

Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosisin Nested-PCR ile Araştırılması

Anıl İÇA¹, Abdullah İNCİ¹, Alparslan YILDIRIM¹, Öznur ATALAY², Önder DÜZLÜ¹

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi,

¹Parazitoloji Anabilim Dalı, ²İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kocasinan, Kayseri, Türkiye

ÖZET: Köpeklerde leishmaniosis (KanL), *Leishmania* spp.'nin neden olduğu zoonotik karakterli bir protozoon hastalığıdır. Bu hastalık, Dünya'da Akdeniz havzasını da içine alan birçok bölgede yaygın olarak görülmektedir. Bu çalışma, Kayseri ve civarındaki köpeklerde KanL'in yaygınlığının Nested-Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniği ile araştırılması amacıyla yapılmıştır. Rastgele seçilen toplam 300 asemptomatik köpeğin vena cephalica antebraçhii'lerinden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Bunun yanında, 14 köpekten lenf sıvısı, üç köpekten de kemik iliği, dalak ve karaciğer biyopsileri alınmıştır. Alınan örneklerden elde edilen DNA'lar, *Leishmania* spp.'nin varlığı yönünden small subunit ribosomal RNA (ssr RNA) geninin amplifiye edildiği Nested-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Nested-PCR sonuçlarına göre muayene edilen 300 köpekten hiçbirinde *Leishmania* spp. DNA'sına rastlanmamıştır.

Anahtar Sözcükler: Köpek, Kayseri, *Leishmania*, Nested-PCR

Investigation of Canine Leishmaniosis by Nested-PCR in Kayseri and Vicinity

SUMMARY: Canine leishmaniosis (CanL) caused by *Leishmania* spp. is a zoonotic protozoon disease. It is widespread in most parts of the world including the Mediterranean basin. The present study was carried out in order to determine the prevalence of CanL in dogs in Kayseri and vicinity by nested-PCR. A total of 300 asymptomatic dogs were sampled randomly. Blood samples taken from the vena cephalica antebraçhii were collected into tubes containing EDTA. Furthermore, lymph samples were taken from 14 dogs while bone marrow, spleen and liver biopsies were taken from three dogs. The DNA's obtained from these samples were examined for the presence of *Leishmania* spp. by nested-PCR which amplified the small subunit ribosomal RNA (ssr RNA) gene. According to the results of the nested-PCR, none of the 300 dogs were *Leishmania* spp. DNA positive.

Key Words: Dog, Kayseri, *Leishmania*, Nested-PCR

GİRİŞ

Leishmaniosis; *Mastigophora* kökünde, *Leishmania* cinsi içerisinde yer alan protozoonların yol açtığı zoonotik karakterli paraziter bir hastalıktır. *Leishmania* türleri heteroksen parazitler olup, etkenin vektörlüğünü tatarcıklar yapmakta ve parazit için birçok memeli de rezervuar olarak görev almaktadır. Akdeniz ve Orta Doğu'da *Leishmania infantum*'un, Latin Amerika'da *L. chagasi*'nin sebep olduğu zoonotik visseral leishmaniosis (VL)'in rezervuarlığını vahşi kanid ve evcil köpekler yapmaktadır (1). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *L. chagasi*'nin, *L. infantum* ile sinonim olduğu bildirilmiştir

(7). Zoonotik karakterli olan *L. infantum*, köpeklerde klinik belirtilerle seyreden hastalık tablosuna da yol açmaktadır. Klinik belirti gösteren enfekte köpeklerde, progresif seyirli deri lezyonları ve iç organ lezyonları birlikte görülmektedir. Bu hayvanlarda, deri lezyonları, ağırlık kaybı veya iştahsızlık, lokal veya genel lenfadenopati, oküler lezyonlar, burun kanaması, topallık, anemi, böbrek yetersizliği ve ishal görülmektedir (20). Hastalığın köpeklerde klinik belirtilerle seyretmesi ve zoonotik karakter taşıması köpek leishmaniosisini (KanL) hem veteriner hekimlik hem de halk sağlığı açısından önemli hale getirmektedir. Nitekim, bazı çalışmalarda insanlardaki VL ile KanL arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmiştir (2).

Hastalığın endemik seyrettiği Akdeniz ülkelerinde prevalans %1-37 arasında değişmektedir (17). Türkiye'de hastalığın ilk teşhis edildiği yıllardaki mikroskopik çalışmaların dışında bugüne kadar yapılan çalışmalarda hastalığın yaygınlığı genellikle serolojik testlerle ortaya konmuştur. Türkiye'de KanL konusunda yapılan çalışmalar Tablo 1'de özetlenmiştir.

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

Geliş tarihi/Submission date: 31 Ekim/31 October 2007

Düzeltilme tarihi/Revision date: 10 Mart/10 March 2008

Kabul tarihi/Accepted date: 26 Nisan/26 April 2008

Yazışma /Corresponding Author: Anıl İça

Tel: (+90) (352) 338 00 06 Fax: (+90) (352) 339 23 12

E-mail: anilica@erciyes.edu.tr

15. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (18-23 Kasım 2007, Kayseri ve Ürgüp) sunulmuştur

Tablo 1. Türkiye’de KanL konusunda yapılan çalışmalar

Kullanılan Yöntem	Bulunduğu Yer	Yaygınlık oranı	Kaynak
Mikroskopik	İstanbul (1946)	Bir köpekte	33
Mikroskopik	İstanbul (1951)	Bir köpekte	34
Mikroskopik	İstanbul (1955)	Bir köpekte	34
Mikroskopik	Ege (1964)	İki köpekte	34
IFAT, ELISA, DAT	Manisa	%7	25
IFAT	Marmara	%5,5	5
ELISA	Ege	%3,6	27
IFAT, DAT, PCR	Manisa	%5,3	23
IFAT, ELISA	Muğla	%3,8	13
IFAT, ELISA, DAT	Karabük	%8	24
IFAT	Sakarya	%1,45	28
IFAT	Kayseri	%0	18
ELISA, IFAT	İzmir	%3,2	36
IFAT, ELISA	Kuşadası	%16,6	26
IFAT	Ankara	%2,58	3
IFAT	Çorum	%13,74	12
IFAT, ELISA	Afyon, Bilecik, Eskişehir	%2,75-9,9	9

Hastalığın teşhisinde, Wright’s, Giemsa ve Leishman ile boyanan preparatlarda parazitin tespit edilmesi halen en geçerli yöntemdir (19). Bunun yanında, *Leishmania* spp.’nin serolojik teşhisi genellikle spesifik antijenlere bağlanan IgG’lerin tespiti yolu ile olmaktadır. *Leishmania* türlerinin serolojik teşhisinde IFAT, ELISA, C-ELISA, Dot-ELISA, DAT gibi testler kullanılmaktadır (10, 14, 32). Ancak, direkt parazitolojik muayene, sensitivitesinin düşük olması ve deneyimli personele ihtiyaç duyulması sebebiyle sınırlı olarak kullanılmaktadır (4). Serolojik testlerde ise çapraz reaksiyonlara bağlı olarak yanlış pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Bu sebeple, parazit DNA’sının tespitine dayalı PCR temelli teşhis yöntemleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. *Leishmania* türlerinin tespitinde kinetoplast DNA’sı (kDNA) (8, 21, 31), ribosomal DNA ve “internal transcribed spacer 1” (ITS-1) DNA’ları kullanılmıştır. (11, 35).

Bu çalışma ile, Kayseri ve civarındaki köpeklerde leishmaniosis yaygınlığının Nested-PCR ile araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Saha Çalışmaları

Kayseri çevresindeki köylerden, belediyeye ait hayvan barınağından ve Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Klinikleri’nden 2006 yılı içinde, çeşitli dönemlerde toplam 300 asemptomatik köpekten tekniğine uygun olarak vena cephalica

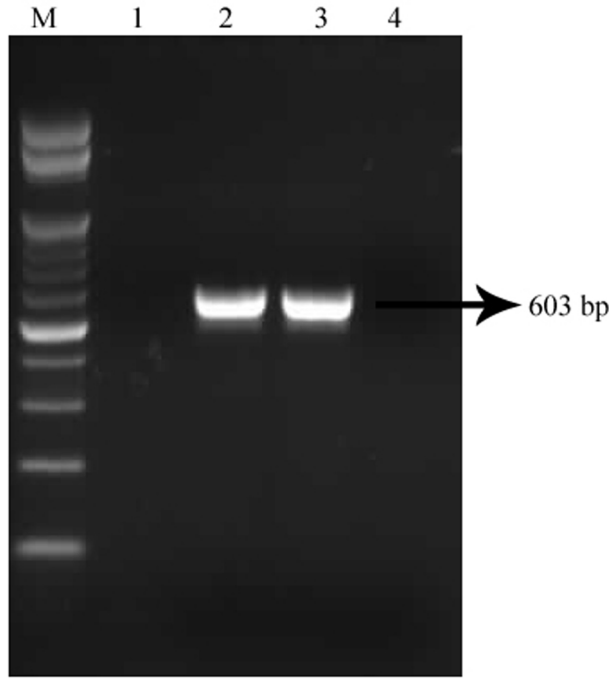
antebrachii’den EDTA’lı tüplere kan örneği alınmıştır. Bunun yanında kan alınan köpeklerin 11’inden lenf sıvısı ve Veteriner Fakültesi Klinikleri’ne ovariohistektomi amacıyla getirilen 3 köpekten lenf sıvısı, kemik iliği, dalak ve karaciğerden biyopsi materyalleri de alınmıştır. Kan örneği toplanan hayvanlar, köylerde kırsal alanlarda yaşayan sahipli, sokakta ve barınakta yaşayan sahipsiz köpeklerdir. Araştırmanın yapıldığı bölge dışında, önceki çalışmalarla hastalığın varlığı bildirilen Ege Bölgesi’nden de kan numuneleri temin edilmiştir. Bu kapsamda, Kuşadası’dan 9, Selçuk’tan 3, Bodrum’dan 12, Marmaris’ten 1, Manisa’dan 1 ve Urla’dan 4 adet olmak üzere toplam 30 kan numunesi temin edilmiştir. Alınan tüm numuneler laboratuvar çalışmaları yapıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

DNA Ekstraksiyonu

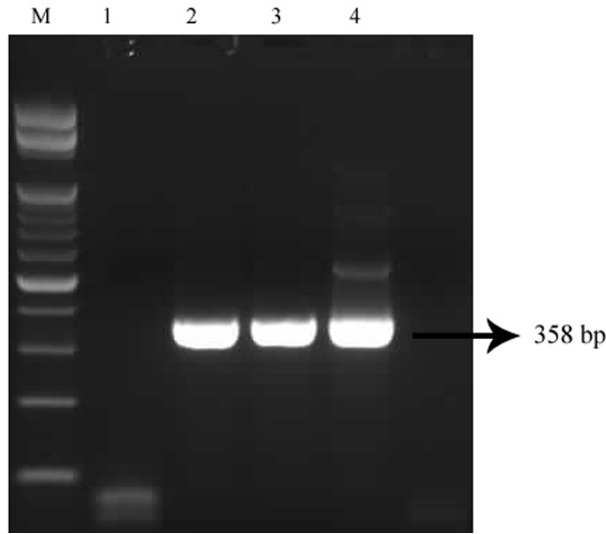
Genomik DNA, köpeklerden toplanan kan numunelerinden ticari kan kiti (DNeasy, Qiagen, Hilden, Germany), lenf sıvısı ve kemik iliği örneklerinden ise doku kiti (Qiagen Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı’ndan temin edilen *Leishmania infantum* suşundan ekstrakte edilen DNA kullanılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri PCR incelemeleri yapıncaya kadar -20°C’de saklanmıştır.

Nested-PCR

Elde edilen DNA örneklerinin *Leishmania* spp. yönünden araştırılmasında ssr RNA geninin amplifikasyonu esasına dayanan Nested-PCR protokolü uygulanmıştır. İlk amplifikasyonda, 603 bp’lik (Şekil 1) bir gen parçasını amplifiye eden R221 (GGTTCCTTCCTGATTACG) ve R332 (GGCCGGTAAAGGCCGAATAG) primerleri kullanılmıştır (35). Reaksiyon karışımı 50 µl final konsantrasyonda, 25 mM KCl/10 mM Tris-HCl/ 2 mM MgCl₂/50 mM dNTP/0,5 U Taq polimerase ve 50 pmol her bir primerden olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımına 10 µl DNA ilave edilmiştir. Reaksiyon PCR makinesinde (Thermo-Hybrid, UK), 95°C’de 5 dk., 35 siklus olacak şekilde 94°C’de 30 sn., 60°C’de 30 sn. ve 72°C’de 30 sn. ve 72°C’de 10 dk. son ekstensiyon olarak gerçekleştirilmiştir. Nested-PCR reaksiyonunda ise 358 bp’lik (Şekil 2) bir gen parçasını amplifiye eden R223 (TCCCATCGCAACCTCGGTT) ve R333 (AAAGCGGGCGCGGTGCTG) primerler kullanılmıştır (35). Aynı oranlarda 25 µl final konsantrasyonlarda hazırlanan reaksiyon karışımına 3 pmol her bir primerden ve 3 µl de birinci amplifikasyondan elde edilen ampikonlardan ilave edilmiştir. PCR protokolü birinci reaksiyondaki gibi uygulanmış sadece annealing ısı 65°C olarak değiştirilmiştir. Amplifikasyon ürünleri %1,5’lik agarose jelde elektroforeze tabii tutulmuş ve jel dokümantasyon sisteminde (Syngene, UK) değerlendirilmiştir. Testlerde kullanılan primerler, MWG (Almanya) firmasına sentezletirilmiştir.



Şekil 1. PCR sonucunda elde edilen bantlar. M: marker, 1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrol, 3-4 saha örneği



Şekil 2. Nested-PCR sonucunda elde edilen bantlar. M: marker, 1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrol, 3-4 saha örneği

BULGULAR

Nested-PCR metodu ile yapılan incelemelerde Kayseri ve civarından toplanan numunelerin hiç birinde *Leishmania* spp. DNA’sı saptanamamıştır. Muayene edilen hayvanların, çalışma merkezlerine göre dağılımı Tablo 2’de, cinsiyet, yaş, ırk ve barınma koşulları ise Tablo 3’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Muayene edilen hayvanların, çalışma merkezlerine göre dağılımı.

Çalışma Merkezleri	Muayene Edilen Hayvan Sayısı	Enfekte Hayvan Sayısı
Kayseri Merkez	152	0
İncesu	38	0
Talas	32	0
Felahiye	18	0
Pınarbaşı	20	0
Yahyalı	23	0
Tomarza	17	0
Toplam	300	0

Tablo 3. Muayene edilen hayvanların, cinsiyet, yaş, ırk ve barınma koşulları

	Muayene Edilen Hayvan Sayısı	Enfekte Hayvan Sayısı
Cinsiyet		
Dişi	95	0
Erkek	205	0
Yaş (yıl)		
0,5-3	194	0
4-6	76	0
7-10	26	0
>10	4	0
İrk*		
Büyük	186	0
Küçük	114	0
Barınma		
Sahipli	204	0
Sahipsiz	96	0
Toplam Hayvan Sayısı	300	0

* >18 kg. büyük ırk, <18 kg. küçük ırk olarak sınıflandırılmıştır.

Buna karşın, önceki çalışmalarla hastalığın varlığı bildirilen Ege Bölgesi’nden temin edilen kan numunelerinin Nested-PCR ile yapılan incelemelerinde Kuşadası, Bodrum ve Urla’dan daha önce leishmaniosis pozitifliği IFAT ile saptanmış toplam 3 köpekte *Leishmania* DNA’sı da tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Leishmania infantum enfeksiyonlarında köpekler hem konak hem de rezervuar olarak görev yapmakta ve bu sayede enfeksiyonların yayılmasına ve doğada enfeksiyon odaklarının devamlılığına neden olmaktadır (15, 36). Bu nedenle zoonotik olan bu hastalığı taşıyan enfekte köpeklerin teşhis edilmesi, hayvan sağlığı yanında insan sağlığı açısından da önem taşımaktadır. Bu parazitin köpeklerde teşhisinde birçok yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemlerden en eskisi olmasına rağmen halen geçerliliğini koruyan yöntem parazitolojik muayenedir (19). Ancak bu yöntemler genellikle birçok hastalığın akut

dönemlerinde teşhise yardımcı olmaktadır. Bunun yanında, parazite karşı gelişen antikorların tespiti esasına dayanan serolojik yöntemler de yaygın olarak kullanılmaktadır (32). Serolojik teşhiste ortaya çıkan çapraz reaksiyonlara bağlı yanlış pozitiflikler, rekombinant antijenlerle giderilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanan parazit DNA'sının tespiti esasına dayanan moleküler teşhis yöntemleri birçok enfeksiyöz etkenin teşhisinde olduğu gibi *Leishmania* türlerinin teşhisinde de kullanılmaktadır. PCR, insanlardan ve hayvanlardan alınan klinik örneklerden *Leishmania* spp. DNA'sının saptanması için sensitif ve spesifik bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Van Eys ve ark., (35), *Leishmania* parazitlerinin ssr RNA geninden dizayn ettikleri spesifik primerler ile, Nested-PCR yöntemini kullanarak parazitini yapmışlardır. Aynı gen bölgesini ve primerleri kullanarak Cruz ve ark. ise (6), HIV pozitif hastalarda leishmaniosisin Nested-PCR ile teşhisini yapmışlardır. Piarroux ve ark. (29), genomik DNA'dan dizayn ettikleri problemlerle *Leishmania* DNA'sının teşhisini insanlarda gerçekleştirmişlerdir. KanL'in teşhisinde de PCR temelli metotlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan, Mathis ve Deplazes (22), Özbel ve ark. (23) ve Lachaud ve ark. (20) PCR, Fisa ve ark. (16) ise Nested-PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Bunun yanında Reale ve ark. (30) ve Manna ve ark. (21) köpeklerde leishmaniosisin teşhisinde üç tane konservatif blok taşıyan kDNA'sını amplifiye eden primerler kullanmışlardır.

Bu çalışmada ise, *Leishmania* spp.'nin ssr RNA genini amplifiye eden Nested-PCR protokolleri kullanılmıştır. Ribosomal RNA genini amplifiye eden Nested-PCR protokolünde ilk amplifikasyon sonucunda 603 bp, Nested-PCR sonucunda ise *Leishmania* DNA'sına spesifik 358 bp'lik bantlar elde edilmiştir. Ege Bölgesi'nden toplanan, daha önce KanL pozitifliği IFAT ile saptanmış 3 örnekte yapılan incelemelerde PCR ile de pozitiflik tespit edilmiştir. Bu sayede, testin saha örneklerinde de pozitif sonuç verdiği doğrulanmıştır.

Türkiye'de leishmaniosis üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar genellikle insanlar üzerinde odaklanmaktadır. Köpeklerde geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar genellikle vaka bildirimleri şeklindedir. Buna karşın son yıllarda özellikle IFAT, ELISA ve DAT gibi serolojik yöntemlerle yapılan epidemiyolojik çalışmalar ağırlık kazanmıştır. Bu çalışmalarda, KanL'in prevalansı Ege Bölgesi'nde %3,2-27,5 (13, 23, 25-27, 36), Marmara Bölgesinde %1,45-9,09 (5, 9, 28), Karabük'te %8 (24), Kayseri, Ankara, Eskişehir ve Çorum'da %0-13,74 (3, 9, 12, 18) olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de Manisa çevresinde yapılan bir çalışmada seropozitif bulunan 17 örneğin PCR'la yapılan incelemesinde 13 örnek pozitif bulunmuştur (23).

Bu çalışmada, KanL'in yaygınlığı konusunda sadece IFAT ile yapılmış bir çalışmanın bulunduğu Kayseri ve civarında hastalığın Nested-PCR ile yaygınlığı araştırılmıştır. Kayseri yöresinde ilk defa moleküler yöntemler kullanılarak yapılan bu çalışmada kontrol edilen köpeklerde pozitif sonuca rastlanmamıştır. Ankara, Eskişehir ve Çorum illerinde yapılan

serolojik çalışmalarda pozitiflikler saptanmış olmasına karşın, Kayseri yöresinde daha önce IFAT ile yapılan çalışmada pozitiflik saptanamamıştır (18). Bunun yanında, Kayseri yöresinde insanlarda VL'in yaygınlığı konusunda bir yayın bulunmamasıyla birlikte, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2003-2006 yılları arasında sadece bir vaka gözlenmiştir. Bu durum, bu çalışmadan elde edilen negatif sonucu destekler niteliktedir. Ayrıca, çalışmanın yapıldığı bölgede vektör tatarcıkların türleri ve yayılışları konusunda yeterince veri bulunmamaktadır. Dolayısıyla, Ankara, Eskişehir ve Çorum gibi Kayseri ile aynı bölgede bulunan illerdeki pozitiflikler değerlendirilirken vektör tatarcık türlerinin karşılaştırılması da önemli bir veri olacaktır.

Sonuç olarak, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden leishmaniosisin Kayseri yöresinde köpeklerde araştırılmasının, hastalığın Türkiye genelinde yayılış konusundaki verilere epidemiyolojik anlamda katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu çalışma, yörede yapılan bu konudaki ilk moleküler çalışma olma özelliği taşımaktadır. Köpeklerden elde edilen bu verilerin yanında, hastalığın bölgedeki durumunun daha ayrıntılı bir şekilde ortaya konması için, hastalığın vektörlerinin araştırıldığı, serolojik metotları da içine alan daha geniş çaplı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 104O302 nolu proje ile desteklenmiştir. Pozitif DNA örneğinin temininde yardımcı olan Prof. Dr. Yusuf Özbel'e, Ege Bölgesi'den numunelerin temininde yardımcı olan Doç. Dr. Tülin Karageç'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J, 2004. Canine leishmaniosis. *Adv Parasitol*, 57: 1-88.
2. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, da Conceição Eulalio M, Pedral Sampaio D, Badaro R, 1998. Studies on control of visceral leishmaniosis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57.
3. Aslantaş Ö, Özdemir V, Kılıç S, Babür C, 2005. Seroepidemiology of leptospirosis, toxoplasmosis and leishmaniosis among dogs in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol*, 129: 187-191.
4. Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC, 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific response. *Am J Trop Med Hyg*, 35: 72-78.
5. Coşkun Ş, Batmaz H, Aydın L, Yılmaz F, 1997. Seroprevalence of *Leishmania infantum* infection of dogs in the western part of Turkey. *Türkiye Parazit Derg*, 21: 287-291.
6. Cruz I, Canavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jimenez-Mejias M, Sirera G, Videla S, Alvar J, 2002. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosis and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96 (suppl 1): 185-189.

7. **Dantas-Torres F**, 2006. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101: 117-118.
8. **Degrave W, Fernandes O, Thiemenn O, Wincker P, Britto C, Cardoso A, Borges Periera J, Bozza M, Lopes U, Morel C**, 1994. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* using the polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 89: 367-368.
9. **Doğan N, Özbel Y, Özensoy S, Dinleyici EÇ, Bor Ö**, 2006. Sero-epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sandfly vectors in Northwestern Turkey: Prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *J Trop Pediatr*, 52: 212-217.
10. **Dye C, Vidor E, Dereure J**, 1993. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol Infect*, 103: 647-656.
11. **El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G**, 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 94: 1-5.
12. **Ertabaklar H, Özensoy S, Özkan AT, Rastgeldi S, Balcioglu İC, Özbel Y**, 2005. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum Province. *Acta Trop*, 93: 239-246.
13. **Ertabaklar H, Özensoy S, Şakru N, Keleş E, Özbel Y**, 2001. Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visceral leishmaniasis’in araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 25: 128-131.
14. **Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M**, 1995. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 136: 514-516.
15. **Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Alsa MJ, Serra T, Riera C, Carrio J, Gallego J, Portus M**, 1999. Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83: 87-97.
16. **Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M**, 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol*, 99: 105-111.
17. **Gradoni LM**, 1995. Canine reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis in the Mediterranean area: Epidemiology and control. Information Circular, WHO Mediterranean Zoonoses Control Center, Greece.
18. **Handemir E, Çam Y, Kamburgil K**, 2003. Kayseri Büyükşehir Belediyesi Köpek Toplama Merkezindeki Köpeklerde Visseral Leishmaniasis Seroprevalansı. *Veterinarium*, 14: 69-71.
19. **Herwald B**, 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354: 1191-1199.
20. **Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P**, 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40: 210-215.
21. **Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE**, 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 125: 252-262.
22. **Mathis A, Deplazes P**, 1995. PCR and in vitro cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. *J Clin Microbiol*, 33: 1145-1149.
23. **Özbel Y, Oksam L, Özensoy S, Turgay N, Alkan MZ, Jaffe CL, Özcel MA**, 2000. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Trop*, 74: 1-6.
24. **Özbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Babaoğlu A, Özensoy S, Babaloğlu N**, 2002. Batı Karadeniz Bölgesi’nde zoonotik visceral leishmaniasis odağı: Karabük. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 26: 362-366.
25. **Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Abranches P**, 1995. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region. *Ann Trop Med Parasitol*, 89 (suppl 1): 89-93.
26. **Özensoy S, Ertabaklar H, Özbel Y, Balcioglu İC, Yıldızlı N, Alkan MZ**, 2005. Seroprevalence of canine leishmaniasis in Kuşadası, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 23-26.
27. **Özensoy S, Özbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gül K, Gilma-Sachs A, Chang KP, Reed SG, Özcel MA**, 1998. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 363-369.
28. **Özkan AT, Babür C, Kılıç S, Örgen C, Özensoy S**, 2003. Sakarya sokak köpeklerinde visceral leishmaniasis’in İndirekt Fluoresan Antikor (IFAT) yöntemi ile araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 27: 97-101.
29. **Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Myscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, Quilici M**, 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 49: 364-369.
30. **Reale S, Maxia L, Vitale F, Glorioso NS, Caracappa S, Vesco G**, 1999. Detection of *Leishmania infantum* in Dogs by PCR with Lymph Node Aspirates and Blood. *J Clin Microbiol*, 37: 2931-2935.
31. **Simpson L**, 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol*, 41: 363-382.
32. **Slappendel RJ**, 1988. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10: 1-16.
33. **Unat EK**, 1981. *Leyişmanyaz’ların Tarihçesi. “Leishmaniasis” Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No:2*. p. 1-9.
34. **Unat EK, Yaşarol Ş, Merdivenci A**, 1965. *Türkiye’nin Parazitolojik Coğrafyası*, Ege Üniversitesi Tıp Fak. Yayını No:42. p.50.
35. **Van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SB**, 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 51: 133-142.
36. **Voyvoda H, Paşa S, Özensoy S, Özbel Y, Ertabaklar H**, 2004. Aydın’ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir’in Selçuk ilçesindeki köpeklerde leishmaniasis ve dirofilariosis’in prevalansı. *Turk J Vet Anim Sci*, 28: 1105-1111.