

Kırıkkale'deki Köpeklerde Mikrokültür Yöntemi ve IFAT ile Visseral Leishmaniosis Prevalansının Araştırılması

Meral AYDENİZÖZ¹, Buğrahan Bekir YAĞCI², Ayşegül TAYLAN ÖZKAN³,
Sibel YASA DURU², Aycan Nuriye GAZYAĞCI¹

Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi ¹Parazitoloji Anabilim Dalı; ²İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kırıkkale;
³Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü, Parazitoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

ÖZET: Bu çalışma 2006-2008 yıllarında Kırıkkale'nin farklı yörelerindeki köpeklerde yeni bir yöntem olan Mikrokültür Yöntemi (MKY) ve İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFAT) ile karşılaştırmalı olarak visseral leishmaniosis prevalansını belirlemek için yapılmıştır. Toplam 50 köpekten alınan kanların tamamı MKY ile negatif olarak saptanmıştır. IFAT ile anti-*Leishmania infantum* IgG antikorları yönünden incelenmesinde ise sadece 3 yaşındaki Beagle ırkı erkek bir köpekte 1/128 titrede (%2) seropozitiflik tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Visseral Leishmaniosis, mikrokültür yöntemi, IFAT, köpek, Kırıkkale

Investigation of the Prevalence of Visceral Leishmaniasis by the Microculture Method and IFAT in Dogs in Kırıkkale

SUMMARY: This study was carried out in order to compare the seroprevalence of visceral leishmaniasis in dogs from different areas of Kırıkkale between 2006-2008 using the microculture method (MCM) which is a new method, and the indirect fluorescent antigen test (IFAT). All of the blood collected from total of 50 dogs was found to be negative by MCM. Only one male Beagle strain dog (3 years old) was found to be seropositive at 1/128 titers (2%) for anti-*Leishmania infantum* IgG antibodies by IFAT.

Key Words: Visceral leishmaniosis, microculture Method, IFAT, dog, Kırıkkale

GİRİŞ

Leishmaniosis, vertebralı konakların makrofajlarında hücre içi bir protozoon olan *Leishmania* türlerinin oluşturduğu zoonotik bir hastalıktır. *Phlebotominae* alt ailesine bağlı dişi tatarcıklar tarafından nakledilen bu protozoon Akdeniz kıyıları başta olmak üzere Avrupa'da visseral (VL) ve köpek leishmaniosisine (CanL) yol açmaktadır. VL ve CanL'e Türkiye'de de Ege ve Akdeniz Bölgesi'nde endemik,

diğer bölgelerde sporadik olarak rastlanmaktadır ve etkeni *Leishmania infantum*'dur (5, 15, 18, 19).

Köpek leishmaniosisini genellikle ağır seyrederek ve en sık görülen klinik bulgular; anemi ile birlikte seyreden aşırı zayıflama, şiddetli deri lezyonları, lokal ve yaygın lenfadenopati, anoreksi, halsizlik, renal ve okuler bozukluklardır (23). Enfekte köpeklerin yoğunluğu halk sağlığı açısından büyük bir risk faktörü ise de özellikle asemptomatik evcil köpekler ara konak *Phlebotominae*'nin esas kaynağıdır ve Leishmaniosisin geçişinde aktif rol oynarlar (5, 8).

Köpek leishmaniosisinin tanısında; direkt mikroskopik yanı sıra IFAT, ELISA, immunokromatografi gibi serolojik yöntemler veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler (4, 10, 12, 16-18, 20, 26) kullanılmaktadır.

Avrupa'da köpeklerdeki seropozitifliğin ortalama %25 olduğu, hatta İspanya gibi bazı ülkelere ithal edilen köpeklerde bu oranın %67'lere ulaştığı bildirilmiştir (5, 15).

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

Geliş tarihi/Submission date: 07 Aralık/07 December 2009

Düzeltilme tarihi/Revision date: 25 Ocak/25 January 2010

Kabul tarihi/Accepted date: 01 Şubat/01 February 2010

Yazışma /Corresponding Author: Meral Aydenizöz

Tel: - Fax: -

E-mail: meralaydenizoz@hotmail.com

Bu çalışma, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi'nde (1-7 Kasım 2009, Adana) sunulmuştur.

Bu araştırma, Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAB) tarafından (Proje No: 2006/21) desteklenmiştir.

Ülkemizde de endemik bölgelerde yapılan çalışmalarda seropozitifliğin %27'lere ulaştığı bildirilmiştir (20, 21)

Bu çalışmada Kırıkkale'deki köpeklerde leishmaniosis yaygınlığının Mikrokültür Yöntemi (MKY) ve İndirekt Floresan Antikor Testi (IFAT) ile karşılaştırmalı olarak belirlenmesi ve leishmaniosis teşhisinde yeni bir yöntem olan MKY'nin köpeklerde uygulanabilirliğinin değerlendirmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, 2006-2008 yıllarında Kırıkkale'nin değişik yerlerinden seçilmiş ve bu bölgede doğmuş olan 50 sahipli köpeğe ait kan ve serumlar VL yönünden incelenmiştir. Köpeklerin klinik muayeneleri sonucunda daha sonra seropozitif bulunan Beagle ırkı bir köpek haricinde, VL yönünden herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. İncelenen köpeklerin 35'i erkek, 15'i dişi, 42'si 2 ve 2 yaş altı, 8'i 2 yaş üstü olarak gruplandırılmıştır. Irk gruplarına göre dağılım ise şu şekildedir: Kangal (n=23), Melez (n=13), Pointer (n=4), German shephard (n=2), Setter (n=2), Beagle (n=1), Cocker (n=1), Terrier (n=1), Pittbul (n=1), Golden Retreiver (n=1), Çatal burun (n=1).

Elli adet köpekten her birinden usulüne göre bir EDTA'lı, bir EDTA'sız tüpe 5'er ml kan alınmış, EDTA'lı olanlar +4 °C veya 0 °C de, diğerleri normal hava sıcaklığında laboratuara getirilmiştir.

Çalışmada IFAT için; promastigot (*L. infantum*) antijen, pozitif ve negatif serumlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. EDTA'sız kanlar santrifüj edilerek ayrılmış serumlar ve antijen ile kaplanarak oda sıcaklığında kurutulmuş lamalar test uygulanıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Testin uygulanışında IgG konjugat (rabbit anti-dog IgG fluorescein isothiocyanate conjugate, Sigma, F-7884) 1/100 dilüsyonda kullanılmış, serum sulandırılmaları ise 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 olarak hazırlanmıştır. IFAT sonuçları floresans mikroskobunda (Olympus, CH-40) 40'luk objektifte incelenmiştir. Seropozitivite için parlak sarı-yeşil floresans veren sulandırılmalar dikkate alınmış, zayıf veya hiç floresan vermeyenler negatif olarak değerlendirilmiştir. 1/128 ve üzeri sulandırılmalar pozitif olarak kabul edilmiştir (13, 19, 29).

Mikrokültür Yöntemi için; laboratuara getirilen EDTA'lı kanlar +4 °C de 5000 devirde 5 dk santrifüje edilmiştir. Serumlar alındıktan sonra, kalan kanın üzerine steril ortamda 1/3 oranında RPMI-1640 medium konularak +4 °C de 1500 devir/dk da 5 dk süre ile santrifüje edilip, bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Dipteki tortunun üzerindeki ince tabaka mikropipet ile çekilerek, hematokrit tüpüne bir uçtan konulup, tüpün her iki tarafı cam macunu ile kapatılarak, 5 dk santrifüje edilmiştir. Hematokrit tüp santrifüj sonrası beyaz halenin altından bir bistüri ile kesilerek

kan Schneider's insect medium solüsyonunun konulduğu eppendorf tüpüne dökülmüştür. Buradaki karışım bir hematokrit tüpüne çekilerek her iki tarafı steril mum ile kapatılıp, daha sonra +27 °C'lik etüvde 7 gün boyunca her gün inverted mikroskopta (Olympus, CKX41-32PH) X20 kontrol edilerek promastigotlar aranmıştır (2, 3).

BULGULAR

Araştırmada MKY ile köpeklerde *Leishmania* promastigotlarına rastlanmamıştır. IFAT ile anti-*Leishmania* antikorları araştırılan 50 köpekten sadece 3 yaşındaki Beagle ırkı erkek bir köpekte 1/128 titrede seropozitiflik (%2) belirlenmiştir.

MKY'de negatif sonuç elde edilmesi ve IFAT'da da sadece bir köpekte seropozitiflik saptanması nedeniyle cinsiyet, yaş ve ırk durumuna göre gruplar arasında istatistikî analiz yapılamamıştır.

TARTIŞMA

Leishmania infantum'un neden olduğu enfeksiyonlar hem insanların hem de köpeklerin yaşamını tehdit etmektedir. Özellikle asemptomatik CanL'li köpekler rezervuar olarak rol oynamaktadırlar. Diğer yandan semptomatik köpeklerin tedavisi de nüks görülebilmesi nedeniyle oldukça sorunludur. Gerek insan gerekse hayvan sağlığı açısından leishmaniosis köpeklerde hızlı ve kesin bir şekilde teşhis edilmesi son derece kritiktir. Köpek leishmaniosis tanısında mikroskobiye dayalı direkt tanı yöntemlerinde spesifite yüksekliğine karşın sensitivite düşüklüğü nedeniyle genellikle serolojik ya da moleküler yöntemlere başvurulmaktadır (14, 18, 21-25).

Avrupa'da serolojik olarak ortalama %25'lerde saptanan CanL, PCR yöntemi ile İspanya'da %63'lere kadar çıkabilmektedir (15, 27). Komşu ülkelerimizden İran'da köpeklerde %14,2, yabani karnivorlarda %10 (DAT) (16), Hırvatistan'da %0-42,85 oranında (dot-ELISA) (30) *Leishmania* enfeksiyonlarına rastlanmıştır.

Türkiye'deki köpeklerde İstanbul'da %0 (IFAT) (10), Sakarya'da %1,45 (IFAT) (29), İzmir'de Karaburun ve Urla'da %23-27 (IFAT, Whole-ELISA, rK39-ELISA) (20), Muğla'da %3,8 (IFAT, Whole-ELISA, rK39-ELISA) (6), Sivas'ta %2 (IFAT) (13) ve Çorum'da %13,74 (IFAT ve DAT) (7) seropozitiflik belirlenmiştir. Eskişehir, Afyon ve Bilecik'te yapılan bir araştırmada IFAT, Whole-ELISA, rK39-ELISA ve dip-stick testleri ile %13,51 seropozitiflik saptanmış ayrıca bu üç test arasında uyumun %100 olduğu ve dipstick testinde 15 köpeğin 13'ünde pozitiflik gözlemlendiği (4) bildirilmiştir. Kayseri'de 300 asemptomatik köpeğin kan ve biyopsi örneklerinde nested PCR ile herhangi bir etken rastlanamamıştır (12).

Kırıkkale'de yapılan bu çalışmada ise MKY'de köpeklerde enfeksiyona rastlanamazken, IFAT da 1/128 titrede yal-

nızca bir köpeğin (%2) seropozitif olduğu belirlenmiştir. Bu bölgedeki enfeksiyon oranı Muğla (6) ve Sakarya’daki (29) oranlara yakın bulunurken, İzmir (20), Eskişehir, Afyon, Bilecik (4) ve Çorum’daki (7) oranlardan oldukça düşüktür. Çorum’un Kırıkkale’ye komşu olmasına karşın enfeksiyon oranları arasında farklılık bulunmasında Kırıkkale’de incelenen köpek sayısının düşük olmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Çorum’da incelemeye alınan köpek serumları insan leishmaniasis olgularının saptandığı köylerden seçilmiş olmasına karşın bu çalışmadaki örnekler Kırıkkale’nin farklı yerlerinden rastgele toplanmıştır. Kılıç ve ark. (13) da benzer şekilde herhangi bir insan leishmaniasis olgusu bildirilmemiş Sivas yöresindeki 50 Kangal köpeğinin yalnızca birinde (%2) antikor saptamışlardır. İça ve ark. (12) da Kayseri’de asemptomatik köpeklerde pozitiflik saptayamamışlardır.

Bir kısım araştırmalarda köpek ırkları ve cinsiyeti ile leishmaniasis arasında ilişkinin olmadığı vurgulanmıştır (29, 30). Mohebalı ve ark. (16), İran’da, Taylan-Özkan ve ark. (29) Sakarya’da erkek köpeklerde, Kılıç ve ark. (13) Sivas’ta dişi köpeklerde daha fazla seropozitiflik saptamalarına karşın CanL’nin cinsiyete göre dağılımının istatistiki olarak anlamlı bulunmadığını bildirmişlerdir. Ancak Živičnjak ve ark. (30), Hırvatistan’da erkek köpeklerin %19,31 oranında dişilerden daha fazla seropozitif olmasının istatistiki olarak önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Enfeksiyonun yaşla olan ilişkisinde İran’da (16) 8 yaşından büyük köpeklerde daha yüksek, 3 yaşından küçüklerde daha düşük bulunduğu; Hırvatistan’da (30) pozitif köpeklerin daha çok 6-7 yaşlarında olduğu ve her iki araştırmada da istatistiki olarak yaşın önemli olduğu bildirilmiştir. Sakarya’daki (29) araştırmada ise iki yaşından büyük köpeklerde pozitiflik gözleendiği, ancak bunun istatistiki olarak önemli olmadığı belirtilmiştir. Sivas’ta da yalnızca 9 yaşındaki bir Kangal köpeğinde seropozitiflik saptanmıştır (13).

Çalışmamızda yalnızca %2 oranında 3 yaşında, Beagle ırkı erkek köpekte IFAT yöntemi ile seropozitiflik gözlenmesi cinsiyet açısından diğer araştırmalarla (16, 29) uyumlu gibi görünse de, toplanan kanların %70’inin erkek köpeklerden elde edilmesi yanı sıra pozitif örnek sayısının yalnızca bir tane olması böyle bir karşılaştırma yapılmasını mümkün kılmamıştır. Enfeksiyonun doğası gereği inkübasyon süresi ve yaşa bağlı olarak köpeklerin enfekte tatarcıklarla karşılaşma ihtimalindeki artışa paralel bir şekilde enfeksiyon riskinin yükselmesi beklenen bir bulgudur. İrklara enfeksiyon sıklığı arasındaki ilişkiyi kurabilmek için de daha fazla sayıda köpekte araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Leishmaniasisin teşhisinde kullanılan direkt tanı, kültür, hızlı teşhis metodları, serolojik testler ve PCR’in avantaj ve dezavantajlarını belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır (1, 9, 12, 28). Reale ve ark. (24), serolojik verilerin tek

başına yeterli olmadığını, köpeklerdeki enfeksiyon varlığının PCR ile desteklenmesi gerektiğini belirtmektedirler. PCR’in in vitro kültürden daha güvenilir ve hızlı olduğu ve rutin teşhis metodu olarak uygulanabileceği bildirilmişse de (14), kutanöz leishmaniasis (KL)’de duyarlılığının akut lezyonlarda %86-95’e kadar yükseldiği, kronik lezyonlarda ise % 45’lere kadar düştüğü; VL’de dalak, kemik iliği ve karaciğer aspiratlarında %75 olduğu, kan örneklerinde ise parazit yoğunluğunun 10 parazit/ml altında olması halinde kültür pozitif örneklerde bile negatif olabileceği tespit edilmiştir (1, 28).

Visseral leishmaniasisli kan örneklerinde konvansiyonel kültür yöntemleri ile 15-35 gün hatta 6 aya yakın inkübasyon süresi sonunda sonuç alınabilmesinin de dezavantaj olduğu; IFAT’ın kalitatif ve kantitatif olarak köpeklerdeki anti-*Leishmania* antikor titresini göstermede değerli olduğu ancak deneyim gerekliliği gibi dezavantajlarının bulunduğu; dip-stick testinin özel beceri ve laboratuvar ekipmanı gerektirmeden sahada hızlı tanı açısından önemli olduğu bildirilmiştir (17, 26). Ancak dipstick yönteminin ELISA ve IFAT ile karşılaştırıldığında köpeklerin büyük bir kısmında hatalı pozitiflik verdiği de belirlenmiştir (25).

İlk kez Allahverdiyev ve ark. (3), tarafından insan KL olgularında kullanılan MKY, günümüzde VL tanısında da başarıyla uygulanmaktadır (2). Bu yöntemle promastigotların deri, kemik iliği, dalak aspirasyon materyallerinden ayrıca periferik kandan da üretilmesi mümkündür. Daha yüksek pCO₂, daha düşük pO₂ ve pH’nın amastigotların promastigotlara dönüşmesini ve daha sonrakilerin gelişmesini ya da canlı kalmasını hızlandırdığı belirtilmiştir (3). Kültür yöntemlerine göre sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksek olan mikrokültür az miktarda besiyeri kullanılması ve inkübasyon periyodunun 2-7 günde tamamlanması nedeniyle hem maliyet hem de zaman açısından avantajlı bir tekniktir.

Kemik iliğinde promastigotların belirlenmesinde sensitivite MKY ile %100 iken, geleneksel kültür yöntemleriyle %37,5’a kadar düşmektedir. Mikrokültür, periferik kanda da geleneksel kültür yöntemlerinden daha etkili bulunmuştur (2, 11). Adana’da 139 KL ve 19 VL şüpheli hastada (1), yine aynı bölgede 25 VL’li çocuktan (2) alınan kemik iliği ve kan örneklerinde leishmaniasisin rutin tanısında MKY, klasik kültür yöntemlerinden daha duyarlı, daha hızlı ve maliyeti düşük olarak bulunmuştur (1).

Bu araştırmada bir köpekte IFAT yöntemi ile *Leishmania*’ya karşı antikor saptanmasına karşın MKY’nde promastigotların üretilmemesinin çeşitli nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Seropozitif bulunan Beagle cinsi köpeğin enfeksiyonu ne zaman aldığı bilinmemesine karşın semptomlarının 6 ay kadar önce başlaması, bununla birlikte uygulanan tedavi nedeniyle

periferik kanında az miktarda antijen bulunmasının kültürde üretilmesini engellediği varsayılmaktadır. Hide ve ark. (11) da, periferik kanda MKY'nin invaziv olmaması, çabuk sonuçlanması ve ucuza mal olması nedeniyle rutin tanıma öncelikli olarak uygulanması gerektiğini belirtmişler, ancak negatif sonuç elde edilmesi halinde diğer invaziv yöntemlerin uygulanmasını önermişlerdir. İnsanlarda yapılan araştırmalarda da MKY'nin dalak, kemik iliği aspiratlarında periferik kandakine göre daha başarılı olduğu bildirilmiştir (2, 11). Bu nedenle IFAT ile seropozitiflik saptandıktan sonra söz konusu köpekten dalak aspiratı alınmaya çalışılmış ancak sahibi izin vermediği için bu yöntemi uygulamak söz konusu olamamıştır.

Sonuç olarak; ülkemizin birçok ilinde olduğu gibi Kırıkkale yöresindeki köpeklerde de CanL seropozitifliği belirlenmiştir. Visseral leishmaniosisin zoonotik karakterde olması sebebiyle, köpeklerde hastalığın hemen teşhis edilebilmesi son derece kritiktir. Özellikle evcil köpeklerin belirli periyotlarla *Leishmania* yönünden rutin kontrolleri ve gerektiğinde tedavisi yapılmalıdır. Bu nedenle MKY, klasik kültür yöntemlerinde vurgulanan dezavantajlara sahip olmaması, daha basit, daha hızlı, diğer yöntemlere göre daha ekonomik olmasından dolayı enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde hastalığın yayılmasını önlemesi açısından tercih edilen bir yöntem olarak kabul edilebilir (1-3, 11). Her ne kadar yapılan bu çalışmada MKY ile promastigotların saptanması mümkün olamamışsa da, yöntemin köpek kanlarıyla da uygulanabileceğinin gösterilmesi açısından bu çalışmanın önemli olduğu, özellikle endemik bölgelerde ve daha fazla numuneyle çalışılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Araştırmada Mikrokültür Yöntemi konusunda yardımlarını esirgemeyen Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalürji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV'e ve Leishmania antijenlerinin sağlamlasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Seray ÖZENSOY TÖZ'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. **Allahverdiyev AM**, 2004. Layışmanyozisin tanısında duyarlılığı yüksek yeni bir yöntem. 31. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 19-23 Eylül, Kuşadası, Aydın.
2. **Allahverdiyev AM, Bagirova M, Uzun S, Alabaz D, Aksaray N, Kocabaş E, Koksall F**, 2005. The value of new microculture method for diagnosis of visceral leishmaniasis by using bone marrow and peripheral blood. *Am J Trop Med Hyg*, 73(2): 276-280.
3. **Allahverdiyev AM, Uzun S, Bagirova M, Durdu M, Memişoğlu HR**, 2004. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 70(3): 294-297.
4. **Doğan N, Özbel Y, Özensoy Töz S, Dinleyici EÇ, Bor Ö**, 2006. Sero-epidemiological survey on canine visceral leishmaniasis and the distribution of sand fly vectors in Northwestern Turkey: Prevention strategies for childhood visceral leishmaniasis. *J Trop Ped*, 52(3): 212-217.
5. **Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaert M**, 2008. Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 14(7):1013-8.
6. **Ertabaklar H, Özensoy S, Şakru N, Keleş E, Özbel Y**, 2001. Muğla ili Göktepe köyünde çocuklarda ve köpeklerde visseral leishmaniasis'in araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 25(2): 128-131.
7. **Ertabaklar H, Özensoy Töz S, Taylan-Özkan A, Rastgeldi S, Balcıoğlu İC ve Özbel Y**, 2005. Serological and entomological survey in a zoonotic visceral leishmaniasis focus of North Central Anatolia, Turkey: Corum province. *Acta Tropica*, 93: 239-246.
8. **Gavvani AS, Mohite H, Edrissian GH, Mohebbali M, Davies CR**, 2002. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg*, 67(5): 511-555.
9. **Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FGC, Alves LC**, 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *Vet J*, 175(1): 45-52.
10. **Handemir E, Öncel T, Kamburgil K**, 2004. İstanbul sokak köpeklerinde visseral leishmaniasis seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 28(3): 123-125.
11. **Hide M, Singh R, Kumar B, Bañuls AL, Sundar S**, 2007. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. *Acta Trop*, 102(3):197-200.
12. **İça A, İnci A, Yıldırım A, Atalay O, Düzlü O**, 2008. Kayseri ve Civarında Köpeklerde Leishmaniosisin Nested-PCR ile Araştırılması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 32(3):187-91.
13. **Kılıç S, Taylan Özkan A, Babür C, Mamak N**, 2008. Investigation of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Leishmania infantum* antibodies among Sivas Kangal Dogs. *Turk J Vet Anim Sci*, 32(4): 299-304.
14. **Mathis A, Deplazes P**, 1995. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from human and dogs. *J Clin Microbiol*, 33(5): 1145-1149.
15. **Mettler M, Grimm F, Naucke TJ, Maasjost C, Deplazes P**, 2005. Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 118(1-2):37-44.
16. **Mohebbali M, Hajjaran H, Hamzavi Y, Mobedi I, Arshi S, Zarei Z, Akhoundi B, Naeini KM, Avizeh R, Fakhar M**, 2005. Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol*, 129: 243-251.

17. **Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, Brandonisio O**, 2004. Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 42(6): 2769-2770.
18. **Özbel Y, Alkan MZ, Özensoy S, Turgay N, Kroon NC, Schoone GJ, Oksam L, Balcıoğlu İC, Özbilgin A, Özcel MA**, 1998. Kala-azar'lı hastalardan ve Manisa civarındaki köpeklerden izole edilen *Leishmania* suşlarının Southern Blot Hibridizasyon yöntemi ile identifikasyonu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 22(1): 1-4.
19. **Özbel Y, Turgay N, Özensoy S, Özbilgin A, Alkan MZ, Özcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oksam L, Abranches P**, 1995. Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean Region. *Ann Trop Med Parasitol*, 89: 89-93.
20. **Özensoy Töz S, Korkmaz M, Balcıoğlu İC, Özbel Y, Ertabaklar H, Rastgeldi S**, 2002a. Karaburun ve Urla bölgesinde zoonotik visseral leishmaniasis. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 26(3): 234-238.
21. **Özensoy Töz S, Sakru N, Ertabaklar H, Demir S, Sengul M, Özbel Y**, 2009. Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli Province, Aegean Region, Turkey. *New Microbiol*, 32(1):93-100.
22. **Özensoy Töz S, Özbel Y, Atay MG, Ertabaklar H, Şakru N, Taylan Özkan A, Hökelek M**, 2002b. İnsan ve köpeklerden alınan klinik örneklerde leishmaniasis tanısı için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulanması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 26(3): 239-244.
23. **Paşa S, Özzensoy Töz S, Voyvoda H, Özbel Y**, 2005. Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniasis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol*, 128(3-4): 243-249.
24. **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(9): 2931-2935.
25. **Reithenger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR**, 2002. Rapid detection to *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356.
26. **Schalling HDFH, Cardoso L, Hommers M, Kron N, Belling G, Rodrigues M, Semião Santos SJ, Vetter H**, 2004. Development of a Dipstick Assay for Detection of *Leishmania*-Specific Canine Antibodies. *J Clin Microbiol*, 42(1): 193-197.
27. **Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L**, 2001. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of Canine Leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*, 39(2): 560-563.
28. **Sundar S, Rai M**, 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(5): 951-958.
29. **Taylan Özkan A, Babür C, Kılıç S, Örgen C, Özzensoy Töz S**, 2003. Sakarya sokak köpeklerinde Visseral Leishmaniasis'in İndirekt Fluoresan Antikor (IFAT) Yöntemi ile Araştırılması. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 27(2): 97-101.
30. **Živičnjak T, Martinković F, Marinculic A, Mrljak V, Kučer N, Matijatko V, Mihaljević Ž, Barić-Rafaj R**, 2005. A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131: 35-43.