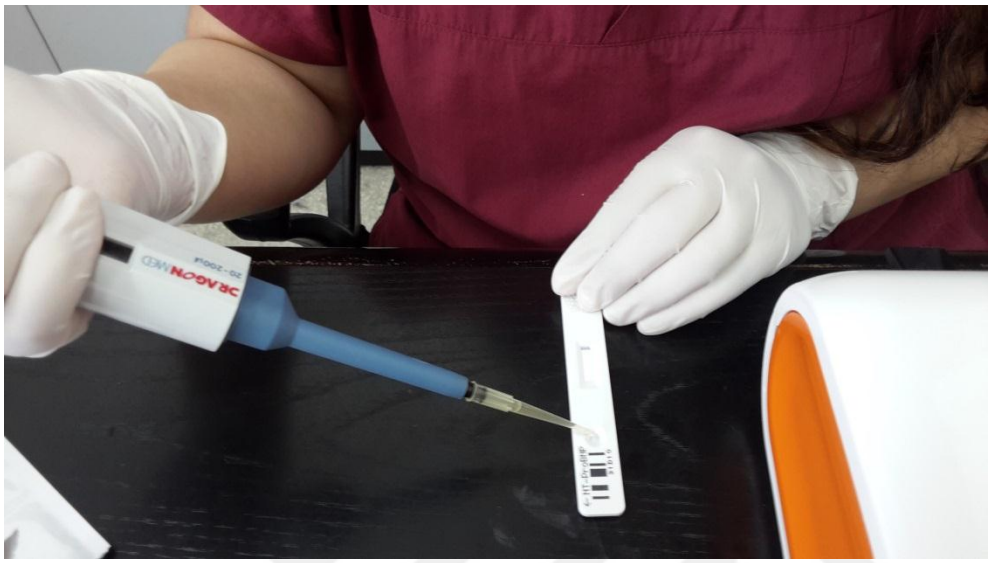
Örneklerin eklenmesi aşamasında: Transfer bir pipet ile 75 µL tam kan, serum veya plazma örneği buffer tüpüne eklendi (Resim 7).



Resim 7. Transfer pipet ile serum örneğinin buffer tüpüne (a) eklenmesi(b).

Karıştırma aşamasında: Örnek ve buffer karışımı 1 dakika süreyle ters-düz edilerek karıştırıldı.

Örneğin cihaza yüklenmesi aşamasında: Karışımdan 75 µL alınarak test kartuşu içerisine yerleştirildi (Resim 8).



Resim 8. Karışımın transfer pipet ile test kartuşuna aktarılması.

5.Aşama: Testin Yapılışı:

i. Finecare™ FIA meter:
ii. Standart test: Kartuş tutacağı bölümüne test kartuşu takıldı ve ‘Test’ tuşuna basıldı. 15 dakika sonra örnek tipi seçildi, sonuç ekranda gösterildiğinde ‘Print’ tuşuna basılarak yazdırıldı.
iii. Quick test: Kartuş platforma koyuldu. 15 dakika sonra, kartuş tutacağı bölümüne test kartuşu takıldı ve ‘Test’ tuşuna basıldı. Örnek tipi seçildi, sonuç ekranda gösterildiğinde ‘Print’ tuşuna basılarak yazdırıldı.
iv. Finecare™multi-channel FIA meter:
v. Kartuş tutucuya test kartuşu takıldı. 15 dakika sonra örnek tipi seçildi ve sonuç ekranda gösterildiğinde ‘Print’ tuşuna basılarak yazdırıldı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Analizler sonucunda elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ve homojenite testleri Kolmogorov-Smirnov analizine göre gerçekleştirildi. Normal dağılım göstermeyen verilere logaritmik transformasyon işlemi uygulandıktan sonra halen daha normal dağılmadığı tespit edildi. Veriler ortalama ve standart hata olacak şekilde tablolaştırıldı. Gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde bağımsız örneklem Kruskall-Wallis testinden yararlanıldı. Tüm analizlerde SPSS 21 (IBM, Chicago) programından yararlanılarak, $p<0,05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Olgulara Ait Demografik ve Analiz Bulguları

Araştırmanın hayvan materyalini Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Küçük Hayvan Kliniklerine ve Aydın ile İzmir illerindeki özel veteriner kliniklerine iştahsızlık, kilo kaybı, yüksek ateş, generalize lenfadenopati, splenomegali, kas zafiyeti, deride ekimoz ve peteşi, epistaksis, bacaklarda ödem, dispne veya poliartiritis şikayetleri ile getirilen farklı ırk (4'er Terrier ve Golden Retriever, 3'er Rottweiler ve Airdale terrier, 2 Siberian Husky 1'er Türk Çoban Köpeği, Labrador retriever, Alman Çoban köpeği, Pointer ile2 melez), yaş (2-7) ve her iki cinsiyetten 10 erkek,12 dişi) 23 köpek oluşturdu. Kliniklere getirilen ve yukarıda mevzu bahis konusu edilen klinik bulguların yanı sıratrombositopeni olan/olmayan 200'e yakın köpek tanı ve ayırıcı tanı amacıyla klinik muayene ve laboratuar testleri aracılığıyla muayene edilmiştir. Tüm olgular hızlı ELISA prensibiyle çalışan ticari test kitleri (Snap 4DX) vasıtasıyla test edilerek, vektör aracılıklı seyahat hastalıkları (Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Dirofilariosis, Borrelliosis) yönünden değerlendirildi. Ayırıcı tanıya yönelik olarak sözü edilen klinik bulgulara ve kan tablosuna sebep olabilen diğer infeksiyöz hastalıklarda (Babesiosis, Hepatozoonosis, Leishmaniosis) lenf aspirasyonları ve sitolojik muayeneyle değerlendirilerek olguların tüm bu infeksiyöz hastalıklar yönünden tekil ya da çoğul etkenle hasta olup olmadığı belirlendi. Elde edilen serum örnekleri *leishmaniozis* yönünden IFAT yöntemiyle (ADÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında) değerlendirildi. IFAT sonucu 1/64 ve üzeri olan olgular dışlanıldı. Tüm bu labaratuvar analizleri sonrası yalnızca *E. canis* ve/veya *E. ewingii* ile infekte olgular çalışma kapsamına alınırken, diğer infeksiyoz ajanlarla pozitif kombine infekte hiçbir olgu çalışma kapsamına alınmadı. Çalışma öncesi Aydın Adnan Menderes Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulundan 64583101/2018/011sayılı etik kurul onayı alındı.

Tablo 5. Olgulara ait analiz sonuçları ve demografik bilgiler.

Gruplar	Olgular	Snap 4Dx	PCR	NT-proBNP (pg/mL)	Irk	Yaş	Cinsiyet
GRUP I CME ile enfekte	Olgu 10	-	+	<18	Rottweiler	2	Erkek
	Olgu 11	-	+	118.3*	Golden Retriever	4	Dişi
	Olgu 12	-	+	<18	Terrier	3	Erkek
	Olgu 13	-	+	<18	Alman Çoban köpeği	6	Erkek
GRUP II CME ile aktif enfekte	Olgu 1	+	+	<18	Airdale terrier	4	Dişi
	Olgu 2	+	+	<18	Siberian Husky	5	Erkek
	Olgu 3	+	+	<18	Terrier	2	Erkek
	Olgu 4	+	+	<18	Türk Çoban Köpeği	2	Dişi
	Olgu 5	+	+	<18	Melez	3	Dişi
	Olgu 7	+	+	<18	Golden Retriever	4	Dişi
	Olgu 9	+	+	24.6*	Melez	5	Erkek
	Olgu 14	+	+	<18	Rottweiler	2	Dişi
	Olgu 15	+	+	<18	Terrier	3	Dişi
	Olgu 20	+	+	23.3*	Golden Retriever	6	Erkek
	Olgu 21	+	+	108.3*	Airdale terrier	5	Dişi
	Olgu 22	+	+	98.7*	Siberian Husky	2	Erkek
GRUP III CME'ye maruz kalma	Olgu 6	+	-	<18	Terrier	2	Dişi
	Olgu 8	+	-	<18	Pointer	3	Erkek
	Olgu 16	+	-	37.7*	Golden Retriever	4	Dişi
	Olgu 17	+	-	<18	Labrador retriever	5	Dişi
	Olgu 18	+	-	<18	Airdale terrier	2	Erkek
	Olgu 19	+	-	<18	Rottweiler	3	Dişi

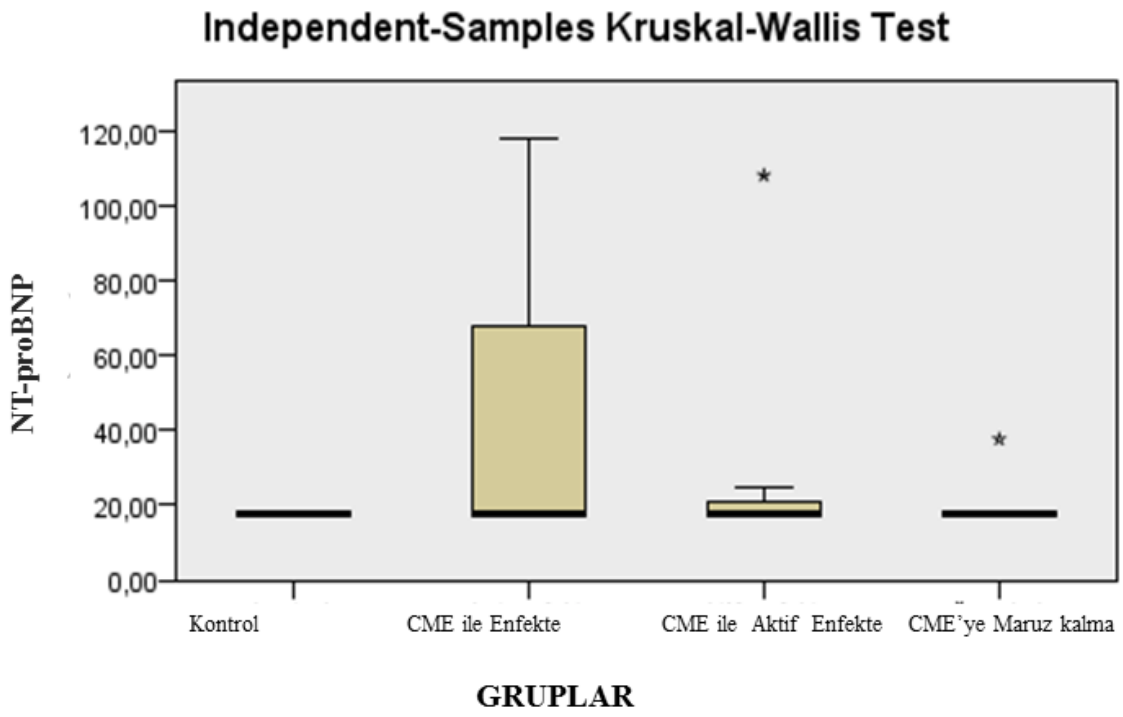
I. grup [akut *E.canis* infeksiyonu; antikor negatif ancak belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR pozitif], II. grup [aktif infeksiyon (PZR pozitif ve *E.canis* seroaktif) III. grup [*E.canis*' e maruz kalma (belirlenebilecek düzeyde DNA [PZR negatif] ancak *E.canis* seroaktif)] olmak üzere hastalıkla ilişkili 3 ayrı sınıflandırmaya tabi tutuldu.

Kontrol grubu olguların tamamında NT-pro BNP düzeyleri 18 pg/mL değerinden düşük olarak tespit edildi.

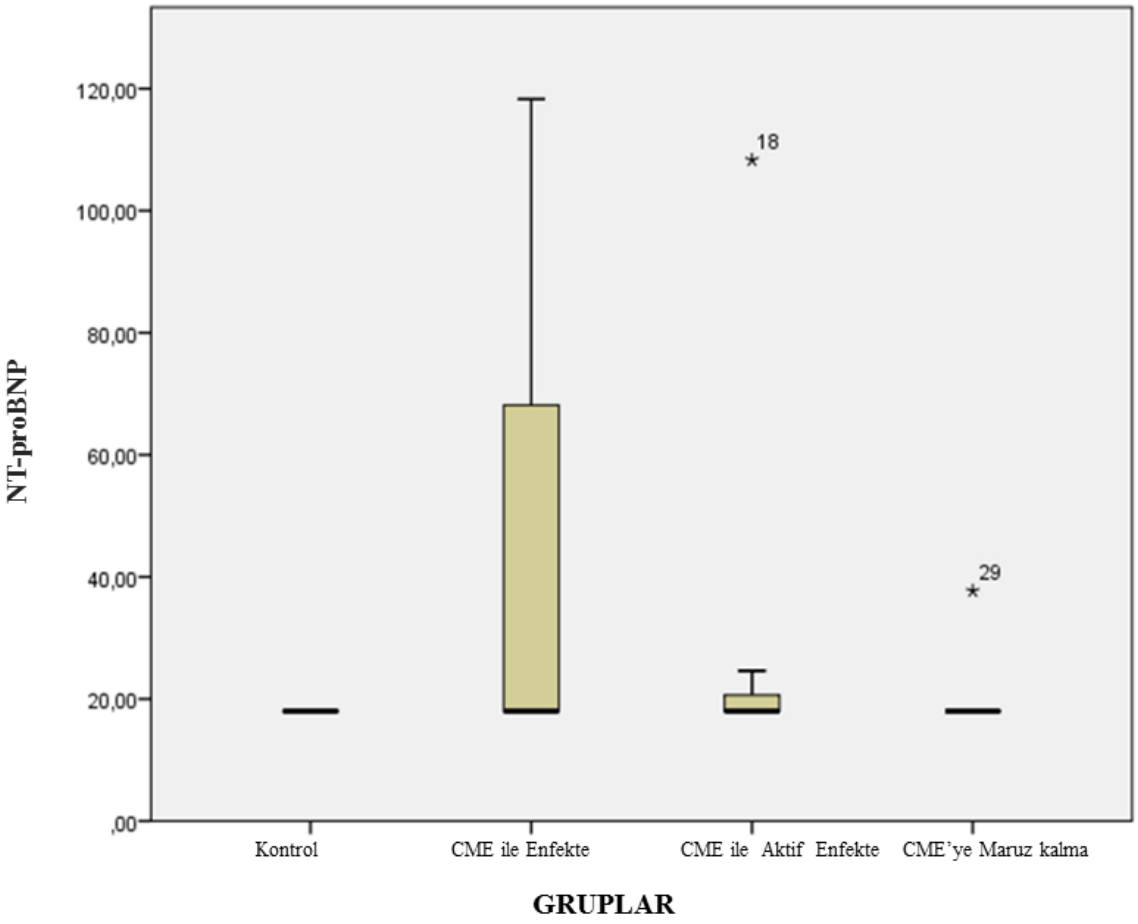
Tablo 6. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplardaki proBNP değerleri.

	NT-proBNP $\bar{X}$ ± SE	**P değeri**
CME ile Enfekte	43,08 ± 25,08	0,373
CME ile Aktif enfekte	27,29 ± 8,13	
CME'ye Maruz kalma	20,81 ± 2,81	
Kontrol	18 ± 0	

NT-pro BNP düzeyleri, Canine Monositik Ehrlichiosis'li Enfekte grup olgularında 43,08 ± 25,08, Aktif enfekte grup olgularında 27,29 ± 8,13, Maruz kalma grubu olgularında 20,81 ± 2,81 ve kontrol grubunda 18 ± 0 pg/mL olarak tespit edildi (Tablo 6).



Şekil 2. Independent-Samples Kruskall-Wallis istatistiksel analiz metodu ile gruplarda görülen referans aralığı dışındaki değişimler.



Şekil 3. Canine Monositik Ehrlichiosis'li köpeklerde hastalık aktivitesi (enfekte, aktif enfekte, maruz kalma) ile NT-pro BNP düzeyleri arasındaki ilişki.

5. TARTIŞMA

Biyobelirteçler, bir organ veya sistem tarafından meydana getirilen biyolojik süreçlerin nicel göstergeleridir. Tanı, lezyonların genişletilmesi ve prognoz hakkında bilgi veren, normal, patolojik ve farmasötik etki süreçlerinin değerlendirilmesinde de rol oynayan önemli araçlardır. İdeal bir biyobelirteç hastalığın başlangıcında olduğu gibi, düşük titrelerin erken tespitini sağlamak için de hassas olmalıdır. Yüksek derecede özgüllük de önem taşımaktadır, çünkü bir biyolojik belirteç belirli bir organ veya dokuda saptanabilir olmalıdır. Ayrıca düşük maliyetli olması, kolay ölçülebilmesi ve enfeksiyon ile antikorların saptanması arasındaki ayrımın yapılması ideal bir biyobelirtecin diğer karakteristik özelliklerindendir (Oyama ve ark 2004; Yonezawa ve ark 2010).

Son yıllarda, natriüretik peptidler (NP'ler), kalp hastalıklarının tanı ve sağaltımlarının monitorizasyonunda önemli araçlar olarak ortaya çıkmışlardır. Araştırmalar, kedi ve köpeklerdeki NT-proBNP'nin serum ve plazma düzeylerinin, konjestif süreçleri ve indirekt olarak küçük hayvanların miyokart fonksiyonları teşhisinin ve monitorizasyonunun sağlanmasındaki önemli bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir. NT-proBNP'nin önemi; örneklerin stabilitesi, laboratuvarda kolay belirlenmesi, duyarlılığı ve miyokardiyal fonksiyonları analiz etme olasılığı ile ilişkilidir. Bu avantajlar, NT-proBNP'nin çoğu zaman miyokardiyal hücre bütünlüğünü belirten diğer kardiyak biyobelirteçlerle karşılaştırıldığında özellikle önemlidir. Hızlı NT-proBNP analizine yönelik test kitleri günümüzde piyasaya sürülmektedir ve tamamlayıcı testlerle birlikte kullanılmaktadırlar. Bu yöntemler, köpek ve kedilerde kardiyopatinin erken teşhisinde kalp ve akciğer hastalıklarının ayırıcı tanısında, tedavi ve prognozunda değerli metodların denenmesinde önemli bir bilgi kaynağıdır (Lima ve ark, 2017).

Son yıllarda natriüretik peptidler (NP), kalp hastalıklarının tanı, tedavi ve monitorizasyonunda önemli araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise NP'ler ile atriyal NP (ANP), beyin NP (BNP) ve kardiyovasküler ve kardiyorenal homeostazda yer alan c-tipi NP olarak karşılaşılmaktadır. Daha spesifik olarak ise Veteriner Hekimlikte, BNP'nin N-terminali fragmanı (NT-proBNP) şu anda en çok kullanılan NP'dir (Vanderheyden ve ark 2014;Anjos ve ark 2015). Biz de bu çalışmada Veteriner Hekimlikte ve özellikle de Veteriner İç Hastalıkları alanında ilk kez Canine Monositik Ehrlichiosis ile farklı dönemlerde enfekte

köpeklerde Nt-pro BNP düzeyleri araştırılmış olup hastalık aktivitesi ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

B tipi natriüretik peptid (beyin natriüretik peptidi, BNP) bir grup natriüretik peptid türüdür; köpeklerde natriüretik, diüretik ve vazodilatatör özelliklere sahiptir (Sudoh ve ark, 1988; Nishida ve ark, 1990). Miyokardiyal germeye yanıt olarak miyositler tarafından salınmaktadır. Sağlıklı köpeklerde küçük miktarlarda bulunurken kalp hastalığı bulunanlarda belirgin şekilde artmış olarak gözlenmektedir (Yasue ve ark, 1994). BNP bir prohormon (proBNP) olarak sentezlenir; biyolojik olarak aktif parça olan BNP'ye ve aktif olmayan amino terminal proBNP'ye (NT-pro BNP) bölünür. Böylece iki peptid de dolaşıma eşit oranda salınmış olur (Hall, 2004). NT-pro BNP diyagnostik test olma açısından hedef olma niteliğinde bazı avantajlara sahiptir; NT-pro BNP, BNP'den daha uzun yarılanma ömrüne sahiptir (daha önce bildirilen veriler yalnız koyunlardan elde edilmiştir) (Pemberton ve ark, 2000), dolaşımda daha yüksek konstantrasyonlarda seyreder (Mueller ve ark, 2004) ve donmuş plazma içinde depo halinde daha kararlıdır. Bu çalışmada gerek uzun yarılanma ömrü gerekse dolaşımda yüksek konsantrasyonlarda seyretme ihtimali dolayısıyla NT-pro BNP ölçümleri yapılmıştır.

Bir biyobelirteç olarak NT-pro BNP düzeylerinin dispnenin kardiyak olan ve kardiyak olmayan nedenlerini birbirinden ayırt etmede ve hastalığın prognozunun izlenmesinde prognostik bir indikatör olarak insan hekimliğinde kullanıldığı bilinmektedir (Silver ve ark, 2004). Yakın zamanda NT-proBNP'nin kalp hastalığı olan köpeklerde artış gösterdiği (Oyama ve ark, 2008; Fine ve ark, 2008), dispnenin kardiyak ve respiratorik nedenlerinin ayrımında (Fine ve ark, 2008) ve kalp hastalığının derecesinin değerlendirilmesinde kullanıldığı gösterilmiştir (Oyama ve ark, 2008). Oyama ve ark; (2008) kalp hastalığı ve kalp yetmezliği teşhisi için sırasıyla 445 ve 1.725 pmol/L değerlerininkullanılmasını önermektedir. Bizim çalışmamızda pg/mL cinsinden analiz gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda analizlerin performansında kullanılan Wondfo Finecare Flöresan İmmunoassay cihazı ile 18-35000 pg/mL aralığında ölçüm gerçekleştirilebilmiş bu alt ve üst değerlerin dışındaki sapmalar cihaz referans aralıklarının dışında olduğundan değerlendirilememiştir. Kontrol grubu hayvanların tamamında 18 pg/mL'nin altında değerler saptanmıştır.

BNP böbrekte ve damarlarda bulunan reseptörler aracılığıyla temizlenir (Rademaker ve ark, 1997). Aksine NT-pro BNP'nin bilinen reseptörleri yoktur ve renal metabolizmanın

sorumlu olduğu düşünülse bile plazmadan temizlenmesi hakkında çok az şey bilinmektedir (Hall, 2005).

Hem BNP hem de NT-pro BNP, böbrek hastalığı olan ancak kalp hastalığı olmayan insanlarda artmış olup, böbrek yetmezliği olanlarda tanısal açıdan sorgulanmıştır (McCullough ve ark, 2003). Testin insanlarda tanısal değerinin devamlılığı için düzenlenmiş referans değerler önerilmiştir (Anwaruddin ve ark, 2006; Khan ve ark, 2006). Son zamanlarda sınırlı veriler böbrek hastalığı olan köpeklerde de benzer şekilde artış olduğunu göstermiştir (Schmidt ve ark, 2009).Bu prospektif çalışmadaki hedef böbrek hastalığının, kalp hastalığı olmayan köpeklerde NT-pro BNP'yi arttırıp arttırmadığını ve bu artışın testin tanısal değerini sınırlayıp sınırlamadığını belirlemek olarak belirlenmiştir (Raffan ve ark, 2009).İlgili araştırmacılar kalp yetmezliği tanısı koyulan köpeklerde azoteminin NT-pro BNP düzeylerinde artışla sonuçlanacağını bildirmiş, dolayısıyla plazma kreatinin konsantrasyonu artan köpeklerde NT-pro BNP'nin dikkatle değerlendirilmesi hususunda görüş birliğine varmışlardır.

BNP ve NT-proBNP'nin kalp yetmezliğini, akut koroner sendrom veya iskemik kalp hastalığının irdelenmesi ya da monitörizasyonu için kullanılabileceği bildirilmektedir (Maisel ve ark, 2002; Januzzi ve ark, 2005; Braunwald, 2008; Liquori ve ark, 2014). Köpeklerde, 900 pmol/l'den az NT-proBNP seviyesi miyokardiyal hasar ya da stresle uyumlu değildir. Diğer yandan Doberman pinscher ırıkında 735 pmol/L'den fazla olmasının dilate kardiyomiyopati'ye yönelik risk teşkil edeceği saptanmıştır (Baisan ve ark, 2016). Önceki araştırmalarda mitral kapak yetersizliği ve dilate kardiyomiyopatisi bulunan köpeklerde, kardiyak hastalık ve şiddetinin derecesinin ölçülmesinde NT-proBNP'nin serum konsantrasyonlarınınsağlıklı olgulara göre daha yüksek olduğunu belirlenmiştir. İlaveten konjestif kalp yetmezliği bulunan köpeklerde NT-proBNP konsantrasyonlarının ekokardiyografik değişiklikler ve böbrek fonksiyonu ile korelasyon gösterdiği ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesindefaydalı olduğu bildirilmiştir olabileceği sonucuna varıldığı bildirilmektedir (Oyama ve ark, 2008; Baisan ve ark, 2016). Kardiyak kökenli veya kardiyak kökenli olmayan dispnenin ayırt edici tanısına yönelik BNP konsantrasyonları ölçülmüş ve konjestif kalp yetmezliğine ilişkin dispnesi bulunan 22 köpek ile diğer olgular karşılaştırılmıştır. Konjestif kalp yetmezliği olan olgulardadaha yüksek BNP konsantrasyonu olduğu (ortalama 34.97 pg/ml) tespit edilmiştir (Prosek ve ark, 2007).

Bir başka çalışmada, babesiosis ile enfekte köpeklerde NT-proBNP değerlendirilmiş ve NTproBNP konsantrasyonunun, hastalığın şiddetini ve indirekt olarak tetiklenen kardiyak stresi öngörebileceğitespit edilmiştir (Lobetti ve ark, 2012). Bizim çalışmamızda da diğer çalışmaları destekler nitelikte çalışmanın kontrol grubunda NT-proBNP düzeyinde herhangi bir değişim saptanmazken, I. gruptaki 1 olguda (118.3 pg/mL), II. gruptaki 4 olguda (23.3, 24.6, 98.7 ve 108.3 pg/mL) ve III. gruptaki 1 olguda (37.7 pg/mL) artış belirlenmiştir. NT-pro BNP düzeyleri Canine Monositik Ehrlichiosis'li enfekte olgularda 43,08 ± 25,08, aktif enfekte olgularda 27,29 ± 8,13, maruz kalan olgularda 20,81 ± 2,81 ve kontrol grubunda 18 ± 0 pg/mL olarak tespit edildi.

Miksomatöz Mitral Kapak Hastalığı (MMVD) köpeklerde görülen kalp hastalıklarının yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır (Detweiler ve ark, 1965). Hastalığın prevalansı küçük köpeklerde (<20 kg), büyük ırk köpeklere göre daha yüksektir ve hastalığın ilerlemesi yıllarca sürebilir (Thrusfield ve ark, 1985; Borgarelli ve ark 2008). Çeşitli çalışmalar MMVD'nin farklı evrelerindeki köpeklerde natriüretik peptidlerin konsantrasyonları araştırılmış ve natriüretik peptidlerin Kronik Kalp Yetmezliği'ne bağlı respiratorik semptomları olan hastaların tespitinde faydalı olduğu konusunda genel bir kanı oluşmuştur (Oyama ve ark, 2009; Prosek ve ark, 2007). Bu çalışmada CME'nin kalpte oluşturduğu hasar ilave yöntemlerle (Ekokardiyografi, 12 kanallı elektrokardiyografi) muayene edilmese de, ilgili hastalığın kalpte hasar oluşturduğu ve myokarditise neden olduğu bilindiğinden NT-pro BNP düzeyleri araştırılmış, bir nevi hastalığın ön görücüsü olarak kullanılabilirliği de değerlendirilmiştir.

Hem B-tipi natriüretik peptid (BNP) hem de atriyal natriüretik peptid (ANP), hacim veya basıncın artarak aşırı yüklenmeye neden olması ve atriyal duvar gerilmesi nedeniyle miyokardiyal dokular tarafından salınırlar (Roncon-Albuquerque ve ark, 2006; Yoshimura ve ark, 1993). Dolaşımda BNP ve ANP natriürez ve diürezi arttırır, böylece sistemik vasküler direnç azalır (Nishida ve ark, 1990). BNP, proBNP olarak sentezlenir; BNP'ye ve biyolojik olarak inaktif N terminal olarak sonlanan NT-pro BNP'ye ayrılır (Sawada ve ark, 1997). ANP, 98 aminoasit fragmanı amino-terminal pro-atriyal natriüretik peptid (NT-pro BNP) ve BNP'ye benzer şekilde ANP'ye ayrılan 126 aminoasitlik bir prekürsör molekül olarak kodlanır. Ayrıca NT-pro BNP; proANP 1-30, proANP 31-67 ve proANP 68-98 adlı 3 moleküle ayrılır, bazı yazarlar herhangi bir biyolojik aktiviteyi tanımlamazken ANP'ninkilere benzer tüm fonksiyonlara sahip gibi görünmektedir (Weir ve ark, 1994). Daha da önemlisi, tanısal biyobelirteç olarak tercih edilen NT-pro BNP ve NT-pro ANP fragmentlerinin yarı

ömürleri önemli ölçüde BNP ve ANP'ninkinden daha uzundur (Ackerman ve ark, 1992; Thomas ve ark, 2003). Ayrıca insanlarda yapılan çalışmalar, atriyal dolum basınçlarındaki hafif artışların saptanmasında (Habibullah ve ark, 1995) proANP'nin ANP'ye göre daha duyarlı olduğunu ve NYHA Sınıf I bireylerini (fiziksel aktivite sınırlaması olmayan hastalar) ayırt etmede ANP, BNP ve C-tipi NP ve NT-pro BNP arasından en duyarlı biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Daggubati ve ark, 1997). İlginç bir şekilde insanlardaki NP konsantrasyonu vücut kitle indeksi (VKİ), yaş ve androjen seviyelerine bağlı gibi görünmekteyken (Redfield ve ark, 2002; Krauser ve ark, 2005) sağlıklı köpeklerde yaş, cinsiyet ve ağırlıkla ilgili varyasyonlar hakkında yeterli veteriner hekim raporu mevcut değildir (DeFrancesco ve ark, 2007; Leach ve ark, 2008). Şuana kadar MMVD'nin subklinik safhalarının görüldüğü köpeklerden kardiyak bozukluğu olmayan köpekleri ayırt etmek için NP konsantrasyonlarının tanısal önemi ve asemptomatik seyirli farklı safhalardaki köpekler arasında ayrım yapılması konusunda bir fikir birliğine ulaşılamamıştır (Chetboulve ark, 2009; Moesgaard ve ark, 2011).

Kardiyak bozukluklar ve buna bağlı olarak artmış serum kardiyak troponin I (cTnI) bildirilmiş olmasına rağmen, klinik bakıda babesiosisli köpeklerde görülen kardiyak tutulumun teşhisi zor olmaktadır. Bu nedenle kardiyak biyobelirteçlerin kullanımı babesiosisli bir köpekte aynı zamanda kardiyak disfonksiyonun görülüp görülmediğini belirlemede fayda sağlayacaktır.

Önceki bir çalışma, babesiosisli köpeklerde aynı zamanda cTnI ile de ilişkili olan olgularda plazma N-terminal beyin natriüretik peptidini (NT-pro BNP) belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Babesiosis enfeksiyonu olan üç grup köpek çalışma için kullanılmıştır: İlgili çalışmada hafif komplikasyonsuz (Grup1), ciddi komplikasyonsuz (Grup2) ve komplike (Grup3), ayrıca grup başına 15 köpekten oluşan bir de kontrol grubu (Grup4) olmak üzere dört farklı grup değerlendirilmiştir. Her bir olguda, serum üre kreatinin ve üre, üre/kreatinin oranı, sistatin-C, cTnI, kan, laktat, plazma NT-proBNP düzeyleri ölçülmüştür. Grup 1-4'teki ortalama NT-proBNP değerleri sırası ile 246, 650, 638 ve 106 pmol/L olarak belirlenmiştir. Grup 2 ve 3'te Grup1'e göre daha yüksek NT-proBNP değeri değerler tespit edildi. Yapılan çalışma babesiosisli köpeklerdeki NT-proBNP düzeylerinin yükseldiğini ve hastalık sürecinin daha şiddetli seyrettiğini göstermektedir. Bu yükselme daha önce veya artan cTnI değerinden bağımsızdır (Lobetti ve ark, 2012).

Yapılan araştırmalar köpek ve kedilerdeki NT-proBNP'nin serum ve plazma düzeylerinin, konjestif süreçlerin teşhis ve izlenmesinde, dolaylı olarak ise küçük hayvanlarda miyokardiyal fonksiyonların değerlendirilmesindeki tek biyobelirteç olduğunu göstermektedir (Boswood, 2009). Çalışmamızda I. gruptaki 1, II. gruptaki 4 ve yine III. gruptaki 1 olguda artmış olan NT-pro BNP düzeyleri muhtemel myokardiyal fonksiyon bozukluğunun bir öngörücüsü olabilir.

Veteriner Hekimliğinde NT-proBNP'ye olan ilgi son 10 yılda, temel bazı araştırmalar kapsamında kullanılmasına rağmen, uygun yöntemler klinik anlamda doğrulanmamış ve standardize edilmemiş olduğu için artış göstermiştir (Freitas ve ark 2013; Ferreirave ark 2016). Bu senaryo doğrultusunda, biyobelirteçler, kullanımları ve gösterdikleri sonuçlar hakkında çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Bu nedenle bu çalışma NT-proBNP ile ilgili gözden geçirilmiş benzer, özel bir literatürü tartışmakta ve bu da NP'nin küçük hayvanların Veteriner Hekimlikte potansiyel klinik uygulamalarını, miyokardiyal veya sistemik hastalıkların tanı, tedavi ve prognozunu göz önüne alarak sunmaktadır.

Ehrlichiosis, rodent modellerinde deneysel olarak enfekte edilmiş köpeklerde SIRS (systemic inflamatuar response syndrome) ile ilişkilendirilmiştir (de Castro ve ark, 2004; Ismail ve ark, 2004). IFN-g ve TNF-a mRNA'larının persistent ekspresyonu ile birlikte deneysel olarak oluşturulmuş *E.canis*enfeksiyonunu takiben akut faz protein düzeyleri artmaktadır (Rikihisa ve ark, 1994). Bu sitokinler ve akut faz proteinleri, *Ixodes ovatus* kenelerinden izole edilen yüksek derecede virulent Ehrlichia'lı bir fare modelinde belirlendiği gibi ölümcül toksik şok benzeri bir sendrom ile sonuçlanabilecek bir organizma kaskadını tetikler şekilde görünmektedir (Ismail ve ark, 2004).

Miyokardiyal depresan faktörü ayrıca, nitrik oksit, araşidonik asit türevleri, endotoksin, sitokinler ve reaktif oksijen moleküllerinin katılımı ile fare ve köpeklerde SIRS ile indüklenen miyokarditiste de anlatılmıştır (Kumar ve ark, 2006). Hindistan'da *E.canis* ile enfekte köpeklerde lineer miyokardiyal ve endokardiyal hemorajiler de tanımlanmıştır(Lakkawar ve ark, 2003). Güç bir yangısal yanıtla birlikte (de Castro ve ark, 2004; Tajima ve ark, 2005), vaskülitis (de Castro ve ark, 2004), miyokardiyal hemorajiler (Lakkawar ve ark, 2003) ve tek taraflı hipoperfüzyon kombinasyonunun gözlemlendiği ehrlichiosisli köpeklerde kardiyak hasarın patofizyolojisine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Kesitsel çalışmalar nedensel ilişkilerin doğrulanmasında etkili bir sonuç vermeyeceği için sonuçlar dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. *E.canis* ile enfekte köpekler, PCR-negatif

fakat hasta köpekler ve diğer organizmalar tarafından enfekte edilmiş köpekler arasındaki farklılıkları belirlemedeki başarısızlık; bazı gruplardaki asimetrik veya az sayıda etkilenen popülasyona atfedilebilir veya diğer enfeksiyonların neden olduğu gerçek bir etki veya belirsiz bir faktör ile açıklanabilir. Doğal şekilde oluşturulmuş enfeksiyon çalışmalarının doğuştan gelen bir komplikasyonu, imkanlar dahilinde sonuçları potansiyel olarak etkileyebilecek ve sonuçları kontrol edilemeyen çok sayıdaki yanlış anlaşılmalardır. *E.canis* ile doğal olarak enfekte olmuş köpeklerin farklı coğrafi konumlardan veya deneysel enfeksiyon modellerinden oluşturulmuş daha ileri düzeydeki çalışmalarda, köpeklerde *E.canis* enfeksiyonu ve miyokardiyal hasar arasındaki bariz ilişkinin doğrulanması gerekecektir (Diniz ve ark, 2008).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında CME'li olgularda enfeksiyon, aktif enfeksiyon ya da enfeksiyona maruz kalma durumlarında sırasıyla 43.08±25.08, 27.29±8.13 ve 20.81±2.81 pg/mL düzeylerinde, kontrol grubuna göre artışların olduğu belirlendi. Artış şekillenen olgularda NT-pro BNP düzeylerinin muhtemel myokardiyal hasar öngörücüsü olarak kullanılması ya da prognostik biyobelirteç olarak önemi daha detaylı, yüksek bütçeli araştırma projelerine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Abeygunawardena, Indira, I. Kakoma, and R. D. Smith. "Pathophysiology of canine ehrlichiosis." *Ehrlichiosis*. Springer, Dordrecht, 1990. 78-92.

Ackerman BH, Wyeth RP, Vesely DL. Pharmacokinetic characterization of the postdistribution phase of prohormone atrial natriuretic peptides amino acids 1- 98, 31-67, and atrial natriuretic factor during and after rapid right ventricular pacing in dogs. J Clin Pharmacol. 1992;32:415–421.

Alves RN, Rieck SE, Ueira-Vieira C, Labruna MB, Beletti ME. Isolation, *in vitro* propagation, genetic analysis, and immunogenic characterization of an *Ehrlichia canis* strain from southeastern Brazil.*J. Vet. Sci.* 2013, **15**(2), 241-248.

Anjos DS, Cintra CA, Rocha JR. and Junior, D.P. Cardiac biomarkers - an ally in the prognosis of heart disorders in small animals. Rev. Investig. Med. Vet. 2015;14(6): 38-45.

Anwaruddin S, Lloyd-Jones DM, Baggish A. Renal function, congestive heart failure, and amino-terminal pro-brain natriuretic peptide measurement: Results from the ProBNP Investigation of Dyspnea in the Emergency Department (PRIDE) study. J Am Coll Cardiol 2006;47:91–97.

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.

Baisan RA, Rosa AD, Loria AD, Vulpe V, Piantedosi D. Cardiac biomarkers in clinical practice of dog and cat-a review. HVM Bioflux 2016, 8(1), 50-58.

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.

Boswood A. Biomarkers in cardiovascular disease: Beyond natriuretic peptides. J. Vet. Intern. Med. 2009; 11: S23-S32.

Börkü MK, Güzel M, Cıngı CC, Ural K, Karakurum MC. Kronik Ehrilchiozisli bir köpekte renal yetmezlik olgusu. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2003:14(2):94-96.

Braunwald E. Biomarkers in heart failure. The New England Journal of Medicine 2008, 358, 2148-2159.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Hancock SI. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, orBartonella vinsonii. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998,*36*(9), 2645-2651.

Buhles WC, Ruxsoll DL, Rıstıc M. Tropical canine panctopenia: clinical, haemoatologic and serologic response of dogs to *E. canis* infection, tetracyline therapy and challenge inoculation. Journal of Infectious Disease 1974;130:358-367.

Carrade D, Foley JE, Michael S, Foley WC, Sykes EJ. Spatial distribution on seroprevalance for *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* and *Dirrofilaria immitis* in dogs in Washington, Oregon and California. Veterinary Clinical Pathology 2011;40(3):293-302.

Castro MB, Machado RZ, de Aguino LP, Alessi AC, Costa MT. Exprimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Depertmant of Veterinary Pathology 2004: 119(1);73-86.

Chetboul V, Serres F, Tissier R. Association of plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration with mitral regurgitation severity and outcome in dogs with asymptomatic degenerative mitral valve disease. J Vet Intern Med. 2009;23:984–994.

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

Codner EC, Maslin WR, Caceci T, Saunders GK, Smith CA, Robertson LL, Martin RA, Troy GC. Investigation of glomerular lesion in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection, American Journal of Veterinary Research 1992; 53(12): 2286–2291.

Codner EC, Maslin WR. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. American Journal of Veterinary Research 1992; 53(3): 294–299.

Daggubati S, Parks JR, Overton RM. Adrenomedullin, endothelin, neuropeptide Y, atrial, brain, and C-natriuretic prohormone peptides compared as early heart failure indicators. Cardiovasc Res. 1997;36:246– 255.

Dagnone AS, De Morais HSA, Vidotto MC, Jojima FS, Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*, 2003, *117*(4), 285-290.

de Castro MB, Machado RZ, de Aquino LP. Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: Clinicopathological and immunopathological findings. Vet Parasitol 2004;119:73–86.

DeFrancesco TC, Rush JE, Rozanski EA. Prospective clinical evaluation of an ELISA B-type natriuretic peptide assay in the diagnosis of congestive heart failure in dogs presenting with cough or dyspnea. J Vet Intern Med. 2007;21:243–250.

Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. Ann N Y Acad Sci. 1965;127:481–516.

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

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.

Dumler JS, Trıgıanı ER, Bakken JS, Aguero-Rosenfeld ME, Wormser GP. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. Clinical and Dıagnostic Laboratory Immunology 2000;7(1):6-8.

Erdeğer J, Sancak A, Ataseven L.Köpeklerde *E.canis*'in indirekt Fluoresan Antikor (IFA) Testi ve Dot-ELISA ile Saptanması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science 2002;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- α in leukocytes and splenocytes of experimentally infected dogs. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria 2010;20(1);71-74.

Ferreira FS, Barretto FL, Fabres A, Silveira LS, Carvalho CB. Cardiac markers in five different breeds of rabbits (Oryctolaguscuniculus Linnaeus, 1758) used for cardiovascular research. Pesq. Vet. Bras. 2016;36(8): 737-742.

Fine DM, Declue AE, Reinero CR. Evaluation of circulating amino terminal-pro-B-type natriuretic peptide concentration in dogs with respiratory distress attributable to congestive heart failure or primary pulmonary disease. J Am Vet Med Assoc 2008;232: 1674–1679.

Freitas MV, Ferreira FS, Barretto FL, Correa ES, Carvalho CB. Creatine phosphokinase isoenzime-MB mass (CK-MB mass) and Troponin I (cTnI) in dogs. MEDVEP Rev. Cient. Med. Vet.Pequenos Anim. Anim. Estim. 2013; 11(38): 156-165.

Gal A, Harrus S, Arcoh I, Lavy E, Aizenberg I, Mekuzas-Yisaschar Y, Baneth G. Coinfection with multiple tick-borne and intestinal parasites in a 6-week-old dog. *The Canadian Veterinary Journal*, 2010;48(6), 619.

Greene C.E, Infectious canine hepatitis and canine acidophil cell hepatitis. Infectious diseases of the dog and cat, 1990;42-48.

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.

Habibullah AA, Villarreal D, Freeman RH. Atrial natriuretic peptide fragments in dogs with experimental heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1995;22:130– 135.

Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NTpro)BNP. Eur J Heart Fail 2004;6:257–260.

Hall C. NT-proBNP: The mechanism behind the marker. J Card Fail 2005;11(Suppl):S81–S83.

Harrus S, Alleman AR, Bark H, Mahan, SM, 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, Aizenberg I, Foley JE, Poland AM, Bark H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with Ehrlichia canis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, *36*(1), 73-76.

Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AWCA. Minireview. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. Journal of Clinical Microbiology 1999;37: 2745-2749.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): an overview. *The Veterinary Journal*, 2011,*187*(3), 292-296.

Heeb H.L, Wilkerson, MJ, Chun R, Ganta RR. Large granular lymphocytosis, lymphocyte subset inversion, thrombocytopenia, dysproteinemia, and positive Ehrlichia serology in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 2003;*39*(4), 379-384.

Hegarty BC, de Paiva Diniz, PPV, 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*(3), 118-124.

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, Conroy JD, McKee AE, Nyindo MBA, Huxsoll DL. Ultrastructure of Ehrlichia canis. *Infection and immunity*, 1973, *7*(2), 265-271.

Iqbal Z, Chaichanasiriwithaya W, Rikihisa Y. Comparison of PZR immunosorbent assay (SNAP 3Dx) for canine ehrlichiosis. Journal of the Clinical Microbiology 1994;32: 1658–1662.

Ismail N, Soong L, McBride JW. Overproduction of TNF-alpha by CD81 type 1 cells and down-regulation of IFN gamma production by CD41 Th1 cells contribute to toxic shocklike syndrome in an animal model of fatal monocytotropic ehrlichiosis. J Immunol 2004;172:1786–1800.

Januzzi JL Jr, Camargo CA, Anwaruddin S, Baggish AL, Chen AA, Krauser DG. The N-terminal Pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) study. American Journal of Cardiology 2005, 95, 948-954.

Karagenç T, Hoşgör M, Bilgiç HB, Paşa S, Kırlı G, ErenH. Ege Bölgesinde Köpeklerde *E. canis*, *A. phagocytophilum* ve *A. platys*' in Prevalansının Nested-PCR ile Tespiti 14. Ulusal Parazitoloji Kongresi 18-25 Eylül 2005, İzmir.

Kelly PJ, Matthewman LA, Mahan SM, Semu S, Peter T, Mason PR, Raoult D. Serological evidence for antigenic relationships between Ehrlichia canis and Cowdria ruminantium. *Research in veterinary science*, 1994,*56*(2), 170-174.

Khan IA, Fink J, Nass C. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and B-type natriuretic peptide for identifying coronary artery disease and left ventricular hypertrophy in ambulatory chronic kidney disease patients. Am J Cardiol 2006;97:1530– 1534.

Komnenou AA, Mylonakis ME, Kouti V, Tendoma L, Leontides L, Skountzou E, Dessiris A, Koutinas AF, Ofri R. Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*E. canis*): a retrospective study of 90 cases. Veterinary Ophthalmology 2007;10(3)137–142.

Krauser DG, Lloyd-Jones DM, Chae CU. Effect of body mass index on natriuretic peptide levels in patients with acute congestive heart failure: a ProBNP Investigation of dyspnea in the emergency department (PRIDE) substudy. Am Heart J. 2005;149:744–750.

Kuehn NF, Gaunt SD. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. Journal of the American Veterinary Association 1985;186(4):355-8.

Kumar A, Varshney JP, Patra RC. A comparative study on oxidative stress in dogs infected with Ehrlichia canis with or without concurrent infection with Babesia gibsoni. Vet Res Commun 2006;30:917–920.

Labarthe N, de Campos Pereria M, Barbarini O,McKee W, Coimbra CA, Hoskins J. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. Veterinary Therapeutics 2003;4:67-75.

Lakkawar AW, Nair MG, Varshney KC. Pathology of canine monocytic ehrlichiosis in a German Shepherd dog. Slov Vet Res 2003;40:123–132.

Leach S, Fine DM, Durham HE. Effect of gender status on NT-prohormone brain natriuretic peptide levels in dogs [Abstract]. J Vet Intern Med. 2008;22:756–757.

Lima GV, Ferreira FSN-terminal-pro brain natriuretic peptides in dogs and cats: A technical and clinical review 2017.

Liquori ME, Christenson RH, Collinson PO, Defilippi CR. Cardiac biomarkers in heart failure. Clinical Biochemistry 2014, 47(6), 327-337.

Lobetti R, Kirberger R, Keller N, Kettner F, Dvir E, NT-proBNP and cardiac troponin I in virulent canine babesiosis; Veterinary Parasitology 2012; 333-339.

Mair J. Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now? Clin Chem Lab Med 2008;46:1507–14.

Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P. Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. New England Journal of Medicine 2002, 347, 161-167.

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.

McCullough PA, Sandberg KR. Sorting out the evidence on natriuretic peptides. Rev Cardiovasc Med 2003;4(Suppl 4):S13–S19.

Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. Vet J. 2011;189:349–352.

Mueller T, Gegenhuber A, Dieplinger B. Long-term stability of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and amino terminal proBNP (NT-proBNP) in frozen plasma samples. Clin Chem Lab Med 2004;42:942–944.

Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, Fox JC, KocanAA. A molecular and serological survey of *Ehrlichia canis*,*E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 1998, 79, 325-339.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Billinis C, Leontides, LS, Kontos V, Papadopoulos O, Fytianou A. Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods. *Veterinary Microbiology*, 2003,*91*(2-3), 197-204.

Mylonakis ME, Koutinas AF, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Billinis CD, Leontides LS, Kontos VS. Chronic canine ehrlichiosis (*E. canis*): a retrospective study of 19 natural cases. Journal of the American Animal Hospital Association 2004;40(3):174–184.

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).

Nakaghi HCA, Machado ZR, Costa TM, Andre RM, Baldani DC. Canin ehrlichiosis: clinical, hamatological, serological and molecular aspectes. Ciencia Rural Santa Maria 38(3):776-770.

Neer MT, Harrus S. Ehrlichiosis, Neorickettiosis, Anaplasmosis and wolbachia infection. In: Greene, C.E. Infectious diseases of the dog and cat 2006;203-216.

Nishida Y, Morita H, Minamino N. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. Jpn J Physiol. 1990;40:531–540.

Nishida Y, Morita H, Minamino N. Effects of brain natriuretic peptide on hemodynamics and renal function in dogs. Jpn J Physiol 1990;40:531–540.

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.

Oyama MA, Fox PR, Rush JE. Clinical utility of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for identifying cardiac disease in dogs and assessing disease severity. J Am Vet Med Assoc 2008;232:1496–1503.

Oyama MA, Rush JE, Rozanski EA. Assessment of serum N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentration for differentiation of congestive heart failure from primary respiratory tract disease as the cause of respiratory signs in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2009;235:1319–1325.

Oyama MA, Singletary GE. Cardiac N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide Assay. *NAVC Clinician's Brief*, 2010, *8*, 58.

Oyama MA, Sisson DD. Cardiac troponin-I concentration in dogs with cardiac disease. J. Vet. Intern. Med. 2004; 18(6): 831-839.

Pemberton CJ, Johnson ML, Yandle TG, Espiner EA. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload. Hypertension 2000;36:355–359.

Potter LR, Yoder AR, Flora DR. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. Handb Exp Pharmacol 2009;191:341–66.

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. J Vet Intern Med. 2007;21:238–242.

Prosek R, Sisson DD, Oyama MA, Solter PF. Distinguishing cardiac and noncardiac dyspnea in 48 dogs using plasma atrial natriuretic factor, B-type natriuretic factor, endothelin, and cardiac troponin-I. Journal of Veterinary Internal Medicine 2007, 21, 238-242.

Rademaker MT, Charles CJ, Kosoglou T. Clearance receptors and endopeptidase: Equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure. Am J Physiol 1997;273(Part 2):H2372–H2379.

Raffan E, J Loureiro, J Dukes-Mc Ewan, S Fonfara, R James, S Swift, N Bexfield, ME Herrtage, J Archer. The Cardiac Biomarker NT-proBNP is increased in dogs with azotemia. *J Vet Intern Med.* 2009;23:1184-1189.

Redfield MM, Rodeheffer RJ, Jacobsen SJ. Plasma brain natriuretic peptide concentration: impact of age and gender. J Am Coll Cardiol. 2002;40:976–982.

Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. J Clin Microbiol 1994;32:912–917.

Rikihisa Y. Mechanisms to create a safe haven by members of the family Anaplasmataceae. Annals of the Newyork Academy of Science 2003:990:548-55.

Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical microbiology reviews*, 1991, *4*(3), 286-308.

Roncon-Albuquerque R Jr, Vasconcelos M, Lourenco AP. Acute changes of biventricular gene expression in volume and right ventricular pressure overload. Life Sci. 2006;78:2633–2642.

Sawada Y, Suda M, Yokoyama H. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. J Biol Chem. 1997;272:20545–20554.

Schmidt MK, Reynolds CA, Estrada AH. Effect of azotemia on serum N-terminal proBNP concentration in dogs with normal cardiac function: A pilot study. J Vet Cardiol 2009;11:S81– S86.

Silver MA, Maisel A, Yancy CW. BNP Consensus Panel 2004: A clinical approach for the diagnostic, prognostic, screening, treatment monitoring, and therapeutic roles of natriuretic peptides in cardiovascular diseases. Congest Heart Fail 2004;10(Suppl 3):1–30.

Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature 1988;332:78–81.

Thomas CJ, Woods RL. Haemodynamic action of B-type natriuretic peptide substantially outlasts its plasma halflife in conscious dogs. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30:369–375.

Thrusfield MV, Aitken CGG, Darker PGG. Observations on breed and sex in relation to canine heart valve incompetence. J Small Anim Pract. 1985;26:709–717.

Unver A, Huang H, Rikihisa Y. Cytokine gene expression by peripheral blood leukocytes in dogs experimentally infected with a new virulent strain of *E. canis*. Annals of the New York Academy of Science 2006;1078:482-486.

van Kimmenade RR, Januzzi JL Jr. The evolution of the natriuretic peptides-current applications in human and animal medicine. J Vet Cardiol 2009;11(Suppl 1): S9–21.

Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M. Brain and other natriuretic peptides: Molecular aspects. Eur. J. Heart Fail. 2004; 6: 261-268.

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, 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. Hematological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. Israel Journal of Veterinary Medicine.2008;63:1.

Weir ML, Honrath U, Flynn TG, Sonnenberg H. Lack of biologic activity or specific binding of amino-terminal pro-ANP segments in the rat. Regul Pept. 1994;53:111– 122.

Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases in dogs. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 21:75-98.

Yasue H, Yoshimura M, Sumida H. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. Circulation 1994;90:195–203.

Yonezawa LA, Silveira VF, Machado LP, Kohayagawa A. Cardiac markers in veterinary medicine. Ciênc. Rural.2010; 40(1): 222-230.

Yoshimura M, Yasue H, Okumura K. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. Circulation. 1993;87:464–469.

EKLER

Ek

1.

BİLGİ ONAM FORMU

Tarih

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kerem URAL'ın yürütücüsü olduğu '*Canine Monositik Ehrlichiosis'in farklı evrelerinde NT-Pro BNP düzeylerinin değerlendirilmesi*' başlıklı çalışma için köpeğimden kan örnekleri alınarak laboratuvar analizlerinin gerçekleştirileceği ve toplanan verilerin bu çalışma dışında başka herhangi bir çalışma için kullanılmayacağı sözlü ve yazılı olarak şahsıma bildirilmiştir.

Hayvan sahibi olarak, köpeğimin yukarıda adı geçen çalışmada yer almasını kabul ediyorum.

ADRES

Hasta Sahibinin Adı Soyadı

İMZA

Ek 2.

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)

Aydın, 30.Ocak. 2018

Oturum	**:** Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2018 Yılı I. Oturum
Sayı	**:** 64583101/2018/011
Proje Başlığı	: Canine Monositik Ehrlichiosis'in Farklı Evrelerinde NT-proBNP Düzeylerinin Değerlendirilmesi.
Proje Yürütücüsü	: Kerem URAL
Proje Ekibi	: Sezen DOĞAN
	Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:
Hayvan Çalışması	İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması İnsanlarda araştırma İnsan olmayan primatların kullanılması Transgenik hayvanların kullanılması Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN Başkan	Prof. Dr. Turhan DOST Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ Üye
Prof. Dr. Deniz ÇOBAN Üye	(Yıllık İzinli) Prof. Dr. Yücel KOCA Üye	Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN Üye
Vet. Hek. Dr. Serdar AKTAŞ Üye	Vet. Hek. Dr. Birgül ÜNAL Üye	(Toplantıya Katılmadı) Yurdagül ALTINBAŞ Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : DOĞAN, Sezen

Uyruk : T.C.

Doğum yeri ve tarihi : Nazilli, 01.01.1993

Telefon : 553 213 5218

E-mail : sezenvet@gmail.com

ALES puanı :75,16

Yökdil puanı (İngilizce) :72.5

Transkript : 2.65

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Dönem
İlkokul	Nazilli Beşeylül İ.Ö.O.	1999-2007
Lise	Nazilli Menderes Anadolu Lisesi	2007-2011
Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2011-2016
Staj	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi (İç Hastalıkları Kliniği)	2015 (yaz sezonu)
Yüksek Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi (İç Hastalıkları Anabilim Dalı)	(Eylül 2016 – Özel Öğrenci Statüsü) 2017-

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2017-	TUNCELİ/ Pülümür Tarım ve Orman İlçe Müdürlüğü	Veteriner Hekim

AKADEMİK YAYINLAR

1.MAKALELER

Ural, K , **Toplu, S** , **Doğan, S** . (2017). Is All Ground Grass Apperance in Radiography Ascites? Journal of Advances in VetBio Science and Techniques, 2 (1), 26-28.