



***EHRlichia canis* İLE ENFEKTE KÖPEKLERDE D VİTAMİNİ VE D-DİMER SEVİYELERİNİN
BELİRLENMESİ**

Gözde ATIKYILMAZ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Cenker Çağrı CINGİ**

Tez No: 2019 - 012

2019-AFYONKARAHİSAR

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***EHRLICHIA CANIS* İLE ENFEKTE KÖPEKLERDE D VİTAMİNİ VE
D-DİMER SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Gözde ATIKYILMAZ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Danışman
Doç. Dr. Cenker Çağrı CINGİ

Tez No: 2019 - 012
2019 Afyonkarahisar

KABUL VE ONAY

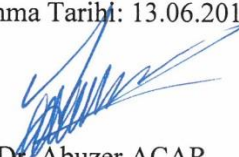
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ İÇ

HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.06.2019


Doç. Dr. Abuzer ACAR

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Kerem URAL

Üye



Doç. Dr. Cenker Çağrı CINGİ

Üye

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Gözde ATİKYILMAZ'ın “Ehrlichia Canis İle Enfekte Köpeklerde D Vitamini Ve D-Dimer Seviyelerinin Belirlenmesi” başlıklı tezi .../.../2019 günü saat Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Esma KOZAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen ve bana her hususta destek veren başta danışman hocam Doç.Dr. Çağrı CINGİ'ya, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Kerem URAL ve Dr. Adnan AYAN'a, ayrıca ailem ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGE VE KISALTMALAR	iv
TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ	v
RESİMLER DİZİNİ	vi
1.GİRİŞ	1
1.1.Ehrlichiozis	1
1.1.1.Klinik Bulgular	3
1.1.2.Tanı	5
1.1.3.Sağaltım	6
1.2.D Vitamini	6
1.2.1.Vitamin D Aktivitesi	8
1.3.D-dimer	10
1.3.1.D-dimer Fizyolojisi	10
1.3.2.D-dimer Ölçüm Yöntemleri	12
1.3.3.D-dimer Klinik Kullanımı	13
2.GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1.Gereç	14
2.1.1.Hayvan Materyali	14
2.1.2.İstatistiksel Analiz	15
2.2.Yöntem	15
2.2.1.Serolojik Muayene	15
2.2.2. <i>Ehrlichia canis</i> 'in Moleküler Tayini (PCR)	16
2.2.3.PCR Tekniği Uygulaması	16
2.2.4.DNA Ayrışması	18
2.2.5.PCR Amplifikasyonu	18

2.2.6. D Vitamini Analizi	19
2.2.7. D Vitamini Analizi Yapılış Aşamaları	20
2.2.8. D-dimer Analizi	20
2.2.9. Floresan Immunoassay (FIA) Prensibi	22
3.BULGULAR	23
3.1.Vitamin D Analiz Sonuřları	24
3.2. D-dimer Analiz Sonuřları	25
3.3. Olgulara Ait Analiz Sonuřları	25
4.TARTIşMA	26
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	30
ÖZET	31
SUMMARY	32
6. KAYNAKLAR	33

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
DNA	Deoksiribonükleik Asit
µl	Mikrolitre
Mg	Miligram
TID	Günde Üç Kez
BID	Günde İki Kez
IV	Damar İçi
IM	Kas İçi
SC	Deri Altı
UV	Ultraviyole
VDR	Vitamin D Reseptörü
Ca	Kalsiyum
MW	Megawatt
Ng	Nanogram
°C	Celcius
ml	Mililitre
Mg	Miligram
PG	Propilen Glikol
CME	Canine Monositik Ehrlichiozis
DIC	Yaygın İntravasküler Koagülasyon
PTE	Pulmoner Tromboemboli

TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1. <i>E.canis</i> Enfeksiyonunun Türkiye’deki Prevalansı	3
Tablo 2. Ehrlichiosis Tanısı Konulan Köpeklerin Gruplandırılması	14
Tablo 3. Köpeklerin Irk, Yaş, Kilo ve Enfeksiyon Yönünden Değerlendirilmesi	23
Tablo 4. D-dimer ve Vitamin D İstatistiksel Sonuçları	24
Tablo 5. Moleküler ve Serolojik Analiz Sonuçlarına Ait Kalitatif Değerlendirmeler	25
Şekil 1. Çalışma ve Kontrol Grubu Köpeklerde Vitamin D Seviyeleri	24
Şekil 2. Çalışma ve Kontrol Grubu Köpeklerde D-dimer Seviyeleri	25

RESİMLER DİZİNİ**Resim 1.** Snap 4DX Kullanım Talimatı**16**

1. GİRİŞ

Keneler dünyanın tüm bölgelerinde yayılım gösteren, başta kuş ve memeliler olmak üzere tüm omurgalı canlılardan kan emerek yaşayan ektoparazitlerdir (Karaer ve ark. 1997). Keneler birçok viral, bakteriyel, riketsiyal ve paraziter etkenleri kan emme esnasında konakçıya bulaştırmakla birlikte aynı zamanda kendisi de direkt olarak toksikasyon, felç ve anemiye yol açabilir (Merdivenci, 1969; Karaer ve ark., 1997).

Keneler birçok patojenin vektörü olup hayvan sağlığını tehdit etmekte ayrıca ciddi ekonomik kayıplara da neden olmaktadır (Larry ve Janovy, 2006).

Keneler tüm gelişim safhalarında, farklı konaklardan kan emebilme yeteneğine sahiptir ve bu durum hastalığın bulaşmasına olanak sağlar. Larva veya nimf döneminde alınan etkenler sonraki dönemlere de aktararak enfeksiyonun bulaşma yeteneği devam etmektedir (Bowman ve ark., 2003; Dik, 2003).

Keneler, kitin tabakasının yapısına göre sert keneler (*Ixodidae*) ve yumuşak keneler (*Argasidae*) olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir (Dik, 2003).

1.1.Ehrlichiosis

Ehrlichiosis, kenelerle bulaşan riketsiyal bir hastalık olup (Matthewman ve ark. 1993) ilk olarak 1935 yılında Cezayir’de saptanmıştır. Daha sonra ise Afrika ve Orta Doğu’nun bazı ülkelerinde de bildirilmiştir (Rikihisa, 1992). Türkiye’de ise hastalık ilk olarak 1997’de tespit edilmiştir (Batmaz ve ark.,2001).

Ixodidae ailesine ait kenelerle nakledilen *Ehrlichia bovis*, *Ehrlichia ovis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* ve *Ehrlichia canis* (*E.canis*) en önemli *Ehrlichia* türleridir (Merdivenci, 1969). Köpeklerde hastalık oluşturan *E. canis*, *Rhipicephalus sanguineus* isimli kenelerle bulaşıp, sıklıkla tropik ve subtropik bölgelerde görülür (Dodurka, 2002; Bramer ve ark., 2005).

E.canis'in prevalansı vektörün yaygınlığıyla ilgili olup, olguların büyük bir kısmı kenelerin aktif olduğu yaz aylarında ortaya çıkar (Harrus ve ark., 1997, Leib ve Monrea, 1997). Hastalık geniş bir yayılım göstermekle birlikte tropikal ve subtropikal bölgelerde daha sık görülür (Wanner ve ark., 1996, Wanner ve ark., 2001, Unver ve ark., 2001, Suto ve ark., 2001). Ayrıca endemik bölgelerde sağlıklı görülen köpeklerin çoğunda, *E. canis* antikorları seropozitifdir (Botros ve ark., 1995, Baneth ve ark., 1996).

Ehrlichiosis Asya, Afrika, Avrupa ve Amerika dahil çoğu bölgede bildirilmiş olup prevalansı Asya'da %18- %30; Afrika'da % 3,1 - % 67,8; Avrupa'da % 2,2 - % 50; Amerika'da %15,4 - %44,7 oranında saptanmıştır (Tsachev ve ark., 2006).

Tablo1 :*E. canis* enfeksiyonunun Türkiye’deki prevalansı (Ural ve ark., 2014).

Bölge	Hayvan Sayısı	Tanı Yöntemi	Prevalans	Çalışma
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	PCR	%41,5	Karagenç ve ark 2005
Ege Bölgesi (Aydın, Muğla, İzmir, Manisa, Denizli)	307	ELISA	%24,42	Ural ve ark 2014

1.1.1.Klinik Bulgular

Hastalığın klinik bulguları akut, subakut ve kronik olarak seyreder (Dodurka ve Bakırel, 2002; Bökkü ve ark., 2003; Bramer ve ark., 2005). Enfeksiyonun inkübasyon periyodu 8-20 gündür ve etkeni alan hastalarda 2-4 hafta içerisinde akut hastalık tablosu gelişir (Castro ve ark., 2004). Bu formunda *E. canis* etkenleri kan ve lenf yoluyla splenik, hepatik ve lenfatik yayılım gösterir. Retiküloendotelial sistem organlarındaki histiyositleri enfekte eder. Enfekte RES hücreleri enfeksiyonu vücudun diğer organlarına taşır. Sonucunda hastalığa ait semptomlar oluşur (Breitschwerdt, 1995; Harrus ve ark., 1997; Troy ve ark., 1980).

Kemik iliğine de yerleşen etken trombositopeniye neden olur ve ayrıca bu duruma lökopeni ve anemi de eşlik eder (Breitschwerdt, 2000). Akut formda, kilo kaybı, yüksek ateş, iştahsızlık, hareket etmede isteksizlik, göz ve burun akıntısı, dispne, lenfadenopati, ekstiremite ve skrotumda ödem, burun kanaması ile merkezi sinir sistemi bulguları gelişir (Dodurka ve Bakırel, 2002; Bökkü ve ark., 2003; Castro ve ark., 2004; Bramer ve ark., 2005). Subklinik formda ise ateş normaldir ve kilo kaybına pek rastlanmaz. Kanda antikor seviyesi artmış olup anemi, trombositopeni ve lökopeni belirlenebilir. Bu aşamada yeterli immun yanıt sağlandığında hastalık kendiliğinden de iyileşebilmektedir (Codner ve Farri-Smith, 1986; Waner ve ark., 1997).

Kronik formda meydana gelen bulgular, akut forma oranla daha şiddetli seyreder. Mukozalarda solgunluk ve kas zayıflığı sıkça görülür (Harrus ve ark., 1997). Ayrıca bu formda hepatomegali ve splenomegali de görülüp buna bağlı olarak abdominal defans, böbrek ve reproduktif problemler, çoklu eklem yangıları, anterior üveitis, retinal konjesyon, periferik ödem, meningo-ensafalitis semptomları ve sekonder enfeksiyonlar gözlenebilir. Ayrıca bu aşamada hipotansif şoka bağlı ölümler de şekillenebilmektedir (Rikişisa ve ark., 1992).

Ehrlichiosis serolojik ve PCR analizinde dört safhada incelenmektedir. Akut *E. canis* enfeksiyonu (antikor negatif ancak belirlenebilecek düzeyde DNA [PCR pozitif]), *E. canis*'e maruz kalma (belirlenebilecek düzeyde DNA [PCR negatif] ancak *E. canis* seroaktif), aktif enfeksiyon (PCR pozitif ve *E. canis* seroaktif) ve hiç *E. canis*'e maruz kalmamış köpekler (PCR negatif antikor negatif) olarak sınıflandırılır (Rikişisa, 1992).

1.1.2.Tanı

Ehrlichiosis tanısında tam kan sayımı önemli yer tutar. Hastalığın akut fazında orta dereceden şiddetliye kadar değişebilen trombositopeni saptanır. Trombosit sayısı 20. 000 ila 52. 000 / μ l arasında değişkenlik gösterir. Ayrıca hastalığın akut fazında trombositopeni ile beraber anemi ve lökopenide bulunur (Assarasakorn ve ark., 2008, Mylonakis., ve ark 2010, Harrus ve Waner, 2011). *E. canis* ile enfekte edilen köpeklerde 10 ila 21. günler arasında belirgin bir trombositopeni geliştiği, trombosit sayısının % 42 oranında azaldığı saptanmıştır. Yine bu hastalarda lökosit ve eritrosit düzeylerinde de azalma belirlenebilmektedir (Waner ve ark., 1997, Harrus ve ark., 1998).

Anemi ve hafif bir lökopeni ile birlikte trombositopeni hastalıktan şüphelendirir (Assarasakorn ve ark., 2008, Mylonakis ve ark., 2010, Harrus ve Waner, 1999). Trombositopeni, enfeksiyonun ilerleyen safhalarında da ortaya çıkmakta olup Alman Çoban Köpekleri diğer ırklara oranla hastalığa daha yatkındır (Rikihiş ve ark., 1992).

Mikroskopik incelemelerde, sürme kan frotilerinde monositler içerisinde tipik sitoplazmik *E. canis* morulaları saptanabilir. Morulalar, membran bağımlı vakuoller şeklinde bakterilerle yoğun olarak bir arada bulunan mikroskopik cisimciklerdir ancak tespit edilmeleri oldukça güçtür (Woody ve Hoskins, 1991). Ayrıca sürme kan frotisinde monositler içerisinde tipik *E. canis* etkenine de rastlanılabilir (Erdeğer ve ark., 2003).

Serolojik yöntemlerden IFAT kesin tanı için güvenilir bir test olmakla birlikte ELISA, Western Blot ve PCR da günümüzde hastalığın kesin tanısında sıklıkla kullanılmaktadır (Matus ve ark., 1987; Matthewman ve ark., 1993; Erdeğer ve ark., 2003).

1.1.3.Sağaltım

Sağaltımda ilk seçenek olarak tetrasiklinler (22 mg/kg TID, PO) kullanılır. İlaç kronik hastalarda 24-48 saat içerisinde etkisini göstermekte olup, bu hastalarda trombosit sayısı 14 gün içerisinde normale dönmektedir. Ayrıca sağaltımda penisilinler, sulfanamidler, oksitetrasiklin (25mg/kg, PO, İV, TID) doksisikilin (5 mg/kg, PO, İV, BID, 28 gün) , İmidokarb dipropiyonat (5-6.-6 mg/kg, İM, 2-3 hafta sonra tekrarlanması gerekmektedir) ve kloramfenikol (25 mg/kg, PO, İV, SC, TID) de kullanılabilir. Tetrasiklin grubu ilaçlar etkilenenlerde en az bir ay süreyle kullanılmalıdır (Rikihisa ve ark., 1992; Bökkü ve ark.,2003).

1.2. D Vitamini

Vitamin D sekosteroid yapıda olup yağda eriyen bir moleküldür. Fosfat ve kalsiyumun barsaklardan emilimini artırır ayrıca osteoidinin gelişimini de sağlayarak kemik oluşumunda görev alır (Turgut,2000).

D vitamininin D-1 (lumisterollü ergokalsiferol), D-2 (ergosterollü ergokalsiferol), D-3 (kolekalsiferol), D-4 (22 dihidrokalsiferol) ve D-5 (sitokalsiferol) olmak üzere bilinen beş formu vardır (Turgut, 2000).

D vitamini, başlıca olarak deride sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D3) ve gıdalarla alınan ergokalsiferol (vitamin D2) olmak üzere iki ayrı kaynaktan oluşur (Sutton ve MacDonald, 2003). D2 vitamini (Kalsiferol, Ergokalsiferol) provitamin olup deride toplanır ve bitkisel kaynaklı ergosterol ise besinlerle alınır. Ultraviyole ışınların etkisiyle deride stratum basale, stratum spinosum tabakasında ergokalsiferol'e dönüşüp karaciğerde ve böbreklerde hidroksilasyon reaksiyonuna

girer. D3 (Kolekalsiferol) vücutta sentezlenip, hayvansal besinler ile de alınabilir. Gerçek bir vitamin olmayan D3 vitamini iki basamaklı bir biyoaktivasyon sonrası, D vitamininin en etkili formu olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol'a dönüştürülür (Sutton ve MacDonald, 2003; Grober ve ark., 2013).

Vücutta bulunan D vitamininin % 90-95'i güneş ışınlarının etkisi ile deride sentezlenir. Güneşten yeterince yararlanım sağladığından ek olarak D vitamini almaya gerek yoktur. Bitkisel kaynaklarda öncül molekül şeklinde (ergosterol) bulunan vitamin D vücutta vitamin D2'ye dönüşür. Vitamin D3 ile aynı işleve sahiptir ve besin kaynaklı vitamin D, barsaklardan emiliminin ardından lenf damarları ile karaciğere aktarılır (Turgut, 2000).

Mor ötesi (UV) ışınlar dalga boylarına göre UVA, UVB ve UVC (280 – 100 nm) olarak üzere 3 grupta incelenir (Chen ve ark 2000). Kısa dalga boylu ışınlar (UVB) (315 – 280 nm) cam arkasında kolayca dağılan, bulutlu havada, engeli yeterince aşamayan ışınlar olarak bilinir ve amaca ulaşabilmesi için açık havada atmosfere dik açıyla gelmesi, başka bir fiziksel faktörle karşılaşmaması gerekir. UVB ışınları fazla pigmentasyon yapmaz ve ayrıca antikanserojen etkisi de bulunur. UVB ışınları deriye ulaştığında stratum basale, stratum spinosum tabakasında var olan 7-dehidrokolesterolden ilk olarak kolekalsiferol (D3) oluşur . Uzun Dalga Boylu Işınlar (UVA) (400 – 315 nm) ise, hedefe rahatlıkla ulaşan, engellere takılmayan ve dağılmayan ışınlardır (Turgut, 2000).

1.2.1. Vitamin D Aktivitesi

Tüm dünyada yaygın olarak görülen D vitamini eksikliği sadece basit bir biyokimyasal bozukluk olmayıp bunun yanında kemik yapım-yıkım hızında artma, osteoporoz ve hafif osteomalasi ve kalça ya da diğer kemiklerde kırık olasılığında artma gibi fizyolojik, klinik ve patolojik semptomlara neden olmaktadır. Kemik formasyonundaki bozulmanın yanında proksimal kas zayıflığı ve nöromusküler koordinasyonda bozulmaya yol açması nedeniyle düşmelere yatkınlık ve kırık riskini artırıp, ağrı ve fonksiyonel kısıtlılığa neden olarak yaşam kalitesini negatif etkiler (Holick ve Chen, 2008).

D vitamini eksikliğinin en önemli sebeplerinden biri bağırsaklardan emilememesidir. Metabolik durumlarda latent asidoz metabolitleri bağlanır ve asit yükünü kompanse etmek amacıyla vücudun tüm kaynakları kullanır. Bunun sonucunda kalsiyum eksikliği meydana gelir. Özellikle D vitamininin ince bağırsaklardan emilimii kalsiyumla ilişkilidir. Buna bağlı olarak latent asidoziste oluşan kalsiyum eksikliği D vitamini eksikliğine neden olur (Nazlıkul, 2010).

D vitamini, kalsiyum emilim ve kullanımına yardımcı olduğu için kemik sağlığı açısından önemlidir. D vitamini düzeyinin normal değerlerde olması, sadece en uygun kemik gelişimi için değil aynı zamanda birçok kronik hastalıktan korunmak için de gereklidir (Grant ve Holick, 2005).

Ciddi vitamin D eksikliği gelişmekte olan iskelet sisteminde yetersiz mineralizasyona, erişkin iskelette ise demineralizasyona neden olarak sırasıyla raşitizm ve osteomalaziye yol açmaktadır (Zittermann, 2003). Vitamin D eksikliği kemiklerde bozulmanın yanı sıra, proksimal kas güçsüzlüğüne ve nöromusküler koordinasyonda bozulmaya neden olarak düşmelere yatkınlığı ve kırık riskini artırır (Zittermann, 2003).

Vitamin D Reseptörü (VDR), bir nükleer transkripsiyon faktörü aracılığı ile meydana gelir. 1,25 dihidroksivitamin D, hücre çekirdeğinin içerisine girerek VDR ile birleşir ve retinoik asit X reseptörü (RXR) isminde farklı bir nükleer reseptör bu birleşmeyi güçlendirir. 1,25 dihidroksivitamin D'nin varlığında, VDR/RXR kompleksi, DNA'nın D vitaminine cevap veren elementler (VDRE) olarak adlandırılan küçük dizilerine bağlanır ve çok sayıda spesifik genin transkripsiyonunu modüle edecek moleküler etkileşim reaksiyonlarını başlatır (Sutton ve MacDonald, 2003).

Genomların üzerinde binlerce VDR'ler belirlenmiştir. 1,25 dihidroksivitamin D tarafından aktive edilen VDR'lerin 100 - 1250 adet geni direk ya da indirek yolla regüle ettikleri düşünülmektedir. VDR'ların beyin, kalp, mide, pankreas, lenfositler, prostat, meme, deri, kolon, gonadlar ve bağırsak gibi birçok sayıda organda bulunduğu belirlenmiştir (Sutton ve MacDonald, 2003; Grober ve ark., 2013).

Gerek VDR gen hasarlı yada gen hasarsız D vitamini eksikliği hücre farklılaşması, oksidasyon bozuklukları, T hücre farklılaşmasına sebep olarak tüberküloz, enfeksiyon hastalıkları, astım, diyabet, kanser, romatizmal hastalıklar, otoimmün hastalıklar, miyokart enfarktüsü, alerjik hastalıklar ve otizm gibi birçok hastalık için risk oluşturmaktadır (Sutton ve MacDonald, 2003).

Vücutta D vitamin azlığının mikrobiyatada değişiklik yarattığı belirtilmiştir (Holick ve Chen 2008). Aynı zamanda vitamin D reseptörlerinin intestinal mikrobiyota dengesi üzerinde de etkili olduğu saptanmıştır. Patolojik bakterilerin invazyonunu engellediği, inflamasyonu azalttığı ve hücresel bütünlüğü sağladığı bildirilmiştir (Asi, 1999).

Kanda yüksek D vitamini toksik olabilir. Bunun nedeni olarak serumda kalsiyum ve fosfat düzeyinin yükselmesi ve sonucunda kalsiyumun böbreklerde ve kan damarlarında birikmesi gösterilmektedir. Kaslarda zayıflık, gastrointestinal

bozukluklar, böbreklerin görevini yerine getirememesi gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Ası, 1999).

Vücutta vitamin D eksikliği için risk faktörler ise, iklimsel etkenler ve güneşten korunma metotları önemli yer tutar. Vitamin D sentez, emilim ve metabolizmasını etkileyen biyolojik faktörler arasında derinin pigmentasyonu, genetik farklılıklar, yaşlılık, kronik böbrek hastalığı, yağ malabsorbsiyonu, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, obezite ve magnezyum düzeyi önemli yer tutar (Merke ve ark., 1987).

1.3. D-dimer

D-dimer, koagülasyon sisteminin herhangi bir sebeple aktivasyonu sonucu çapraz bağlarla oluşan fibrin pıhtılaşmasının, plazmin tarafından yıkılması ile oluşur (Blomback ve ark.,1978).

1.3.1. D-dimer Fizyolojisi

Fibrinojen, 3 çift polipeptid zincirinden ($A\alpha$, $B\beta$ ve 2 γ zinciri) oluşmakta ve ortalama olarak 340,000 dalton ağırlığındadır. Dış uçları $B\beta$ ve 2 γ zincirlerinin karboksi terminal uçlarından oluşup, D domain olarak adlandırılmaktadır. Merkez bölgesi ise tüm zincirlerin amino terminal uçlardan oluşmakta ve E domain olarak adlandırılmaktadır. $A\alpha$ ve $B\beta$ zincir çiftlerinin amino terminal bölgelerinde 16 ve 14 aminoasitlerden oluşan fibrinopeptid A ve B (ikişer fibrinopeptid) kısımları bulunmaktadır. Fibrinojen akut faz reaktan olup travma, gebelik ve doku inflamasyonu gibi fizyolojik stres durumlarında üretimi 10 katına kadar çıkmaktadır.

Koagulasyon sisteminin bir şekilde aktivasyonu sonucu aktive olan trombin, fibronojenin fibrine dönüşümünü sağlamaktadır (Blomback ve ark., 1978).

Fibrinojenin fibrine dönüşümü üç aşamada oluşur. Bunlardan ilki enzimatik aşamada olup bu aşamada trombin tarafından fibrinopeptid A ve B kısımları ayrılarak çözünebilir fibrin monomerleri oluşur. Gamma zinciri, fibrine dönüşüm aşamada intakt olarak kalır (hidrolize olmaz). Fibrin polimerasyonu için ilk önce fibrinopeptid A ayrılır. Bunu takiben de fibrinopetid B ayrılır (Blomback ve ark., 1978).

Bir diğer aşama olan polimerizasyon aşamasında fibrinopeptid A ve B' nin uzaklaşması (fibrinopeptid A ve B negatif yüklüdür) ile fibrin monomerlerin elektronegativitesi anlamlı oranda azalır. Buda fibrin monomerleri arasındaki itme güçlerinin azalması ile sonuçlanır. Ortamda uygun pH ve iyonik konsantrasyon mevcut ise fibrin monomerleri spontan olarak (temel olarak zayıf hidrojen bağları oluşturarak) bağlanır. Monomerler öncelikle fibrinopeptid A ayrılması ile uç uca bağlanırlar, daha sonra ise fibrinopeptid B ayrılması ile yan yana olacak şekilde bağlanır. Bu yapı gevşek özellikte olup in vitro 5 M urea'da çözülebilir (Blomback ve ark., 1978).

Üçüncü aşama ise stabilizasyon dönemidir. Bu aşamada gevşek olmayan bir pıhtı oluşur. Trombin tarafında aktive edilen faktör XIII (F XIII) ve Ca faktör XIII 'ün transglutaminaz özelliği ile fibrin Ca^{2+} monomerleri arasında stabil kovalent bağların oluşmasını sağlar. Stabilize olan fibrin fibrinolize daha da dayanıklı hale gelir (Blomback ve ark., 1978).

Oluşan fibrin plağı daha sonra plazmin tarafından parçalanır. Bu yıkım sonucunda fibrin yıkım ürünleri ortaya çıkar. Bu işlem plasminojenin pıhtıyı absorbe etmesiyle başlayıp, plazmine dönüşüm ile devam eder. Plazmin özellikle fibrinin lizin içeren karboksi terminal kısmına bağlanarak, fibrini yıkımlamaya başlar. Fibrin polimerleri öncelikle plazmin tarafından daha büyük olan parçalara ayrılır (fragment X ve Y). Daha sonrada daha küçük parçalar olan E ve D-dimer oluşur. D-dimer

yaklaşık olarak 180.000 MW aralığında olup, karaciğer, böbrek ve RES tarafından plazmadan uzaklaştırılır (Blomback ve ark., 1978).

1.3.2. D-dimer Ölçüm Yöntemleri

Günümüzde ticari olarak otuzdan fazla D-dimer ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Bu ölçüm yöntemleri üç ana kategoride sınıflandırılır (Greenberg ve ark., 1987; Froehling ve ark., 2007).

ELISA yöntemi zaman alıcıdır ancak kantitatif ve yüksek duyarlı bir yöntemdir (Greenberg ve ark., 1987; Froehling ve ark., 2007).

Lateks temelli immun ölçüm, ELISA yöntemine göre duyarlılığı daha az, ancak daha hızlı, görsel gözleme dayanan yarı kantitatif bir yöntemdir (Greenberg ve ark., 1987; Froehling ve ark., 2007).

Lateks temelli immuno turbidimetrik okuma yapan otomatik ölçümler ELISA yöntemi kadar duyarlı, kantitatif ve hızlı bir yöntemdir. Lateks partikülleriyle kaplanmış D-dimer'e karşı monoklonal antikorlar test edilecek plazmayla karıştırılır. Plazmada D-dimer yoksa çözeltide bulunan partiküller tek parça olarak bulunur ve koagülometrede yüksek turbidimetrik okuma değerleri elde edilir. Diğer yandan, plazmada D-dimer varlığında, lateks partikülleri çökerek çözeltide net bir görünüm oluşturur ve koagülometrede turbidimetrik okuma değerleri elde edilir (Blomback ve ark., 1978).

Hem ELISA hem de lateks turbidimetrik metot, FDA onay almış olup ve tüm dünyada yaygın kullanılmaktadır (Blomback ve ark., 1978).

1.3.3. D-dimer'in Klinik Kullanımı

D-dimer'in plazmada artışına yol açan klinik durumlar arasında; ilerleyen yaş, yeni doğan dönemi, gebelik, hastanede yatış, enfeksiyon, tümör, yakın zamanda geçirilen cerrahi müdahaleler, travma, yanık, yaygın damar içi pıhtılaşma (DIC), venöz tromboemboli, iskemik kardiyopati, paraliz, periferik arteriyopati, anevrizma, konjestif kalp yetmezliği, hemoliz, kanama, akut solunum sendromu, karaciğer ve böbrek hastalığı, yangısel barsak hastalığı, trombolitik sağaltım uygulamaları ve aort yırtılmasıdır (Di Nisio ve ark., 2007; Stein ve ark., 2006).

Bu çalışmada Ehrlichiozisli köpeklerde hastalığın farklı evrelerinin, kan Vitamin D seviyeleri ile koagülasyon parametrelerinden D-dimer düzeyleri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Yine planlanan araştırma ile elde edilen sonuçların Ehrlichiozis enfeksiyonunun farklı aşamalarında D-dimer ve Vitamin D seviyelerinin belirlenmesi ile trombozise zemin hazırlayan değişikliklerin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten 33 köpek oluşturdu. Klinik bulgularla birlikte trombositopeni tespit edilen ve edilmeyen 33 köpekte klinik muayene ve laboratuvar testleri ile kesin tanı ve ayırıcı tanıya gidildi. Tüm olgular hızlı Snap 4DX test kiti ile Ehrlichiozis hastalığı yönünden değerlendirildi.

Çalışma grubu, daha öncesinde sağaltım uygulanmamış köpeklerden oluşturuldu. Çalışmada yer alan tüm köpeklerin fiziksel muayene bulguları, laboratuvar analizleri, anemnez bilgileri ve eşgal bilgilerinin kayıtları tutuldu.

Hem hızlı tanı test kiti hem de PCR yöntemiyle Ehrlichiozis tanısı konulan (n=27) her iki cinsiyet ve çeşitli yaş gruplarından toplam 33 köpek 4 farklı gruba ayrıldı;

Tablo 2. :Ehrlichiozis Tanısı Konulan Köpeklerin Gruplandırılması

1.grupta CME ile akut olgular	n=7
2.grupta CME ile aktif enfekte olgular	n=10
3.grupta CME' ye maruz kalan olgular	n=10
4.grupta sağlıklı kontrol grubu	n=6

2.1.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

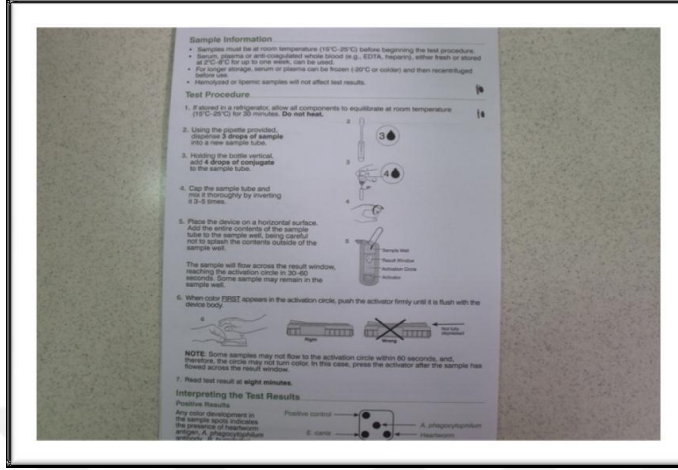
Elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama ve standart hata değerleri belirlenerek gerçekleştirildi. Normalite testi sonucunda her iki parametreye ait verilerin bazı gruplarda Kolmogorov-Smirnov analizine göre normal dağılım göstermediği belirlendi. Normal dağılımın sağlanması amacı ile Log10 tabanına göre transformasyon işlemleri yapıldıktan sonra söz konusu gruplardaki verilerin halen normal dağılım oluşturmadığı belirlendi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi bağımsız örnekler Kruskal Wallis testi yardımı ile gerçekleştirilerek gruplar arasındaki karşılaştırmalar sağlandı. Tüm istatistiksel analizlerde SPSS 21.0 (IBM, USA) programından yararlanılarak $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Serolojik Muayene

Çalışma içerisinde tüm olgulardan alınan kan hızlı ELISA prensibiyle çalışan ticari test kitleri (Snap 4DX) tarafından muayene edilerek, Ehrlichiosis yönünden değerlendirildi. Tüm olgularda EDTA'lı taze tam kan örneği kullanıldı ve test prosedürü gerçekleştirilmeden önce kullanılacak test kitlerini oda sıcaklığında bekletildi. Alınan örneklerden pipetle üç damla alınarak başka tüp içerisinde dört damla konjugatla birleştirilerek homojen bir şekilde karıştırıldı ve bu karışım test kitinin örnekleme çukuruna damlatılarak sonucunda 40-60 saniye içerisinde testin çalıştığını ve ilerleyişini gösteren aktivasyon halkasının oluşumu gözlemlendi. Renk belirmesi ile test kitinin hareketli kısmı aşağı doğru itirilerek pürüzsüz bir zeminde sabitlenmesi sağlanarak ilk bir dakika içerisinde aktivasyon halkasında herhangi bir hareketlilik ve renk değişimi görülmeyen test kitleri çalışma içerisine kesinlikle alınmadı. Pozitif kontrol çizgisinin belirmesi ile testin çalıştığını ve tüm hastalıkların

negatif olduğunu belirleyen bir belirteç olarak üretici firmanın belirttiği sistemde alındı.



Resim 1.Snap 4DX Kullanım Talimatı

2.2.2. *Ehrlichia canis*'in Moleküler Tayini (PCR)

DNA; 200 µl periferel köpek kanından ve santrifüj edilmiş enfekte ve non-enfekte DH82 hücre kültürlerinden DNAeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany) kullanılarak izole edildi. DNA; Milli-Q Integral System (Merck Millipore, USA) elde edilen distile su ile yıkandı ve ardından NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) ile ölçümü yapıldı.

2.2.3.PCR Tekniği Uygulaması

16S rRNA geni periferel köpek kanı ve DH82 hücrelerinden izole edilerek çoğaltıldı. Ürünü (istenilen gen bölgesini) yaklaşık 478 bp boyutunda çoğaltmak amacı ile, ECC (5'-AGAACGAACGCTGGCGGCAAGC-3') ve ECB (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') isimli iki çift primer kullanıldı. Ürün, 365-bp fragmentine spesifik (o bölgeyi çoğaltan) ECAN5 (5'-

CAATTATTTATAGCCTCTGGCTATAGGA-3') ve HE3 (5'-TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT-3') inners primers ile test edildi. Dsb genini analiz etmek için, dsb-330 forward (5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACAAAT-3') ve dsb-728 reverse (5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3') primerleri kullanılarak 409-bp fragmenti çoğaltıldı. P28 genini analiz etmek için, forward 793 (5'-GCAGGAGCTGTTGGTTACTC-3') ve reverse 1,330 (5'-CCTTCCTCCAAGTTCTATGCC-3') primerleri kullanılarak 518-bp fragmenti çoğaltıldı. Her bir tepkime için, gerekli primerlerden 25 pmol, 1.25 U Platinum Taq, DNA Polymerase (Invitrogen, USA), PCR buffer (50 mM KCl and 20 mM Tris-HCl) (Invitrogen, USA), 2mM MgCl₂ (Invitrogen, USA), dNTP karışımı (0.25 mM each) (Invitrogen, USA), 100~200 ng DNA örneği ve üzerlerine ultrapure suyun (distile su) (Milli-Q Integral System (Merck Millipore, USA) 50 µl'ye tamamlanması ile oluşan bileşimler kullanıldı. PCR, Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) isimli otomatik DNA thermal cycler PCR cihazı ile ; 2 dakika 95 C (santigrat derece), 95 C 'de 30 saniyelik 30 siklus, p28 için 55 C' de 1 dakika, dsb için 60 C'de 1 dakika, 72 C'de 2 dakikayı takiben 72 C'de 5 dakika protokolü takip edilerek uygulandı (Greenberg ve ark 1987; Froehling ve ark 2007).

Çoğaltılan ürün, %15'luk agarose jel ile separe edildi, UV ışığın altında ethidium bromide (SigmaAldrich, USA) boyama ile boyandı. Çoğaltılan dsb ve p28 gen parçaları QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) ile saflaştırıldı. DNA 10 µl ile yıkandı, NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA) ile analiz edilerek -20 °C 'de şoklandı (Greenberg ve ark 1987; Froehling ve ark 2007).

2.2.4. DNA Ayırıştırması

DNA, üreticinin talimatlarına uygun bir şekilde bütün kandan (200 ml) QIAamp kan kitiyle (Qiagen, Santa Clarita, CA) ayırıştırıldı.

2.2.5. PCR Amplifikasyonu

Her bir kan örneğinden alınan saflaştırılmış DNA öncelikle bazıları 16S RNA geninin bir bölümünü amplifikasyonunu sağlayan dört farklı PCR amplifikasyonunda denenmiştir. ECC ve ECB bazıları tüm *Ehrlichia spp.*'lerin gen amplifikasyonlarını sağlamaktadır. HE1 ve HE3 bazıları *E. chaffeensis* gen amplifikasyonlarında kullanılmıştır, ECAN5 ve HE3 bazıları *E.canis* amplifikasyonlarında kullanılmıştır ve EE52 ve HE3 bazıları *E. ewingii* amplifikasyonlarında kullanılmıştır. Baz sıralamaları onlarla eşlenen *Ehrlichia spp.* 16S rRNA genlerinin bölgeleriyle birlikte gösterilmiştir ve Dawson ve McBride'in *E. Chaffeensis* ve köpek kanından olan *E.canis*'in PCR'si için kullandıkları bazıları gösterilmiştir. Reaksiyonlar 10mM Tris-Cl içinde 10 ml. örnek DNA , dNTP başına 0.2 mM, 2mM MgCl₂, 50 mM KCl, baz başına 0.5 mM ve 1.25 U AmpliTaq DNA polimeraz içermektedir. Sıcak başlatma PCR tekniği kullanılmış ve enzim reaksiyonları 94 derecede üç dakikalık bir denatürasyon sürecinden sonra eklenmiştir. ECC ve ECB bazılarıyla olan reaksiyonlar 94 derecede birer dakikalık 30 denatürasyon döngüsünden oluşmakta olup bu işlemde , iki dakika 65 °C' de tavllanır ve iki dakika 72 °C' de kalır.Türlere özgü bazıları olan reaksiyonlar iki aşamalı olup ilki 94 °C' debirer dakikalık üç denatürasyon döngüsünden oluşturuldu. 55 derecede iki dakika boyunca tavlandıktan sonra bir buçuk dakika 72 °C' de kalmaktadır. İkincisi 92 °C' de birer dakikalık otuz yedi denatürasyon döngüsünden oluşmakta olup, 55 °C iki dakika boyunca tavlansın ve daha sonra bir buçuk dakika 72 °C'de kaldı (Greenberg ve ark 1987; Froehling ve ark 2007).

Seçili kan örneklerinden saflaştırılmış DNA da iç içe geçmiş PCR ile denendi. Dış reaksiyon için, ECC ve ECB bazları yukarıda belirtilen koşullarda kullanıldı. İç içe geçmiş reaksiyonlar dış reaksiyonun 5 mL'si model alınarak yapıldı ve her bir türe özgü baz yukarıda belirtilen reaksiyon şartlarına ayarlandı .PCR sonrasında herhangi bir *Ehrlichia* türü için yapılan PCR'de pozitif çıkan köpeklerden arınmış DNA'ya uygulandı. Arındırılmış DNA, iç içe geçmiş PCR ile yukarıda belirtildiği gibi test edildi, ancak ECC ve ECB bazlarıyla olan dış reaksiyonun tavlama derecesi 55 °C idi (Greenberg ve ark 1987; Froehling ve ark 2007).

Laboratuvar ortamında yetişmiş ve enfeksiyon geçirmemiş bir köpeğin kanından ayrıştırılmış olan DNA, negatif kontrol olarak işlev gördü. Pozitif kontrol DNA'ları *E. chaffeensis* ile enfekte olmuş DH82 hücrelerinden, deneysel olarak *E.canis* ile enfekte edilmiş bir köpekten ve *E.ewingii* ile deneysel olarak enfekte edilmiş bir köpeğin eklem sıvısından ayrıştırılmıştır. Örneklerin kontaminasyonunu engellemek için, DNA ayrıştırma, PCR karışımının hazırlanması ve amplifikasyonlar farklı odalarda yapılmıştır. Pozitif yer değiştirmeli pipetler ve aerosolsüz pipet uçları da kullanılmıştır. Amplifikasyon reaksiyonu sonuçları %1.5 agaroz jel üzerinde ayrılmıştır ve etidyum bromür ve UV ışığı ile bakılmıştır. Kontrol DNA'larıyla olan PCR *Ehrlichia* türü için olan bazların özgüllüğünü doğrulanmıştır.

2.2.6.D Vitamini Analizi

Plazma, serum veya tam kan örneğinde 25 (OH)D düzeylerinin kantitatif olarak tespit edilmesi için ticari olarak üretilmiş test kitlerinden yararlanıldı. Değerlendirmede kutu içinde bulunan 50 testlik standart paketler kullanıldı. Svant marka flöresan immunoassey cihazı kullanılarak flöresan immuno kromotografik yöntemle yapıldı.

Değerlendirme yarışmalı reaksiyon prensibine dayalı olarak yapıldı. Daha için

önceden işaretlenmiş ve 25 (OH) D tam antijeninin nitrosellüloz membran üzerine kaplanması ile sağlanan ayraç yerleştirilmesi test kitlerine uygun biçimde yapılmıştır. Sonrasında aynı şekilde kontrol çizgisi olarak anti-rabit immunglobulin G monoklonel antikorlarının nitrosellüloz membran üzerine yerleştirilmesi ile oluşumu gerçekleştirildi. Daha sonraki adımda fare anti 25 (OH)D monoklonel antikor ve tavşan Ig G'leri latex flöresan mikrosfer üzerinde işaretlenerek yerleştirildi. Cam fiber membran üzerine sıkılan içerik ardından işaretlendi ve kurutuldu. Test kiti içerisinde bulunan önceden işaretlenmiş olarak bulunan antikor, donörün kanında bulunan 25 (OH) D antijeni ile birleşerek yarışmalı zarf antijenini oluşturmuştur. Test çizgisi ve kontrol ile birleştirilen biyobelirteç optik sinyallere belirli yoğunlukta işaret etmektedir. Örneğe ait konsantaryon T/C (test çizgisi sinyalinin kontrol çizgisine oranı) örnek konsantrasyonu ile negatif ilişkide olmak üzere standart eğriyi oluşturarak örneğe ait konsantrasyon belirlenmiştir.

2.2.7. D Vitamini Analizi Yapılış Aşamaları

1. Oda sıcaklığı alınarak test stribi test uygulamasının yapılacağı masanın yapılacağı masanın üzerine yerleştirildi.
2. Analizötör üzerine cihaz kimlik kartı uygun biçimde yerleştirildi.
3. 30 mikrolitre köpek kan örneği eşit miktarda olacak şekilde 25(OH)3 ayırıcı ile karıştırıldı.
4. Her bir test kiti içinde bulunan sıvı karakterde olan reaktif 60 mikrolitre pipete edildi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Sonrasında savant 100 analizatörünün içerisine yerleştirilerek test edildi. Cihaz ölçümleri otomatik olarak gerçekleştirdi ve her bir örneğin konsantrasyonunu değerlendirerek gösterdi.

2.2.8. D-dimer Analizi

Yaygın damar içi pıhtılaşma bozukluğunun ve buna ilişkin sekonder olarak kardiyak hasarın belirteçlerinden, D-dimer konsantrasyonunun ölçümü Flöresan Immunassay hızlı test (Finecare, Wondfo Biotech Co. Ltd, Finecare, Atateknik Türkiye) cihazıyla ölçüldü. Serum CTnI konsantrasyonu ölçümünde FIA meter ticari test kitleri (CTnI test, Finecare, Wondfo Biotech Co. Ltd) kullanıldı. Serum örnekleri hemoliz olmadan, analiz süresine kadar 20 °C’ de ilgili laboratuvara nakledildi.

2.2.9. Floresan Immunoassay (FIA) Analiz Prensibi

Finecare FIA Meter Operasyon Kullanım kılavuzuna göre, test oda sıcaklığında yapılması gerekmektedir.

Birinci aşama (hazırlık): Testten önce serum örneği hazır hale getirildi. Kimlik çipi cihaza yerleştirildi.

İkinci aşama(örnekleme) : cTnI ve NT-proBNP için 75 µl, D-dimer için 10 µl serum örneğini pipet ile buffer tüpüne konuldu.

Üçüncü aşama (karıştırma) : buffer ve serum örneği bulunup tüp, bir dakika kadar karıştırıldı.

Dördüncü aşama(yükleme): tüp içerisindeki karışımdan 75 µl transfer pipeti ile alınarak test kartuşunun örnek koyma kuyusuna konuldu.

Beşinci aşama (test) : örnek konulan kartuşu, test kartuşunu tutucusuna konularak, test düğmesine basıldı. On beş dakika sonra örnek protokolü girilerek cihazın ekranında sonuç görüntülendi. Yazdır düğmesine basıldığında sonuç kağıda aktarılarak yazdırıldı.

Cihaz analiz aralığı; cTnI: 0.1-50 ng/ml, belirleme limiti (analitik hassasiyet); cTnI: 0.1 ng/ml

Cihaz analiz aralığı; NT-proBNP: 18-35000 pg/ml. Belirleme limiti (analitik hassasiyet); NT-proBNP: 0,1 pg/ml. köpeklerde bu parametreye yönelik çalışmalarda pmol/l yönünden değeriendirme yapıldığı göz önünde bulundurulduğunda 1 pg/ml = 0.118 pmol/l çevirme faktörü (Weber ve Hamm, 2006) baz alınarak değeriendirildi.

Cihaz analiz aralığı; D-dimer: 0.1 – 10 mg/l, belirleme limiti (analitik hassasiyet); D-dimer 0.1 mg/l.



3. BULGULAR

1.grupta CME ile akut enfekte 2-5 yaş aralığında melez, Maltes teriyer, Labrador Retriever, Golden Retriever, Doberman ve Pincher Köpek ırkları yer aldı . 2. grupta CME ile aktif enfekte 2-7 yaş aralığında French Bulldog, Dalmatian, Golden Retriever, melez, Terrier, Aksaray Malaklısı, Spaniel Cocker ve Kangal ırkı köpekler yer aldı. 3.grupta CME ye maruz kalan 2-15 yaş aralığında Golden Retriever, Melez, Boxer, Alman Çoban Köpeği, Terrier, Pitbull Saint Bernard ırkları yer almaktadır.4.grupta kontrol grubu olup 2-8 yaş aralığındaki Alman Çoban Köpeği, melez, Labrador Terrier Spaniel Cocker ve melez köpek ırkları yer almıştır.(Tablo 3)

Tablo3. Köpeklerin ırk, yaş kilo ve enfeksiyon yönünden sınıflandırılması

Evre	Olgu	Cinsiyet	İrk	Yaş (Yıl)	Kilo (kg)
CME ile Akut Enfekte	1	D	Melez	3	27
	2	E	Maltese Terrier	2	7
	3	D	Labrador Retriever	3	17
	4	E	Golden Retriever	4	23
	5	E	Melez	5	11
	6	E	Doberman	2	15
	7	D	Pincher	4	10
CME ile Aktif Enfekte	1	D	French Bulldog	4	19
	2	D	Dalmatian	7	37
	3	D	Golden Retriever	3	22
	4	E	Melez	2	14
	5	D	Alman Çoban Köpeği	2	15
	6	D	Dalmatian	5	21
	7	D	Kangal	2	34
	8	D	Terrier	5	8
	9	D	Aksaray Malaklısı	6	50
	10	D	Spaniel Cocker	5	17
CME ye Maruz kalan	1	D	Melez	12	14
	2	D	Golden Retriever	4	31
	3	D	Boxer	5	17
	4	E	Golden Retriever	7	27
	5	D	Alman Çoban Köpeği	4	25
	6	D	Labrador Retriver	15	28
	7	D	Melez	4	10
	8	D	Terrier	5	15
	9	E	Pitbull	2	15
	10	E	Saint Bernard	7	14
Kontrol	1	D	Melez	3	15
	2	E	Alman Çoban Köpeği	3	16
	3	E	Melez	3	19
	4	E	Labrador Retriever	2	17
	5	D	Spaniel Cocker	7	27
	6	D	Melez	8	18

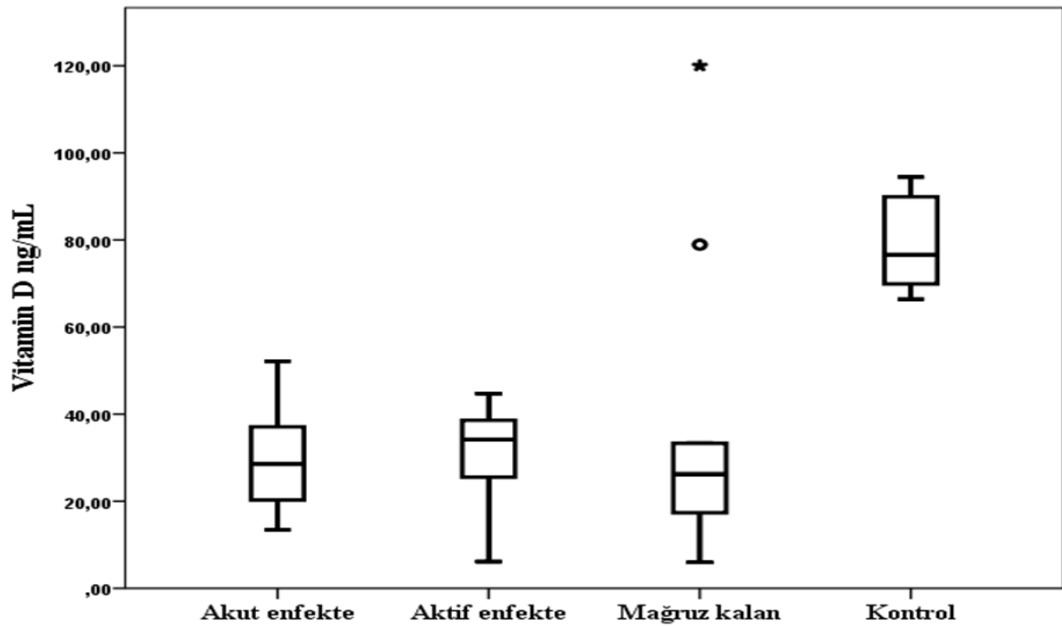
Tablo 4. D-dimer ve Vitamin D İstatistiksel Sonuçları

Grup	D-dimer $\bar{X} \pm SE$	Vitamin D $\bar{X} \pm SE$
Akut enfekte	$3,5829 \pm 1,35369^b$	$29,8229 \pm 5,26606^b$
Aktif enfekte	$1,6800 \pm 0,56368^b$	$31,5190 \pm 3,58451^{ab}$
Maruz kalan	$0,7300 \pm 0,34994^{ab}$	$37,8110 \pm 10,99690^b$
Kontrol	$0,1333 \pm 0,02108^a$	$78,9883 \pm 4,50496^a$

^{a,b,ab}: aynı sütunda farklı harfler ile ifade edilen değerler birbirinden istatistiksel anlamlı farklıdır ($p < 0,05$).

3.1. Vitamin D Analiz Sonuçları

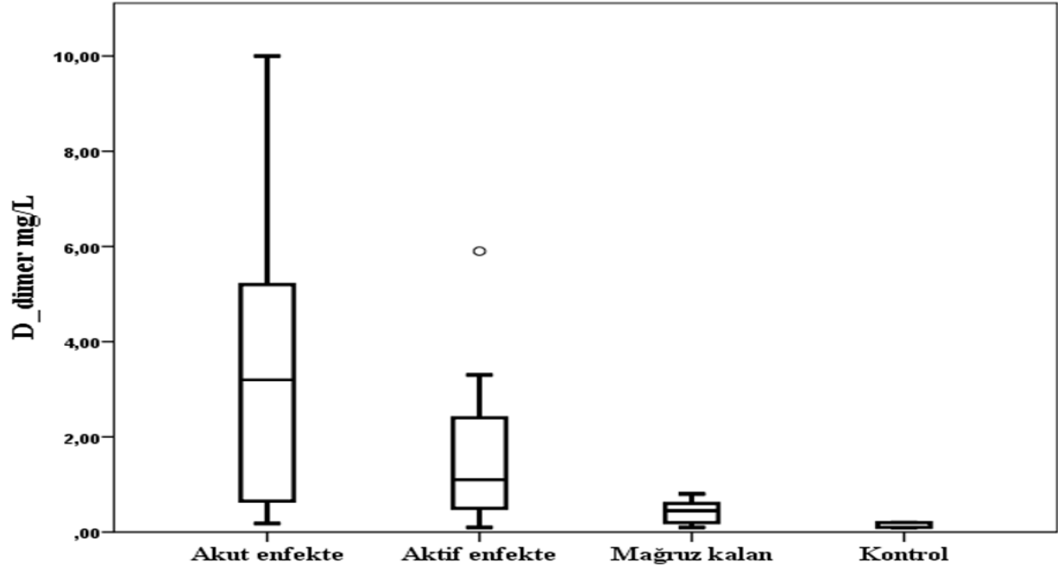
Vitamin D yönünde yapılan istatistiksel analizlerde genel gruplar arası farklılık $p=0,04$: akut enfekte grup ile kontrol grubu arasında $p=0,23$ düzeyinde, maruz kalan grup ile kontrol grubu arasında $p=0,004$ olarak belirlendi (Şekil 1) (Tablo 4).



Şekil 1. Çalışma ve Kontrol Grubu Köpeklerde Vitamin D Seviyeleri, * $p < 0,05$

3.2. D-dimer Analiz Sonuçları

D-dimer için genel gruplar arası farklılık $p=0,01$: kontrol grubu ile aktif enfekte arasında $p=0,022$, kontrol grubu ile akut enfekte grup arasında $p=0,004$ düzeyinde anlamlı farklı oldukları belirlendi (Şekil 2) (Tablo 4).



Şekil 2.Çalışma ve Kontrol Grubu Köpeklerde D-dimer Seviyeleri

3.3. Olgulara Ait Moleküler ve Serolojik Analiz Sonuçları

PCR analizleri ile gerek akut gerekse aktif enfeksiyon görülen köpeklerde PCR sonuçları pozitif (Tablo 5).

Tablo 5. Moleküler ve Serolojik Analiz Sonuçlarına Ait Kalitatif Değerlendirmeler

	PCR	ELISA
Akut CME	+	-
Aktif CME	+	+
Maruz Kalma	-	-

4. TARTIŞMA

Ehrlichiosis köpeklerde anemi, trombositopeni ve çeşitli sistemik bulgularla seyreden vektör kaynaklı hastalıktır. Tromboemboliler kanama bozuklukları ile seyreden hastalıklarda mortalite düzeylerini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Ehrlichiosis gibi kanama bozukluğuna sebep olan hastalıklarda derin ven trombozları ve tromboembolilerin meydana geldiği bilinmekte ancak tanının konulabilmesi için ileri diyagnostik tekniklere ihtiyaç duyulmaktadır (Griffin ve ark.,2003). Bu çalışmada, Ehrlichiosis ile monoenfeksiyonlu köpeklerde D-dimer seviyelerinin belirlenmesi amaçlandı. Buna bağlı olarak yüksek ateş lenfadenopati ve iştahsızlık gibi klinik semptomlar gösteren ve hasta başı hızlı ELISA testi Snap 4dx sonuçlarına göre Ehrlichiosis tanısı konulan köpekler (n=27) ile klinik ve laboratuvar değerlendirmeleri sonucunda sağlıklı olduğu tespit edilen (n=6) köpekler çalışmaya alındı. Ehrlichiosis ile enfekte köpeklerin kan D-dimer (3059.0 ± 1074.4 ng/ml) seviyeleri sağlıklı köpeklere göre istatistiksel olarak ($P=0.011$) yüksek bulundu. Sonuç olarak Ehrlichiosislu köpeklerde D-dimer'ın ileri diyagnostik teknikler ile birleştirilerek veteriner sahada tromboembolilerin tanısısal anlamda yaklaşımına ışık tutabilecek biyobelirteçler arasına girebileceği düşünüldü.

Tromboembolik hastalıkların tanısı, klinik bulguların ve laboratuvar değerlerinin bir kombinasyonuna göre değerlendirildiğinde, diagnostik doğruluğa sahip değildir. Yaygın intravasküler koagülasyon (DIC) ve pulmoner tromboemboli (PTE) olan hastaların, bu bozuklukların varlığını veya yokluğunu belirlemede doğru sonuçlar veren ve bu gibi hiperkoagülatif durumlar için basit, hassas ve özel bir diagnostik testten faydalanabilmeleri amacıyla yapılan araştırmalar D-dimer testinin geliştirilmesini sağlamıştır (Griffin ve Kumar,2003). D dimer molekülünün bir kısmı antijenik olup ve varlığı tespit edilirken gerçekleştirilen laboratuvar testlerinin temelini oluşturur. İnsan D dimerine karşı bir antikor kullanan lateks aglütinasyonu, kırmızı kan hücresi aglütinasyonu, immünoturbido metrik tahlil ve enzimatik immün tahlil gibi çeşitli test metodolojilerigeliştirilmiştir. Aglütinasyon testleri D dimerin sadece kalitatif veya yarı-kantitatif değerlendirmeleridir, ancak klinik bir durumda

hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilme avantajına sahiptir. İmmünoturbidometrik ve enzimatik immün tahlil (ELISA) tipik olarak özel ekipman gerektiğinden referans laboratuvarlarında yapılan testlerin başında gelir (Stokol 2000, Scott ve ark., 2001, Nelson ve Andreasen, 2003). D-dimer, tromboembolik hastalıkların tanısında oldukça duyarlı, ancak belirli bir tromboembolik bozukluk için spesifik değildir. Bu çalışmada ehrlichiozisli tüm köpeklerde D dimer seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu durum D-dimer'in ehrlichiozis gibi trombositopeni ile karakterize hastalıklarda bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür.

DIC'li köpeklerde D-dimer ve FSP arasında genellikle yüksek bir korelasyon vardır. DIC'li köpeklerde FDP ve D dimerlerini lateks aglütinasyon ile değerlendiren bir çalışmada, DIC'li tüm köpeklerin FSP veya D dimer açısından pozitif test sonuçlarına rastlanmıştır. Başka bir çalışmada, pulmoner veya sistemik tromboembolili köpeklerde FSP bulunmamıştır, ancak D dimer testinin pozitif olması araştırmacıları tromboembolizm tanısı için daha yararlı olduğu sonucuna sevk etmiştir. İki çalışma hiperkoagülatif duruma neden olduğu bilinen spesifik hastalıkları değerlendirmiştir: parvoviral enteritis ve immün aracılı hemolitik anemi gibi tromboembolizm bulgularına gelişen hastalarda saptanabilir D dimer düzeyleri gözlenmemiştir. IMHA'lı ve DIC bulguları görülen çoğu köpekte D dimeri saptanabilir seviyededir. Kanin spesifik test kullanılarak normal köpeklerin tespit edilemeyen D dimer seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Kanama olan köpeklerde de yüksek D dimer seviyelerine rağmen ortalama değer DIC'li köpeklerden daha düşüktür (Griffin ve Kumar,2003). Ancak D-dimer seviyelerinin hastalığa spesifik olmaması nedeniyle yüksek D-dimer seviyelerinin destekleyici olarak düşünülmesinin daha doğru olacağı kanısına varıldı. Bununla beraber D-dimer seviyesi yüksek hastaların tromboz için dikkatlice değerlendirilmesinin gerekliliği göz önünde bulundurulmalıdır.

Son yapılan çalışmalarda D vitaminin yağda çözünen bir vitaminden çok hormon benzeri yapı arz eden bir sterol olduğu ve asıl metabolizmasına ek olarak yaşamsal olgularda anahtar görevi görebileceği düşünülmektedir (Kalkanoğlu, 2010; Jussilaa ve ark, 2012; Holick ve Chen., 2008; Dusso ve ark, 2005). Çeşitli

hastalıklarla ilişkili olabileceği öne sürülen vitamin D'nin yangı ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Periferel kanda bulunan yangı hücrelerinde VDR'nin belirlenmesi, bahsi geçen vitaminin bağışıklık sisteminde de etkili olabileceğine dikkat çekmektedir. D vitamini yetersizliği, bağışıklık olaylarında T hücre yanıtında azalmaya neden olmaktadır (Nicholson ve ark, 2012). Bu nedenle, D vitamininin T hücre gelişimi üzerine de etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Ulitsky ve ark., 2011). İki farklı T hücresi bulunmaktadır (Raman ve ark., 2011; Özkan ve Döneray, 2011). Th1 (T1 yardımcı),proinflamatuvar sitokin üretilmesini stimüle ederek güçlü bir yanıt oluştururken, Th2 (T2 yardımcı) antiinflamatuvar sitokin salınımını sağlar (Raman ve ark., 2011; Özkan veDöneray., 2011). D vitamini, Th1 hücre proliferasyonunu baskılamakta, böylelikle interferon gama ve interlöykin-2 benzeri proinflamatuvar sitokinlerin meydana gelişini baskılamaktadır (Lim ve ark., 2005; Nerich ve ark., 2011). D vitamini eksikliğinde aktivasyona uğrayan ve Th1 cevabı ile yakın ilişkide bulunan proinflamatuvar sitokinler çok farklı hastalıkların oluşumda varlığını sürdürür (Cantorna ve Mahon, 2014; Özkan ve Döneray, 2011; Hassan ve ark., 2013). Ehrlichiosis hastalığında da özellikle akut enfekte formda serum Vitamin D seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla çok düşük bulunması etkili bir immun cevabın gelişemediğini ve hastalığın ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı kanaati oluşturmuştur.

Yapılan bir çalışmada, sağlıklı ve kritik hastalığı bulunan köpeklerde serum vitamin D seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, klinik, biyokimyasal ve hematolojik parametrelere ek olarak yoğun bakım ünitesinde kalan 99 köpekte vitamin D ölçülmüştür. Sonuç olarak kritik hasta köpekler ile ve sepsisli hastalarda kontrol grubuna kıyasla serum vitamin D seviyeleri önemli derecede düşük bulunmuştur (Jaffey, 2018). Ayrıca yine birçok çalışmada D vitamininin, enfeksiyöz ajanlara karşı bağışıklık sistemini edinsel olarak uyardığı (White, 2008), bununla birlikte farklı otoimmun ve inflamatuvar bozukluklarda adaptif immun sistem üzerine de etkili olduğu ayrıca hastalık oluşma sıklığı ve metabolizmaya olan olası etkileri de azalttığı belirlenmiştir (Dov ve ark., 2013). Çalışmamızda ehrlichiosis'e gerek maruz kalan, gerekse aktif veya akut enfekte hastalarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kan D vitamini seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu duruma bağlı olarak Vitamin D'nin

başışıklıkta aktif rol oynadığı ve kan vitamin D seviyelerinin düşük bulunmasının ehrlichiosis hastalığına zemin hazırlayabileceğini düşündürmüştür.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Plazmada şekillenen fibrinolitik aktivitenin önemli bir belirteci olan D-dimer düzeyleri travma, cerrahi, enfeksiyon, yangı, gebelik, DIC, venöz tromboemboli, iskemik kardiyomyopati ve tromboz gibi birçok klinik durumda artabilir. Çapraz bağlı fibrinin, plazmin vasıtası ile enzimatik yıkımının ürünü olan D-dimer, trombüsün ana komponenti olan fibrin, koagülasyonun aktive oluşuyla şekillenir. Fibrinin plazminojen kanalıyla çözünmesi, D-dimer'i de içerisine alan spesifik yıkımlanma ürünlerinin oluşumuyla sonuçlanmaktadır. D-dimer çapraz bağlı bazı parçalar plazmin enziminin aktive olmasıyla pıhtıdan salınırlar ve kan akımına katılırlar. D-dimer normal yara iyileşme süreci ve kanın pıhtı oluşumunun bir parçası olarak üretilir. Patolojik olarak herhangi bir nedene bağlı pıhtılaşma meydana geldiğinde; D-dimer analizi istem dışı trombozisi gösteren değerli belirteç halini alır. Bu çalışmada da ehrlichiosisli köpeklerde D-dimer seviyeleri önemli derecede artmış olup, diğer klinik, hematolojik ve laboratuvar tetkikleri ile beraber yardımcı bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda yer alan köpeklerde daha önce etkene maruz kalan yada etkenle gerek aktif gerekse de akut enfekte hastalarda serum vitamin D seviyeleri düşük bulunmuştur. Bu durumun vitamin D'nin bağışıklık sistemi ile yakından ilişkide olduğu ve serum düşük D vitamini seviyelerin ehrlichiosis hastalığının gelişime zemin hazırlayabileceği sonucuna varıldı. Kan serumunda D vitamini düşük olarak belirlenen hastalarda enfeksiyöz hastalıklara yatkınlık oluşabileceği ve bu durumun sağaltımında tekrarlayan ölçümlerle monitörizasyonu doğrultusunda değerlendirilmesi ve uygun dozajlama ile rasyonel uygulama şekli doğrultusunda D vitamini takviyelerinin yapılmasıdır. Yine d-dimer seviyeleri kanda yüksek bulunan köpeklerde tromboembolizme yatkınlık gelişebileceği bu nedenle ehrlichiosis gibi vektör aracılı kan paraziti hastalıklarda prognozun belirlenmesinde tekrarlayan ölçümlerin gerçekleştirilmesi gerektiği, d-dimer seviyelerinin yüksek kaldığı durumlarda uygun antikoagülan sağaltımın eşlik ettirilmesi gerektiği öne sürülebilir.

ÖZET***EHRLİCHİA CANİS İLE ENFEKTE KÖPEKLERDE D VİTAMİNİ
VE D-DİMER SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ***

Bu çalışmada Ehrlichiozisli köpeklerde hastalığın farklı evrelerinin, kan Vitamin D seviyeleri ile koagülasyon parametrelerinden D-dimer düzeyleri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın materyalini farklı ırk, yaş ve her iki cinsiyetten 33 köpek oluşturdu. Klinik bulgularla birlikte trombositopeni tespit edilen ve edilmeyen 33 köpekte klinik muayene ve laboratuvar testleri ile kesin tanı ve ayırıcı tanıya gidildi. Tüm olgular hızlı Snap 4DX test kiti ile Ehrlichiozis hastalığı yönünden değerlendirildi. Ayrıca PCR analizi ile de moleküler olarak hastalığın tanısı konuldu. Yine kontrol ve çalışma grubu köpeklerde kan D-vitamini ve D-Dimer seviyeleri belirlendi. Yapılan analizlerde kontrol grubuna kıyasla çalışma grubu köpeklerde D-Dimer seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yine kontrol grubu ile çalışma grubu köpeklerin kan D-vitamini seviyeleri kıyaslandığında ise Ehrlichiozisli köpeklerde kan D- vitamini seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada ehrlichiozisli köpeklerde D-dimer seviyeleri önemli derecede artmış olup, diğer klinik, hematolojik ve laboratuvar tetkikleri ile beraber yardımcı bir biyobelirteç olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca köpeklerde daha önce etkene maruz kalan yada etkenle gerek aktif gerekse de akut enfekte hastalarda serum vitamin D seviyeleri düşük bulunmuş olup bu durumun vitamin D'nin bağışıklık sistemi ile yakından ilişkide olduğu ve serum düşük D vitamini seviyelerinin ehrlichiozis hastalığının gelişimine zemin hazırlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimer : Ehrlichiozis, D Vitamini, D-dimer, Köpek

SUMMARY

DETERMINATION OF VITAMIN D AND D-DIMER LEVELS IN DOGS WITH EHRLICHIA CANIS INFECTION

In this study, it was aimed to determine the blood vitamin D and D-dimer levels in dogs with Ehrlichiosis. The material of this study consisted of 33 dogs of different breeds, ages and both sexes. In 33 dogs with and without thrombocytopenia with clinical findings, definitive diagnosis and differential diagnosis were made with clinical examination and laboratory tests. All patients were evaluated for Ehrlichiosis with rapid Snap 4DX test kit. In addition, the diagnosis of the disease was made by PCR analysis. Blood D-Dimer levels were determined in control and study groups. D-Dimer levels were significantly higher in the study groups when compared with the control group. Ad also when blood D-vitamin levels of control and study groups were compared, it was found that blood D-vitamin levels were significantly lower in dogs with Ehrlichiosis. In conclusion, in this study, D-dimer levels were significantly increased in dogs with ehlichiosis and it was thought to be an adjunct biomarker with other clinical, hematologic and laboratory tests. In addition, serum vitamin D levels were found to be low in both active and acute infected patients in dogs previously exposed to the causative agent, which is closely related to the immune system of vitamin D, and serum low vitamin D levels may pave the way for the development of ehrlichiosis disease.

Key Words; Ehrlichiosis, D-dimer, Vitamin D, Dog

6. KAYNAKLAR

- ANANTHAKRISHNAN A.N., ULITSKY A., NAIK A., SKAROS S., ZADVORNOVA Y., BINIÖN D.G., ISSA M.(2011). Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life. *Journal of Parenter Enteral Nutrition*, **35(3)**: 308-16.
- ASI T., 1999. Tablolarla Biyokimya I-II, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara.
- ASSARASAKORN, S., KAEWTHAMASORN, M., MANACHAI, N. A. (2008). 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*, **17**: 237-243.
- BANETH G., WANER T., KOPLAH A., WEINSTAIN S., KEYSARY A. (1996). Survey of *Ehrlichia canis* Antibodies among Dogs. In Israel, *Vet. Rec*, **138**:257-259.
- BATMAZ H., NEVO E., WANER T., SENTURK S., YILMAZ Z., HARRİ S. (2001). Seroprevalence of *Ehrlichia canis* antibodies among dogs in Turkey, *Vet Rec*, **148**: 665–666.
- Bikle DD. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. *Curr Osteoporos Rep*. 2009;**7(2)**:58–63.147.
- BLOMBACK B., HESSEL B., HOGG D., THERKILDSSEN L. A (1978). Two-step fibrinogen–fibrin transition in blood coagulation. *Nature*.;**275**:501-505.
- BOTROS B.A., ELMOLLA M.S., SALİB A.W., CALAMAIÖ C.A., DASCH G.A., ARTHUR R.R. (1995) . Canine ehrlichiosis in Egypt: seroepidemiological survey, *Onderstepoort J. Vet. Res*. **62**:41-43
- BOWMAN D.D., LYNN R.C., EBERHARD M.L., ALCARAZ A. (2003). *Arthropodes. Georgy's Parasitology for Veterinarians*, Eight ed, New York, s. 48-59.
- BÖRKÜ M.K., GÜZEL M., CINGİ C.C., URAL K., KARAKURUM M.C. Kronik Ehrlichiozisli bir köpekte renal yetmezlik olgusu. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2003;**14(2)**:94-96.

- BRAMER W.G., SCHAEFER, J.J., WANGER E.R., EWING S.A., RIKIHISA Y., NEEDHAM G.R., JITTAPALAPONG S., MOORE D.L., STICH R.W., (2005). *Transstadial and intrastadial experimental transmission of Ehrlichia canis by male Rhipicephalus sanguineus*. Vet Parasitol, **131**: 95–105.
- BREITSCHWERDT E.B. (1995). The Rickettsioses In: Text Book of Veterinary Internal Medicine, 4th Edition, Chapter 67 WB Saunders Comp, p:376-384, Philadelphia
- BREITSCHWERDT E.B. (2000). The Rickettsioses, Textbook of Veterinary Internal Medicine Disease of the Dog and Cat WB Saunders: p:400-408
- CANTORNA M.T., YU S., BRUCE D.(2008). The paradoxical effects of vitamin D on type 1 mediated immunity. Mol Aspects Med, **29**:369–75.
- CASTRO M.B., MACHADO R.Z., AQUINO L.P.C.T., ALESSI A.C. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. Vet Parasitol, **119**: 73–86.
- CHEN T.C., PERSONS K.S., LU Z., MATHIEU J.S., HOLICK M.F.(2000). An evaluation of the biologic activity and vitamin D receptor binding affinity of the photoisomers of vitamin D3 and previtamin D. J Nutr Biochem.;**11**: 267-272.
- CODNER E.C., FARRI-SMITH L.L. (1986). Charecterization of the subclinical phase of Ehrlichiosis in dogs, J. Am. Vet. Med. Assoc, **189(1)**: 47–50.
- DÌ NISÌO M., SQUIZZATO A., RUTJES A.W., BULLERH.R., ZWINDERMAN A.H., BOSSUYT P.M.(2007). Diagnostic accuracy of D-dimer test for exclusion of venous thromboembolism: a systematic review. J Thromb Haemost.;**5**:296-304.
- DİK B.,(2003). Veteriner Entomoloji, S.Ü. Basımevi, s.167-188.
- DODURKA H.T., BAKIREL U., (2002). Bir köpekte Ehrlichiosis olgusu. İÜ Vet. Fak Derg, **28**: 11-16.
- DOV T., GİZİ WILDBAU W., VARDİT G., OLEG V., YOSEF W., NATHAN K., AMOS E.(2013).The Role of Vitamin D Receptor in Innate and Adaptive Immunity: A Study in Hereditary Vitamin D–Resistant Rickets Patients. J Clin Endocrinol Metab.

- DUSSO A.S., BROWN A.J., SLATOPOLSKY E. (2005). Vitamin D, American Journal Of Physiology - Renal Physiology Published, 289.
- ERDEĞER, J., SANCAK, A., ATASEVEN, L., (2003). Köpeklerde Ehrlichia canis'in indirekt fluoresan antikor (IFA) testi ve Dot-ELISA ile saptanması. Turk J Vet Anim Sci, **27**: 767-773.
- FROEHLING D.A., DANIELS P.R., SWENSEN S.J., (2007). Evaluation of a quantitative D-dimer latex immunoassay for acute pulmonary embolism diagnosed by computed tomographic angiography. Mayo Clin Proc.;**82**:556-560.
- GRANT W.B., HOLICK M.F.(2005). Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. Altern Med Rev;**10**:94-111.
- GREENBERG C.S., DEVINE D.V., MCCRAE K.M.(1987).Measurement of plasma fibrin D-dimer levels with
- GRİFFİN A., CALLAN M.B., SHOFR F.S. (2003). Evaluation of a canine D-dimer point of care test kit for use in samples obtained from dogs with disseminated intravascular coagulation, thromboembolic disease, and hemorrhage. Am J Vet Res;**64**:1562-1569.
- GRİFFİN M.D., KUMAR R.(2003). Effects of 1alpha,25(OH)2D3 and its analogs on dendritic cell function. J Cell Biochem, **88**:323-6.
- GROBER U., SPITZ J., REICHRATH J., KISTERS K., HOLICK M.F.(2013). Vitamin D: Update2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. Dermatoendocrinol.;**5**(3):331-347.
- HARRUS S, KASS PH, KLEMENT E, WANER T (1997) Canine Monocytic Ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease, Vet Rec, **141**: 360-363.
- HARRUS S., WANER T., AIZENBERG I., JONGEGEJAN F., CORNELISSEN A.W. (1999) .Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic Ehrlichiosis, J. Clin. Microbiol, **37**: 2745-2749.

- HASSAN, V., HASSAN, S., SEYED-JAVAD, P., AHMAD, K., ASİEH, H., MARYAM, S. FARİD, F. ANDSİAVASH, A.(2013). Association between Serum 25 (OH) Vitamin D Concentrations and Inflammatory Bowel Diseases (IBDs) Activity. Medical Journal of Malaysia, 2013, **68(1)**:34-8.
- HEİLBORN J.D., NİLSSON M.F., KRATZ G. WEBER G., SORENSEN O., BORREGAARD N. (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. J Invest Dermatol, **120**:379–89.
- HOLİCK M.F., CHEN T.C. (2008).Vitamin D Deficiency: A Worldwide Problem With Health Consequences, The American Journal Of Clinical Nutrition, 1080-1086.
- JUSSİLAA, A., VİRTAC, L.J., SALOMAAD, V., MÄKİE, J., JULAE, A., FÄRKKİL, M.A.(2012). High and increasing prevalence of inflammatory bowel disease in Finland with a clear North–South difference. Journal of Crohn's and Colitis.
- KALKANOĞLU S.(2010). D vitamini Metabolizması, Kalsiyum ve D vitamini Metabolizması, Danone Enstitüsü .
- KARAER, Z., YUKARI, B.A., AYDIN, L. (1997). Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri, (Eds.) Özcel, M.A. ve Daldal, N. Parazitolojide Artropod Hastalıkları-Vektörler, Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın no:**13**, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir.
- Kerem U., Mehmet G., Abidin A., Bulent U. 2017
- LARRY, S., JANOVY, J. (2006). Foundations of parasitology. 7th ed. MC Graw Hill Companies, pp: **590**.
- LEIB M.S., MONRROE W.E. (1997) . *Ehrlichiosis*, Practical Small Animal Internal Medicine. W. B. Saunders, p: 864:869
- LİM W.C., HANAUER S.B., Lİ Y.C.(2005). Mechanisms of disease: vitamin D and inflammatory bowel disease. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology,**2**: 308–315.

- MATTHEWMAN L.A., KELLY P.J., MAHAN S.M., SEMU D., TAGWIRA M., BOBADE P.A., BROUQUÉ P., MAJON P.R., RAOULT D. (1993). *Western blot and indirect with fluorescent antibody testing for antibodies reactive with Ehrlichia canis in sera from apparently healthy dogs in Zimbabwe, JS Afr Vet Assoc.* **64(3)** :111-115
- MATUS, R.E., LEIFER, C.E., HURVITZ, A.I. (1987). Use of plasmapheresis and chemotherapy for treatment of monoclonal gammopathy associated with Ehrlichia canis infection in a dog. *JAVMA.* **190(10)**: 1302-1304.
- MERDİVENCİ A. (1969). Türkiye Keneleri Üzerine Araştırmalar. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay.. Kutulmuş Matbaası, İstanbul, p: 185-199.
- MERKE J., HOFMANN W., GOLDSCHMİDT D., RITZ E. (1987). Demonstration of 1,25 (OH) 2vitamin D3 receptors and actions in vascular smooth muscle cells in Vit-ro. *Calcif Tissue Int*; **41**:112-114
- MYLONAKIS M.E., DAY M.J., SIARKOU V., VERNAU W., KOUTINAS AF. (2010). *Absence of myelofibrosis in dogs with Ehrlichia canis-induced myelosuppression. Journal of Comparative Pathology,* **142**:328- 331.
- NAZLIKUL H. Tamamlayıcı Tıp ve Regülasyon 2006.
- NELSON O.L, ANDREASEN C. (2003) . The utility of plasma d-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *J Vet Intern Med*; **17**:830-834.
- NERİCH V., JANTCHOU P., BOUTRON-RUAULT M.C., MONNET E., WEILL A., VANBOCKSTAEL V., AULELEY G.R., BALAIRE C., DUBOST P., RİCAN S., ALLEMAND H., CARBONNEL F.(2011). Low exposure to sunlight is a risk factor for Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics,* **33**: 940–945.
- NİCHOLSON I., DALZELL A.M, EL-MATARY W.(2012). Vitamin D as a therapy for colitis: a systematic review. *Journal of Crohns Coliti,* **6(4)**:405-411.
- ÖZKAN B., DÖNERAYH. (2011). D Vitaminin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi,* **54**:99-119.
- RAMAN M., MİLESTONE A.N., WALTERS J.R., HART A.L., GHOSH S. (2011). Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Gastroenterology,* **4(1)**:49-62.

- RIKIHISA Y., EWING S.A. FOX J.C, SIREGAR., PASARIBU F.H., MALOLE B.M. (1992). *Analyses of Ehrlichia canis and Canine Granulotic Ehrlichia infection*, J. Clin. Microbiol, **30**: 143–149.
- SCOTT-MONCRIEFF J.C., TREADWELL N.G., MCCULLOUGH S.M. (2001). Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune mediated hemolytic anemia. J Am Anim Hosp Assoc: **37**:220-227.
- STEIN P.D. FOWLER S.E., GOODMAN L.R.(2006) Multidetector computed tomography for acute pulmonary embolism. N Engl J Med.; **354**:2317-2327.
- STOKOL T., BROOKS M.B., ERB H.N. (2000) . D dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. Am J Vet Res; **61**:393-39
- SUTO Y., SUTO A., INOKUMA H., OBAYASHI H., HAYASHI T. (2001). First confirmed canine of Ehrlichia canis infection in Japan, Vet. Rec., **148**:809-811
- SUTTON A.L., MACDONALD P.N. (2003). Vitamin D: more than a “bone-a-fide” hormone. Mol Endocrinol.; **17**(5):777-791.
- TROY G.C., VYLGAMOTT J.C., TURNWALT G.H. (1980). Canine ehrlichiosis: a retrospective study of 30 naturally occurring cases, j. Am. Anim. Assoc., **16**:181:187
- TSACHEV I. (2006). Detection of Antibodies Reactive with Bulgaria Turk, J. Vet. Anim. Sci., **30**:425-426
- TURGUT K.(2000). Klinik Laboratuvar Teşhis. Konya: Bahçivanlar Basım Sanayi; p.123-165.
- UNVER A., OHASHI N., TAJIMA T., STICH R., GROVER D., RIKIHISA Y. (2001). *Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of Ehrlichia canis in dogs, ticks, and cell at different temperatures*, Infect Immun, **69**:6172-6178.
- WANER T., ROSNER M., HARRUS S., NAVEH A., ZASS R., KEYSAR A. (1996). Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute. Ehrlichia canis infection, Vet Parasitol **63**:331-335
- WANER T., STRENGER C., KEYSAR A., HARRUS S. (1998). Kinetics of serologic cross-reactions between ehrlichia canis and the Ehrlichia phagocytophila genogroups in experimental E.canis infection in dogs, Vet immunol immopathol **66**:237-243.

WANER, T., HARRUS, S., BARK, H., BOGIN, E., AVIDOR, Y., KEYSARY, A., (1997) Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. *Veterinary Parasitology*, 69:307-317.

WANNER T, HARRUS S, JONGEJAN F, BARK H, KEYSARS A (2001) Cornelissen AW: *Significance of serological testing for ehrlichial disease in dogs with special emphasis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis*, *Vet Parasitol*, **95**:1-15.

WHITE JH.(2008) Vitamin D signaling, infectious diseases, and regulation of innate and adaptive immunity. *Infect Immun.*,**76**:3837-3843.

WOODY BJ, HOSKINS JD (1991) Ehrlichial diseases in dogs. *Vet Clin North Am*, **21**:75-98

ZITTERMANN A. (2003) Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr*;**89**:552-72.