

## Köpeklerde *Ehrlichia canis*'in İndirekt Fluoresan Antikor (IFA) Testi ve Dot-ELISA İle Saptanması\*

Jale ERDEĞER

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara - TÜRKİYE

Arda SANCAK

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 06110, Ankara - TÜRKİYE

Lale ATASEVEN

Tarım ve Köyşleri Bakanlığı, 06000, Ankara - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

**Özet:** *Ehrlichia canis*, canine monocytic ehrlichiosis (CME) etkenidir. Bu çalışmada IFA ve dot-ELISA teknikleri ile köpeklerde *E. canis*'e karşı oluşan antikorlarının saptanması amaçlandı.

Materyal olarak toplam 239 köpekten kan serumu toplandı. IFA testi ve dot-ELISA ticari test kitleri ile yapıldı. IFA testi, *E. canis* IFA kitindeki prosedüre göre uygulandı. Dot-ELISA'da immunocomb test sistemi kullanıldı. İki tekniğin birbiriyle uyumu istatistiksel olarak kappa (K) testiyle analiz edildi. Dot-ELISA'nın spesifite ve sensitivitesi hesaplandı.

Toplam 239 köpeğin 162'sinde (% 67,8) IFA testi, 137'sinde (% 57,3) dot-ELISA ile pozitiflik saptandı. Bunlardan CME'nin klinik bulgularını gösteren 91 köpeğin 56'sı (% 61,5) IFA testi, 46'sı (% 50,5) dot-ELISA ile; klinik bulgu göstermeyen 31 köpeğin 8'i (% 25,8) IFA testi, 1'i (% 3,2) dot-ELISA ile; sadece kene enfestasyonlu olan 117 köpeğin ise 98'i (% 83,8) IFA testi, 90'ı (% 76,9) dot-ELISA ile *E. canis* antikorları yönünden pozitifti.

IFA testi ve dot-ELISA arasındaki uyum derecesi 0,73 olup ( $P < 0,001$ ) önemli bulundu. Dot-ELISA'nın spesifitesi % 96, sensitivitesi % 82 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak, ehrlichiosis serolojik teşhisinde IFA testi ve dot-ELISA'nın uyumlu sonuçlar verdiği ve IFA testi gibi dot-ELISA'nın da hastalığın serolojik tanısında kullanılabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Sözcükler:** Dot-ELISA, *Ehrlichia canis*, IFA, köpek

### Detection of *Ehrlichia canis* in Dogs by IFA Test and Dot-ELISA

**Abstract:** *Ehrlichia canis* is the causative agent of canine monocytic ehrlichiosis (CME). The aim of this study was to detect *E. canis* antibodies in dogs by the IFA and dot-ELISA techniques.

Blood sera from 239 dogs were collected as material. IFA test and dot-ELISA were performed with commercially available test kits. The IFA test was applied according to the procedure in the IFA kit. The Immunocomb test system was used in dot-ELISA. Agreement between these techniques was analysed by the kappa (K) test. The specificity and sensitivity of dot-ELISA were calculated.

Positive results were observed from 162 (67.8%) and 137 (53.3%) of 239 dogs by IFA test and dot-ELISA, respectively. Among 91 dogs with clinical signs of CME, 56 (61.5%) and 46 (50.5%); of 31 apparently healthy dogs, 8 (25.8%) and 1 (3.2%); and of 117 dogs with only tick infestation, 98 (83.8%) and 90 (76.9%) were positive for *E. canis* antibodies by IFA test and dot-ELISA, respectively.

The agreement between the IFA test and dot-ELISA was 0.73 and was significant ( $P < 0.001$ ). The specificity and sensitivity of dot-ELISA were calculated to be 96% and 82%, respectively.

In conclusion, it was determined that IFA test and dot-ELISA gave concordant results and that both could be used in the serologic diagnosis of ehrlichiosis.

**Key Words:** Dot-ELISA, *Ehrlichia canis*, IFA, dog

\* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1643 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

*Ehrlichia canis*, canine monocytic ehrlichiosis (CME)'in etkenidir (1-4). Etken Rickettsia'lar (Rickettsiales takımı, Rickettsiaceae familyası) içerisinde, Ehrlichieae kabilesindeki obligat, intrasellüler mikroorganizmalar (*Ehrlichia* cinsi) arasında yer almaktadır (1,5).

CME'de yaşın ve cinsiyetin önemi yoktur. Tüm köpek ırkları *E. canis* ile infekte olabilir. Ancak, Alman çoban köpeklerinin (GSD) diğer ırklardan daha duyarlı olduğu görülmüştür (6,7). Kahverengi köpek kenesi (*Rhipicephalus sanguineus*) *E. canis*'i köpeklere taşımaktadır (1,3).

*E. canis* enfeksiyonu geniş bir coğrafik dağılım gösterir ve bu vektörün dağılımı ile ilişkilidir (1,8). CME ilk olarak 1935'te Cezayir'de tanımlanmıştır. Daha sonra hastalık Batı Avrupa, Amerika, Asya ve Afrika'da da bildirilmiştir (1,3,4).

CME, 8-20 günlük inkubasyon süresi sonunda akut, subklinik ve bazen kronik formda seyreder (6). Genellikle hayvanlarda kene enfestasyonu vardır (4). Hastalık depresyon, letarji, ağırlık kaybı, anoreksi, pireksi, lenfadenomegali, splenomegali ve kanama eğilimleri gibi çeşitli klinik bulgular gösterir. Hematolojik anormallikler akut formda trombositopeni, hafif anemi ve hafif lökopeni; subklinik formda hafif trombositopeni ve şiddetli kronik formda pansitopeniyi içerir. Biyokimyasal anormallikler ise hipoalbuminemi, hiperglobulinemi ve hipergammaglobulinemidir (6).

Laboratuvar muayeneleri ile tanı Wright'ın Giemsa'sı ile boyanan kan frotilerindeki monositlerde *E. canis* morularını görmekle veya serolojik olarak indirekt fluoresan antikor (IFA) tekniği ile *E. canis*'e karşı oluşmuş antikorlarının tespiti ile, ayrıca *E. canis*'in doku ve kanda polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) ile saptanmasıyla yapılır (2,9).

Ehrlichiosisin teşhisi için en güvenilir test 1972'de tanımlanan IFA testidir ve *E. canis*'in tespiti ve antikor titrelerinin saptanmasında 'gold standart' olarak kabul edilir. Pozitif bir IFA titresi aktif bir reaksiyonu gösterebildiği gibi geçmiş bir enfeksiyonu da gösterebilir (2,7). Genelde *E. canis*'e karşı oluşmuş IgG'ler enfeksiyondan 21 gün sonra IFA ile saptanabilir. Sağaltılmayan köpeklerde bu titre devam eder. Yüksek *E. canis* titreleri klinik olarak iyileşen köpeklerde de yıllarca kalabilir (2,4). IFA tekniğinde araştırmacılar genel olarak 1/20 titre ve üzerini ehrlichiosis enfeksiyonu için pozitif

olarak değerlendirmişlerdir (2,8,10,11). Waner ve ark. (7), deneysel enfeksiyonlarda IgM ve IgA antikorlarının enfeksiyondan 4-7 gün sonra, IgG'lerin ise enfeksiyondan 15 gün sonra şekillendiğini ve ilk enjeksiyondan sonra IFA'daki IgG titrelerinin 1:60-1:640 olduğunu bildirmişlerdir. Waner ve ark. (12), klinik olarak sağlıklı ancak, subklinik infekte köpeklerde yaptıkları çalışmada IFA testi ile antikor titrelerinin 1:2560-1:20480 arasında değiştiğini saptamışlardır. IFA tekniği ile subklinik ehrlichiosisin erken teşhis edilebildiği, böylece bu köpeklerin kronik faza girmeden tespit edilebilmesi ile başarılı bir tedavinin gerçekleştirilebildiği rapor edilmiştir (12). Iqbal ve ark. (13) CME'nin erken teşhisinde PCR'in duyarlılığı ile IFA, Western immunoblotting (WI) ve hücre kültüründe *E. canis*'in rekolonyonunu karşılaştırmışlardır. Araştırma sonucuna göre, IFA testi ve WI ile *E. canis*'e karşı oluşmuş antikorlar enfeksiyonun 2-8. günlerinde saptanabilmiştir. Waner ve ark. (14), infekte köpeklerin plasmasında *E. canis* antijenini tespit etmek ve hastalığın erken teşhisinin yapılması amacıyla ilk kez sandviç ELISA kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Ehrlichial antijen, enfeksiyondan 15-20 gün sonra saptanmaya başlamıştır. Araştırmacılar plazmadaki ehrlichial antijenin klinik ve hematolojik bulgulardan kısa ve farklı zamanlarda gözlenmesinin, ehrlichiosisin erken teşhisini sınırlandırdığını bildirmişlerdir. Cadman ve ark. (10), IFA ile dot-blot enzyme linked immunoassay (DBELIA) tekniklerini *E. canis* antikorlarının saptanması amacıyla karşılaştırmışlar ve çalışmada hem doğal hem de deneysel enfeksiyonlarda DBELIA'nın IFA kadar duyarlı ve spesifik olduğunu gözlemlemişlerdir.

Çeşitli ülkelerde, köpeklerdeki *E. canis* enfeksiyonu prevalansı üzerinde pek çok araştırma yapılmıştır (2,3,8,11).

Köpeklerde ehrlichiosis hastalığının Türkiye'de tespit edildiğine dair literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada Türkiye'de CME'nin varlığının serolojik olarak ortaya konması ve IFA ile dot-ELISA tekniklerinin bu hastalığın teşhisinde kullanımının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Örnekler:** Çalışmada anamnezi alınan ve klinik bulguları saptanan toplam 239 köpeğin kan serumları kullanıldı. Klinik olarak hasta (91), sağlıklı görünen (31) ve sadece kene enfestasyonlu (117) köpekten alınan kan serumları testler yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Örnek alınan köpeklerin buldukları şehir ve bölgelerin kayıtları tutuldu.

**IFA test kiti (VMRD):** Pozitif ve negatif serumlar; serum sulandırma solüsyonu % 1 ve % 10 BSA'lı; IFA yıkama solüsyonu; IFA yapıştırma sıvısı; IFA konjugat sulandırma sıvısı; Konjugat (keçi orijinli FITC ile işaretli anti-köpek IgG'leri); IFA lamaları (bu lamalar DH82 hücrelerin içinde fikze edilmiş *E. canis* antijeni ile kaplanmış) içeren kit, IFA testinin yapımında kullanıldı.

**Immunocomb *Ehrlichia canis* antibody test kit (Biogal-Galed Labs):** Dot- ELISA tekniği için kullanıldı.

**IFA Testi:** IFA testi, *E. canis* IFA kitindeki prosedüre göre yapıldı. Antijen kaplı lamalar üzerine 0.15 M PBS (pH 7,2) ile sulandırılan serumlar (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80.....) damlatılarak lamalar 37 °C'de 30 dakika bekletildi. Yıkama ve kurulum işlemi yapıldı. FITC ile işaretli anti-köpek IgG'si kullanım prosedürüne göre lam üzerindeki çukurlara damlatıldı ve lamalar 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Tekrar kurulum ve yıkama işlemi yapıldıktan sonra yüzeydeki boya kurumadan lamalar IFA yapıştırma sıvısı ile kaplanarak floresan mikroskopta incelendi. Test sonucunda 1:20 ve üzerindeki titreler pozitif olarak kabul edildi.

**Dot-ELISA:** Dot-ELISA'da immunocomb test sistemi kullanıldı. Her bir serum örneği tarağın bir kağıt şeridinde uygulandı (1'den 12'ye kadar). Kit pleyti kompartımanlarına serumlar konulduktan sonra, prosedüre göre uygulanan test sonucu, dot-ELISA tarağı üzerindeki reaksiyonlar renk skalasıyla karşılaştırılarak değerlendirildi ve titresi belirlendi.

H: Yüksek derecede pozitif: >1:1280; M: Orta derecede pozitif: 1:160-1:640; L: Düşük derecede pozitif: 1:20-1:80; N: Negatif:<1:20 titre olarak değerlendirildi.

**İstatistiksel analiz:** IFA testi ve dot-ELISA'nın birbiriyle uyumu Kappa (K) testi ile analiz edildi. Dot-ELISA'nın spesifite ve sensitivitesi Thrusfield'in (15) bildirdiği metoda göre hesaplandı.

## Bulgular

Toplam 239 köpek serumunda dot-ELISA (Immunocomb) ve IFA tekniği ile *E. canis*'e karşı oluşmuş antikorlar arandı. Kan serumu toplanan köpeklerin bölgelere göre ve ehrlichiosis klinik belirtilerini göstermesine göre dağılımı şöyledi:

Ankara çevresindeki köpek barınaklarında bulunan 31 köpekten kan serumu alındı. Bunlar ehrlichiosis klinik bulgularını göstermeyen, sağlıklı görünümlü köpeklerdi. Aydın-Muğla çevresinden toplanan 208 köpeğin kan serumu incelenmeye alındı. Bunlardan 91 adedi kliniklere hastalık şikayeti ile getirilen, ehrlichiosis klinik belirtileri gösteren köpeklere aitti. Yine aynı bölgeden köpek bakım evlerinden toplanan 117 köpeğe ait kan serumları ise klinik bulgu göstermeyen ancak tümünde kene enfestasyonu olanlardan alınmıştı (Şekil 1).

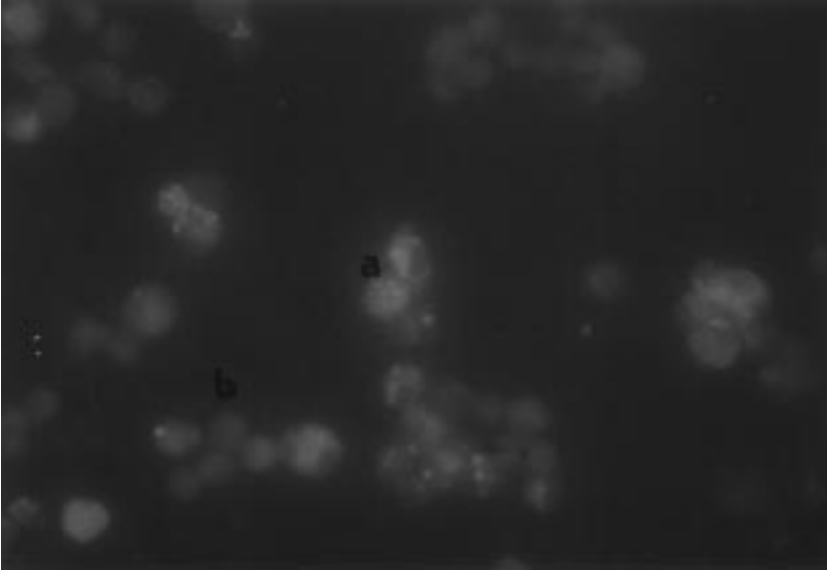
Materyallerin toplandığı bölgelere göre değerlendirildiğinde; Ankara çevresindeki köpeklerde (sağlıklı görünümlü) % 25,8 oranında, Aydın-Muğla çevresindeki (klinik belirti gösteren ve kene enfestasyonu

Tablo 1. Materyallerin alındığı bölgelere göre *E. canis* pozitiflik oranları.

Materyalin Alındığı Yer	İncelenen Köpek Serumları Sayısı	Test					
		IFA		Dot- ELISA (Immunocomb)		Toplam	
		Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)
Ankara ve çevresi	31	8 (25.8)	23 (74.2)	1 (3.2)	30 (96.8)	8 (25.8)	23 (74.2)
Aydın-Muğla (Bodrum) çevresi	208	154 (74)	54 (26)	136 (65.4)	72 (34.6)	156 (75)	52 (25)



Şekil 1. Kene (*Rhipicephalus sanguineus*) enfestasyonlu köpek.



Şekil 2. IFA testi (*Ehrlichia canis* IFA kiti kullanıldı).  
a: Pozitif  
b: Negatif

olan köpekler) köpeklerde ise % 75 oranında serolojik olarak *E. canis* enfeksiyonu saptandı (Tablo 1).

Klinik bulgu gösteren 91 köpekten 56'sında (% 61,5) IFA, 46'sında (% 50,5) dot-ELISA ile; klinik bulgu göstermeyen 31 köpekten 8'inde (% 25,8) IFA, 1'inde (% 3,2) dot-ELISA ile; kene enfestasyonlu 117 köpekten 98'inde (% 83,8) IFA, 90'ında (% 76,9) dot-ELISA ile *E. canis* yönünden pozitiflik saptandı. Toplam 239 köpeğin 162'sinde (% 67,8) IFA testi ile 137'sinde (% 57,3) dot-ELISA ile pozitiflik bulundu. Toplanan köpek serumlarının IFA testi ve dot-ELISA ile elde edilen sonuçları Tablo 2' de verilmiştir.

IFA testi ile pozitif bulunan 162 köpeğin *E. canis* antikor titreleri 1:20-1:1280 arasında değişmekteydi. Testin pozitif ve negatif değerlendirmeleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

Dot-ELISA'da 137 (% 57,3) köpekte 1:20'nin üzerinde titre saptandı ve pozitif olarak kabul edildi. köpeklerin 102'sinde (% 42,7) ise titre 1:20'nin altında ve negatif olarak değerlendirildi. Köpek serumlarının dot-ELISA ile *E. canis* antikorları yönünden titrelerine göre dağılımı Tablo 3'de verilmiştir.

Toplam 239 materyalden, dot-ELISA ile negatif sonuç veren 28 köpek serumu, IFA testinde pozitif olarak

Tablo 2. Köpek serumlarının *E. canis* antikorları yönünden IFA testi ve dot-ELISA sonuçları.

	Klinik bulgu gösteren köpek n=91		Klinik bulgu göstermeyen köpek n=31		Kene enfestasyonlu köpek n=117		Toplam köpek N=239	
	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)	Pozitif Sayı (%)	Negatif Sayı (%)
IFA	56 (61.5)	35 (38.5)	8 (25.8)	23 (74.2)	98 (83.8)	19 (16.2)	162 (67.8)	77 (32.2)
Dot-ELISA (Immunocomb)	46 (50.5)	45 (49.5)	1 (3.2)	30 (96.8)	90 (76.9)	27 (23.1)	137 (57.3)	102 (42.7)

\*Kene enfestasyonu, yüksek ateş, mukozalarda kanama, halsizlik, zayıflama, iştahsızlık vs. gibi ehrlichiosis klinik belirtilerini gösteren köpekler

\*\*Herhangi bir klinik bulgu göstermeyen sağlıklı görünümlü köpekler

\*\*\*Sadece kene enfestasyonu olan ancak, ehrlichiosis belirtilerini göstermeyen köpekler.

Tablo 3. Köpek serumlarının dot-ELISA (Immunocomb) testi ile *E. canis* antikorları yönünden titrelere göre dağılımı.

Dot-ELISA (Immunocomb) Titreleri	Klinik bulgu gösteren köpek n=91		Klinik bulgu göstermeyen köpek n=31		Kene enfestasyonlu köpek n=117		Toplam köpek N=239	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
>1:1280 yüksek derecede pozitif	18	(19.8)	-	-	7	(6)	25	(10.4)
1:160-1:640 orta derecede pozitif	18	(19.8)	-	-	74	(63.2)	92	(38.5)
1:20-1:80 düşük derecede pozitif	10	(10.9)	1	(3.2)	9	(7.7)	20	(8.4)
<1:20 negatif	45	(49.5)	30	(96.8)	27	(23.1)	102	(42.7)

bulundu. IFA testi negatif olan 3 köpeğin serumu ise dot-ELISA testinde 1:160- 1:640 (orta dereceli pozitif) titrede pozitif reaksiyon verdi.

Yapılan istatistiksel analiz sonucu *E. canis*'in serolojik teşhisinde, IFA testi ve dot-ELISA arasındaki uyum derecesi 0,73 olup ( $P<0,001$ ) önemli bulundu. IFA testi esas alındığında dot-ELISA'nın spesifitesi % 96, sensitivitesi % 82 olarak hesaplandı.

## Tartışma

Köpeklerdeki *E. canis* infeksiyonunun prevalansı üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Zimbabve'de bir *E. canis* prevalans çalışmasında incelenen 105 köpekten % 52'si IFA testinde pozitif bulunmuştur (11). Kuzey-batı

İspanya'da 308 köpek serum örneği incelenmiş ve canine ehrlichiosis seroprevalansı % 19,2±% 2,24 olarak saptanmıştır (8). İsrail'de ise 410 köpek serumu incelenmiş ve seroprevalansın pet köpeklerde % 23,9 ve sokak köpeklerinde % 37,5 olduğu bildirilmiştir (2). Amerika'nın kuzey doğusunda yapılan bir çalışmada ise incelenen 60 köpek serumunun % 11,7'sinde *E. canis*'e karşı antikor saptanmıştır (3). Baneth ve ark. (2), sağlıklı görünen köpeklerin seroprevalansları (% 17,6) ile hasta köpeklerinki (% 26,6) arasında önemli bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, toplam 239 köpeğin 162'sinde (% 67,8) IFA; 137'sinde (% 57,3) dot-ELISA ile pozitiflik bulundu. Bu oran, klinik bulgu gösteren 91 köpeğin 56'sında (% 61,5) IFA, 46'sında (% 50,5) dot-ELISA ile;



klirik bulgu göstermeyen 31 köpekten 8'inde (% 25,8) IFA, 1'inde (% 3,2) dot-ELISA ile; kene enfestasyonlu ancak klinik bulgu göstermeyen 117 köpekten 98'inde (% 83,8) IFA, 90'ında (% 76,9) dot-ELISA ile *E. canis* yönünden pozitifdir.

Bu bulgulara göre, Baneth ve ark. (2)'nin çalışma sonuçlarına uygun olarak sağlıklı görümlü köpeklerle, klinik belirti gösterenler arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Bu, hastalığın subklinik formunda, CME'nin klinik bulgularını göstermeyen köpeklerde yüksek *E. canis* antikor titrelerine rastlanabileceğini; bu köpeklerin daha önce bir *E. canis* enfeksiyonuna maruz kaldığını, daha sonra enfeksiyonun subklinik fazına geçtiğini gösterebilir.

Ehrlichiosisin tanısı genelde güç olup laboratuvar muayeneleri ile konulmaktadır. Serolojik testlerden IFA tekniği bu hastalığın teşhisinde 'gold standart' olarak kabul edilmektedir (2,7). İlk enjeksiyondan sonra IgG titreleri IFA testi ile 1:160-1:640 arasında bulunmuştur. Akut fazı atlatan veya yetersiz sağaltım alan köpekler hastalığın subklinik fazına geçmiştir. Subklinik enfekte olan bu köpekler yüksek IFA antikor titreleri (1:2560-1:20480) göstermişlerdir (1,7). *E. canis* enfeksiyonunun IFA testi ile tespitinde iki kriter belirlenmiştir.

Bu kriterlere göre; klinik bulgular ve hematolojik parametrelerle CME'yi düşündüren ve serumdaki  $\geq 1:256$ 'lık IFA IgG titresi enfeksiyonun kesin olduğunu; yine klinik bulguların CME'den şüphe ettirmesi ve tek bir IFA IgG'nin 1:64-1:128 titrede olması hastalığın muhtemel veya şüpheli olduğunu göstermektedir. CME'nin subklinik fazını tanımlamak için yapılan çalışmalara göre; IgG'lerin köpeklerdeki varlığı *E. canis*'le geçmişte bir enfeksiyonun göstergesi olduğu halde, herhangi bir CME klinik belirtisi olmadan başka bir primer hastalığı da taşıdığı ihtimalini gösterebilir. Bu olasılık klinik olarak sağlıklı ancak, *E. canis*'e karşı sero reaktif köpeklerin yüksek oranda olduğunu gösteren serosurveylerde dikkate alınmalıdır (7). Yine 3 yıl süren bir çalışmada, deneysel *E. canis* enfeksiyonu sonucu, klinik olarak sağlıklı köpeklerin CME'nin subklinik fazında etkenin taşıyıcısı olduğu ve kronik hastalık şekillendirmeksizin yıllarca persiste kalabileceği ve medikal sağaltım olmaksızın iyileşebilecekleri gözlenmiştir (6). İsrail'de yapılan seroepidemiolojik bir çalışmada IFA testi ile belirlenen titrelerin 1:640-1:2560 olduğu bildirilmiştir (2). IFA tekniğinde araştırmacılar genel olarak 1/20 titre ve üzerini ehrlichiosis enfeksiyonu için pozitif olarak değerlendirmişlerdir (2,8,10,11).

Bu çalışmada, IFA testinde *E. canis*'e karşı oluşmuş antikor titreleri 1:20-1:1280 arasında bulundu. Diğer araştırmacılarınki ile karşılaştırıldığında bu titreler köpeklerde daha çok akut enfeksiyonların olabileceğini, subklinik enfektelerde daha yüksek titrelerin saptanması gerektiğini göstermektedir.

Iqbal ve ark. (13), CME'nin erken teşhisinde PCR'in duyarlılığı ile IFA, WI ve hücre kültüründe reizolasyonu karşılaştırmışlardır. Çalışmada IFA testi ve WI ile *E. canis* antikorları enfeksiyondan sonra 2-8. günlerde saptanabilmiştir. *E. canis*'in reizolasyonu erken tanıda kesin ve en duyarlı olanıdır. Ancak, yapılışı çok kolay değildir; pozitifliği görmek uzun zaman (14-34 gün) alır. PCR'in duyarlılığı diğer bilinen yöntemlere göre biraz daha azdır buna karşın, kullanımı hızlı ve kolay olup, *E. canis*'in direkt olarak klinik teşhisi için uygun ve yararlı bir tekniktir. Diğer bir çalışmada, ELISA tekniği kullanılmış ve IFA testi ile karşılaştırılmıştır. ELISA tekniğinin IFA testi ile korelasyon gösterdiği, ELISA'nın *E. canis* IgG'leri saptamada IFA kadar spesifik ve sensitiv olduğu gözlenmiştir (16). Cadman ve ark. (10), *E. canis* antikorlarının tespit edilmesinde dot- blot enzime linked immunoassay (DBELIA)'nın kullanımını ve bu tekniğin IFA testi ile karşılaştırılmasını çalışmışlardır. Bu çalışma deneysel ve doğal *E. canis* enfeksiyonlarında antikorların saptanmasında DBELIA'nın IFA kadar sensitiv ve spesifik olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar DBELIA'nın IFA yanında pek çok avantaja sahip olduğunu, testin UV mikroskopu kullanımına ihtiyaç göstermediğini, bu nedenle kullanımının sınırlı olmadığını, fazla pahalı bir ekipmana ihtiyaç olmadığını, bir kere hazırlanan nitrosellüloz blotların 1 yıl dayandığını, sonuçların deneysiz personel tarafından okunabilecek kadar kolay değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir. Bu avantajlar DBELIA'nın CME'nin özellikle saha çalışmalarında yararlı olacağını göstermektedir (10).

Bu çalışmada, köpek serumları *E. canis* antikorları yönünden IFA testi ve dot-ELISA ile incelendi ve her iki testin sonuçları karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel analiz (Kappa testi) sonucu *E. canis* antikorlarının saptanmasında iki test arasındaki uyum derecesi 0,73 ( $P < 0,001$ ) olup önemli bulundu. IFA testi gold standart alınarak dot-ELISA'nın spesifitesi % 96, sensitivitesi % 82 olarak hesaplandı. Bu, IFA testi gibi dot-ELISA'nın da ehrlichiosisin serolojik teşhisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Yapılan araştırmalarla (10,13,16), WI, ELISA ve DBELIA gibi testlerin *E. canis* antikorlarının

saptanmasında gold standart olarak kabul edilen IFA testine alternatif olarak kullanılabilmesi ortaya konulmuştur. Bu çalışmada da dot-ELISA'nın IFA testine alternatif olabileceği saptanmıştır. IFA testinin bu hastalığın teşhisinde kullanımının avantajları olduğu kadar, dezavantajlarının da olduğu unutulmamalıdır.

## Kaynaklar

1. Waner, T., Keysary, A., Bark, H., Sharabani, E., Harrus, S.: Canine Monocytic Ehrlichiosis-An Overview. *Israel J. Vet. Med.* 1999; 54: 103-107.
2. Baneth, G., Waner, T., Koplak, A., Weinstain, S., Keysary, A.: Survey of *Ehrlichia canis* Antibodies among Dogs in Israel. *Vet. Rec.* 1996; 138: 257-259.
3. Magnerelli, L.A., Anderson, J.F.: Serologic Evidence of Canine and Equine Ehrlichiosis in Northeastern United States. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 2857-2860.
4. Lee Pyle, R.: Canine Ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1980; 177: 1197-1202.
5. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R.: *The Rickettsiales* (Order). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London. 1994; p. 316-319.
6. Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., Cornelissen, A.W.C.A.: Minireview. Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 2745-2749.
7. Waner, T., Harrus, S., Jongejan, F., Bark, H., Keysary, A., Cornelissen, A.W.C.A.: Significance of Serological Testing for Ehrlichial Diseases in Dogs with Special Emphasis on the Diagnosis of Canine Monocytic Ehrlichiosis Caused by *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 2001; 95: 1-15.
8. Sainz, A., Delgado, S., Amusatogui, I., Tesouro, M.A., Carmanes, P.: Seroprevalance of Canine Ehrlichiosis in Castilla-Leon (North-West Spain). *Prev. Vet. Med.* 1996; 29: 1-7.
9. Elias, E.: Diagnosis of Ehrlichiosis from the Presence of Inclusion Bodies or Morulae of *E. canis*. *J. Small. Anim. Pract.* 1991; 33: 540-543.
10. Cadman, H.F., Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Zhou, R., Mason, P.R.: Comparison of Dot-Blot Enzyme Linked Immunoassay with Immunofluorescence for Detecting Antibodies to *Ehrlichia canis*. *Vet. Rec.* 1994; 135: 362.
11. Matthewman, L.A., Kelly, P.J., Bobade, P.A., Tagwira, M., Mason, P.R., Majok, A., Rouqui, P., Raoult, D.: Infections with *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in Dogs in Zimbabwe. *Vet. Rec.* 1993; 133: 344-346.
12. Waner, T., Harrus, S., Hylton, B., Bogin, E., Avidar, Y., Keysary, A.: Characterization of the Subclinical Phase of Canine Ehrlichiosis in Experimentally Infected Beagle Dogs. *Vet. Parasitol.* 1997; 69: 307-317.
13. Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., Rikihisa, Y.: Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1658-1662.
14. Waner, T., Rosner, M., Harrus, S., Naveh, A., Zass, R., Keysary, A.: Detection of Ehrlichial Antigen in Plasma of Beagle Dogs with Experimental Acute *Ehrlichia canis* Infection. *Vet. Parasitol.* 1996; 63: 331-335.
15. Thrusfield, M.: *Veterinary Epidemiology*. Butterworth & Co. Ltd. Great Britain. 1986.
16. Harrus, S., Waner, T., Strauss-Ayali, D., Bark, H., Jongejan, F., Hecht, G., Baneth, G.: Dynamics of IgG1 and IgG2 Subclass Response in Dogs Naturally and Experimentally Infected with *Ehrlichia canis*. *Vet. Parasitol.* 2001; 99: 63-71.

## Teşekkür

Bodrum'daki çalışmalarımıza sağladığı katkılardan dolayı Veteriner Hekim Ahmet Kurt'a teşekkür ederiz.