

Türkiye’de Köpeklerde *Babesia canis canis*’in Klinik ve Parazitolojik Olarak İlk Tespiti

Erhan GÖKÇE¹  Ali Haydar KIRMIZIGÜL¹ Gencay Taşkın TAŞÇI²
Erdoğan UZLU¹ Neslihan GÜNDÜZ² Zati VATANSEVER²

¹ Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, TR-36200 Kars - TÜRKİYE

² Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı, TR-36200 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-7598

Özet

Bu makalede, Giemsa boyama ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemleri ile parazitolojik olarak *Babesia canis canis* tanısı konulan 3 köpekte klinik, biyokimyasal ve hematolojik bulgularının sunulması amaçlanmıştır. Olgu I ve II’de şiddetli ikterus, anemi, hemoglobinem, hemoglobinüri, trombositopeni, taşipne, taşikardi ve miyozitis ile karaciğerde hasar geliştiği tespit edildi. Olgu I’de bu bulgulara ek olarak kolesistitis, Olgu II’de ise renal hasarın olduğu saptandı. Olgu III’te hafif anemi ve ikterus tablosuyla birlikte karaciğerde hasar ve miyozitis şekillendiği belirlendi. Tedavi sonucunda Olgu II ve III’de iyileşme sağlanırken Olgu I öldü. Sonuç olarak, köpeklerde *B. canis canis* klinik ve parazitolojik olarak Türkiye’de ilk kez bildirilmektedir.

Anahtar sözcükler: *Babesia canis canis*, *Babesiosis*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PZR, Köpek, Kars, Türkiye

First Clinical and Parasitological Detection of *Babesia canis canis* in Dogs from Turkey

Summary

This study was aimed to describe clinical, biochemical and haemathological findings in three dogs with *Babesia canis canis* diagnosed by Giemsa staining and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods. In Case I and II severe icterus, anemia, haemoglobinemia, haemoglobinuria, thrombocytopenia, tachypnea, tachycardia, liver damage and myositis were determined. In addition in Case I cholecystitis and in Case II renal damage were developed. In Case III mild anemia and icterus along with liver damage and myositis were developed and clinical signs were mild. Following treatment Case II and III completely recovered while Case I died. In conclusion, *B. canis canis* has been determined clinically and parasitologically for first time in Turkey.

Keywords: *Babesia canis canis*, *Babesiosis*, Polymerase Chain Reaction, PCR, Dog, Kars, Turkey

GİRİŞ

Kanin babesiosis kenelerin naklettiği protozoal parazit olan *Babesia* türleri tarafından oluşturulan bir enfeksiyondür. Köpek *Babesia* türleri piroprasmik formlarının morfolojilerine göre, büyük (5 x 2.5 µm) ve küçük (2 x 1.5 µm) olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Büyük türler *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* ve *Babesia* sp. (Coco), küçük türler ise *B. gibsoni*, *B. conradae* ve *B. microti-like* (*Theileria annae*)’dan oluşmaktadır [1-3]. Son yıllarda *B. c. canis*, *B. c. rossi* ve *B. c. vogeli*’nin, her ne kadar morfolojik olarak çok benzeseler de, klinik belirtilerinin değişkenlik göstermesi, ayrı yayılış alanlarına ve farklı vektörlere

sahip olmaları nedeniyle, tek başlarına birer tür (*B. canis*, *B. vogeli*, *B. rossi*) olarak kabul edilmeleri eğilimi ağırlık kazanmıştır [2,4-6]. Perakut, akut, kronik ve subklinik seyir gösteren kanin babesiosis’de klinik belirtiler tür, vektör, ırk, yaş ve immun duruma göre değişebilmektedir [1-3,6-11]. *B. c. canis* orta derecede patojenik özellik gösterirken, *B. canis vogeli* daha hafif hastalık tablosuna neden olur. *B. c. canis* ve *B. gibsoni* ilerleyici hemolitik anemi yaparken, *B. canis rossi* disemine intravasküler koagulopati (DIC) ile birlikte şok, sistemik yangı ve organ bozukluğuna yol açmaktadır [2,8,11]. Bilgilerimize göre Türkiye’de *B. c. canis*’in



İletişim (Correspondence)



+90 464 2426807/5237



erhangokce36@hotmail.com

neden olduğu babesiosis vakası bildirilmemiştir ^[1,3,12,13]. Bu raporda, *B. c. canis*'in neden olduğu babesiosis'in teşhis, klinik, biyokimyasal ve hematolojik bulgularının sunulması amaçlanmıştır.

OLGULARIN TANIMI

Olgu materyalini Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı kliniklerine iştahsızlık, durgunluk ve sarılık şikayetleriyle getirilen farklı yaş, cinsiyet ve ırkta 3 köpek oluşturdu. Köpeklerden tedavi öncesi ve tedaviden 15 gün sonra kan alınarak hemogram değerleri ve biyokimyasal parametrelere bakıldı. Hemogram değerleri MS4e marka hemogram cihazında, serumda biyokimyasal parametreler ise otoanalizörde (Kodak Vitros DT60II) ölçüldü. İdrar analizinde Cybow 10 M idrar stripi kullanıldı.

OLGU I

İki yaşında, dişi sokak köpeğinin incelendiği birinci olguda hastada 4 gün önce başlayan ve giderek şiddetini arttıran bir iştahsızlık olduğu öğrenildi. Hastada ayrıca ayakta durmakta zorlanma, çevreye karşı ilgisinin olmaması ile birlikte idrarının kırmızı renkte olduğu tespit edildi. Hayvanın üzerinde çok sayıda kene ile birlikte, klinik olarak apati, şiddetli ikterus, yüksek ateş (41.3°C), hemoglobinuri, solunum ve nabız sayısının artış belirlendi. Hemogramda ise eritrosit (RBC), hemoglobin (Hb), hematokrit (HCT) değerlerinde ve trombosit sayısında şiddetli düşüş saptandı. Biyokimyasal analizlerde alkalen fosfataz (ALP), gamma gamma glutamilttransferaz (GGT), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), kreatin kinaz (CK),

laktat dehidrogenaz (LDH), total bilirubin ve direkt bilirubin değerlerinin yükseldiği tespit edildi (Tablo 1). İdrar muayenesinde bilirubinüriye rastlandı. Bu bulgulara göre olguda şiddetli anemi, trombositopeni ve myozitis şekillendiğinin belirlenmesinin yanında hastada kolangio-hepatitis geliştiği belirlendi.

OLGU II

İkinci Olguyu 4 gündür halsizlik, iştahsızlık, durgunluk şikayetleri olan 3 yaşında erkek husky oluşturdu. Hastada ayrıca depresyon, sallantılı yürüyüş, çevreye karşı ilgisizlik, ikterus, solunum ve nabız sayısında artış, yüksek ateş (40.5°C), hemoglobinuri belirlendi. Hayvanın derisinde farklı bölgelerde 8 adet keneye rastlandı. Hastanın RBC, Hb, HCT ve trombosit değerlerinde belirgin düşüş olduğu saptandı. Serum biyokimyasında ALP, CK, üre, kreatinin, total bilirubin ve direkt bilirubin değerlerinin yüksek olduğu belirlendi (Tablo 1). Elde edilen verilere göre hayvanda şiddetli anemi, trombositopeni ve miyozitis şekillendiği belirlendi. İdrar analizinde ise bilirubinuri ve proteinüri tespit edildi. Ayrıca mevcut verilere göre hastada renal ve hepatik hasarın gelişmiş olabileceği düşünüldü.

OLGU III

İştahsızlık, durgunluk şikayetleriyle getirilen 5 yaşında erkek kangal ırkı köpeğin incelendiği III. Olguda inguinal bölgede 3 adet keneye rastlanırken, hastanın çevreye karşı ilgisinin azaldığı, mukozalarında hafif ikterusla birlikte solgunluk ve yüksek ateşi (40.6°C) olduğu belirlendi. Hematolojik muayenede RBC, Hb, HCT değerlerinde hafif

Tablo 1. Olgularda tedavi öncesi ve sonrası bazı hematolojik ve biyokimyasal parametrelerindeki değişiklikler

Table 1. Changes in some haematological and biochemical parameters in cases before and after treatment

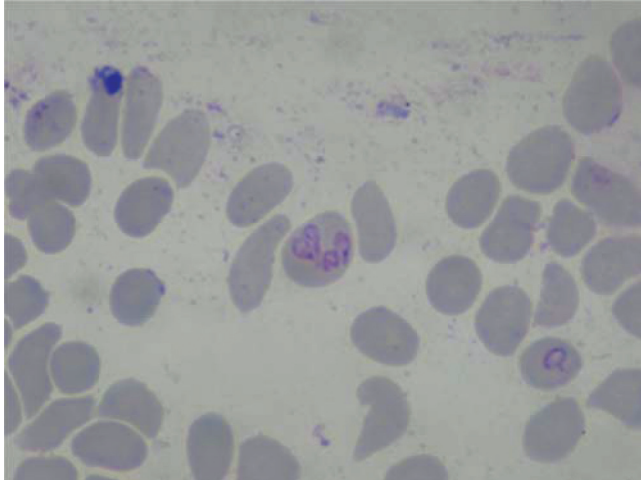
Parametreler	Referans Değerler ^[14]	Olgu I* TÖ	Olgu II TÖ	Olgu II TS	Olgu III TÖ	Olgu III TS
Hematolojik	WBC (x10 ³ /µL)	5.5-16.9	6.01	5.33	10.53	9.05
	RBC (x10 ⁶ /µL)	5.5-8.5	1.79	3.37	7.73	6.13
	HGB (g/dL)	12-18	4.4	8.7	11.9	15.9
	HCT (%)	37-55	12.3	23.1	36.4	46.9
	PLT (x10 ³ /µL)	175-500	11	6	248	259
Biyokimyasal	ALP (U/L)	20-150	840	424	142	214
	GGT (U/L)	1-10	20	5	3	3
	ALT (U/L)	10-88	250	56	53	47
	AST (U/L)	10-88	188	61	52	63
	CK (U/L)	20-200	236	277	152	684
	LDH (U/L)	50-495	977	750	103	3779
	Üre (mg/dL)	25-55	52.5	107.1	50.2	41.9
	Kreatinin (mg/dL)	0.5-1.5	1.2	2.8	0.9	0.86
	Total Protein (g/dL)	5.4-7.7	5.6	4.3	7.4	5.2
	Albumin (g/dL)	2.3-3.8	2.2	1.8	3.5	2.7
	Total Bilirubin (mg/dL)	0.1-0.6	16.1	12.4	0.12	0.19
	Direkt Bilirubin (mg/dL)	0-0.3	>7	6.5	0.1	0.05

TÖ: Tedavi öncesi, TS: Tedavi sonrası *Olgu I eks olduğu için TS değerler bulunmamaktadır

düşüş saptandı. Biyokimyasal analizlerde ise ALP, CK ve LDH değerlerinin yüksek olduğu belirlendi (Tablo 1). Hematolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda köpekte hepatik hasar gelişmiş olabileceği düşünüldü. Bunun dışında miyozitis ve hafif anemi şekillendiği anlaşıldı.

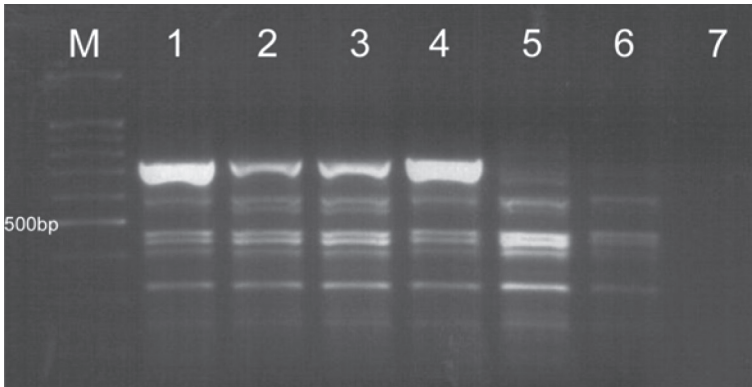
Her üç hayvanın üstünden toplanan kenelerin *Dermacentor reticulatus* olduğu anlaşılmış, yapılan sürme perifer kan frotilerinin Giemsa boyama sonuçlarında, mikroskopta eritrositler içinde büyük yapıda, çift veya çoklu piroplazmik formdaki *Babesia* etkenleri görülmüştür (Şekil 1).

Klinik belirtiler ve parazitolojik laboratuvar muayenesi (Giemsa boyama) sonucunda babesiosis teşhisi konulan olgular tedaviye alındı. Tedavide her üç köpeğe 6 mg/kg İM yolla tek doz imidokarb (İmicarp®, TeknoVet) uygulandı. Destekleyici tedavi amacıyla B kompleks ve C vitaminleri ve intravenöz yolla laktatlı ringer + dekstroz verildi. Olgular 1 tedavi başladıktan bir gün sonra öldü. Hasta sahibinin istememesi nedeniyle nekropsi yapılamadı. İki ve üçüncü olgularda ise tedavi başladıktan 15 gün sonra hastaların iyileştiği, hematolojik ve biyokimyasal değerlerin normale döndüğü belirlendi (Tablo 1).



Şekil 1. Giemsa ile boyanmış sürme kan preparatında görülen tipik büyük *Babesia* etkenleri

Fig 1. Typical large *Babesia* agents detected in blood smear with Giemsa stain



İncelenen olgularda etkenlerin tür düzeyinde doğrulaması, *B. canis canis*'e özgü primerler kullanılarak PZR testi ile yapıldı. Hayvanlardan EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden ticari kit (High Pure Nucleic Acid Isolation Kit, Roche) kullanılarak üreticinin bildirdiği şekilde DNA ekstraksiyonu yapıldı. Polimeraz Zincir Reaksiyonu testinde Duarte ve ark.'nın^[15] belirlediği ve 18S rRNA gen bölgesinden *B. c. canis*'e özgün 746 bp'lik bölgeyi çoğaltan Bab1 5'-GTG AAC CTT ATC ACT TAA AGG-3' ve Bab3 (5'-CTA CAC AGA GCA CAC AGC C-3') primerleri kullanıldı. Reaksiyon miktarı 25 µl olarak belirlendi ve her reaksiyon için 18.25 µl steril su, 2.5 µl 10x PCR buffer (Invitrogen), 1 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl dNTP miks (Invitrogen), 20 pmol/µl konsantrasyondaki her primerden 0.5 µl, 0.25 µl Taq DNA polymerase 5U/µl (Invitrogen) ve 1.5 µl DNA örneği kullanıldı. Reaksiyon Biometra TGradient PCR cihazında toplam 35 döngü (94°C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn, 72°C'de 45 sn) üzerinden yapıldı. İlk döngüden önce 94°C'de 2 dk denaturasyon ve en son döngüden sonra da 72°C'de 10 dk ekstensiyon basamakları uygulandı. Reaksiyon sonuçları %1.5 Agaroz jelde yürütülerek UV ile görüldü. Türe özgü PZR sonucunda, her 3 olguda da özgün 746 bp'lik bantlar oluşurken, kontrol olarak kullanılan *B. c. rossii* ve *B. c. vogeli* DNA'larından benzer bant elde edilmemiştir (Şekil 2).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Köpeklerde *B. c. canis*'in neden olduğu babesiosis özellikle Orta Avrupa ve Rusya'da yaygın olarak görülmekte olup, son yıllarda kuzeye doğru bir yayılım göstererek Norveç ve Hollanda gibi ülkelerde de rapor edilmeye başlanmıştır^[1,2,16,17]. Etken *D. reticulatus* tarafından nakledilmekte olup, hastalık bu kenenin yayılım alanları ile ilişkilidir^[1,2]. Ülkemizde, günümüze kadar, genellikle *Rhipicephalus sanguineus* tarafından nakledilen *B. c. vogeli* ve *B. gibsoni* varlığı bildirilmiştir^[3,12,13]. Öte yandan, çalışmamızda babesiosisli köpeklerde *B. c. canis*'in tespiti Türkiye için ilk rapor olup, gerek etkenin gerekse de *D. reticulatus*'un ülkemizde belli bölgelerde kalıcı popülasyon oluşturduğuna işaret eder niteliktedir.

Etkene ve komplikasyonlara göre değişmekle birlikte babesiosisli köpeklerde genellikle anoreksi, depresyon, akut

Şekil 2. PZR sonuçları; M: 100bp DNA marker, 1- Olgular-I, 2- Olgular-II, 3- Olgular-III, 4- *B. canis canis* kontrol DNA, 5- *B. canis rossii* kontrol DNA, 6- *B. canis vogeli* kontrol DNA, 7- Negatif kontrol (su)

Fig 2. PCR results; M: 100bp DNA marker, 1- Case-I, 2- Case-II, 3- Case-III, 4- *B. canis canis* control DNA, 5- *B. canis rossii* control DNA, 6- *B. canis vogeli* control DNA, 7- Negative control (water)

hemoliz, hemoglobinüri, ikterus, taşipne, taşikardi, splenomegali değişen derecelerde hemolitik anemi ve trombositopeni görülmektedir [1,7,11,13]. Bu raporda klinik tablonun ağır seyrettiği olgularda (Olgu I ve II) anoreksi, apati, yüksek ateş, ikterus, hemoglobinüri, şiddetli anemi, trombositopeni, solunum ve nabız sayısında artış görüldü. Daha hafif klinik tabloya sahip olan köpekte ise (Olgu III) iştahsızlık, mukozalarda hafif ikterusla birlikte solgunluk ve ateşin yüksek olduğu belirlendi.

Kanin babesiosis'te en sık karşılaşılan hematolojik bulguları HCT değerinin düşmesi, eritrositopeni ve hemoglobinemidir [1,2,9,10]. Sunulan raporda da II. Olguda hematokrit değerinde belirgin düşüş, şiddetli eritrositopeni ve hemoglobinemide belirlenirken I. Olguda bu değerlerdeki düşüşün daha hafif olduğu görüldü. Kanin babesiosis'de en sık karşılaşılan bozukluklardan biri olan trombositopeninin [9-11] Olgu I ve II'de şiddetli olduğu belirlenirken Olgu III'te trombosit değerinin normal sınırlarda olduğu saptandı. Son yıllarda, *B. c. canis*'in kendi içinde farklı virulansa sahip iki genetik grup içerdiği ve bunların farklı hematolojik bulgulara, özellikle de farklı şiddette trombositopeniye neden olduğu bildirilmiştir [18]. Bizim olgularımızdaki farklılığın kesin olarak bundan kaynaklanıp kaynaklanmadığının ortaya konması için daha ayrıntılı çalışmaya ihtiyaç vardır. Yapılan bazı çalışmalarda *B. c. canis* enfeksiyonlarında lökopeni şekillendiği [7,11] bildirilmiş olsa da, bu çalışmada her üç olguda da lökosit sayısının referans değerler arasında olduğu görüldü.

Babesiosis'te böbrek yetmezliği, hepatopati ve miyozitis gibi çoklu organ bozuklukları gelişebilmektedir [9,11,19]. Olgu I'de ALT ve AST enzim değerlerinin yüksek olması, olgu II ve III'te ALP enzim değerinin yüksek bulunması üç olguda da karaciğerde olası bir hasar geliştiğine işaret etmektedir. Olgu I de ALP ve GGT enzimlerinin yüksek bulunması köpekte kolestazisin hepatik hasara eşlik ettiği şeklinde yorumlanabilir. *B. c. canis* enfeksiyonlarında kolestazis şekillenmesi hakkında bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu nedenle bu bulgunun önemli olduğu kanısındayız. Her üç olguda da CK ve LDH enzimlerinin yüksek bulunması miyozitis oluştuğunu göstermiştir. Yine literatürlerle uyumlu olarak [8,11,19] Olgu II'de üre ve kreatinin değerlerinin yüksek olması ve idrarda proteine rastlanması renal hasar gelişmiş olabileceği gösteren veriler olarak değerlendirilebilir.

Sunulan raporda *B. c. canis* enfeksiyonunun önemli biyokimyasal değişikliklerinden olan hiperbilirubinemi ve hemoglobininin [7,20], Olgu I ve II'de şiddetli geliştiği tespit edildi. Bu olgularda hemoglobininüri ve bilirubinüri gelişmesinin nedeni eritrositlerdeki aşırı hemolize bağlı olarak dolaşımda fazla miktarda Hb ve bilirubin bulunması, bu maddelerin renal eşiği aşmasından kaynaklanabilir.

Bu çalışma ile *B. c. canis* Türkiye'den ilk kez rapor edilmiştir. Olguların yerli hayvanlar olması ve bölgede de *D. reticulatus* popülasyonunun varlığı (yayınlanmamış bulgular), etkenin Kars gibi alpin iklimde sahip yerlerde

yerleşik hal aldığına işaret etmektedir. Bu çalışmada ayrıca, hastaların klinik ve biyokimyasal bulguları da izlenerek, hastalık konusunda ayrıntılı veriler elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Matijatko V, Torti M, Schetters TP: Canine babesiosis in Europe: How many diseases? *Trends Parasitol*, 28, 99-105, 2012.
2. Solano-Gallego L, Baneth G: Babesiosis in dogs and cats-expanding parasitological and clinical spectra. *Vet Parasitol*, 181, 48-60, 2011.
3. Aysul N, Ural K, Ulutaş B, Eren H, Karagenç T: First detection and molecular identification of *Babesia gibsoni* in two dogs from the Aydın province of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 226-229, 2013.
4. Uilenberg G, Franssen FF, Perie NM, Spanjer AA: Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet Q*, 11, 33-40, 1989.
5. Schetters TP, Moubri K, Precigout E, Kleuskens J, Scholtes NC, Gorenflot A: Different *Babesia canis* isolates, different diseases. *Parasitology*, 115, 485-93, 1997.
6. Zahler M, Schein E, Rinder H, Gothe R: Characteristic genotypes discriminate between *Babesia canis* isolates of differing vector specificity and pathogenicity to dogs. *Parasitol Res*, 84, 544-548, 1998.
7. Solano-Gallego L, Trotta M, Carli E, Carcy B, Caldin M, Furlanello T: *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease. *Vet Parasitol*, 157, 211-212, 2008.
8. Ruiz de Gopegui R, Penalba B, Goicoa A, Espada Y, Fidalgo LE, Espino L: Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain. *Vet J*, 174, 129-132, 2007.
9. Matijatko V, Kis I, Torti M, Brkljacic M, Kucer N, Rafaj RB, Grden D, Zivcicjak T, Mrljak V: Septic shock in canine babesiosis. *Vet Parasitol*, 162, 263-270, 2009.
10. Schetters TP, Kleuskens JA, Van DCJ, De LPW, Finizio AL, Gorenflot A: Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*: A haematological study. *Vet Parasitol*, 162, 7-15, 2009.
11. Matijatko V, Kiş I, Torti M, Brkljačić M, Rafaj RB, Žvorc Z, Mrljak V: Systemic inflammatory response syndrome and multiple organ dysfunction syndrome in canine babesiosis. *Veterinarski Arhiv*, 80, 611-626, 2010.
12. Gulanber A, Gorenflot A, Schetters TP, Carcy B: First molecular diagnosis of *Babesia vogeli* in domestic dogs from Turkey. *Vet Parasitol*, 139 (1-3): 224-230, 2006.
13. Ulutaş B, Bayramli G, Ulutaş PA, Karagenc T: Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: A preliminary study. *Vet Clin Pathol*, 34, 144-147, 2005.
14. Turgut K: Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. II. Baskı, Bahçıvanlar Basım Sanayi AŞ, Konya, 2000.
15. Duarte SC, Linhares GF, Romanowsky TN, da SNOJ, Borges LM: Assessment of primers designed for the subspecies-specific discrimination among *Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli* and *Babesia canis rossi* by PCR assay. *Vet Parasitol*, 152, 16-20, 2008.
16. Matjila TP, Nijhof AM, Taoufik A, Houwers D, Teske E, Penzhorn BL, de Lange T, Jongejan F: Autochthonous canine babesiosis in The Netherlands. *Vet Parasitol*, 131, 23-29, 2005.
17. Oines O, Storli K, Brun-Hansen H: First case of babesiosis caused by *Babesia canis canis* in a dog from Norway. *Vet Parasitol*, 171, 350-353, 2010.
18. Adaszek L, Winiarczyk S, Skrzypczak M: The clinical course of babesiosis in 76 dogs infected with protozoan parasites *Babesia canis canis*. *Pol J Vet Sci*, 12, 81-87, 2009.
19. Matijatko V, Mrljak V, Kis I, Kucer N, Forsek J, Zivcicjak T, Romić Z, Simec Z, Ceron JJ: Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol*, 144, 242-250, 2007.
20. Furlanello T, Fiorio F, Caldin M, Lubas G, Solano-Gallego L: Clinicopathological findings in naturally occurring cases of babesiosis caused by large form *Babesia* from dogs of northeastern Italy. *Vet Parasitol*, 134, 77-85, 2005.