

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AVANOS YÖRESİ SOKAK KÖPEKLERİNDE
Dirofilaria immitis'in PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Feray YABANERİ**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2014
KAYSERİ**

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

AVANOS YÖRESİ SOKAK KÖPEKLERİNDE
***Dirofilaria immitis*'in PCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan
Feray YABANERİ

Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2013-4316 nolu proje ile desteklenmiştir.

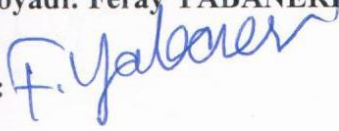
Haziran 2014
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Feray YABANERİ

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Avanos Yöresi Sokak Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in PCR ile Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

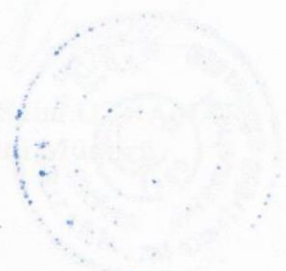
Feray YABANERİ

Danışman

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında Feray YABANERİ tarafından hazırlanan "Avanos Yöresi Sokak Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in PCR ile Araştırılması" konulu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

05/06/2014

JÜRİ :

İmza

Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM (Vet. Fak. Parazitoloji AD)

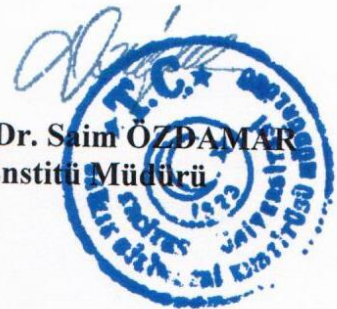
Üye: Doç. Dr. K. Semih GÜMÜŞSOY (Vet. Fak. Mikrobiyoloji AD)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 13.06.2014 tarih ve 632 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

13 / 06 / 2014

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Başta tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda sonsuz desteğiyle gelişmeye katkıda bulunan Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdullah İNCİ'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmaya başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Önder DÜZLÜ, Öğr. Gör. Dr. Zuhale ÖNDER ve Araş. Gör. Arif ÇİLOĞLU'na, Avanos Belediyesi'nce yürütülen "Sokak Köpeklerini Kısırlaştırma Projesi" kapsamında çalışma materyalinin temininde yardımcı olan sayın Vet. Hek. Ahmet DEMİRCİOĞLU'na laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Biyolog Zekiye KOÇER, Vet. Hek. Gamze YETİŞMİŞ, Biyolog Gözde ŞAHİNGÖZ'e ve çalışma süresince malzeme bazında TYL-2013-4316 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan sevgili eşime ve yaşamımın her döneminde bana duydukları güven için aileme teşekkürü borç bilirim.

**AVANOS YÖRESİ SOKAK KÖPEKLERİNDE
Dirofilaria immitis'in PCR İLE ARAŞTIRILMASI
Feray YABANERİ**

T.C.
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2014
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

KISA ÖZET

Bu çalışma, Avanos ve çevresindeki köpeklerde filarial enfeksiyonların yayılışını tespit etmek amacıyla Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında toplam 138 köpekte yapılmıştır. Bu amaçla alınan her kan örneği öncelikle natif, Modifiye Knott ve membran filtrasyon yöntemleri daha sonra Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'na tabii tutularak perifer kandaki mikrofilerler yönünden incelenmiştir. Kan örneği alınan köpeklerin yaş, cinsiyet ve ırkları kayıt altına alınmıştır. Yapılan analizler sonucu Avanos yöresindeki 138 köpeğin 3'ü (%2.17) *Dirofilaria immitis* pozitif olarak saptanmış, diğer filarial nematod enfeksiyonlarına rastlanmamıştır. Pozitif bulunan 3 örneğin 2'si natif yöntem, modiye knott yöntemi ve membran filtrasyon yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemlerle pozitif bulunan 2 örnek de dahil olmak üzere toplam 3 örnek PCR tekniği ile pozitif bulunmuştur. *D. immitis* mikrofilerlerinin natif yöntemde yavaş ve yılanvari hareket edip mikroskop sahası dışına çıkmadığı, Modifiye Knott ve membran filtrasyon yöntemlerinde kılıfsız, ön kısmının konik biçimde sivrilerek sonlanıp kuyruklarının düz olduğu saptanmıştır. 5.8S-ITS2-28S ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) spesifik gen bölgelerini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile yapılan PCR sonucu pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan bir izolat jelden pürifiye edilerek her iki gen bölgesi için çift yönlü sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Elde edilen sekans dizilimleri ilgili gen bölgeleri yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki diğer bazı *D. immitis* izolatlarının gen dizilimlerinin filogenetik analizleri ve pairwise kıyaslamaları yapılmıştır. Yapılan analizler sonucu Avanos yöresinden elde edilen *D. immitis* izolatının 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla %99.5-%100 oranlarında, parsiyel COI gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre ise %94.3-%100 oranlarında identiklik gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Avanos yöresi sokak köpeklerinde ilk kez *D. immitis* enfeksiyonlarının moleküler prevalansı belirlenmiş ve elde edilen izolatın 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi yapılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Dirofilaria immitis*, Köpek, Mikrofiler, Prevalans, Moleküler Karakterizasyon, Avanos

INVESTIGATION OF *Dirofilaria immitis* IN STRAY DOGS BY PCR TECHNIQUE IN AVANOS PROVINCE

Feray YABANERİ

Erciyes University, Graduate School of Health Science

Department of Veterinary Parasitology

Master's Thesis, June 2014

Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ABSTRACT

This study was carried out between May-September 2013 to determine the prevalence of filarial infections in 138 dogs in Avanos and vicinity. For this aim, first all blood samples were examined by wet mount (direct microscopic examination), Modified Knott's and membrane filtration techniques and then by using Polymerase Chain Reaction techniques in order to detect the circulating microfilaria in peripheral blood. The age, sex and breed of dogs were recorded. Three (%2.17) out of 138 dog blood samples were found to be *Dirofilaria immitis* positive whereas no other filarial species were found in Avanos and vicinity. Two out of 3 positive samples were found by wet mount (direct microscopic examination), Modified Knott's and membrane filtration techniques and totally three sample were found positive by only using PCR technique. The microfilaries of *D.immitis* observed to exhibit sluggish and undulating movements and not to move across the field of view in the wet mount technique and in the Modified Knott and membrane filtration techniques, microfilaries determined to be unsheathed, tapered conically from the anterior extremity and straight tailed. Genomic DNAs from blood samples were analyzed by PCR using the primers specific to cytochrome oxidase subunit 1 (COI) and 5.8S-ITS2-28S gene regions. The amplified fragments were sequenced in both directions using the same primers. Pairwise analyses of the obtained DNA sequences and multiple alignments with some other *D. immitis* strains from different groups available in the GenBank were done and phylogenies were investigated. The identity rates between the obtained *D. immitis* isolate and other isolates from the world was determined as 99.5%-100% and 94.3%-100% according to the phylogenetic analyses of 5.8S-ITS2-28S and COI gene regions, respectively.

In conclusion, the molecular prevalence of *D. immitis* from stray dogs of Avanos region was firstly revealed and the molecular characterization and phylogenetic analyses of 5.8S-ITS2-28S and COI gene regions of the obtained isolate were investigated with this study.

Key Words: *Dirofilaria immitis*, Dog, Microfilaria, Prevalence, Molecular characterization, Avanos

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	 1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SİSTEMATİK VE TARİHÇE.....	3
2.2. MORFOLOJİ.....	5
2.2.1. Erişkinlerin Morfolojisi.....	5
2.2.2. Mikrofilerlerin Morfolojisi.....	6
2.3. BİYOLOJİ.....	7
2.3.1. Arakonaktaki Gelişim.....	7
2.3.2. Sonkonaktaki Gelişim.....	8
2.4. EPİDEMİYOLOJİ	9
2.4.1. Sıcaklık ve Nem	9
2.4.2. Mevsim.....	10
2.4.3. Vektör (AraKonak) Popülasyonu	10
2.4.4. Mikrofiler ve Erişkin Parazit Sayısı	12
2.4.5. Konak Bağışıklığı.....	12
2.4.6. Konağın Yaşı, Cinsiyeti ve Yaşam Alanı.....	12
2.4.7. Parazitin Yaşam Süresi.....	13

2.4.8. İntrauterin Bulaşma.....	13
2.4.9. Mikrofileremi	13
2.4.10 <i>Dirofilaria immitis</i> Enfeksiyonlarının Türkiye’deki Yayılışı.....	15
2.4.11. <i>Dirofilaria immitis</i> Enfeksiyonlarını Dünya’daki Yayılışı	16
2.5. PATOGENEZ	17
2.6. KLİNİK SEMPTOMLAR	21
2.7. TEŞHİS YÖNTEMLERİ	23
2.7.1. Konvansiyonel Yöntemler ile Teşhis.....	23
2.7.1.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Natif)	23
2.7.1.2. Sürme Preparat Yöntemi.....	23
2.7.1.3. Saponin Konsantrasyon Yöntemi	23
2.7.1.4. Mikrohematokrit-Kapillar Sedimentasyon Yöntemi	24
2.7.1.5. Modifiye Knott Tekniği.....	24
2.7.1.6. Membran Filtrasyon Tekniği	24
2.7.1.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi	24
2.7.2. Serolojik Yöntemler ile Teşhis	27
2.7.3. Moleküler Teknikler ile Teşhis.....	28
2.7.4. Radyolojik Tanı Yöntemleri	29
2.8. TEDAVİ	29
2.9. KORUNMA VE KONTROL.....	31
2.10. <i>Dirofilaria immitis</i> VE ENDOSİMBİYONT <i>Wolbachia</i>	35
2.11. <i>Dirofilaria immitis</i> ’in ZOONOTİK ÖNEMİ	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. SAHA ÇALIŞMALARI	41
3.1.1. Araştırma Sahası	41
3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması	46
3.2. LABORATUVAR ÇALIŞMALARI	47
3.2.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Natif)	47
3.2.2. Modifiye Knott Yöntemi	47
3.2.3. Membran Filtrasyon Testi	47
3.2.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu.....	48
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	49

3.2.6. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi.....	50
3.2.7. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in 5.8S-ITS2-28S ve COI Gen Bölgelerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi.....	51
4. BULGULAR	52
	<u>Sayfa no</u>
4.1. Direkt Kan Muayene (Natif) Sonuçları.....	53
4.2. Modifiye Knott Testi Sonuçları	53
4.3. Membran Filtrasyon Testi Sonuçları.....	54
4.4. PCR Sonuçları.....	55
4.5. COI Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi.....	56
4.6. <i>Dirofilaria immitis</i> izolatının COI Geninin Pairwise Kıyaslaması ve Filogenetik Analizi	58
4.7. 5.8S-ITS2-28S Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi	60
4.8. <i>Dirofilaria immitis</i> izolatının 5.8S-ITS2-28S Geninin Pairwise Kıyaslaması ve Filogenetik Analizi	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR	76
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında Avanos yöresinde örnekleme alınan köpeklerin protokol numaraları, cinsiyet, yaş ve ırkları	42
Tablo 4.1. Farklı teşhis yöntemleri ile <i>Dirofilaria immitis</i> pozitif bulunan köpeklerin cinsiyeti, ırkı ve yaşı.....	52
Tablo 4.2. Avanos yöresi <i>Dirofilaria immitis</i> izolatu ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı <i>Dirofilaria immitis</i> izolatlarının COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri	59
Tablo 4.3. Avanos yöresi <i>Dirofilaria immitis</i> izolatu ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı <i>Dirofilaria immitis</i> izolatlarının 5.8S-ITS2-28S gen dizilimlerinin pairwise analizleri	63
Şekil 2.1. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in taksonomideki yeri.....	4
Şekil 2.2. <i>Dirofilaria immitis</i> , erkek ve dişi.....	5
Şekil 2.3. <i>Dirofilaria immitis</i> , erkek ve dişi arka uçları.....	6
Şekil 2.4. <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilari.....	7
Şekil 2.5. Sivrisinekte malpighi kanalında “sosis form” L1	8
Şekil 2.6. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in biyolojik siklusu.....	9
Şekil 2.7. <i>Culex pipiens</i> dişi.....	11
Şekil 2.8. <i>Aedes vexans</i> dişi	12
Şekil 2.9. <i>Dirofilaria immitis</i> enfeksiyonlarının Avrupa'daki yayılışı	16
Şekil 2.10. Pulmoner hipertansiyon sonucu kalpte sağ ventriküler dilatasyon.....	18
Şekil 2.11. <i>Dirofilaria immitis</i> enfeksiyonlu bir köpek akciğerinde gri-kahverengi alanlı bölgeler ve gri-beyaz renkli granülom.....	19
Şekil 2.12. Arteria pulmonalis'te bulunan erişkin <i>Dirofilaria immitis</i>	19
Şekil 2.13. Caval sendrom, kalbin sağ tarafında erişkin <i>Dirofilaria immitis</i>	20
Şekil 2.14. <i>Dirofilaria immitis</i> ile enfekte köpekte göğüs ve karın boşluğunda sıvı toplanması (Asites).....	21
Şekil 2.15. Caval sendromda hemoglobüri (soldaki), normal idrar (sağdaki)	22
Şekil 2.16. Membran filtrasyon tertibatı	25
Şekil 2.17. <i>Dirofilaria immitis</i> ve <i>Dipetalonema reconditum</i> mikrofilari; H: Ön, T: Kuyruk	26
Şekil 2.18. <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilarilerinde asit fosfataz aktivitesi	27
Şekil 3.1. Örnekleme yapılan Avanos yöresi	41
Şekil 3.2. Membran filtrasyon testi.....	47
Şekil 4.1. Natif muayene yöntemi ile saptanan <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilari X 300	53
Şekil 4.2. Modifiye Knott yönteminde <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilari	54
Şekil 4.3. Membran Filtrasyon yönteminde <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilari X 400	55
Şekil 4.4. <i>Dirofilaria immitis</i> izolatlarının parsiyel COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü..	55
Şekil 4.5. <i>Dirofilaria immitis</i> pozitif izolatların parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü	56
Şekil 4.6. <i>Dirofilaria immitis</i> izolatının parsiyel COI gen bölgesi sekans dizilimleri	57

Sayfa No

Şekil 4.7.	Avanos yöresinde saptanan <i>Dirofilaria immitis</i> izolatu ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri..	60
Şekil 4.8.	<i>Dirofilaria immitis</i> izolatının parsiyel 5.8S-ITS2 gen bölgesi sekans dizilimleri	61
Şekil 4.9.	Avanos yöresinde saptanan <i>Dirofilaria immitis</i> izolatu ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri.....	64

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Köpekler, evcilleştirildikleri ilk günden beri insanlarla birlikte yaşamış, insanlara dost, arkadaş ve koruyucu olmuşlardır. Ancak günlük yaşamdaki insan-köpek dostluğu bazı sorumlulukları ve sorunları da beraberinde getirmiştir. Sayıları günümüzde 200'ü aşan zoonoz hastalıkların da aralarında bulunduğu birçok hastalık insanlar ve köpekler arasında müşterek seyretmekte ve bu durum halk sağlığı açısından büyük bir önem arz etmektedir. Çoğunlukla az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde, azımsanamayacak oranda da gelişmiş ülkelerde çok sayıda köpek sokaklarda başıboş dolaşmaktadır. Rutin sağlık kontrolleri yapılmayan, kendi kaderine terk edilmiş olan bu köpekler birçok paraziter hastalıkları bünyelerinde barındırmakta ve insan sağlığı için açık bir tehdit oluşturmaktadırlar.

Köpeklerin kalp kurdu olarak da bilinen *Dirofilaria immitis*, nematoda sınıfının Filarioidea üst ailesinde yer alan, sivrisineklerle biyolojik olarak nakledilen zoonotik karakterli bir parazittir. Köpeklerde filarial nematodların oluşturduğu patojenite, parazitin türü, sayısı, lokalizasyon yeri, hayvanın genel durumu gibi faktörlere bağlıdır. *D. immitis*, köpeklerde meydana getirdiği enfeksiyon bakımından diğer filarial etkenlere göre daha patojendir. *D. immitis*'in olgunları, kalp, pulmoner arterlerde lokalize olmakta ve kan ile beslenmekte, pulmoner sirkülasyon, kalp, karaciğer ve böbrekleri etkileyen çeşitli sistemik bozukluklara sebep olmaktadır Geçmişten günümüze meydana gelen iklimsel değişikliklerle birlikte ticaret, turizm ve benzer diğer sebeplerden dolayı

köpeklerin bölgeler arası hareketliliğinin artması, kalp kurdu enfeksiyonlarının coğrafik dağılımının ve hayvanlar ile birlikte insanlar için risk faktörlerinin artmasına sebep olmuştur. Türkiye’de de *D. immitis* enfeksiyonlarının son yıllarda prevalansının arttığı gözlemlenmektedir. Bunun yanında yine son yıllarda çeşitli ülkelerde oldukça önemli bir enfeksiyon olan *D. immitis*’in teşhisi üzerine moleküler tabanlı tekniklerin hız kazandığı da görülmektedir.

Türkiye’de *D. immitis*’in yaygınlığı üzerine yapılan çalışmaların daha çok konvansiyonel tekniklerle yapıldığı, daha az olarak da serolojik ve moleküler teşhis yöntemlerinden yararlanıldığı görülmektedir. Bunun yanında moleküler tiplendirme çalışmalarının ise çok sınırlı olduğu ve bu konuda yapılan çalışmaların yetersiz olduğu görülmüştür. Hâlbuki dirofilariosis’in bulaşma dinamiklerinin belirlenmesi, epidemiyolojik faktörlerinin analizi ve hastalığa karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde enfeksiyona yol açan türün moleküler karakterizasyonu ve GenBank’taki diğer izolatlarla filogenetik ilişkilerine yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, Türkiye’nin iç ve dış turizm potansiyeli yüksek yöreleri arasında yer alan Nevşehir’in Avanos ilçesi ve civarında sokak köpeklerinde *D. immitis*’in moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması amaçlanmış ve bu çalışmayla araştırma yöresinde *D. immitis*’in moleküler prevalansı saptanmış, elde edilen izolatların 5.8S-ITS2-28S ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonları ve filogenetik analizleri yapılmıştır.

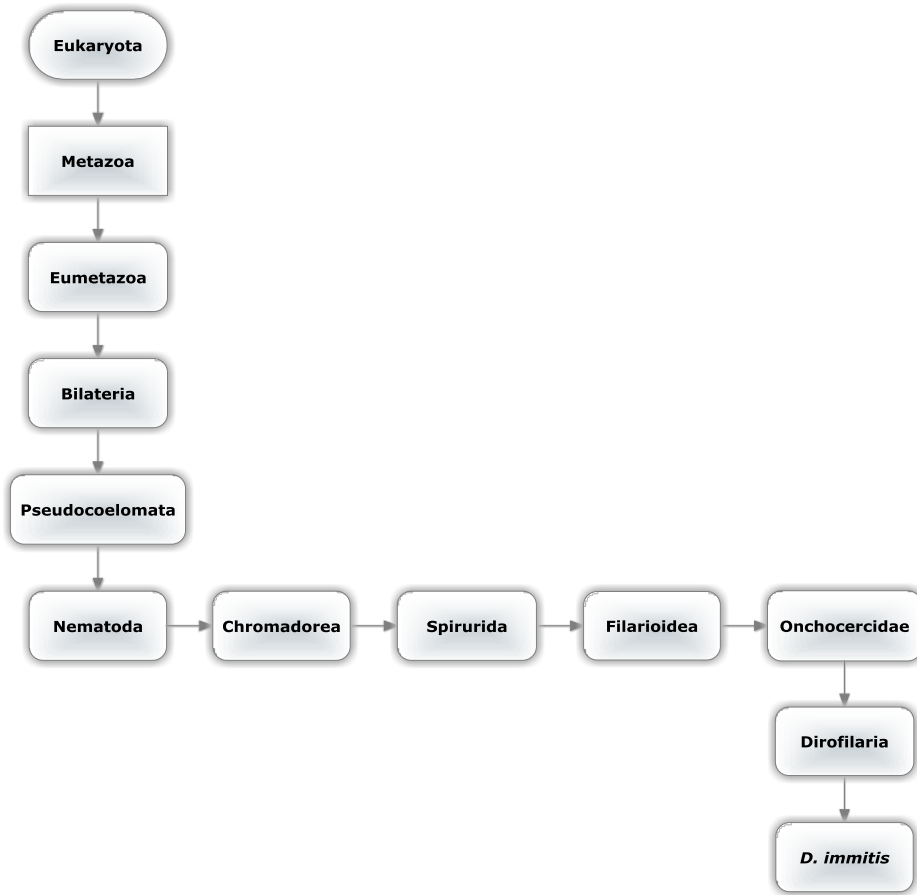
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sistematik ve Tarihçe

Dirofilariosis, başta köpekler olmak üzere birçok carnivor hayvanda ve nadir olarak da insanlarda görülen, *Dirofilaria* soyunda bulunan ve sayıları 40 civarında olan tür (*Dirofilaria immitis*, *D. (Nochtiella) repens*, *D. striata*, *D. conjunctiva*, *D. subdermata*, *D. spectans*, *D. acutiuscula*, *D. tenuis*, *D. ursi*, *D. malayi*, *D. timori*, *D. loa*, *D. corynodes*, *D. roemeri*, *D. scapiceps* vs.) tarafından oluşturulan bir zoonotik paraziter enfeksiyondur (1-6).

Köpeklerde en sık rastlanan tür olan *Dirofilaria immitis* dünyada ilk kez 1856 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin Philadelphia şehrinde doğa bilimci ve fizikçi olan Joseph Leidy tarafından tarafından Alabama'dan gelen bir köpekte tanımlanarak *Filaria immitis* olarak isimlendirilmiş, ancak 1911 yılında Railliet ve Henry isimli iki Fransız bilim adamının *Dirofilaria* soyunu belirlemesiyle parazit, *Dirofilaria immitis* (Leidy,1856) Railliet ve Henry, 1911 ismi ile taksonomideki yerini almıştır (7).

Filarial nematodlar gurubunda yer alan ve başta köpekler olmak üzere birçok carnivor hayvanda ve insanlarda görülen kalp kurdu etkeni *D. immitis*'in sistematikteki yeri Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. *Dirofilaria immitis*'in taksonomideki yeri

Kaynak: Anderson, 2000:8.

Dirofilaria soyunda yer alan türlerden *Dirofilaria striata* Molin tarafından 1858 yılında, *D. conjunctivae* Addario tarafından 1885 yılında, *D. corynodes* Linstow tarafından 1899 yılında, *D. roemeri* de yine Linstow tarafından 1905 yılında, *D. (Nochtiella) repens* Railliet ve Henry tarafından 1911 yılında, *D. ursi* Yamaguti tarafından 1941 yılında, *D. tenuis* Chandler tarafından 1942 yılında, *D. magnilarvatum* ise Price tarafından 1959 yılında tanımlanmıştır (3, 5, 8).

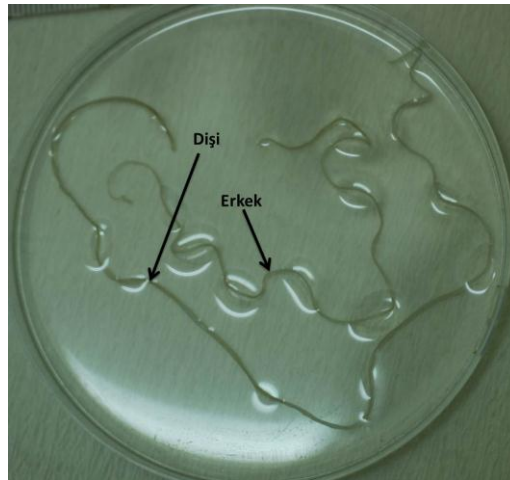
Filarioidea üsttailesinde yer alan diğer filarial nematodlardan *Dipetalonema grassii* 1907 yılında Noè tarafından bildirilmiştir. *Dipetalonema (Acanthocheilonema) reconditum* 1889 yılında Grassi tarafından, *Dipetalonema dracunculoides* 1870 yılında Cobbold tarafından bir kurtta, 1912 yılında da Railliet ve arkadaşları tarafından köpeklerde bildirilmiştir. *Brugia malayi* 1927 yılında Brug tarafından, *Brugia pahangi* 1956 yılında Buckley ve Edeson tarafından, *Brugia patei* 1958 yılında Buckley, Nelson ve Helsch tarafından bildirilmiştir (8).

2.2. Morfoloji

Dirofilaria immitis'in erişkin ve mikrofiler olmak üzere iki morfolojik formu bulunmaktadır.

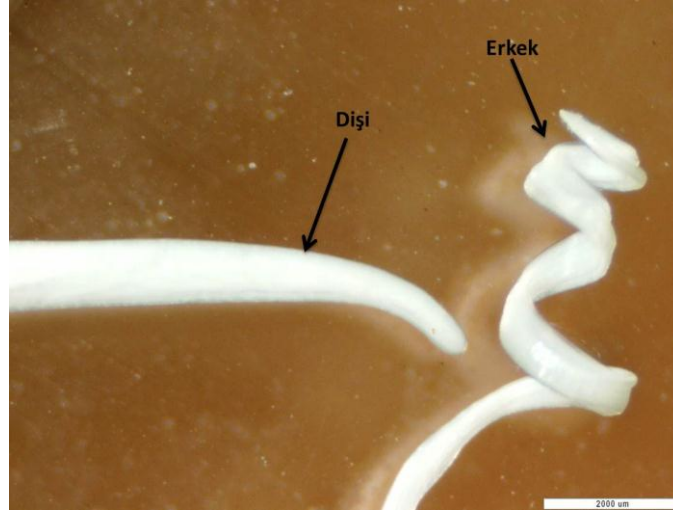
2.2.1. Erişkinlerin Morfolojisi

Erişkinler uzun, ince ve beyaz renkte olup küçük yuvarlak bir ağıza sahiptir. Ağız lateral dudaklarla, bazı türlerde de kitini oluşumlarla çevrilidir. Oesophagus 1,25-1,5 mm uzunluğunda olup, ön kısmı kassal, arka kısmı glandular parçalara bölünmüş olarak görülmektedir. Erkekler 12-18 cm, dişiler ise 25-31 cm uzunluğundadır (Şekil 2.2). Erkekler 0,5-1 mm genişliktedir ve arka uçları spiral tarzda kıvrılmıştır (Şekil 2.3). Kuyrukta küçük kaudal kanat ile 5 çift perianal, 6 çift postanal papil yer alır. Spikülümner eşit olmayıp sağ spikülüm 175-229 μm , sol spikülüm 300-375 μm 'dir. Dişiler ise, 1-1,3 mm genişlikte olup arka uçları kütür (Şekil 2.3). Vulva posteriorda oesophagointestinal kavşağa yerleşmiş durumdadır ve ön uca olan uzaklığı 2,7 mm'dir. Bağırsaklar, dişilerde sindirim kanalı ve genital organlar dışarıya açılabilirdi için anüs ile sonlanırken erkeklerde deferens kanalı ile birleşip kloaka ile sonlanmaktadır. Anüsün arka uca uzaklığı 175 μm 'dir. Erişkinlerde nematodun her iki yanında seyreden ve yemek borusu civarında birleşen boşaltım deliği ile özefagusu çevreleyen bir sinir halkası ve bundan çıkıp öne ve arkaya doğru uzanan sinir iplikçiklerinden oluşan bir sinir sistemi bulunmaktadır. Ayrıca erişkinlerin baş kısmında amfid ve arka kısımlarında fasmid olarak adlandırılan kimyasal reseptörler ile papillerden oluşan dokunma duyusu reseptörleri de bulunmaktadır. Erişkin parazitler doku sıvıları ve plazma ile beslenmektedirler (2, 5, 6, 9-13).



Şekil 2.2. *Dirofilaria immitis*, erkek ve dişi

Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.



Şekil 2.3. *Dirofilaria immitis*, erkek ve dişi arka uçları

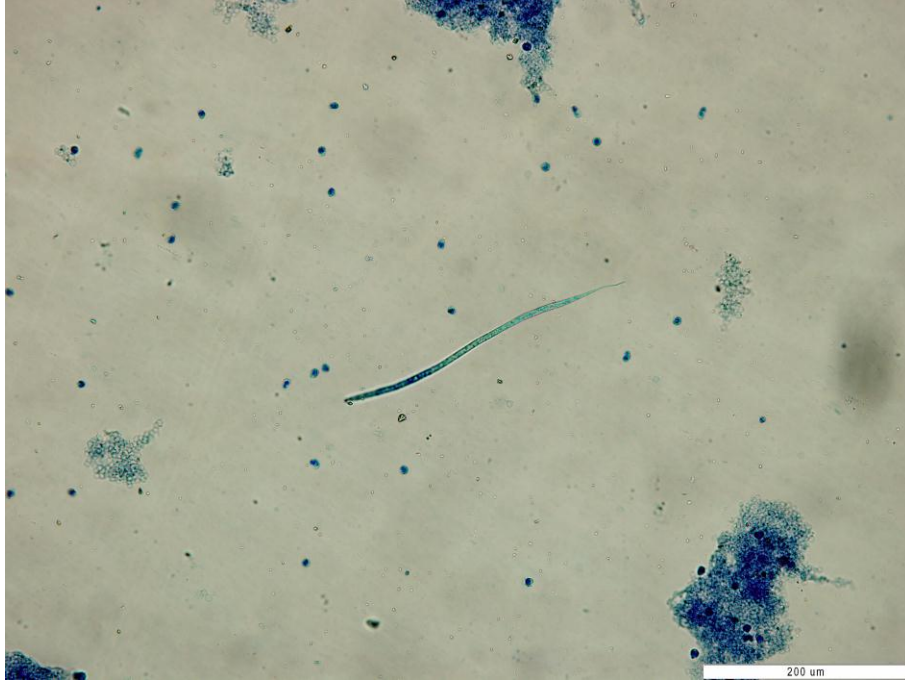
Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

Ovovivipar olan erişkinlerin genital sistemi dişilerde ovaryum, ovidukt, resepteculum seminis, uterus, vagina ve vulvadan oluşurken, erkeklerde tek bir testis, deferens kanalı, vesicula seminalis ve kaslı ejakulatör kanal vardır. Erkeklerde ayrıca telemon ve iki adet spiculum vardır ki bunlar çiftleşmede görev alan yardımcı erkeklik organlarıdır. Erkeklerde gubernaculum yoktur. Bu organların görevi erkeğin dişiye tutunmasını ve vulvanın açılmasını sağlamaktır. Çiftleşme, dişilerin feramon salgılaması ve bu salgı vasıtasıyla erkeğin dişiye bulması ile gerçekleşmektedir. Çiftleşme sonrasında atılan yumurtaların içerisinde larva gelişmiş olabilir ve larva yumurtayı uterusda terk ederek dışarıya çıkabilir (3, 6, 9).

2.2.2. Mikrofilerlerin Morfolojisi

Dirofilaria immitis'in 5 larval dönemi (L₁, L₂, L₃, L₄ ve L₅) bulunmaktadır. Filaroidea üstailesinde bulunan parazitlerin larvalarına mikrofiler, beşinci dönemde olan larvalara ise genç erişkinler denilmektedir. Parazitin genital organları 4. dönemde gelişmeye başlamakta ve 5 dönemde gelişimini tamamlamaktadır (6).

D. immitis'in mikrofilerleri 270-325 X 5-7,3 µm, kılıfsız, düz bir vücut ile kuyruğa sahip olup ön kısmı gittikçe incelerek sonlanmaktadır (11, 15-19), (Şekil 2.4). *D. immitis*'in mikrofilerlerindeki sinir tasması ön uçtan itibaren vücut uzunluğunun %24'ünde, boşaltım deliği %33'ünde, boşaltım hücresi %39'unda, R1 hücresi %68'inde, R2 hücresi %75'inde, R3 hücresi %75'inde, R4 hücresi %79'unda, anal delik hücresi %82'sinde ve son hücre nükleusu %93'ünde yer almış olarak görülmektedir (2, 3, 20).



Şekil 2.4. *Dirofilaria immitis* mikrofilari

Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

2.3. Biyoloji

Dirofilaria immitis heteroxene gelişim gösteren bir nematoddur olup ara konak olarak; Diptera takımında, Nematocera alttakımında, Culicidae ailesinde, Toxorhynchitinae, Culicinae ve Anophelinae altailelerinde yer alan *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Myzorrhynchus*, *Taeniorhynchus*, *Ayzorrhynchus*, *Mansonia* ve *Armigenes* cinsi sivrisineklerde, sonkonak olarak ise; başta köpekler olmak üzere, kedi, kurt, aslan, kaplan, geyik, tavşan, rakun, tilki, ayı, su samuru, dingo, fok balıkları, denizaslanı, at, şempanze, orangutan gibi hayvanlar ve insanlarda gelişim göstermektedir (5, 9, 20-24).

2.3.1. Arakonaktaki Gelişim

Dişi sivrisinekler tarafından alınan perifer dolaşımda veya lenf aralıklarında bulunan mikrofilerler 24 saatlik bir süre içerisinde sivrisineğin mide ve bağırsaklarına gelirler. Daha sonra mikrofilerler 48 saat içerisinde (26°C’de) orta bağırsak kısmını terk edip malphighi kanallarına göç ederek distal hücrelere yerleşirler. Mikrofilerlerin alınmasının ardından 4. günden itibaren (enfeksiyondan 6 gün sonra) larvalar hareketsiz kalır, boyları kısalır, kalınlıkları artar ve “sosis form” şeklini alır (Şekil 2.5), (25, 26). Sosis form şeklindeki larvalar 10. günde malpigi kanallarında gömlek değiştirerek 2. dönem larvalar (L₂) haline dönüşürler. Bu dönemde larvaların boyu uzamaya başlar. Larvalarda yeniden aktifleşme ile birlikte sindirim ve genital kanalların geliştiği gözlenir. Bu aşamada Enfeksiyondan 13 gün sonra ikinci gömlek değiştirme

gerçekleşir. Gömlek değiştirme neticesinde “minyatür olgun” da denen, aynı zamanda enfektif dönem olan yaklaşık 800-900 µm uzunluktaki 3. dönem larvalar (L₃) gelişir. Yüksek aktiviteye sahip enfektif L₃’ler, sivrisineklerin mikrofiler alımından 17 gün sonra malpighi kanallarını parçalar ve hemocel yoluyla baş ve ağız kısmına göç ederek labiuma ulaşırlar (27).



Şekil 2.5. Sivrisinekte malpighi kanalında “sosis form” L₁

Kaynak: Johnstone, 2000:28.

2.3.2. Sonkonaktaki Gelişim

Köpekler, arakonak sivrisineklerin dişilerinin kan emmeleri esnasında *D. immitis*’in üçüncü dönem larvaları ile enfekte olmaktadır. Sivrisinek tarafından köpeğe bulaştırılan larva (L₃) sayısı 10-12 arasında değişir. Enfektif üçüncü dönem larvalar (L₃), aktif hareketlerle son konağın derialtı, seroza altı, kas veya yağ dokusuna göç ederler. Bu dokularda 3-12 günlük bir süre içerisinde, tekrar gömlek değiştirerek dördüncü dönem larvalar (L₄) haline gelirler. Dördüncü dönem larvalar da (L₄) enfeksiyondan 50-70 gün sonra bir gömlek daha değiştirerek, yaklaşık 18 mm boyutlarındaki beşinci dönem larvalar (L₅) veya genç erişkinler olarak isimlendirilen forma ulaşırlar. Genç erişkinler enfeksiyondan 70 gün sonra sağ kalbe gelip yerleşirler ve 90. güne kadar göçlerini tamamlayarak seksüel olgunluğa ulaşırlar. Vektör sivrisineklerin sonkonaktan kan emdiği ilk günden yaklaşık 190-197 gün (6-7 ay) sonra sonkonağın perifer damarlarında mikrofilerlere rastlanabilmektedir. *D. immitis* için prepatent süre 6-9 (ortalama 6,5) ay sürmektedir (Şekil 2.6), (5, 20, 26-30).



Şekil 2.6. *Dirofilaria immitis*'in biyolojik siklusu

Kaynak: Yıldırım, 2003:31.

2.4. Epidemiyoloji

Dirofilaria immitis'in epidemiyolojisinde; sıcaklık, nem, mevsim, vektör (arakonak) popülasyonu, mikrofilari ve erişkin parazit sayısı, konak bağışıklığı, konağın yaşı-cinsiyeti ve yaşam alanı, parazitin yaşam süresi, intrauterin bulaşma ve mikrofilariemi gibi önemli faktörler rol oynamaktadır.

2.4.1. Sıcaklık ve Nem

Vektör sivrisinekler ancak belli bir sıcaklık ve nem aralığında yaşamlarını sürdürebilmekle beraber mikrofilarielerin vektör sivrisinekte gelişebilmesi için ideal sıcaklığın da 24-32°C arasında olması gerekmektedir. Sıcaklığın 21.1°C'nin altına düştüğü durumlarda mikrofilarielerin gelişme süresinin uzadığı, 16°C'nin altına düştüğü durumlarda ise sivrisinekte gelişme gösteremedikleri bildirilmiştir (6, 8, 20, 23, 27, 28, 32, 33).

2.4.2. Mevsim

Mikrofiler sayısı çevre sıcaklığına bağlı olarak yaz aylarında artış göstermektedir. Sivrisinek azlığından veya yokluğundan dolayı kış mevsiminde mikrofilerlerle bulaşma olmamaktadır. Nitekim parazite en sık oranda, sivrisinek popülasyonuna da bağlı olarak yaz aylarında rastlanmaktadır (33).

2.4.3. Vektör (Arakonak) Popülasyonu

Vektör sivrisinek sayısındaki artış, enfeksiyonun bulaşmasını kolaylaştırmaktadır (6). Sivrisineklerin bölgesel ve yöresel yayılımı üzerinde sıcaklık, nem, toprak, su, bitki örtüsü, iklim, yağış, rüzgar, hava akımı gibi çevresel faktörler rol oynamaktadır (22).

İtalya’da 2000-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada 2721 adet sivrisinek örneği toplanmış ve bunlardan 2534 (%97.1) tanesinin *Aedes albopictus*, 162 tanesinin *A. geniculatus*, 11 tanesinin *Ae. caspius*, 9 tanesinin *Culex pipiens*, 2 tanesinin *Cx. modestus*, 1 tanesinin *Ae. vexans*, 1 tanesinin *Anopheles maculipennis* ve 1 tanesinin de *Culiseta annulata* türü olduğu anlaşılmıştır. Çalışmanın başladığı 2000 yılında 713 sivrisinek örneğinin toplandığı 69 havuzdan 19 unda (%27.5), 2001 yılında 1216 sivrisinek örneğinin toplandığı 144 havuzdan 40 ında (%27.8), 2002 yılında 605 sivrisinek örneğinin toplandığı 123 havuzdan 22 sinde (%17.9) spesifik primerler (S2 ve S16) kullanılarak *D. immitis* DNA’sı belirlenmiştir (34).

Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan çalışmalarda *D. immitis*’in en yaygın vektörlerinin *Aedes vexans*, *Ae. albopictus*, *Anopheles punctipennis*, *An. crucians* ve *Culex quinquefasciatus* türü sivrisinekler olduğu belirtilmiştir (26, 35).

Brezilya’da yapılan bir çalışmada, *D. immitis* ile enfekte olan ve olmayan iki köpekten 1573 adet *Culex quinquefasciatus* ve 1588 adet *Aedes aegypti* türü sivrisineğe kan emdirilerek bu sivrisineklerin vektörlük potansiyeli araştırılmıştır. Sivrisinekler kan emdikten 4 gün sonra L₁ (sosis form), 8-9 gün sonra L₂ ve 10. günde *Aedes aegypti*’nin, 14. günde de *Culex quinquefasciatus*’un L₃ formunun gelişmiş olduğu düşünülerek sivrisinekler diseke edilmiştir. Diseksiyon sonrasında sivrisinek başına toplanan L₃ sayısı kaydedilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, *Aedes aegypti* türü sivrisineklerden toplanan L₃ sayısının *Culex quinquefasciatus* türü sivrisineklerden toplananlardan daha fazla olduğu görülmüş ve *Aedes aegypti* türü sivrisineklerin *D. immitis* için daha iyi bir vektör olabileceği kanaatine varılmıştır (36).

Türkiye’de ise *D. immitis*’in vektör popülasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Kayseri'nin Felahiye yöresinde yapılan bir çalışmada, toplanan 305 adet sivrisinek için havuzlar oluşturulmuş ve bu havuzlardan genomik DNA ekstrakte edilmiştir. Bu DNA'lar 16S rRNA ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgelerinden dizayn edilen iki ayrı primer kullanılarak PCR ile incelenmiş ve *Aedes vexans*'ların baş, toraks (L₃ dönemi-enfektif) ve gövdelerinden (L₂ dönemi-enfekte) oluşan iki havuzda *D. immitis* DNA'ları saptanmıştır. *Culex pipiens*'lerden oluşturulan havuzlarda ise *D. immitis* DNA'larına rastlanılmamıştır. Çalışma ile *Aedes vexans* türünün araştırma bölgesinde *D. immitis*'e aktif olarak vektörlük yaptığı anlaşılmıştır (37). Yine Kayseri yöresinde yürütülen bir çalışmada 2008 sezonunda toplanılan sivrisinekler arasında en yaygın tür %68.8 ile *Culex pipiens* belirlenmiş, bunu %24.9 ile *Aedes vexans*, %3.8 ile *Cx. theileri* ve %2.4 ile *Cx. hortensis* türleri izlemiştir. 2009 sezonunda ise en yaygın tür %55.9 ile *Ae. vexans* belirlenmiş, bunu %37.8 ile *Cx. pipiens*, %3.0 ile *Cx. theileri*, %1.8 ile *Culiseta annulata*, %1.2 ile *Anopheles maculipennis* ve %0.3 ile *Cx. hortensis* türleri izlemiştir. İki sezon boyunca incelenen 6153 adet dişi sivrisinekte *Ae. vexans* ve *Cx. pipiens* türlerinin *D. immitis*'in potansiyel vektörleri olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.7, 2.8), (38).



Şekil 2.7. *Culex pipiens* dişi
Kaynak: Yıldırım ve ark., 2010:39.



Şekil 2.8. *Aedes vexans* dişi

Kaynak: Yıldırım ve ark., 2010:39.

2.4.4. Mikrofiler ve Erişkin Parazit Sayısı

Klinik semptomların şiddeti köpekte bulunan erişkin parazit sayısı ile ilgilidir. Parazit sayısı ne kadar fazla ise hastalık o kadar şiddetli seyretmektedir. Son konaktaki erişkin parazit sayısının 50'nin üzerinde olması ventriculusta tıkanmaya, 100'den fazla olması ise kalbin sağ bölümünün tamamının parazitlerle dolmasına ve az miktarda kan pompalanmasına neden olmaktadır (5, 31, 40). Sonkonak tarafından alınan mikrofilerlerin yaklaşık %30-50'si erişkin hale gelebilmektedir (27).

2.4.5. Konak Bağışıklığı

Parazite karşı konakta çeşitli immun yanıtlar oluşmaktadır. Söz konusu reaksiyonlar oluşumu nedeniyle mikrofilerler ortadan kalkmakta ve erişkin dişiler steril kalabilmektedir (6, 28, 31, 41).

2.4.6. Konağın Yaşı, Cinsiyeti ve Yaşam Alanı

D. immitis enfeksiyonları ile konak yaşı arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda, enfeksiyonun yayılışının yaşla ilgili değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir (31, 42-44,). Rowley (45) ve Martin and Collins (46), enfeksiyonun yayılışında yaşın etkili olmadığını belirtmekle birlikte, köpeklerde yaşın artışına paralel olarak enfeksiyon oranının da arttığı, yavru köpeklerde hastalığın transplasental yolla bulaştığı bilinse de özellikle 3-15 yaş arası köpeklerde enfeksiyonun daha yaygın olduğu ifade edilmiştir (31, 43, 47-50). Enfeksiyonun yaşlı köpeklerde nispeten daha yüksek olmasındaki önemli faktörler, parazitin prepatent periyodunun uzun olması ve konak-parazit ilişkisinde yaşlı köpeklerin vektörlere daha uzun süre maruz kalması olarak bildirilmiştir (43).

Dirofilaria ile konak cinsiyeti arasındaki ilişki de araştırılmış, bazı araştırmacılar (42, 49-52) erkek köpeklerdeki enfeksiyonun dişilere kıyasla önemli derecede yüksek çıktığını bildirmişlerdir. Öte yandan diğer araştırmacılar (31, 43, 46, 47, 53-57) erkek ve dişi köpeklerde parazit insidensinin farklı olmadığını bildirmişlerdir.

Ev dışında açık alanlarda barındırılan ve özellikle iri yapılı köpeklerde hastalığın daha çok görüldüğü ve köpeklerin enfeksiyona maruz kalma ihtimallerinin ev içinde barındırılanlara kıyasla 4-5 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (44, 50, 51).

2.4.7. Parazitin Yaşam Süresi

Erişkin parazitlerin üreme periyodu 2-7 yıl kadar sürebilmektedir. Mikrofiler ise 2-7,5 yıl canlı kalabilmektedir. Ayrıca erişkin parazit olmaksızın mikrofilerler kanda 2 yıl kadar canlı kalabilmektedirler (6, 20, 27, 31).

2.4.8. İntrauterin Bulaşma

Yapılan araştırmalar sonucu *D. immitis* mikrofilerlerinin transplasental yolla neonatal yavrulara geçişinin olduğu bildirilmiştir (5, 6).

2.4.9. Mikrofileremi

Dirofilaria immitis'in mikrofilerleri günün her saatinde kanda görülebilmektedir. Ancak pulmoner arterler ile venalar arasındaki oksijen basıncı akşam ve gece saatlerinde düştüğü için mikrofilerler yoğun olarak akşam saatlerinde perifer kanda görülmektedirler. Yani larvalar nokturnaldır. Ayrıca toplam mikrofiler sayısının %5-20 si perifer dolaşımda, geri kalanı ise iç organlarda özellikle de akciğerin küçük solunum kanallarının kan damarlarında bulunmaktadır (3, 6, 20, 25, 58, 59).

Mikrofilerlerin kanda görülme saatleri ülkelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde minimum mikrofileremi saat 11.00'da maksimum mikrofileremi ise 16.30'da görülmektedir. Fransa'da en az mikrofiler saat 8.00'da, en fazla mikrofiler ise saat 20.00'da; Çin Halk Cumhuriyeti'nde en az mikrofiler saat 06.00'da, en çok mikrofiler ise saat 18.00'da görülmüştür (2, 5). Tanzanya'da ise en az mikrofiler saat 11.00'da, en fazla mikrofiler saat 22.00'da tespit edilmiştir (60). Kore'de yapılan çalışmada ise mikrofilereminin minimum olduğu saat 11.00, maksimum olduğu saat ise 21.00 olarak belirlenmiştir (61). Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda da en az mikrofiler sabah saat 6.00'da, en fazla mikrofiler ise 18.00-24.00 saatleri arasında görülmüştür (62, 63).

Ayrıca konakta mikrofilerlerin tespiti her zaman mümkün olmamakta, bazen köpeklerin %10-67'sinde erişkin parazit var olduğu halde mikrofiler görülememektedir. Bu duruma

gizli (okult) enfeksiyon adı verilmektedir. Köpekteki erişkin parazitlerin aynı cinsiyette veya steril olması, immün reaksiyonlar neticesinde erişkin dişilerin mikrofilere üretiminin baskılanması veya mikrofilere ortadan kalkmış olması, parazitlerin henüz gelişmemiş olması, özellikle kış aylarında mikrofilere minimum düzeyde olması, mikrofilere etkili bir ilaç kullanımı gibi nedenlerden dolayı mikrofiler görülemeyebilmektedir. Bazen de köpekte mikrofiler tespit edilebilirken erişkin parazite rastlanamamaktadır. Mikrofilere 2-7,5 yıl boyunca canlı kalabilmesi, mikrofilere anneden yavruya transplasental yolla geçmiş olması, erişkin parazitlere karşı adultisit uygulanması gibi nedenlerden dolayı da erişkin parazitler görülemeyebilmektedir (6, 20, 31, 41, 64).

Perifer kandaki mikrofiler yoğunluğunun zaman içerisinde basit harmonik bir dalga yapısını takip eden yükseliş ve düşüşüne periodisite adı verilmektedir. Periodisite, mikrofiler yoğunluğunun seyrine göre üç değişik formda sınıflandırılmaktadır:

- A) Subperiodik Form: Dolaşımdaki mikrofiler yoğunluğunun belirli bir seviyede seyrederken belli zaman diliminde minimum ve maksimum değerlerin gözlemlendiği form.
- B) Periodik Form: Dolaşımdaki mikrofiler yoğunluğunun çok az olduğu veya hiç olmadığı dönemde belli zaman diliminde maksimum değerlerin gözlemlendiği form.
- C) Nonperiodik Form: Gün boyunca mikrofiler yoğunluğunda minimum seviyede değişikliğin görüldüğü form.

Periodisite ayrıca maksimum mikrofiler yoğunluğunun belirlendiği zaman dilimine göre de nokturnal (gece saatlerinde) ve diurnal (gündüz saatlerinde) form olarak sınıflandırılmaktadır (25, 62). Yapılan bir çalışmada, *D. immitis* ile enfekte iki köpekte perifer kandaki mikrofiler periodisitesi natif, sürme preparat, sayım kamerası ve membran filtrasyon yöntemleri ile araştırılmıştır. Köpeklerden 24 saat boyunca 2 saatlik aralıklarla kan alınmıştır. Bu işlem 2 gün arayla tekrarlanmış, sonuçta gözlenen ve teorik olarak beklenen mikrofiler yoğunlukları arasındaki en iyi uyumun membran filtrasyon testi ile olduğu, periodisitenin nokturnal ve subperiodik olduğu görülmüştür (62).

Dirofilariosis'in bulaşmasında sivrisinek tarafından alınan mikrofiler sayısı, mevsim, sıcaklık gibi faktörler de rol oynamaktadır. Fazla miktarda mikrofilerli kan emen sivrisineklerin bir kısmı kan emdikten sonra ölmektedir (33). Özellikle kış aylarında sivrisinek olmaması veya çok az olması nedeniyle mikrofilerlerle bulaşma olmamaktadır. Mikrofilere sivrisinekte gelişme gösterebilmesi için çevre

sıcaklığının iki hafta boyunca 16°C'ın altına düşmemesi gerekir. Sıcaklık bu değerin altına düşerse mikrofilerler sivrisinekte gelişme gösterememektedir (8).

2.4.10 *Dirofilaria immitis* Enfeksiyonlarının Türkiye'deki Yayılışı

Dirofilaria immitis Türkiye'de ilk kez 1951 ve 1959 yıllarında yabancı orijinli iki köpekte bulunmuştur (2, 65). Daha sonra yapılan çalışmalarda prevalansın %0 ile %65.4 arasında değiştiği görülmüştür (47, 66).

Ankara'da üç ayrı çalışmada nekropside toplam 7 köpekte (65, 67, 68), Bursa'da 2 (69), Kars'ta 6 (70), Kayseri'de 8 (71), Konya'da 4 (72), Sivas'ta 3 (73), Eskişehir'de iki ayrı çalışmada 2 şer köpekte (74, 75) *D. immitis* olgunlarına, Elazığ'da 6 köpekte *D. immitis*, 3 köpekte de *D. (Nochtiella) repens* olgunlarına (76) rastlanmıştır.

Ankara'da bir çalışmada 9 (49), bir çalışmada 26 (77), bir başka çalışmada da 19 köpekte (31), Eskişehir'de bir çalışmada 14 (74), bir başka çalışmada ise 6 köpekte (75), Bursa'da 2 (57), Aydın ve İzmir'de bir çalışmada 15 (78), bir başka çalışmada ise 22 köpekte (79), İstanbul'da 4 (80), Iğdır'da 40 (81), Van'da 18 (82), Erzincan'da 12 (83), Konya'da 3 (84), Hatay'da 70 (85), Kırıkkale'de 10 (86), Gemlik'te 5 (87), Kayseri'de 27 (8 inde %29.6 oranında gizli enfeksiyon) (50), Elazığ'da 11 köpekte (1) *D. immitis* mikrofilere veya antijeni saptanmıştır. Ankara'daki bir başka çalışmada 1 köpekte *D. (Nochtiella) repens* (88) ve İstanbul'da 2 köpekte (89) *Dipetalonema reconditum* mikrofilere saptanmıştır. Ayrıca Şanlıurfa ile Afyonkarahisar ve Eskişehir'de 7'şer (90, 91), Kars'ta ise 31 köpeğin *Dirofilaria sp.* ile enfekte oldukları (92) görülmüştür.

Elazığ'da bir çalışmada 53 köpekte *Dirofilaria* soyuna ait nematod larvasına rastlanmıştır (93), Elazığ, Mersin, Sakarya, Kocaeli ve Ankara'dan toplanan 211 tam kan ve serum örneğinin incelendiği bir başka çalışmada ise 27 sinde (%12.8) seropozitiflik saptanmış, ancak aynı örneklerle yapılan PCR'da parazite özgü bantlar elde edilememiştir (94).

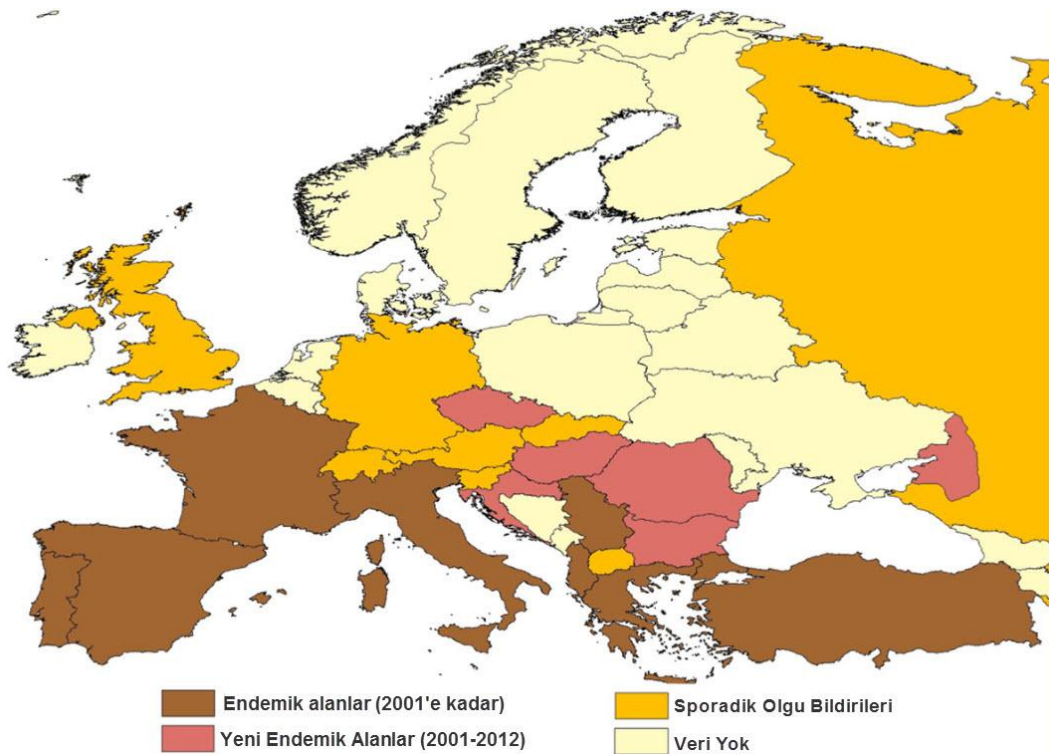
Kars ve Iğdır yöresinde 240 sokak köpeğinde yapılan bir çalışmada (95) Membran Filtrasyon-Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama (MF-Asit Fosfataz) yöntemi ile 52 (%21.7), Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile 72 (%30) ve PCR yöntemi ile de 45 köpeğin (%18.75) *D. immitis* ile enfekte olduğu tespit edilmiştir. *D. immitis*'in teşhisinde kullanılan yöntemlerden herhangi birisi ile alınan pozitif sonuçlar değerlendirildiğinde söz konusu parazitin Kars ve Iğdır yöresindeki prevalansının %35.8 (86/240) olduğu bildirilmiş ve ELISA ile 26 köpekte (%36.1) gizli (okult) enfeksiyon belirlenmiştir.

Şimşek ve ark. (96), Erzurum'da 123 sokak köpeğinden topladıkları kan örneklerini mikroskopik, serolojik ve moleküler yöntemler ile incelemiş ve 10 köpeğin (%8.1) *D. immitis* ile enfekte olduğunu saptamışlardır.

Sarı ve ark. (97), Iğdır yöresindeki sokak köpeklerinde *D. immitis*'in seroprevalansını araştırmışlar ve 100 köpeğin 40'ında (%40) *D. immitis* antijenine rastlamışlardır.

2.4.11. *Dirofilaria immitis* Enfeksiyonlarını Dünya'daki Yayılışı

Dirofilaria immitis enfeksiyonları Dünya'nın hemen her yerinde görülebilmekle birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar ile birlikte enfeksiyona bağlı Avrupa'da yeni endemik alanlar oluştuğu da bildirilmiştir (Şekil 2.9), (98).



Şekil 2.9. *Dirofilaria immitis* enfeksiyonlarının Avrupa'daki yayılışı

Kaynak: Otranto et al., 2013:98.

Yapılan çalışmalarda *D. immitis*'in köpeklerdeki prevalansı Hindistan'da %15.2 (99), Kanada'da %0.16-0.59 arasında (100, 101), Malezya'da %25.8 (102), ABD'de köpeklerde %0.1-6.16 arasında, koyotelerde (*Canis latrans*) ise %16 (103-105), Missouri'de ve Mississippi Nehri kenarındaki yerleşim yerlerinde %3.8 (106), Hollanda'da %10 (107), Avustralya'da %11.4 (108), Kuzey Kore'de %40 (44), İspanya'da %0-67.02 arasında (42, 109-111), Arjantin'de %0-71 arasında (112), Brezilya'da %0-73.5 arasında (113-119), Tayvan'da %13.4-31.6 arasında (43, 120, 121), Meksika'da %1.3-59.8 arasında (122-124), Almanya'da %0 (125), Gabon'da %13.6 (126), Dominik Cumhuriyeti'nde %18.2 (56) oranlarında tespit edilmiştir.

Ayrıca Hollanda'da 7 köpekte (127), Montana'da 24 köpekte (128), Avustralya'da bir çalışmada 8 kırmızı tilkide, bir çalışmada da 18 köpekte (53, 60), Kuzey Kore'de bir çalışmada Modifiye Knott Testi ile 13, Antijen Testi ile ise 36 köpekte (129), yine Kuzey Kore'de bir hayvanat bahçesinde bir Avrasya su samurunda (130), Kolombiya'da 7 köpekte (131), Nebraska'da 39 koyote, 1 kırmızı tilki ve 22 köpekte (132), Los Angeles'de 18 köpekte (133), ABD'deki bir başka çalışmada 33 köpekte (134), İtalya'da 327 köpekte (135), Mozambik'te 4 köpekte (136) *D. immitis* bildirilmiştir.

Japonya'da 234 köpekte (59), 8 rakunda (137) ve bir kar leoparında (10), Irak'ta 3 köpekte (138), Brezilya'da 14 köpekte (113), Meksika'da 52 köpekte (122), Townsville'de 34 köpekte (139), Tayvan'da bir çalışmada 477 köpekte (121), bir başka çalışmada da nekropsi sonrasında %40.6 oranında (120) *D. immitis* bulunmuştur. Arjantin'de 782 köpekten 40'ında (52), Yunanistan'da ise 91 köpekte (140) *D. immitis* görülmüştür.

İtalya'da kedilerde *D. immitis*'in yaygınlığı %16 (157 kedi) olarak belirlenmiştir (141). *D. immitis* ile enfekte köpeklerde antikor yanıtını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, bir grupta larva inokülasyonundan 16 hafta sonra, bir grupta da 11 hafta sonra antikor titreleri belirlenebilmiştir (142).

İspanya'da 114 köpeğe ait kan örneği Modifiye Knott, PCR ve ELISA teknilerinin kullanıldığı testler ile *D. immitis* varlığı yönünden incelenmiş sırasıyla %0, %1.6 ve %2.6 oranlarında pozitiflik saptanmıştır (110).

Güney Kore'de 848 köpekten elde edilen kan örnekleri ELISA ile *D. immitis* yönünden incelenmiş ve %40 oranında seropozitiflik tespit edilmiştir (44).

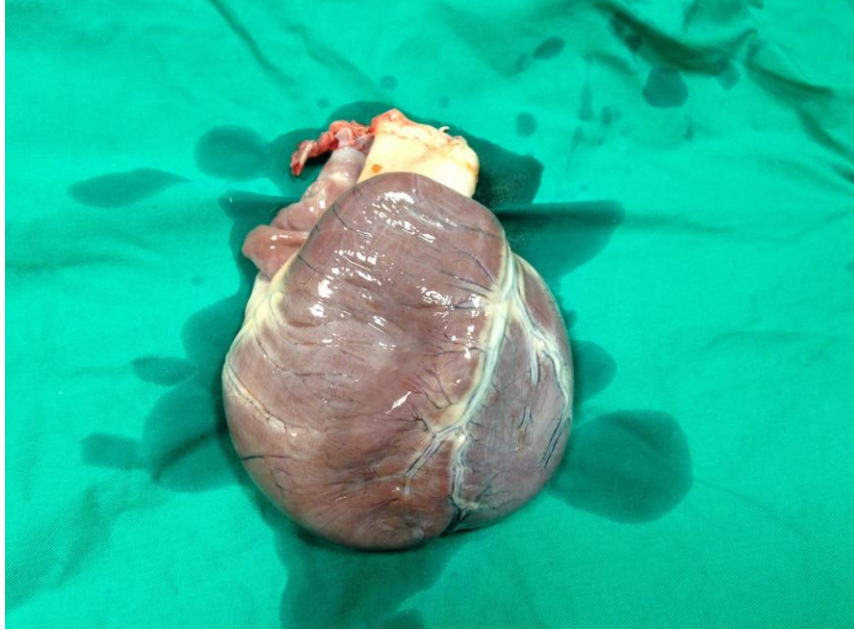
2.5. Patogenez

Köpeklerde *D. immitis* türünün oluşturduğu patojenite, parazitin türü, sayısı, lokalizasyon yeri, hayvanın genel durumu gibi faktörlere bağlıdır (5, 28, 143). Son konaklar üzerinde patojen etkiyi parazitin L₅, erişkin ve bazen de mikrofilere formları meydana getirmektedir. L₃ ve L₄ formlarının konak üzerinde herhangi bir patojen etkisi bulunmamaktadır (6, 28, 64).

D. immitis'in erişkinlerine sağ atrium'da, sağ ventrikülüs'de ve üst pulmoner arterlerde çok fazla sayıda rastlanabilmektedir.

Pulmoner arterlerdeki parazitler güçlü bir yangısal reaksiyonun oluşumuna, endotelde dejenerasyona ve kanda pıhtılaşmaya yol açarak, kalbin daha çok çalışmasına ve

zorlanmasına sebep olmaktadır. Meydana gelen yangısal reaksiyon arterlerin interna ve media kas tabakasında proliferasyona yol açmakta, bu da obstrüksiyon (tromboz) ve vasküler permeabilite artışına neden olmaktadır (interstitial ve alveolar ödem). Pulmoner arterlerdeki genişleme, emboli ve düzensiz görünüm (28, 144); pulmoner hipertansiyon, sağ ventriküler dilatasyon ve hipertrofiye (cor pulmonale) yol açarak sağ ventriküler yetmezliğe neden olmaktadır (Şekil 2.10) (27, 28, 140, 144-146).



Şekil 2.10. Pulmoner hipertansiyon sonucu kalpte sağ ventriküler dilatasyon

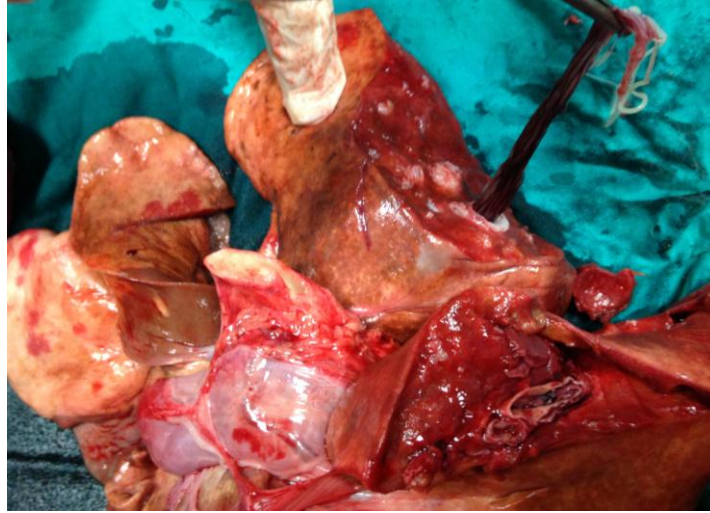
Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

Parazite karşı ortaya çıkan yangı hücrelerinin aşırı artışı (144, 147) ile yüksek antikor düzeyinin pulmoner kapillarlardaki mikrofilere yıkımlaması sonucu (28, 146) akciğerlerde non-enfeksiyöz pneumoni (pulmoner eozinofilik granulomatosis) tablosu şekillenebilmektedir. Parazitlerin kendiliğinden veya tedavi sonrası ölümü, pulmoner thromboembolisme sebep olarak akciğer parankimasında periarteriel granülomlar oluşabilmektedir (Şekil 2.11, 2.12), (144, 146).



Şekil 2.11. *Dirofilaria immitis* enfeksiyonlu bir köpek akciğerinde gri-kahverengi alanlı bölgeler ve gri-beyaz renkli granülom

Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

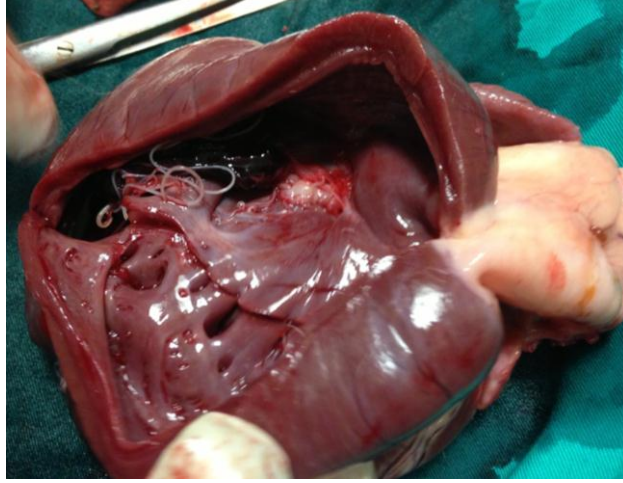


Şekil 2.12. Arteria pulmonalis'te bulunan erişkin *Dirofilaria immitis*

Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

Sağ ventrikulusa geçen parazitler kalpte oldukça önemli bir yer işgal ederek kanın daha az pompalanmasına neden olmaktadır. Parazit sayısının 50'nin üzerinde olması ventrikulusta tıkanma ve atriuma parazitlerin geçmesine, 100'den fazla olduğunda ise kalbin sağ bölümünün tamamının parazitlerle dolmasına (Şekil 2.13) ve pompalanan çok az sayıda kan kalmasına neden olmaktadır. "Caval Sendrom" olarak bilinen tablo en ağır seyreden form olup köpeklerin ölümüne neden olmaktadır (143, 144, 146). Bu formda posterior vena cava ve trikuspid valf bölgesine doğru geçen parazitler karaciğerde venöz basıncı artırır (pasif venöz konjesyon) ve parankimde hasara yola açar (25, 28, 140, 144, 147). Meydana gelen karaciğer yetmezliği serum kolesterol esterifikasyonunun azalmasına, alyuvar membranlarındaki kolesterolün artmasına ve bu

hücrelerin yapısının bozulmasına sebep olur. Sonuçta hemoliz, anemi, hemoglobinuri ve bilirubinemi gibi belirtiler şekillenir (28, 146). Karaciğer bozuklukları ayrıca olgun parazitleri elimine etmek için kullanılan organoarseniklerin (thiacetarsemide) ve mikrofilarisidal ilaçların uygulanması neticesinde de ortaya çıkabilir (28).



Şekil 2.13. Caval sendrom, kalbin sağ tarafında erişkin *Dirofilaria immitis*

Kaynak: Onmaz ve ark., 2013:14.

Enfekte köpekler tedavi edilmediği takdirde immun sistem kronik olarak stimule edilir (Kronik İmmün Stimülasyon). Yüksek düzeyde bulunan antikorlar göz, böbrek, kan damarları ve eklemlerin hassas membranlarında presipite olarak birçok bozukluğa sebebiyet verebilir. Bu alanlara yerleşen antikorlar bölgeye yangı hücrelerinin gelmesine sebep olarak büyük bir doku hasarı ve ağrı tablosunun ortaya çıkmasına neden olur (64, 144).

D. immitis ile enfekte köpeklerde mikrofilerler glomeruler epitelde travmalara ve amyloidosis oluşumuna sebebiyet verdikleri için böbreklerde glomerulonefritis şekillenebilmektedir. Ayrıca erişkinler vücutta parazit antijenlerine karşı antikor oluşumuna, antikorlarla antijenlerin birleşmesi neticesinde immun kompleks oluşumuna, bu immun komplekslerin taban membranında birikmesi neticesinde de böbreklerde glomerulonefritis şekillenmesine neden olmaktadır (6, 9, 27, 28, 31, 148).

Dirofilaria immitis'in mikrofilerleri de patolojik lezyonların oluşmasına neden olmaktadır. Mikrofiler yoğunluğunun fazla olması durumunda vücutta parazite karşı antijen-antikor kompleksleri oluşmakta ve Tip-2 aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşarak, hayvanlarda kaşıntılı-ülserli-nodüllü, kaşıntılı-papüllü-kabuklu, eritamatoz, alopesik, seboreik gibi değişik dermatitis tabloları şekillenebilmektedir (2, 6, 25).

2.6. Klinik Semptomlar

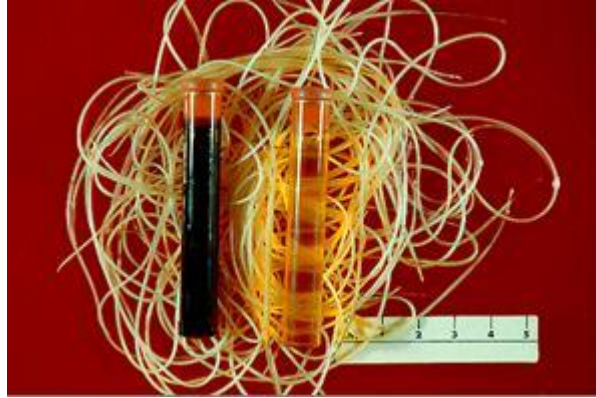
D. immitis diğer hayvanlardan ziyade köpeklerde daha sık görülen bir nematoddur. Bazı köpekler *D. immitis* ile enfekte oldukları halde herhangi bir klinik belirti göstermemektedirler. Klinik belirtiler, köpekte bulunan erişkin parazit sayısına, köpeğin yaşına, hastalığın köpekte bulunma süresine, parazitin köpektaki yerleşim yerine, köpeğin genel durumuna bağlı olarak değişiklik gösterir (2, 6).

Parazit ile enfekte köpeklerde klinik belirtilerin görülebilmesi için köpeklerde 25 den fazla sayıda erişkin parazitin bulunması gerekmekte, parazit sayısının 100 ün üzerinde olması durumunda ise enfeksiyon ağır bir seyir izlemektedir. Klinik bulgu olarak, köpeklerde solunum güçlüğü, kuru ve kısık öksürük, sağ kalp yetmezliğinden dolayı kısa mesafeli koşulardan sonra bile yorulma, hareket güçlüğü, proteinüri, hematüri, hipoalbuminemi bronchopneumoni, karın ve göğüs boşluğunda sıvı toplanması (asites), burun kanaması gibi belirtiler görülür (2.14). Hastalığın en şiddetli formu olan Caval sendrom şekillenmiş bir köpekte ses kısıklığı, salyada kan izleri ve çabuk soluma, taşikardi, kollaps, sinkop (bilinç kaybı), asfeksi, anoreksi, kaşeksi, ekstremitelerde ödem, kalp ve akciğerde patolojik sesler, değişik tipte dermatitisler, iştahsızlık, aşırı zayıflama, sarılık, hepatomegali, idrarda safra tuzları, proteinüri, hematüri, hemoglobünüri, hipoalbuminemi, bilirubinemi, bilirubinüri ve 1-2 gün içerisinde ölüm görülür (Şekil 2.15), (2, 5, 6, 28, 31, 40, 75).



Şekil 2.14. *Dirofilaria immitis* ile enfekte köpekte göğüs ve karın boşluğunda sıvı toplanması (Asites)

Kaynak: Johnstone, 2000:28.



Şekil 2.15. Caval sendromda hemoglobininuri (soldaki), normal idrar (sağdaki)

Kaynak: Johnstone, 2000:28.

D. immitis'in erişkinleri bazen kan yoluyla farklı doku ve organlara giderek yerleşebilmektedirler. Parazitler merkezi sinir sisteminde yerleştiğinde ataksi, salya artışı, konvülzyon, körlük, bitkinlik ve koma, göze yerleştiğinde ise gözyaşı akıntısı, fotofobi ve keratitis gözlenir (28).

Diğer klinik belirtiler ise sekonder olarak enfeksiyonun etkisini sürdürdüğü organlara bağlı olarak şekillenmektedir. Endemik bölgelerde kardiovasküler bozukluklar ve akciğer komplikasyonları *Dirofilariosis immitis*'i akla getirmelidir (2).

D. immitis'le enfekte köpeklerin çoğunda elektrokardiografi (EKG) bulguları normal düzeylerde görülmektedir. Dinlenme esnasında enfekte köpeklerin elektrokardiogramları normal iken, kısa süreli koşma sonrasında T dalgası ters olabilmektedir (2, 5). Ancak klinik tablonun ağır olduğu köpeklerin EKG'sinde sağ kalp hipertrofisini gösteren aritmi, sağ axis deviasyonu; toraks radyografisinde sağ ventriküler dilatasyon, akciğer arterlerinde genişlemeler ile akciğer loblarında intersitisyel veya alveoler infiltrasyon görülebilmektedir (49).

Yapılan bir çalışmada *D. immitis* ile enfekte köpeklerde, kalp için spesifik olan CK enzimi ile AST, ALT, ALP gibi karaciğer enzim seviyelerinin önemli derecede, serum total protein ve glikoz değerlerinin ise önemsiz derecede arttığı kaydedilmiştir (149).

D. immitis ile enfekte köpeklerin %10-67'sinde perifer kanda mikrofililer görülmemekte ve bu duruma gizli (okult) enfeksiyon adı verilmektedir. Bu durum henüz olgunlaşmamış, tek-cinsiyetli (erkek) veya steril dişi parazitlerden, microfilaricide uygulamalarından, immun kökenli reaksiyonlar sonucu dişi parazitlerin mikrofililer üretiminin baskılanması veya oluşan antikorların mikrofilierleri ortadan kaldırmasından oluşmaktadır. Gizli enfeksiyonların ortaya çıkmasındaki en yaygın nedenin immun kökenli reaksiyonlar olduğu kaydedilmektedir (41, 46). Yüksek antikor düzeyi

pulmoner kapillarlardaki mikrofilierlerin ölümüne sebep olarak, kapillar permeabilitede artış ve akciğerlerde aşırı duyarlık reaksiyonları (Alerjik pneumonitis) ile granülomatosise neden olur.

2.7. Teşhis Yöntemleri

Dirofilaria immitis'i teşhis edebilmek amacıyla konvansiyonel, serolojik, moleküler biyolojik yöntemlerle birlikte radyolojik, ultrasonografik ve anjiyografik tanı yöntemleri de kullanılmaktadır. Söz konusu tekniklerin kullanılmasıyla hem mikrofilierlerin hem de erişkin parazitlerin teşhisi yapılabilmektedir.

2.7.1. Konvansiyonel Yöntemler ile Teşhis

D. immitis'in kandaki larva formu olan mikrofilierleri saptama ve bu mikrofilierlerin morfolojik özelliklerini ortaya koymada çeşitli konvansiyonel yöntemlerden yararlanılmaktadır.

2.7.1.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Natif)

Lam lamel arasına alınan 1-2 damla kan örneği mikroskop altında incelenerek, kanda mikrofilier aranmaktadır (18, 145, 150). Eritrosit yoğunluğu nedeniyle mikrofilierlerin görülmesi zor olduğu için, eritrositleri lize etmek amacıyla, incelenecek kan örneğine bir damla %2 saponin veya %0.04 amonyum hidroksit ilave edilir (18, 41).

Yapılan bir çalışmada *D. immitis* mikrofilierlerinin tanısında kullanılan direkt kan muayenesinin sensitivitesi araştırılmış ve ml'de 50'den fazla mikrofilier bulunduğu takdirde direkt kan muayenesinin sensitivitesinin %100 olacağı kanısına varılmıştır (151).

2.7.1.2. Sürme Preparat Yöntemi

Lam üzerine alınan bir damla kan örneğinden sürme preparat hazırlanarak ya hareketli mikrofilierler yönünden ya da havada kurutulduktan sonra tespit edilerek çeşitli boya yöntemleri ile boyanıp, morfolojik özellikleri bakımından incelenir (19, 150).

2.7.1.3. Saponin Konsantrasyon Yöntemi

İki ml antikoagulanlı kan örneği, 1 ml % 2 saponin ile 5 ml'lik enjektörde homojenize edildikten sonra 4500 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra sedimentten alınan örnekler lam-lamel arasında mikroskopta mikrofilierler yönünden incelenmektedir (16, 18).

2.7.1.4. Mikrohematokrit-Kapillar Sedimentasyon Yöntemi

Mikrohematokrit kapillar tüplerine alınan antikoagulantlı kan örneği mikrohematokrit santrifüjüne yerleştirilerek 8500 rpm’de 4-5 dk santrifüj edilir. Plazma ile kan hücreleri arasında meydana gelen sarı renkteki tabaka plazma kısmı ile birlikte mikroskop altında mikrofilerler yönünden incelenir. Bir damla formalinli metilen mavisi (5 ml metilen mavisi solüsyonu, 15 ml distile su, 5 ml %10 formalin) ilave edilerek mikrofilerlerin morfolojik özellikleri incelenir (18, 41, 152).

2.7.1.5. Modifiye Knott Tekniği

Bir ml antikoagulantlı kan örneği, 9 ml % 2’lik formalin (2 ml konsantre [%37] formaldehit, 100 ml distile su) ile 10 ml ye tamamlandıktan sonra 1500 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek, süpernatant atılır (10 ml karışım için yaklaşık 1/4 sediment yeterlidir) ve sediment eşit hacimde % 0.1’lik metilen mavisi ile karıştırılır. Sedimentten alınan örnekler lam-lamel arasında mikroskop altında mikrofiler ölçüleri ile diğer morfolojik özellikleri yönünden incelenir (18, 19).

2.7.1.6. Membran Filtrasyon Tekniği

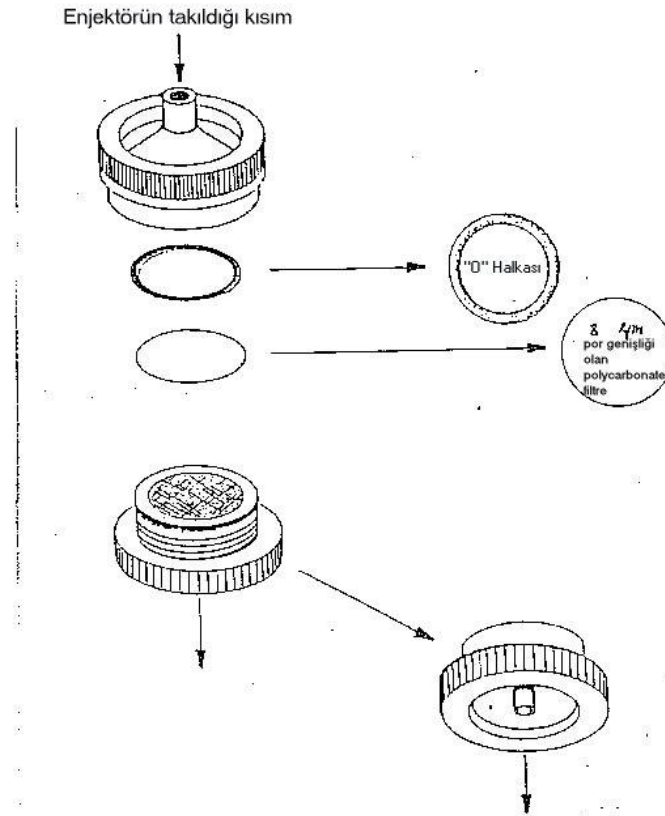
Bir ml antikoagulantlı kan örneği 9 ml lize edici solüsyon (8gr Na₂CO₃, 1000 ml distile su, 5 ml Triton X-100; % 2 formalin; fizyolojik tuzlu su ile homojenize edilmiş Teepol) ile 10 ml’lik enjektörde karıştırıldıktan sonra içinde 25 mm çapında 3, 5 veya 8µm por genişliğinde plastik, selüloz veya polikarbonat filtreden geçirilir (Şekil 2.16). Aynı enjektör vasıtasıyla 2-3 kez distile su geçirildikten sonra 2-3 defa da hava enjekte edilerek filtre üzerinde sıvı kalmaması sağlanır (18, 152-155). Tutucudan çıkartılan filtreler lam-lamel arasında mikroskopta incelenir. Mikrofilerlerin daha rahat görülmesi için filtre üzerine bir damla %0.01 metilen mavisi ilave edilir ya da mikrofilerin yapısını incelemek için filtreler havada kurutulur, tespit edilir ve daha sonra amaca yönelik olarak boyanır (153, 156-158).

2.7.1.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi

Mikrofilerlerin ayrıcı teşhisinde yaygın olarak kullanılan ve oldukça başarılı olan asit fosfataz histokimyasal boyama tekniğinde, kırmızı-kahverengi azo boyasının türlere göre farklı bant veya nokta tarzında, mikrofilerlerin çeşitli somatik doku ve hücrelerinde presipite olduğu kaydedilmektedir. Bu amaçla sürme preparat veya membran filtreleri, ya hazır kit ile (159, 160) ya da naphtol AS-TR-phosphate boya solüsyonu hazırlanarak (155, 161, 162) boyanmaktadır. Oda sıcaklığında 2-3 saat histokimyasal boya solüsyonu içerisinde inkübasyona bırakılan preparatlar distile su ile yıkandıktan

sonra %1'lik metilen yeşili veya Mayer's hemalum ile boyanır. Tekrar su ile yıkanan preparatlar havada kurutulduktan sonra üzerine lamel kapatılarak mikroskopta, mikrofilerlerdeki asit fosfataz aktivitesi yönünden incelenir (161, 160). Kan örneklerinin alımında antikoagulant madde olarak kullanılan EDTA'da, enzim aktivitesinin oluşması için gerekli magnezyum bağlandığından heparin sitrat, heparin oxalate veya sodyum sitratın seçiminin daha uygun olduğu kaydedilmektedir (162).

MEMBRAN FİLTASYON TERTİBATI



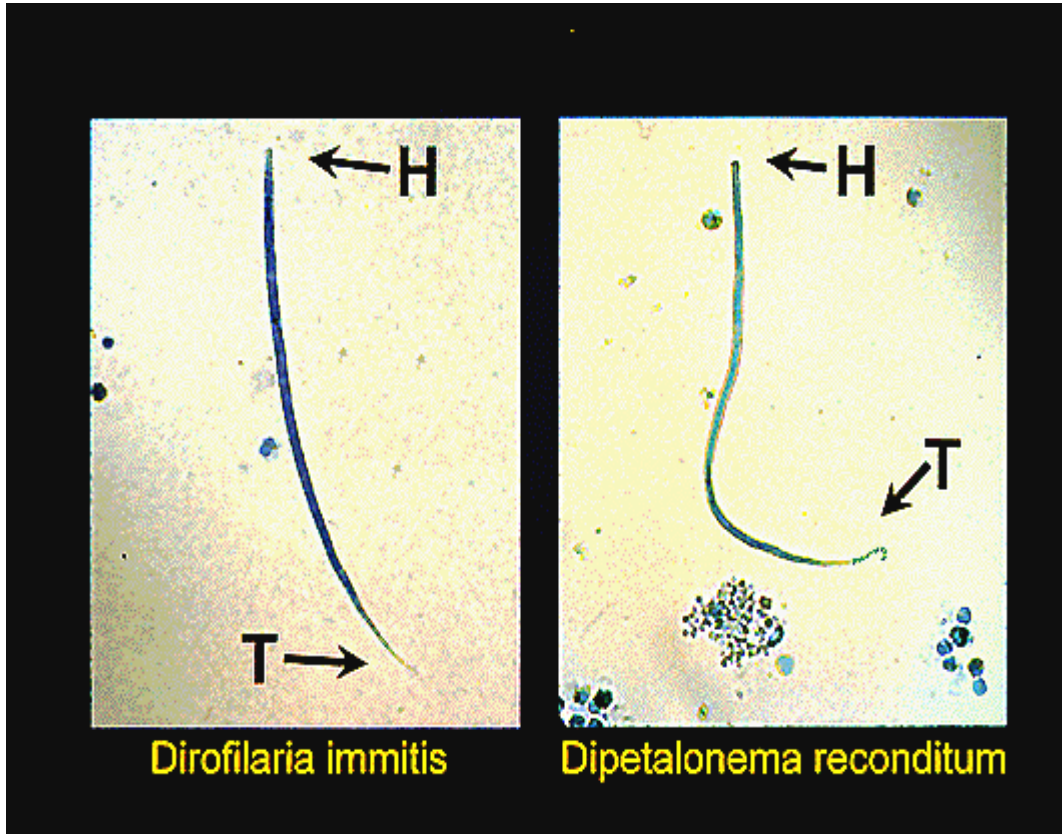
Şekil 2.16. Membran filtrasyon tertibatı

Kaynak: Nolan, 2002:158.

Yukarıda adı geçen muayene yöntemlerinde mikrofilerlerin hareket ve morfolojik özellikleri incelenmektedir. Hareket özellikleri daha çok natif yöntemle göre verilmekte olup *D.immitis* mikrofilerlerinin genellikle belli bir bölgede dalgalanma tarzında, yavaş hareketli olduğu ve mikroskop sahasının dışına çıkmadığı belirtilmektedir (18, 143, 163).

Mikrofiler identifikasyonunda, en ve boy ölçümleri ile baş, kuyruk ve gövde morfolojik özellikleri önem taşımakta olup (11, 13, 15, 16, 18, 19, 143, 152, 163, 164), daha çok Modifiye Knott testi ile yapılan incelemelere göre kaydedildiği (19, 163) ve uygulanan

tekniklere göre ölçümlerde farklılıklar olabileceği belirtilmiştir (17-19, 155). *Dirofilaria immitis* ve *D.repens* mikrofilerlerinin ortalama 290 µm den büyük, *D.reconditum* mikrofilerlerinin ise 290 µm den küçük olduğu bildirilmektedir (19, 143, 146, 165). Mikrofilerlerde anterior ucun *D. immitis*'de konik şekilde, *D.repens*'de yuvarlak şekilde, *D.reconditum*'da paralel seyredip küt olarak sonlandığı kaydedilmektedir (Şekil 2.17), (19, 146, 163). *D. immitis* mikrofilerlerinde kare tarzında olan ve net gözükmeyen cephalic boşluğun, *D.repens* ve *D.reconditum* mikrofilerlerinde net olarak gözüktüğü belirtilmektedir (19, 165). *D. reconditum* mikrofilerlerinde anterior uçta 4 µm uzunluğunda cephalic çengel bulunduğu kaydedilmektedir (17, 19).



Şekil 2.17. *Dirofilaria immitis* ve *Dipetalonema reconditum* mikrofilerleri; H: Ön, T: Kuyruk

Kaynak: Johnstone, 2000:28.

Dirofilaria immitis ve *D.repens* mikrofilerlerinde düz olarak sonlanan kuyruğun, *D. reconditum* mikrofilerlerinde çoğunlukla çengel tarzında kıvrıldığı, *D.immitis* ve *D.repens* mikrofilerlerinde düz olan gövdenin *D.reconditum*'da hilal şeklinde bir görüntü sergilediği kaydedilmiştir (11, 19, 146, 165, 166).

Mikrofilerlerin bazı somatik yapıları ile anterior uç arasındaki uzaklığın vücut uzunluğuna oranının teşhiste oldukça önem taşıdığı ve bu amaçla sürme preparat veya

membran filtrasyon testinde saptanan mikrofilerlerin Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Brilliant cresol blue, Hematoxyline ferrique ve Hemalun-eosine gibi çeşitli boyama teknikleri ile boyandığı belirtilmektedir (19, 164, 166). Hematoxyline ferrique ve May-Grunwald-Giemsa boyama yöntemleri ile mikrofilerlerdeki somatik yapıların daha net görüldüğü bildirilmektedir (19, 166).

Asit fosfataz aktivitesinin *D.immitis* mikrofilerlerinde boşaltım deliği (EP) ve anal delikte (AP) kırmızı-kahverenginde, nokta tarzında görüldüğü bildirilirken (Şekil 2.18), (13, 19, 41, 162, 155, 159-161, 167), *D.repens* mikrofilerlerinde yalnızca anal delikte (AP) şekillenip yüzük (halka) tarzında görüldüğü saptanmıştır (13, 19, 160, 162).



Şekil 2.18. *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinde asit fosfataz aktivitesi

Kaynak: Johnstone, 2000:28.

2.7.2. Serolojik Yöntemler ile Teşhis

Dirofilaria immitis enfeksiyonlarında Indirekt Floresan Antikor Testi (IFAT), Counterimmunoelktrophoresis, Latex Aglütinasyon, Koaglütinasyon, Hemaglütinasyon ve ELISA gibi immunoserolojik tanı yöntemleri kullanılmaktadır (41, 168, 169).

Antikor testlerinden IFAT'ın yüksek duyarlılıkta olduğu ancak bağırsakta yerleşen nematodlar ile *D.reconditum* ve *D.repens*'le çapraz reaksiyon vermesinin düşük spesifiteye neden olduğu kaydedilmektedir. (143, 170).

Antijen testlerinin antikor testlerine oranla daha yüksek spesifite verdiği kaydedilmekte, sadece *D.repens* ile çapraz reaksiyon gözlenebileceği belirtilmektedir (40). Mevcut antijen testleri yalnızca dişi üreme organlarından kaynaklanan antijenlere karşı

antikorları saptadığı, gelişmemiş veya sayılarının az olduğu durumlar (<3) ile yalnızca erkek parazitlerin mevcut olduğu durumlarda etkili sonuç alınamadığı kaydedilmektedir (40, 146).

Yapılan bir çalışmada, *D. immitis* ile *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis* ve *Ancylostoma caninum* arasında serolojik testlerde cross reaksiyon olup olmadığı araştırılmıştır. *D. immitis* ile enfekte serum örneği ile *T. vulpis* ve *A. caninum* crude extractları arasında cross reaksiyon tespit edilememiş ancak *T. canis*'e ait 44, 57, 88 ve 100 kDa ağırlığındaki protein bantlarının immunoblotting analizinde *D. immitis* ile güçlü bir cross reaksiyon belirlenmiştir. Bu durumun parazitin somatik yapılarındaki antijenik epitoplara bağlı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmektedir (171).

Günümüzde bu amaçla antijen testi olarak ELISA, diğer testlere nazaran tercih edilmekte ve çeşitli ticari kitler kullanılmaktadır. Bu kitlerle yapılan araştırmalarda (134, 169, 172, 173) sensitivitenin %64.5-87.3, spesifitenin ise %95.9-100 arasında değiştiği, zayıf pozitif reaksiyonun görüldüğü durumlarda antijen testinin tekrar edilmesi gerektiği kaydedilmiştir.

2.7.3. Moleküler Teknikler ile Teşhis

Dirofilaria soyunda yer alan ve dirofilariosis'e neden olan türler mikroskopik yöntemlerin kullanılarak yapılan teşhislerde birbirlerine benzemeleri nedeniyle araştırmacılar tarafından karıştırılmakta ve dolayısıyla net bir teşhis konulamamaktadır. Ancak teknolojinin bilim dünyasındaki gelişimiyle birlikte hem bu tip karıştırmaları önlemek hem de çapraz reaksiyonların önüne geçmek amacıyla sensitivite ve spesifitesi yüksek olan moleküler tabanlı teknikler geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır.

Enfeksiyonun spesifik teşhisi veya parazitlerin identifikasyonu için kullanılan PCR tabanlı testlerde bir veya daha fazla hedef DNA bölgesi belirlenebilmektedir. Bu yöntem, hedef organizmanın genomundaki, özgül bir DNA dizilimini, tekrarlayan şekillerde, binlerce kez çoğaltarak, kolaylıkla tespit edilebilir hale getirmektedir. Spesifik identifikasyon için hedef DNA bölgesi popülasyon içindeki küçük bir farklılığı bile ortaya koyabilmelidir. Bunun yanında PCR ile kanda %0.000083 oranındaki paraziteminin saptanabilmesi dirofilariosis'in teşhisinde PCR'ın önemli bir tanı yöntemi olduğunu göstermektedir (50, 174, 175).

Moleküler tabanlı yöntemlerden olan real-time PCR'ın, 1990'ların başında gelişmesiyle birlikte PCR amplifikasyonu görünür hale gelmiştir. Real time PCR sistemi, floresan işaretli boya ve probalar kullanılarak PCR çoğaltımını görünür hale getirmekte ve

monitorize edebilmekte ve aynı zamanda birden fazla paraziti kantitatif olarak eş zamanlı tespit etmesiyle oldukça spesifik bilgiler sağlamaktadır (176, 177). Yöntemin biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarını oluşturmakla birlikte tek nokta mutasyonlarını belirleme, hastalık etkeni patojenleri ve DNA hasarını belirleme, metilasyon tespiti, SNP analizi (single nucleotid polymorphism), kromozom bozukluklarının tespiti gibi birçok çalışmalarda da kullanım alanları bulunmaktadır (178). *Dirofilariosis* enfeksiyonlarının teşhisinde hızı, sensitivite ve spesifitesi, seçiciliği, hedef patojen veya gen bölgesinin kantitatif olarak belirlenebilmesi ve otomasyona uygun olması gibi nedenlerle son yıllarda öne çıkan real-time PCR tekniği ile yapılan çalışmalarda, söz konusu tekniğin tekniğinin *D. immitis* teşhisinde ve epidemiyolojik çalışmalarda oldukça duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (179-181).

2.7.4. Radyolojik Tanı Yöntemleri

Dirofilaria immitis mikrofiliterleri görülen köpeklerin %80-90'ında radyolojik muayene yöntemlerinin pozitif sonuç verdiği bildirilmektedir (146). Bu muayene yönteminde, sağ ventrikül, ana pulmoner arter ile pulmoner arterdeki genişleme ve kısılma, hepatomegaly, asites gibi anormallikler tespit edilebilmektedir (40, 41, 146, 182).

Ayrıca fazla pratik olmamakla birlikte, *D.immitis* enfeksiyonlarının teşhisinde, Anjiyografi, Ekokardiografi, Elektrokardiografi gibi yöntemlerin de kullanıldığı kaydedilmektedir (40, 146, 150, 183, 184).

2.8. Tedavi

Son yıllarda paraziter hastalıkların tedavisi, bu hastalıklardan korunma ve bu hastalıkları kontrol altında tutabilmek adına yoğun çabalar sarf edilmektedir. Bu amaçla, parazitlere karşı etkili aşılar geliştirilmeye çalışılmış, yeni kemoterapotik ajanlar üretilmeye başlanmış ve vektör kontrolü üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmaların sonuç verebilmesi, sensitif ve spesifik, prediktif ve prognoztik, ucuz ve kolay tanı metotlarının geliştirilmesine ve bu metotlarla sağlıklı verilerin toplanarak değerlendirilmesi neticesinde etkili korunma ve kontrol metotlarının ortaya konabilmesine bağlıdır (185).

Dirofilaria immitis ile enfekte bir köpeğin tedavisine başlamadan önce kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri yapılmalı, test sonuçlarına göre tedavi prensipleri belirlenmelidir. Aynı zamanda kullanılacak ilaçların dozunun da çok iyi ayarlanması

gerekmektedir. Çünkü ilaç az miktarda verildiğinde erişkin parazitler ölmekte, çok miktarda verildiğinde ise hepatotoksik ve nefrotoksik etki nedeniyle karaciğer ve böbreklerde doku hasarı meydana gelmektedir (5, 6, 186).

Dirofilaria immitis'in tedavisinde önce erişkin parazitleri, daha sonra da mikrofilerleri öldürmek amaçlanmalıdır. Erişkin parazitlere karşı kullanılan ilaçlar şunlardır:

1- Thiacetarsamide Sodium (Arsenamide Sodium): İntra venöz (i.v.) olarak iki gün süreyle, günde 2 kez 2,2 mg/kg dozda uygulandığında erişkin parazitlere karşı etkili olmaktadır (5, 6, 28, 40, 186, 187).

2- Melarsomine dihydrochloride: Üç-24 saat arayla, 2 gün süreyle ve 2,5 mg/kg dozda intramuskuler (i.m.) uygulandığında etkili olmaktadır. Hafif enfeksiyonlarda uygulama 4 ay sonra tekrarlanmalıdır. Ağır enfeksiyonlarda ise öncelikle hayvanlardaki diğer semptomlara yönelik tedavi uygulanarak genel durum düzeltilmeye çalışılır. Daha sonra 2,5 mg/kg dozda intramuskuler olarak melarsomine dihydrochloride tek doz olarak, bir ay sonra 24 saat ara ile iki doz olarak uygulanır (6, 9, 186).

3- Levamisole: Günlük 2,5 mg/kg dozda 2 hafta süreyle hergün uygulanır. Sonrasında 5 mg/kg dozda iki gün boyunca ve 2 hafta süreyle günde 10 mg/kg dozda uygulandığında etkili olur (6, 188).

4- Prednisolan: Tedavi amacıyla 1-2 mg dozda birkaç gün oral yolla kullanılabilir (9, 189).

Erişkin parazitlere yönelik olarak kullanılan ilaçlar tedavi esnasında trombo-emboli oluşumuna neden olabilmektedir. Bunu engellemek için kanı sulandırıcı ve tromboz oluşumunu engelleyici ilaçlar da tedavi süresince kullanılmalıdır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar ise şunlardır:

a) Acetylsalicylic acid (Aspirin): Oral yolla 5-7 mg/kg 2-3 hafta süreyle kullanılabilir (6, 189).

b) Ticlopidine hydrochloride: Tedavi süresince hergün 108 mg/kg dozda verilebilir (6).

c) Heparin: Her 8 saatte bir subcutan yolla 300 U/kg dozda uygulanabilir (6).

Mikrofilerlere yönelik tedaviye, erişkin parazitlere yönelik ilaç uygulamalarından 3-6 hafta sonra veya erişkinlerden kaynaklanan komplikasyonlar ortadan kalktıktan sonra başlanmalıdır (143, 150).

Mikrofilerlere karşı kullanılan ilaçlar şunlardır:

1- Ivermectin: Oral yolla 0,05 mg/kg tek doz uygulanabilir (6, 186).

- 2- Levamisole: Oral yolla 11 mg/kg dozda, 1 hafta- 1 ay arasında değişen sürede kullanıldığında mikrofilere karşı etkilidir (6, 188).
- 3- Milbemycin oxime: Oral yolla 0,5 mg/kg dozda kullanılabilir (6, 186, 189).
- 4- Dithiazanine-iodide: Oral yolla 4mg/kg dozda bir hafta boyunca uygulanabilir (188, 189).

Ayrıca aşırı duyarlılığa bağlı olarak ortaya çıkan dermatitis tablosu tedavi sonrasında kendiliğinden ortadan kalkmaktadır (6).

Erişkin parazitler uygun anthelmintiklerle öldürüldükten sonra yerleştikleri yerlerde ortaya çıkabilecek olan komplikasyonları önlemek amacıyla cerrahi yolla (arteriotomi) ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu amaçla özellikle boyundaki geniş venalardan (vena jugularis gibi) girilerek erişkin parazitler alınabilir. Ancak operasyon için respirasyon aleti gerekliliği, mortalitenin kemoterapiden daha yüksek olması, tüm erişkinlerin damardan çıkarılamaması gibi nedenlerden dolayı arteriotomi pek tercih edilmemektedir (6, 28, 189- 191).

2.9. Korunma ve Kontrol

Köpekleri *Dirofilaria immitis*'ten korumak için L₃ ve L₄'lere karşı etkin bir antihelmintik ilaç kullanılmalıdır. Antihelmintik ilaç kullanımına sivrisineklerin görülmeye başlandığı dönemden bir ay önce başlanmalı ve sivrisineklerin ortadan kaybolduğu dönemin bir ay sonrasına kadar devam edilmelidir (6, 189).

Köpekleri *D. immitis*'ten korumak için kullanılan ilaçlar şunlardır:

- 1- Ivermectin: Ayda bir kez 0.006 mg/kg dozda kullanılabilir. İlacın bu dozu Koli ırkı köpeklerde toksik etki yaratmamaktadır. Ancak bu köpeklerin 8 saat süreyle gözetim altında tutulması gerekmektedir (6, 9, 158, 189, 191).
- 2- Moxidectin: Ayda bir kez 0.003 mg/kg dozda kullanılabilir. Koli ırkı köpeklerde 30 kat doza çıkılması durumunda ataksi, salivasyon, depresyon gibi bulgular görülebilir (9, 158, 189).
- 3- Milbemycin oxime: Ayda bir kez 0,5 mg/kg dozda kullanılabilir (6, 9, 189).
- 4- Diethylcarbamazine (DEC): Günde 5.5-6.5 mg/kg dozda yiyeceklerle birlikte verildiğinde immatür parazitler gelişmemektedir. İlacın şurup ve tablet formları da vardır (40, 184, 188, 189).
- 5- Selamectin: Ayda bir kez 0.6 mg/kg dozda topikal olarak uygulandığında etkili olmaktadır (9, 40, 189, 192)

Birisi *Dirofilaria (Nochtiella) repens*, diğeri de *D. immitis* ile doğal enfekte iki köpek üzerinde yapılan bir çalışmada, bir organik arsenik bileşiği olan “Aricyl^R” ile levamisole preparatı olan “Citarin-L^R” nin parazitler üzerine etkisi incelenmiştir. Tedaviye başlamadan önce akşam saat 18.00’da alınan 1 cm³ kandaki mikrofler sayısı, *D. immitis* ile enfekte köpekte 2250, *D. (Nochtiella) repens* ile enfekte köpekte 2530 olarak saptanmıştır. Köpeklere de önce iki hafta boyunca her gün 2.5 mg/kg dozda, sonra iki hafta ara ile iki defa 5 mg/kg dozda, derialtı yolla Citarin-L^R (levamizol) enjeksiyonu yapılmıştır. Levamisole uygulamasından 45 gün sonra da erişkin parazitlere karşı, 2.2 mg/kg dozda günde 2 defa 2 gün süreyle damar içi yolla Aricyl (arsenik bileşiği) verilmiştir. Sonra köpeklere otopsi yapılmıştır. Köpeklerden birinin sağ ventrikülüsünde 7 adet canlı *D. immitis*, diğlerinin ise sırtında, derialtı bağ dokusunda 1 adet canlı *D. (Nochtiella) repens*’e rastlanmıştır. Citarin-L^R ile tedaviden bir ay sonra yapılan muayenede mikrofler sayıları *D. immitis* ile enfekte köpekte 26, *D. (Nochtiella) repens* ile enfekte köpekte 20 olarak belirlenmiştir. Tedavi sonrasında Aricyl^R’nin olgun parazitlere karşı etkili olmadığı, Citarin-L^R’nin ise gerek *D. immitis* ve gerekse *D. (Nochtiella) repens*’in mikroflerlerine karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür (63).

Eskişehir’de yapılan bir çalışmada, 1.Taktik Hava Üs Komutanlığı’na ait, *Dirofilaria immitis* ile enfekte, 6-11 yaş arası Alman Kurt ve Kangal ırkı 14 köpek kullanılmış, bunlardan 10 u tedavi, 4 ü kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Tedavi grubu olarak ayrılan köpeklere 2 hafta süreyle oral yolla 2.5 mg/kg dozda levamizol (Citarin-L^R) verilmiştir. Bu uygulamadan 15 gün sonra aynı ilaç 5 mg/kg dozda tekrar verilmiştir. İlk uygulamadan 35 gün sonra 5 gün süreyle 0.2 mg/kg dozda ivermectin (Ivomec^R) verilmiştir. Hayvanların vücut direncini artırmak amacıyla tedavinin 1. ve 30. günlerde derialtı yolla 50 mg dozda organik arsenik bileşiği (Aricyl^R) verilmiştir. İlaç uygulamalarından 30 gün sonra yapılan kan muayenelerinde, tedavi grubu olarak ayrılan köpeklerin 7 sinde mikrofler görülmüş, 3 ünde görülmemiştir. Ivermectin uygulamasından bir ay sonra ise tedavi grubundaki hiçbir köpekte mikrofler görülmemiştir. Üç ay sonra yapılan muayenelerde ise tedavi grubundan bir köpekte mikrofler görülmüş, diğlerinde görülmemiştir. Levamizolun parazitin mikroflerlerine karşı yeterince etkili olmadığı, ivermectinin ise etkili bir ilaç olduğu ifade edilmiştir (74).

Bir başka çalışmada, *D. immitis* ile enfekte 9 köpeğe iki gün süreyle günde iki kez 2.2 mg/kg dozda thiacetarsamide sodium uygulanmış, uygulamayı müteakip halsizlik ve iştahsızlığın düzeldiği, öksürüğün 15-20 gün içinde ortadan kalktığı görülmüştür (49).

Gemlik'te yapılan bir çalışmada *D. immitis* ile enfekte oldukları tespit edilen köpekler 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 ve 210. günlerde kandaki mikrofilere sayıları belirlenmiştir. Yapılan analizlerde, ilaç uygulamaları sonrasında mikrofilere sayısında ciddi oranda azalma tespit edilmiştir. Çalışma neticesinde ivermectinin etkili bir mikrofilarisid olduğu, 0.2 mg/kg dozun köpeklerde herhangi bir olumsuz etki göstermediği, aynı dozun 3 ay aralıklarla tekrarlanması durumunda parazitin yayılımının kontrol altında tutulabileceği kanısına varılmıştır (87).

Heartgard-30 (ivermectin) ve Interceptor (milbemycin oxime) isimli ticari preparatlar köpekleri dirofilariosis'den korumada, hem erişkin parazitleri hem de mikrofilere ortadan kaldırmada etkili bulunmuştur. Bu preparatların 30 günde bir kullanımı yeterli olmaktadır. Ancak bu preparatlar köpeklerde kısa süreli ishallere neden olmaktadır. Ayrıca diethylcarbomazine içeren Filaribits Plus isimli ticari preparat enfektif larvaları öldürebilmekte ancak erişkin parazitlere karşı fazla etkili olamamaktadır (23).

Vektör sivrisineklerin kontrolünde kullanılan yöntemlerin genel amacı ise, üreme alanlarını kurutmak, larva ve erişkinlerle ayrı ayrı mücadele etmek, sivrisineklerin hayvan ve insan barınaklarına girmesini engellemek, sivrisinek popülasyonunu azaltmaktır. Bu amaçla yapılan mücadele yöntemleri şunlardır:

a) Çevre Düzenlemesi: Çevre düzenlemesi vektörün üremesini engelleyecek şekilde yapılmalıdır. Vektör kaynakları kurutulmalı ve patojen-vektör-insan bağlantısı kesilmelidir. Larva üreme alanlarına drenaj kanalları açılmalı, kanalizasyon sistemleri iyi yapılmalı, su birikintileri ve bataklıklar kurutulmalı veya buralara belli periyotlarla insektisitler püskürtülmeli, su seviyesi ve akıntı hızı değiştirilmeli, konutlar sivrisinek üreme alanlarından uzakta inşa edilmelidir (21, 186).

Kişisel kontrol tedbirleri de sivrisinek saldırılarından korunmak adına önem taşımaktadır. Bu amaçla kapı ve pencerelerde sineklik kullanılması, uyurken cibinlik kullanılması, akşam ve geceleri açık alanda oturulmaması, vücudun açık kısımlarına repellent sürülmesi önerilmektedir (21, 186).

b) Biyolojik ve Mikrobiyal Kontrol: Biyolojik kontrolde amaç, zararlı bir artropoda karşı o zararlının patojeni, avcısı veya onunla yarışan başka bir organizmanın toksik

maddeleri gibi biyolojik ajanları silah olarak kullanmaktır. Bu biyolojik ajanlar sadece hedef canlıyı etkilemekte ve diğer canlılara zarar vermemektedir. Ayrıca bu ajanlara karşı direnç gelişimi de söz konusu değildir. Ancak bu ajanların, suya uygulandıklarında dibe çökmeleri, uygun olmayan yerlerde birikmeleri, çevreden zarar görebilmeleri gibi dezavantajları vardır. Sivrisineklerin kontrolünde biyolojik ajan olarak sivrisinek balığı da denen *Gambusia affinis* türü balıklar yetiştirilebilir ki, bu balıklar sinek larvalarını yiyerek beslenmektedir. Sivrisinek larvalarını enfekte edebilen *Romanomermis culcivorax* adlı bir nematod ile *Nosema algerae* adlı bir protozoon da biyolojik kontrol amacıyla kullanılmış, ancak her ikisinin de kötü hava şartlarından etkilenmesinden dolayı kontrol değerinin düşük olduğu görülmüştür. Sivrisineklere özgü patojen bir bakteri olan *Basillus thuringiensis israelensis* de larvalarla mücadele amacıyla kullanılmıştır (21).

c) Genetik Kontrol: Genetik kontrolde amaç, bir defaya mahsus laboratuvar ortamında üretilen bir genotipin doğadakilerle değiştirilmesidir. Bu amaçla kimyasal kısırlaştırıcılar veya radyasyon kullanılarak erkek bireyler kısırlaştırılıp doğaya bırakılır. Bu yöntemle, sivrisineklerin bir çiftleşme sonrasında çok sayıda yumurta ürettikleri için zamanla doğada kısır birey sayısında artış kaydedileceği düşünülmüştür. Ancak bu deneyler sonrasında kısırlaştırılan erkeklerin doğaya uyum sağlayamaması nedeniyle popülasyonda kayda değer bir azalma olmadığı görülmüştür. Son yıllarda moleküler genetikte kat edilen gelişmeler doğrultusunda, hastalık ajanlarına dayanıklı genleri taşıyan ve doğadakilerle yarışabilen transgenik sivrisinek ırkları elde etmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (21).

d) Kimyasal Kontrol: Kimyasal kontrol amacıyla kullanılan insektisitler kısa zamanda, kesin ve etkin sonuç alınmasını sağlamaktadır. İnsektisitler, mide zehiri olarak, sistemik zehir olarak, solunum zehiri olarak, su kaybı yaratarak, hormonal ve kimyasal inhibitör olarak etki gösterirler. Ancak son yıllarda hedef organizma dışındakileri de etkilemesi, çevrede birikmesi, organizmada direnç geliştirmesi, maliyeti artırması gibi nedenlerden dolayı insektisitlerin kullanılmasına yönelik tepkiler artmıştır. Bütün bu olumsuzluklara rağmen insektisit kullanımı akılcı ve bilimsel değerlendirmeler neticesinde yapıldığı takdirde vazgeçilmez hale gelmiştir. Kimyasal kontrol amacıyla Propoxur, Dichlorvos (DDVP), Fenthion, Chlorpyrifos gibi karbamatlı ve organik fosforlu insektisitlerin yanı sıra DEET gibi böcek kovucular (repellent) ile Deltamethrin, Permethrin ve Cypermethrin gibi sentetik piretroitler kullanılmaktadır (21, 186).

2.10. *Dirofilaria immitis* ve Endosimbiyont *Wolbachia*

Wolbachia, Rickettsiaceae familyasına ait, gram negatif bir alfa proteobakteridir. *Wolbachia* ilk kez 1924 yılında Herting ve Wolbach tarafından sivrisineğin üreme dokularında saptanmıştır. Bunun ilk tanımlanması aynı sinek türünde 1936 yılında *Wolbachia pipientis* olarak Herting tarafından yapılmıştır (193, 194).

Bu bakteri obligat, hücre içi organizma olup, bazı artropod ve nematodlarda kütikula altında hypodermisteki hücrelerin içinde buna ilaveten dişilerde ovaryum, ookist ve uterustaki embriyonik gelişim devrelerinde bulunur (195, 196). Bu durum bakterinin vertikal olarak taşınabildiğini de göstermektedir (195). Kokoid veya basilliform şeklinde olan bu bakteri, çift membranlı, ribozomal granüllü ve ortalama 0.8-1.3µm uzunluğunda olup dünya genelinde çok yaygındır.

Yapılan araştırmalarda 63 artropod türünden (Aracnida 2, İnsecta 61) 48'inde (%76), 20 filarial nematod türünün 18'inde (%90) *Wolbachia* tespit edilmiştir (197, 198). *Wolbachia* insek türlerinin en az %20'sini (199-201), filarial nematodların ise neredeyse tamamını infekte eder (202). *Wolbachia*, *ftsZ* (hücre bölünmesi geni), *groEL* (bakteriyel ısı şok proteini), *gltA* (sitrat sentaz) ve *dnaA* gen sekanslarına bağlı olarak A'dan H'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. *Wolbachia*'nın A ve B genotipleri artropodların büyük bir kısmını, C ve D genotipleri nematodları, E genotipi springtailleri (yay kuruğu böceği), F genotipi bazı artropod ve nematodları, G genotipi örümcekleri ve H genotipi de termitleri enfekte etmektedir (194, 198, 203). *Dipetalonema gracile*, *Dirofilaria repens* (filarial nematod) ve *Ctenocephalides felis* henüz bu sınıflandırmada bir alt gruba yerleştirilememiştir. Filarial nematodlardan *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ve *Litomosoides sigmodontis* D alt grubunda, *Onchocerca* ve *Dirofilaria immitis* C alt grubunda yer almaktadır (194, 203-205). Diğer filarial türlerde olduğu gibi, *D. immitis* ve *D. repens*'de de *Wolbachia* hücre içinde bulunan bir bakteridir (206). *Dirofilaria* ve *Wolbachia* arasındaki simbiyotik ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte filarial parazitlerin bakterinin gelişmesi ve replikasyonu için gerekli olan aminoasitleri sağladığı, diğer taraftan *Wolbachia* bakterilerinin ise *Dirofilaria* nematodlarının metabolizması için gerekli olan glutathione ve haeme gibi çeşitli önemli molekülleri ürettiği öne sürülmektedir (207). Bu açıdan filarial enfeksiyonlar için yeni kontrol/tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bu simbiyotik ilişki anahtar rol üstlenmektedir.

Gram-negatif bakteri olması sebebi ile *Wolbachia* filarial enfeksiyonlarda patogeneze ve immun yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. *Wolbachia* hem canlı parazitlerden hem de parazitlerin doğal ölümü, mikrofilarial yıkımlanma ve farmakolojik müdahale sonrası ölen parazitlerden salınmaktadır (208). Enfeksiyonun insan ve fare modellerinde bakterinin salınımının pro-inflamatör sitokinlerin up-regülasyonu, nötrofil artış ve spesifik immunglobulinlerin artışı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *D. immitis* enfeksiyonu sonucu doğal olarak ölen köpeklerde bakterinin mikrofililerin normal olarak sirküle ettiği özellikle böbrek ve karaciğer gibi organlarda yoğunlaştığı belirlenmiştir (206). Bunun yanında mikrofilaremik köpeklerde gizli enfekte köpeklerde oranla daha güçlü spesifik bir immun yanıt belirlenmiştir. Bu durum da mikrofilier yıkımlanmasının kalp kurdu ile enfekte köpeklerde *Wolbachia* için önemli bir kaynak olduğu hipotezini desteklemektedir. Bunun yanında *D. immitis*'ten açığa çıkan *Wolbachia*'nın chemiokinesis ve kanin nötrofillerde pro-inflamatör sitokin üretimini provoke ettiği gösterilmiştir (209).

Filarial parazitlerdeki *Wolbachia* enfekte konaklarda antibiyotik tedavisi ile uzaklaştırılabilir. Çeşitli çalışmalar çeşitli tedavi protokollerinin (Tetracycline ve sentetik deriveleri en etkili grup olarak gösterilmektedir), filarial parazitten *Wolbachia* bakterilerinin tamamen uzaklaştırılmaması durumunda etkinliklerinin şiddetli bir şekilde azalma gösterdiğini ortaya koymuştur. *Wolbachia*'ların antibiyotik tedavisi ile uzaklaştırılması sonunda filarial nematodlarda dolaşımdaki mikrofilier düzeyinde azalma, embriyogenesinin bloklanması, dişilerin sterilizasyonu, larval gelişimde defektler ve erişkin nematodların ölmesine kadar çeşitli anti-filarial etkilere de neden olmaktadır (204, 210). Doğal enfekte köpeklerde yapılan ön çalışmalar (206) melarsomine ile adulticide tedavisinden önce yapılan doxycycline tedavisinin ergin parazitlerin ölümüne bağlı pro-inflamatör reaksiyonların azalmasına yardımcı olabileceğini göstermiştir. Anti *Wolbachia* yüzey proteininin (WSP) konaklarda saptanması epidemiyolojik çalışmalarda enfeksiyonun gerçek etkisini değerlendirmede önemli olduğu belirtilmektedir. Bu noktada risk faktörlerinin yalnızca aktif enfeksiyonla (filarial antijenlerin saptanması) değil aynı zamanda kedi dirofilariosis'inde daha çok önemli olmak üzere prepatent enfeksiyonların saptanması ile de ortaya konabileceği kaydedilmektedir. Bunun yanında makro/mikrofilaricidal tedavi etkinliğinin takip edilmesinde de *Wolbachia* antikör düzeylerinin tespit edilmesi önem arz etmektedir. Filarial parazitlerin ölmesi *Wolbachia* bakterilerinin salınımı için esas faktör olup,

konak immun sistem uyarımının artmasına yol açar. Anti-*Dirofilaria* antikorlarındaki düşüşle birlikte anti-*Wolbachia* antikor düzeylerinde saptanan yükselme ilaç etkinliğinin bir işareti olarak değerlendirilebilir (211).

Rezervuar konaklarda dirofilariosis için *Dirofilaria* moleküllerinin kullanımı ya da saptanmasına bağlı geçerli teşhis yöntemlerinin bulunmasına rağmen *Wolbachia*'nın direkt ve indirekt teşhis yöntemleri ile saptanması güçlü tamamlayıcı bir veri olarak ortaya çıkmakta ve epidemiyolojik çalışmalar ile inflammatör patoloji çalışmaları için etkin bir araç oluşturmaktadır. Ayrıca insanlarda dirofilariosisin ayırıcı tanısında granümatöz reaksiyon sonucu parazitlerin yıkımına bağlı olarak anti-*Wolbachia* antikor düzeylerinin belirlenmesi esas kriter olarak nitelenmektedir (211, 212).

2.11. *Dirofilaria immitis*'in Zoonotik Önemi

Dirofilaria immitis mikrofilerleri insanlara ara konak sivrisineklerin kan emmesi esnasında bulaşır ve bu mikrofilerler pulmoner ve subcutan dokulara, nadiren mezenterium, periton, scrotum gibi dokulara gelerek yerleşir. Ancak mikrofilerler gelişen Tip 1 immun yanıt nedeniyle ergin döneme ulaşamaz ve ölürlür. Yani insanlarda ergin parazitler görülmeyeceği gibi, yeni bulaş olmadıkça kanda mikrofiler de görülmez (20, 213). Sadece bir vakada ergin, dişi parazite bir kadının pulmoner arterlerinde rastlanmıştır (214). İmmun yanıt nedeniyle ölen mikrofilerler emboli şeklinde akciğer arterlerine gelerek burada hemorajik enfarktüs ve granülom oluştururlar. *D. immitis*'ten kaynaklanan pulmoner olgularda klinik belirtilere rastlanmamakta, ancak bazen vaskülit, pulmoner enfarktüs ve parazitin çevresinde granülomlar oluşabilmektedir (20, 63).

İnsanlarda dirofilariosis'e neden olan diğer türler ise *Dirofilaria (Nochtiella) repens* ve *D. tenuis*'tir (5, 69). *Dirofilaria (Nochtiella) repens*'in olgunları sonkonakların derialtı bağ dokusunda, nadiren büyük damarlarda, periton boşluğunda, mezenterlerde, akciğerlerde, merkezi sinir sisteminde, paraoküler bölge, göz kapağı, burun kanatları, yanak, parmak arası, sırt ve karın gibi değişik bölgelerde derialtı nodülleri şeklinde, mikrofilerleri ise perifer kanda ve lenf aralıklarında görülür. Parazit gelişen immun yanıt nedeniyle insanlarda cinsel olarak olgunlaşmamakta ve mikrofileremi olmamaktadır. Klinik olarak genellikle bir belirtiyeye rastlanmaz ancak bazen göğüs ağrısı, öksürük, hemoptizi, kaşıntılı-ağrılı şişkinlikler, ateş ve eozinofili görülebilir (5, 20, 58, 69, 215).

İnsanlarda dirofilariosisin tanısında güçlükler yaşanmaktadır. Derialtında veya gözde oluşan lezyonlar kolayca fark edilebilmekte iken akciğerdeki lezyonlar genellikle radyolojik veya diğer görüntüleme yöntemleri ile saptanabilmektedir. İnsanlarda mikrofilaremi ve belirgin derecede eozinofili olmadığı için tanıda çoğunlukla cerrahi yöntemlere başvurulmaktadır. Cerrahi yöntemlerle erginleşmemiş parazit elde edildiği zaman kütikulasının kalınlığına ve şekline bakılmaktadır. *Dirofilaria immitis*'in kütikulası 140-300 µm kalınlıkta ve düz olup, uzunlamasına çizgiler taşımamaktadır. *D. (Nochtiella) repens* ve *D. tenuis*'in kütikulası ise 220-600 µm kalınlıkta olup longitudinal ve enlemesine çizgiler taşımaktadır. Bu nedenle tanıda histopatolojinin önemi artmaktadır (20).

İnsanlarda dirofilariosisin teşhisinde Western Blot ve ELISA gibi serolojik yöntemlerin yanı sıra PCR, DNA dizi analizi gibi moleküler yöntemler de kullanılabilmektedir. Moleküler yöntemlerin tanı amacıyla kullanılmasındaki zorluk cerrahi yolla parazitten parça elde edilmesinin gerekliliğidir. Ayrıca parazit ile enfekte insanlarda *D. immitis*'in somatik veya ES antijenlerine karşı vücutta IgM, IgG ve IgE türü antikorlar gelişmektedir. Parazitin erişkin ve larval formlarında yüzey antijenleri de farklıdır. L₃ formunda 6 ve 35 kDa'luk, erişkinlerde ise 14.5, 16, 17.5 kDa'luk polipeptidler ile 20 ve 40 kDa'luk glikoproteinler baskındır. Ancak her larval dönemin immun sistemden korunma yolu farklıdır. Ayrıca parazitin antijenik yapısının karışık olmasından dolayı serolojik tanıda zorluklar yaşanmaktadır (20).

İnsanlardaki pulmoner dirofilariosis olgularında 35 kDa ve 22 kDa'luk polipeptid karışımı tanıda spesifiktir. Ayrıca son zamanlarda parazite karşı P22U ve PLA2 kodlarıyla isimlendirilen rekombinant antijenler geliştirilmiştir. Ancak pulmoner dirofilariosis vakalarında tüberküloz, mantar enfeksiyonları, tümör ve tromboemboliler, derialtına yerleşenlerde ise neoplazmalar göz önünde bulundurulmalıdır (20).

Dirofilariosisin endemik olduğu bölgelerde yapılan serolojik çalışmalarda parazite özgü antikorların %20 civarında tespit edilmesine rağmen çoğu olgunun gözden kaçtığı sanılmaktadır. *Dirofilaria immitis*'in insanlarda görülme oranı son yıllarda artmaktadır. Japonya'da 1998-2004 yılları arasında 24 kişide *D. immitis* kaynaklı vaka saptanmıştır. 1990-2003 yılları arasında 15 ülkeden toplam 130 kişide pulmoner dirofilariosis vakası gözlenmiştir (20).

Dirofilariosis, insanlarda nadiren görülmekle beraber dünyanın birçok yerinde sporadik olarak seyretmektedir (20, 215). İnsanlarda dirofilariosis, Türkiye, Amerika'nın sıcak ve

tropik kesimleri, Güney Asya, Avrupa, Afrika, Japonya, Yunanistan, Brezilya, Ukrayna, Hindistan, Sri Lanka, Avustralya ve İsrail’de görülmüştür (9, 20, 69, 216). Dünyanın çeşitli yerlerinde 1957 yılında 37 kişide, 1962 yılında 44 kişide (3), son 30 yılda Florida’da yaklaşık 100 kişide (23) *D. immitis* vakası rapor edilmiştir.

Dirofilariosis için en yüksek prevalans %66 oranında İtalya’da tespit edilmiştir. Fransa’da %22, Yunanistan’da %8, İspanya’da %4 oranında prevalans belirlenmiştir. Vakaların çoğunluğunun *Dirofilaria (Nochtiella) repens*’ten kaynaklandığı görülmüştür (20, 69).

El Salvador’un Sonsonate şehrinde 66 yaşındaki bir kadında erişkin, olgunlaşmamış *D. immitis*’e rastlanmıştır. Kadında o güne kadar herhangi bir semptom gözlenmemiş, ancak sağ akciğer röntgeninde 5 cm büyüklüğünde düğme şeklinde bir görüntü elde edilmiştir. Granulomanın histolojik muayenesinde küçük arterlerin içerisinde boyu 602 µm, kutikulası 10-12 µm olan *D. immitis* erişkini tespit edilmiştir (214).

Kolombiya’da Amazon nehri kenarında Hindistan’dan gelen insanların yerleştiği bölgede, 55 kişiden 18’i rasgele seçilmiş ve erişkin somatik antijenleri ile E/S antijenlerinin kullanıldığı iki farklı ELISA testiyle dirofilariosis’in prevalansı araştırılmıştır. Knott Testi ile de mikrofilere aranmış ancak insanlarda mikrofilere rastlanmamıştır. Erişkin somatik antijenlerinin kullanıldığı ELISA ile 9 kişi, E/S antijenlerinin kullanıldığı ELISA ile ise 8 kişi seropozitif bulunmuştur (131).

Japonya’da dört kişide *D. immitis* olgusu saptanmıştır. Bu olguların dördünün de ortak noktası hiçbirinde solunum sistemine ait semptomların görülmemesi ve köpeklerde temasın olmamasıdır. Hastaların röntgen muayenelerinde sağ akciğerin orta kısmında yuvarlak nodüller görülmüştür. Üç hastanın hematolojik değerleri normal olarak tespit edilirken, bir hastada eozinofili belirlenmiştir. Histolojik muayenede koagülasyon nekrozu, fibrozis, nodül kenarında granülasyon tespit edilmiştir. Gümüş boyamayla da nodül içerisindeki yapılar görülmüştür. Immunohistokimyasal olarak somatik kas hücreleri anti-dirofilaria antikorları ile boyanmıştır (217).

Dirofilaria (Nochtiella) repens Türkiye’de ilk kez 1944 yılında bildirilmiştir. Eskişehir’de ilk kez 1998 yılında *D. (Nochtiella) repens*’e bir kadında rastlanmıştır. Yapılan histolojik muayene sonrasında *D. (Nochtiella) repens* için tipik olan çok katlı kütikula ve dış kütikular tabakadaki belirgin longitudinal uzantılar görülmüştür (215).

Adana’da bir erkeğin gözünde 44 mm uzunluğunda 320 µm genişliğinde *D. (Nochtiella) repens*’in subkonjunktival olarak yerleştiği görülmüştür (216).

Kuzey Kore’de rutin muayene için hastaneye gelen bir kişide ilk kez karaciğerin sağ lobunda *D. immitis* görülmüştür. Aynı hastanın kan serumu ile yapılan antikor ELISA testi ile *D. immitis* pozitif sonuç alınmıştır (213).

Dirofilariosis’in erkeklerde kadınlara göre 2:1 oranında görülmekte olduğu ve 50-60 lı yaş grubunda daha sıklıkla rastladığı ifade edilmiştir (69).

İnsanlarda dirofilariosis vakalarının tedavisinde parazitlerin cerrahi yolla çıkarılması ve destek tedavisi önerilmektedir. İlaç olarak ise ivermectin ve DEC 2 mg/kg dozda dört hafta süreyle kullanılmalıdır (20).

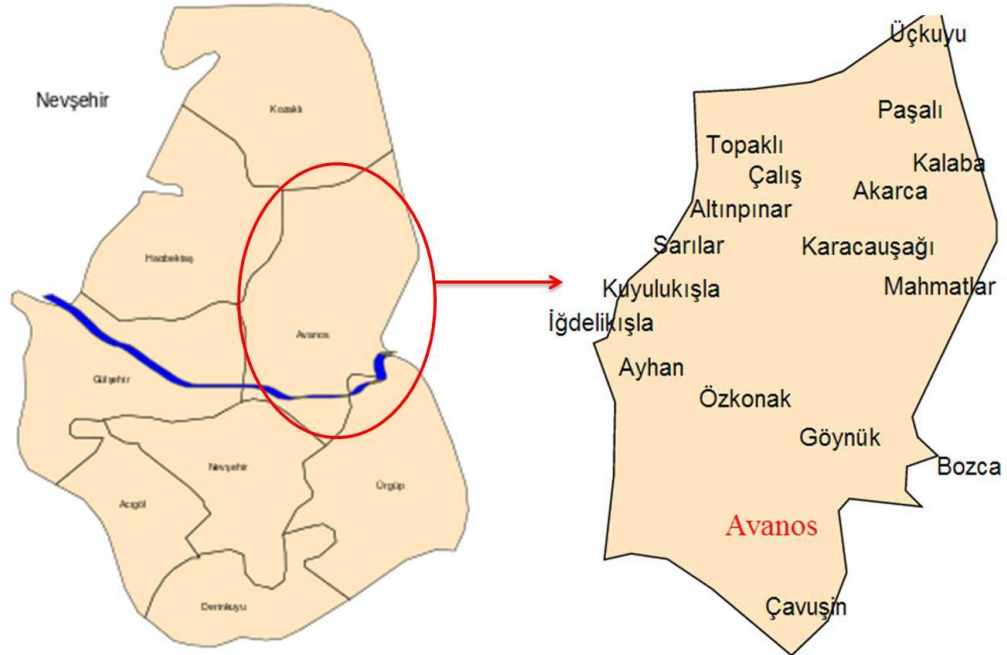
Endemik bölgelerde insanların enfeksiyondan korunması için sivrisineklerle mücadele edilmesi ve repellent veya cibinlik kullanılması gerekmektedir (20).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Saha Çalışmaları

3.1.1. Araştırma Sahası

Çalışma Avanos merkez, civar ilçe ve köylerinde, Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında toplam 138 sokak köpeği üzerinde yürütülmüştür.



Şekil 3.1. Örnekleme yapılan Avanos yöresi

Örneklemeye alınan köpeklerin yaş, cinsiyet ve ırkları kayıt altına alınmış ve Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında Avanos yöresinde örnekleme alınan köpeklerin protokol numaraları, cinsiyet, yaş ve ırkları

ÖRNEKLEMESİNE ALINAN KÖPEKLER			
Protokol No	Cinsiyet	İrk	Yaş (Yıl)
1	Dişi	Çoban Köpeği	4
2	Erkek	Melez	6 ay
3	Erkek	Melez	1
4	Erkek	Çoban Köpeği	8 ay
5	Dişi	Melez	8 ay
6	Dişi	Melez	1
7	Dişi	Melez	1
8	Erkek	Çoban Köpeği	5 ay
9	Dişi	Alman Çoban Köpeği	1,5
10	Dişi	Terrier	2
11	Dişi	Melez	2
12	Dişi	Melez	1
13	Dişi	Melez	2
14	Erkek	Çoban Köpeği	3
15	Dişi	Çoban Köpeği	3
16	Erkek	Kangal	4
17	Dişi	Çoban Köpeği	1
18	Dişi	Çoban Köpeği	2
19	Erkek	Kangal	5
20	Erkek	Melez	4
21	Erkek	Çoban Köpeği	3
22	Dişi	Kangal	3
23	Erkek	Kangal	2
24	Dişi	Çoban köpeği	3
25	Erkek	Çoban köpeği	3

26	Erkek	Melez	1
27	Dişi	Çoban köpeği	1
28	Dişi	Çoban köpeği	6 ay
29	Dişi	Çoban köpeği	6 ay
30	Erkek	Çoban köpeği	1
31	Dişi	Çoban köpeği	3
32	Erkek	Melez	2
33	Dişi	Çoban köpeği	1
34	Dişi	Çoban köpeği	3
35	Dişi	Çoban köpeği	1
36	Dişi	Terrier	6 ay
37	Erkek	Melez	2
38	Dişi	Kangal	6 ay
39	Dişi	Çoban Köpeği	2
40	Erkek	Terrier	1
41	Dişi	Terrier	1,5
42	Dişi	Melez	6 ay
43	Dişi	Melez	1
44	Dişi	Kangal	1
45	Dişi	Kangal	2 ay
46	Dişi	Melez	2
47	Dişi	Kangal	6 ay
48	Erkek	Terrier	4 ay
49	Dişi	Kangal	3
50	Dişi	Melez	3
51	Erkek	Terrier	2
52	Erkek	Melez	8 ay
53	Dişi	Melez	8 ay
54	Erkek	Melez	8 ay
55	Dişi	Melez	8 ay
56	Erkek	Melez	3
57	Erkek	Kangal	3 ay

58	Dişi	Kangal	2
59	Erkek	Kangal	4
60	Erkek	Melez	3
61	Dişi	Çoban Köpeği	1
62	Dişi	Melez	6 ay
63	Dişi	Melez	6 ay
64	Dişi	Melez	6 ay
65	Erkek	Kangal	10 ay
66	Dişi	Kangal	8 ay
67	Dişi	Çoban Köpeği	3
68	Dişi	Çoban Köpeği	5 ay
69	Dişi	Çoban Köpeği	5 ay
70	Dişi	Çoban Köpeği	5 ay
71	Erkek	Melez	3
72	Dişi	Çoban Köpeği	1
73	Erkek	Kangal	2
74	Erkek	Kangal	3
75	Dişi	Çoban Köpeği	1
76	Erkek	Melez	8 ay
77	Dişi	Melez	1
78	Erkek	Melez	2
79	Dişi	Çoban Köpeği	1
80	Erkek	Melez	2
81	Dişi	Terrier	2
82	Erkek	Kangal	3
83	Dişi	Kangal	4
84	Erkek	Terrier	4
85	Erkek	Çoban Köpeği	2
86	Dişi	Çoban Köpeği	3
87	Erkek	Melez	5
88	Dişi	Melez	3
89	Erkek	Terrier	4

90	Erkek	Melez	2
91	Dişi	Melez	1
92	Erkek	Melez	4
93	Erkek	Melez	2
94	Dişi	Melez	3
95	Dişi	Kangal	2
96	Dişi	Terrier	2
97	Erkek	Çoban Köpeği	6
98	Erkek	Melez	2
99	Dişi	Kangal	6 ay
100	Erkek	Kangal	5
101	Erkek	Melez	3
102	Erkek	Melez	1
103	Erkek	Terrier	2
104	Erkek	Çoban Köpeği	3
105	Erkek	Melez	8 ay
106	Erkek	Melez	1
107	Erkek	Alman Çoban Köpeği	2
108	Erkek	Melez	3 ay
109	Erkek	Doberman	4
110	Dişi	Melez	2
111	Dişi	Çoban Köpeği	1
112	Erkek	Melez	2
113	Dişi	Terrier	2
114	Erkek	Kangal	4
115	Erkek	Melez	3
116	Dişi	Çoban Köpeği	1
117	Dişi	Melez	6 ay
118	Dişi	Melez	6 ay
119	Erkek	Melez	3
120	Dişi	Terrier	2
121	Dişi	Melez	2

122	Dişi	Melez	1
123	Dişi	Melez	2
124	Erkek	Çoban Köpeği	3
125	Dişi	Çoban Köpeği	3
126	Erkek	Kangal	4
127	Dişi	Çoban Köpeği	1
128	Dişi	Çoban Köpeği	2
129	Erkek	Kangal	5
130	Erkek	Melez	4
131	Erkek	Melez	4
132	Dişi	Kangal	1
133	Dişi	Kangal	2 ay
134	Dişi	Melez	2
135	Dişi	Kangal	6 ay
136	Erkek	Terrier	4 ay
137	Dişi	Kangal	3
138	Dişi	Melez	3

3.1.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Köpeklerden kan örnekleri, Avanos Belediyesi'nce yürütülen “Sokak Köpeklerini Kısırlaştırma Projesi” kapsamında yakalanıp genel amaçlı (özellikle zoonotik hastalıklar yönünden) kontroller için alınan kan örneklerinden ve/veya ovariohysterectomie (kısırlaştırma operasyonu) esnasında alınan kan numunelerinden sağlanmıştır. Çalışma süresince toplam 138 köpekten 5 ml'lik steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) ve 10 ml'lik heparinli tüplere alınan kan örnekleri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Anabilim Dalı'na getirilen kan örneklerinin her birine protokol numarası verilmiş heparin'li tüplere alınan kan örnekleri aynı gün veya +4°C bekletilip ertesi gün natif, modifiye knott, membran filtrasyon yöntemleri ile incelenmiştir. DNA ekstraksiyonuna tabii tutulacak EDTA'lı kan örnekleri ise analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Natif)

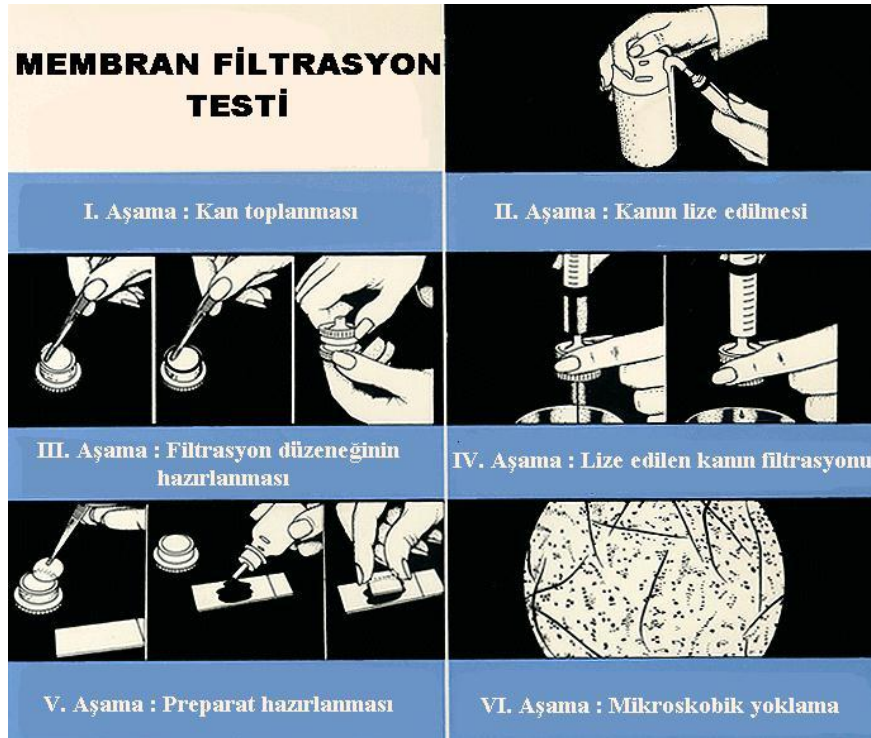
Heparinli kan örneğinden alınan birkaç damla kan önce direkt daha sonra lize edici solüsyon (% 0.04 amonyum hidroksit) ile karıştırılarak lam-lamel arasında mikroskopta mikrofiler yönünden incelenmiştir. Bu yöntemle mikrofiler olup olmadığı saptanmış ve bu işlem her bir kan numunesi için 5 kez tekrarlanmıştır.

3.2.2. Modifiye Knott Yöntemi

Bir ml heparinli kan örneği 9 ml % 2'lik formalin (2 ml %37'lik konsantre formaldehit, 100 ml distile su) ile karıştırılıp 1500 devirde 5 dk santrifüj edilmiş üstteki sıvı dökülerek sedimente %0.1'lik metilen mavisi ilave edilmiştir. Sedimentten alınan birkaç damla, lam-lamel arasında mikroskopta incelenmiştir.

3.2.3. Membran Filtrasyon Testi

Bir ml heparinli kan örneği 9 ml lize edici solüsyon (8gr Na_2CO_3 , 1000 ml distile su, 5 ml Triton X-100) ile karıştırılıp bir enjektör vasıtasıyla, 25 mm çapında 8 μm por genişliğindeki polikarbonat membran filtreden geçirilmiştir. Filtre tutucudan çıkartılan filtreler, lam üzerine alınıp % 0.01'lik metilen mavisi ilave edilmiş ve lamel kapatılıp mikroskopta mikrofiler yönünden araştırılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Membran filtrasyon testi

Kaynak: Nolan, 2002:158.

3.2.4. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Köpek kanlarından DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. Analize tabi tutulana kadar -20°C'de muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesinde oda ısısında çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen örneklerden DNA ekstraksiyonu, Axygen Firmasına ait AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit'inin prosedürüne göre yapılmıştır.

Ekstraksiyon işlemine başlamadan önce ticari kitin prosedürüne göre Buffer W1A ve Buffer W2A solüsyonları üzerine %100'lük ethanol eklenmiştir. Kit, kullanılabileceği kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. Ticari kitin önerileri doğrultusunda DNA ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

1. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri vorteksle homojenize edildi. İşlenecek numune sayısına göre, örneklerin karışmaması amacıyla ependorf tüplerinin üzerine hayvanlara ait protokol numaraları yazıldı. Kit içerisinde bulunan Buffer TE, önceden ısı 65 °C'ye ayarlanmış su banyosu içerisine konuldu.
2. 1.5 ml'lik ependorflara 500 µl Buffer AP1 eklendi.
3. Her biri farklı köpeğe ait kan örneklerinden 200 µl kan, pipetle alınarak protokol numaralarına göre ependorflara ilave edildi. Tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye vortekslendi.
4. İyi vortekslenen örneklerin üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilerek ependorf tüpleri tekrar vortekslendi.
5. Örnekler oda ısısında 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücresel kısımların dibe çökmesi sağlandı.
6. Her bir örnek için 2 ml'lik ependorf tüplerine miniprep kolon yerleştirildi. Santrifüj işlemi sonucu üstte kalan süpernatant pipet yardımıyla alınarak miniprep kolonlar içerisine konularak 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Santrifügasyon sonucu, süpernatant içerisinde parazite ait genomik DNA varsa, bunlar DNA'yı tutma özelliğinde olan miniprep column'da kaldı ve geri kalan süpernatant da 2 ml'lik ependorfların dip kısımlarına süzüldü. Dibe çöken süpernatantlar döküldü ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. Miniprep kolonlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 700 µl Buffer W1A ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletildi. Sonra 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

8. Miniprep kolondan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırıldı. Miniprep kolonlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirildi. İçerisine ikinci yıkama solusyonu olan Buffer W2A'dan 800 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9. Süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılarak miniprep kolonlar bu tüplere geri yerleştirildi. Bu basamakta ikinci yıkama solusyonu Buffer W2A'dan 500 µl eklenip 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tekrar yıkama işlemi yapıldı. Bu son yıkama opsiyonel olarak yapılan bir işlem olup sekanslama işlemlerinde problem teşkil edebilecek tuz ve enzimlerin tamamen elimine edilmesi amacıyla yapılmıştır.

10. Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirildi. Herhangi bir solusyon eklenmeden boş tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solusyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlandı.

11. Her bir örneğe ait miniprep kolonlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirildi. Üzerlerine, önceden 65 °C'lik su banyosuna konulmuş olan Buffer TE'den 80 µl ilave edilerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Daha sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak genomik DNA elde edildi.

Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları moleküler analizlerde optimum DNA konsantrasyonunun ayarlanabilmesi için Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçüldü. Genomik DNA ekstraktları kullanılabilecek şekilde -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Köpek kanlarından elde edilen genomik DNA ekstraktları *D. immitis*'in farklı iki gen bölgesinden sırasıyla 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinden 542-bp DIDR-F1 (5'-AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG-3' F) ve DIDR-R1 (5'-AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA-3' R) (175) ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinden dizayn edilen 203-bp DICOIF1 (5'-AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3') ve DICOIR1 (5'-ACA GGC ACT GAC AAT ACC ATT-3' R) (175) DNA fragmentlerini amplifiye eden iki ayrı primer ile kontrollü olarak ThermoHybaid (Product no: 35195, Thermo Scientific Inc.) thermalcycler'da PCR reaksiyonuna tabii tutulmuştur.

Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. 5.8S-ITS2-28S gen bölgesindeki primerler için reaksiyon karışımı; 2,5 µl 10XPCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1µl 20 pmol her bir primer, 2 µl 200 mM her bir dNTP, 1.25U Taq DNA polimerase ve 2,5 µl template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha

sonra karışım thermalcyclera yerleştirilip ve initial denaturation: 94°C'de 2 dk; 35 siklus, denaturation: 94°C'de 30s, annealing: 60°C'de 30s, extension: 72°C'de 30s; final extension: 72°C'de 7 dk olacak şekilde programlanmıştır (175).

COI gen bölgesindeki primerler için reaksiyon karışımı ise; 2,5 µl 10XPCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 1 µl 20 pmol her bir primer, 2 µl 200 mM her bir dNTP, 1.25U *Taq* DNA polymerase ve 2,5 µl template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Thermalcyclerde programlama initial denaturation: 94°C'de 2 dk; 32 siklus, denaturation: 94°C'de 30s, annealing: 58°C'de 30s, extension: 72°C'de 30s; final extension: 72°C'de 7 dk olacak şekilde ayarlanmıştır (175).

PCR testinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla; Erciyes Üniversitesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda mevcut olan *D. immitis* olgun parazitten elde edilmiş DNA örneği (Gen Bank Aksesyon No: KF273903) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

3.2.6. PCR Ürünlerinin Elektroforez ile Görüntülenmesi

Dirofilaria immitis'in 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu sonucu elde edilen amplikonların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solusyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Jelin fazla kalın olmaması için 500 ml'lik bir beher içerisinde toplam hacim 50 ml olacak şekilde; 0,75 mg agaroz tartılarak üzerine 50 ml 1XTAE ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım; agaroz, sıvı içerisinde tamamen eriyene kadar ısıtılmıştır. Karışımın buharlaşmasını engellemek amacıyla beherin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Karışım hazır hale geldiğinde biraz soğumaya bırakıldıktan sonra üzerine 3 µl ethidium bromide ilave edilmiş ve ethidium bromidin sıvı içerisine tamamen dağılması için yavaş bir şekilde bilek hareketleriyle solusyon karıştırılmıştır. Tamamen hazır hale gelen solusyon jel tablasına dökülmüş ve incelenecek örnek sayısına göre taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen soğuduğunda jel tablası ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1XTAE solusyonu ile dolu tankın içerisinde taraklar yavaşça çıkarılmıştır. Elden edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp, 1 µl 6X loading dye (Fermentas) ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. İlk gözlere bantların boylarının ölçülmesinde

kullanılan DNA ladder (Fermentas), son kuyucuklara ise pozitif ve negatif örnekler yüklenmiştir. Yüklenen örnekler; sabit akımda, 110 V'da 40 dakika süreyle yürütülmüştür. Süre sonunda örnekler jel dökümentasyon sistemi (Gen Genuis) ile UV ışın altında görüntülenmiştir.

3.2.7. *Dirofilaria immitis*'in 5.8S-ITS2-28S ve COI Gen Bölgelerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

PCR sonrası jel üzerinde belirlenen ampliconlar, High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye sonrası ampliconlar PCR primerleri ile 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin parsiyel sekansının ortaya konması amacıyla çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi ortaya konan örneklerin BioEdit Sequence Alignment (218) ve Geneious 5.5.5 (219) yazılımları ile pairwise alignmentları yapılarak final dizilim elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (220) ve Geneious 5.5.5 (219) yazılımlarında multiple alignmentları yapılarak filogenileri araştırılmış ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen tüm dizilimlerin GenBank kayıtları yapılmıştır.

4. BULGULAR

Dirofilaria immitis'in teşhisi amacı ile Avanos yöresi sokak köpeklerinden toplanan 138 adet kan örneğinin direkt kan muayenesi yöntemi, modifiye knott yöntemi, membran filtrasyon yöntemi ve PCR tekniği ile ayrı ayrı incelenmesi sonucunda toplam 3 (%2.17) köpekte *Dirofilaria immitis* etkeni belirlenmiştir. Diğer filarial etkenlere rastlanmamıştır. Pozitif bulunan 3 örneğin 2'si natif yöntem, modiye knott yöntemi ve membran filtrasyon yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemlerle pozitif bulunan 2 örnek de dahil olmak üzere toplam 3 örnek PCR tekniği ile pozitif bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Farklı teşhis yöntemleri ile *Dirofilaria immitis* pozitif bulunan köpeklerin cinsiyeti, ırkı ve yaşı

Protokol No	Cinsiyet	İrk	Yaş (Yıl)	Natif Muayene	Modifiye Knott Yöntemi	Membran Filtrasyon Yöntemi	PCR	
							COI Gen Bölgesi	5.8S-ITS2-28S Gen Bölgesi
1	Dişi	Çoban Köpeği	4	+	+	+	+	+
36	Dişi	Terrier	6 ay	-	-	-	+	+
102	Erkek	Melez	1	+	+	+	+	+

4.1. Direkt Kan Muayene (Natif) Sonuçları

Toplanan kan örneklerinin tamamı önce natif yöntem ile *Dirofilaria* mikrofilerleri yönünden incelenmiştir. Toplanan 138 örneğin sadece 2'sinde (%1.44) natif yöntem ile *Dirofilaria immitis* mikrofilerleri teşhis edilmiştir (Şekil 4.1). Natif yöntemde saptanan mikrofilerlerin yavaş, yılanvari ve sapık hareketlerle gelişi güzel dolaştığı, aynı zamanda mikroskop sahasının dışına çıkmadığı dikkati çekmiştir. Bu hareket özellikleri ile *D.immitis* mikrofilerlerine benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.1. Natif muayene yöntemi ile saptanan *Dirofilaria immitis* mikrofileri X 300

4.2. Modifiye Knott Testi Sonuçları

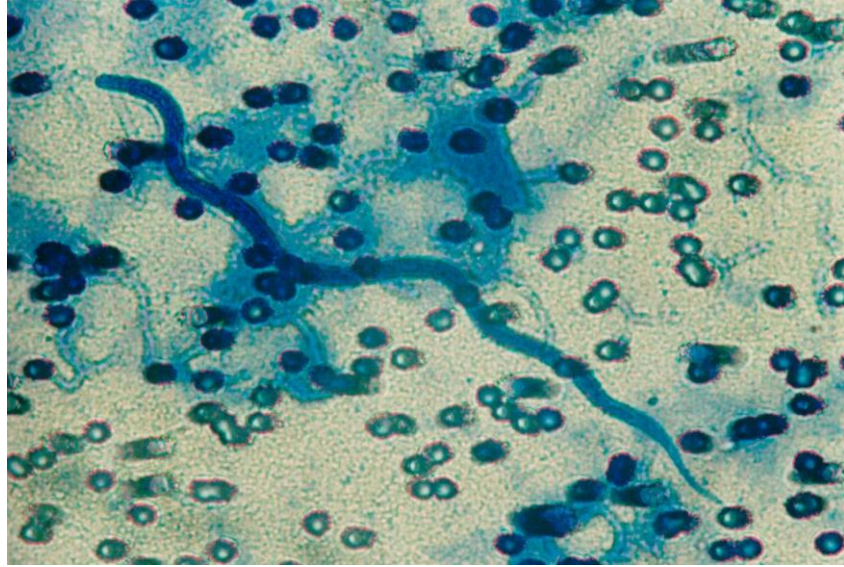
Toplanan kan örnekleri natif yöntemle incelendikten sonra modifiye knott tekniği ile incelenmiştir. Toplanan 138 kan örneğinde daha önce natif muayene ile *D. immitis* pozitif bulunan 2 (%1.44) örnek modifiye knott tekniği ile de pozitif olarak teşhis edilmiştir. Modifiye Knott testinde mikrofilerlerin kılıfsız, ön kısmının konik tarzda sivrilerek sonlandığı, gövde ve kuyruklarının düz olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Mikrofilerler $316,3 \pm 1,9$ μm (247-345,6 μm) uzunlukta, $6 \pm 0,1$ μm (4,6-7,2 μm) genişlikte saptanmıştır.



Şekil 4.2. Modifiye Knott yönteminde *Dirofilaria immitis* mikrofilari

4.3. Membran Filtrasyon Testi Sonuçları

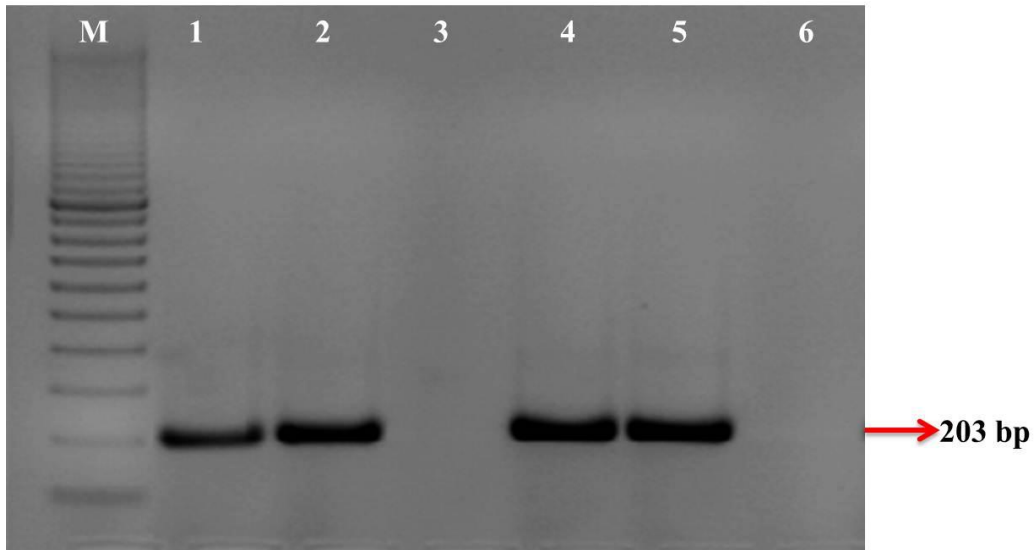
Toplanan kan örneklerinde natif muayene ve modifiye knott yöntemi ile yapılan inceleme sonrası membran filtrasyon tekniği ile yapılan incelenmede 138 kan örneğinde daha önce natif muayene ve modifiye knott yöntemi ile *D. immitis* pozitif bulunan 2 (%1.44) örnek membran filtrasyon yöntemi ile de pozitif olarak teşhis edilmiştir (Şekil 4.3). Membran filtrasyon testinde mikrofiler vücut uzunluğu $279 \pm 1,9 \mu\text{m}$ ($266,4-310 \mu\text{m}$), genişliği $4,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ($3,4-6,4 \mu\text{m}$) saptanmıştır. Bununla birlikte filtre üzerindeki porların mikrofiler ölçümlerinin yapılmasında güçlükler ortaya çıkardığı, çoğu durumda mikrofilerlerin çeşitli kısımlarının (baş, gövde bölümleri, kuyruk) bu porlar tarafından gizlendiği dikkati çekmiştir.



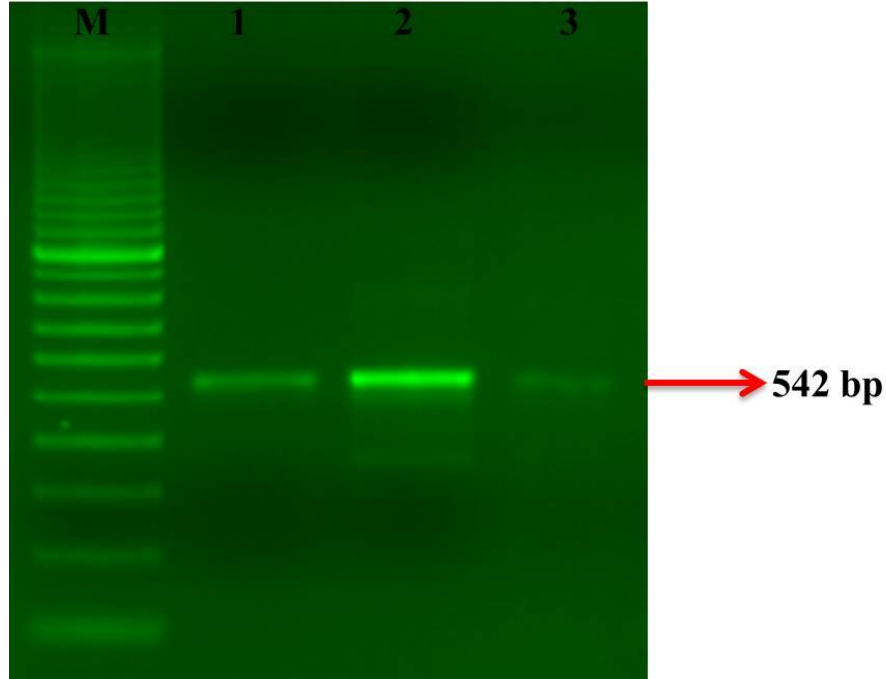
Şekil 4.3. Membran Filtrasyon yönteminde *Dirofilaria immitis* mikrofilari X 400

4.4. PCR Sonuçları

Her iki spesifik gen bölgesi (COI ve 5.8S-ITS2-28S gen bölgeleri) yönünden PCR analizine tabii tutulan 138 kan örneğinde daha önce yapılan natif muayene, modifiye knott ve membran filtrasyon testleri sonucu pozitif bulunan 2 (%1.44) örneğin dışında 1 örnekte daha *D. immitis* pozitifliği saptanmıştır. Böylece toplamda 138 örneğin 3'ü (%2.17) *D. immitis* pozitif olarak belirlenmiştir. Pozitif izolatlarda parsiyel COI ve 5.8S-ITS2-28S gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonları sonucu elde edilen ampliconların %1,5'lik jel agarozdaki görüntüleri Şekil 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.



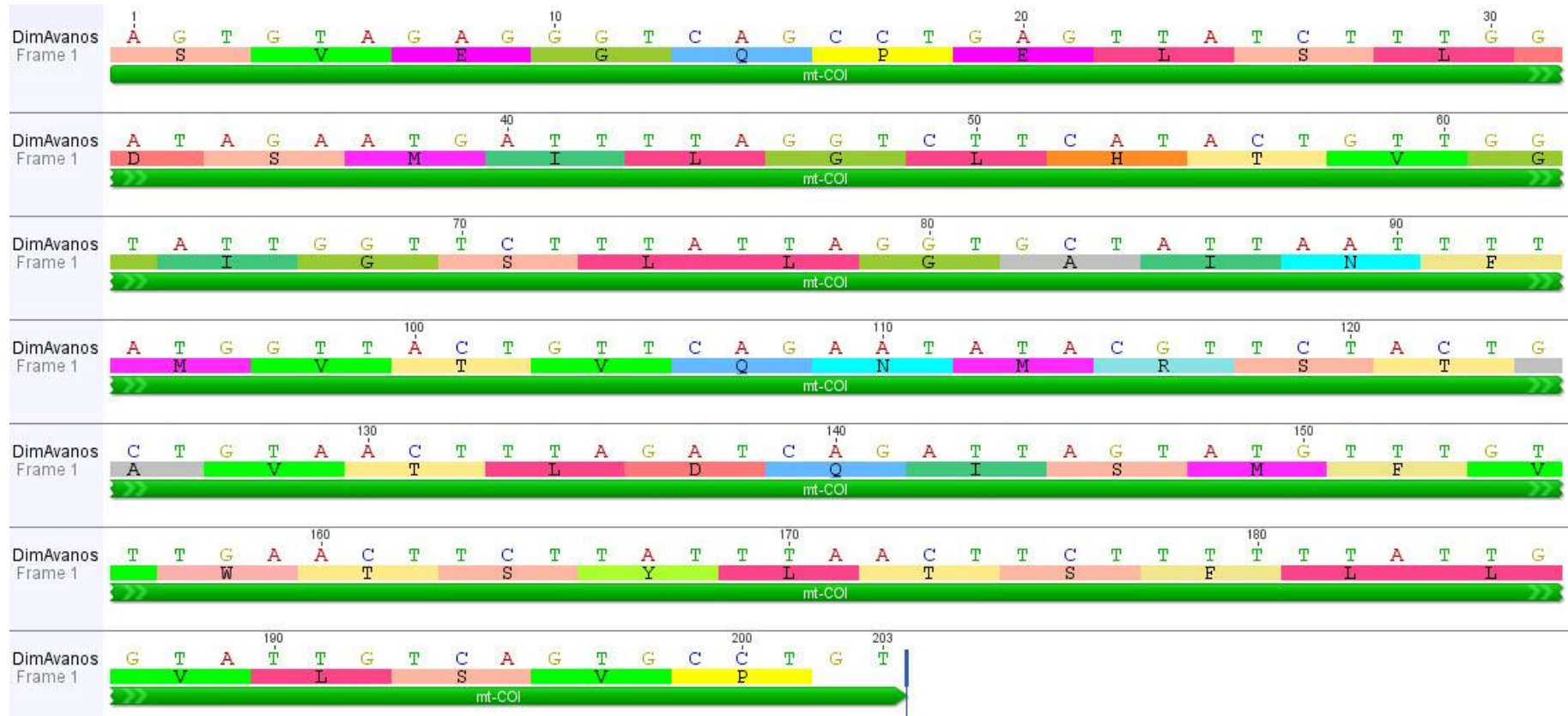
Şekil 4.4. *Dirofilaria immitis* izolatlarının parsiyel COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,2 ve 4: Pozitif izolatlar; 3: Negatif izolat; 5: Pozitif kontrol; 6:Negatif kontrol.



Şekil 4.5. *Dirofilaria immitis* pozitif izolatların parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen amplikonların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1-3: Pozitif izolatlar

4.5. COI Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi

COI genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile yapılan PCR sonucu pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan 1 izolat sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Bu izolatın sekans kalitesini artırabilmek için amplikon jel pürifikasyon sonrası tekrar aynı primerler ile PCR amplifikasyonuna tabii tutulmuştur. Örnek, PCR amplifikasyonunu takiben tekrar jel pürifiye edilerek sekans için hazır hale getirilmiş ve sonrasında sekanslanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *Dirofilaria immitis* izolatının parsiyel COI gen bölgesi sekans dizilimleri

4.6. *Dirofilaria immitis* izolatının COI Geninin Pairwise Kıyaslaması ve Filogenetik Analizi

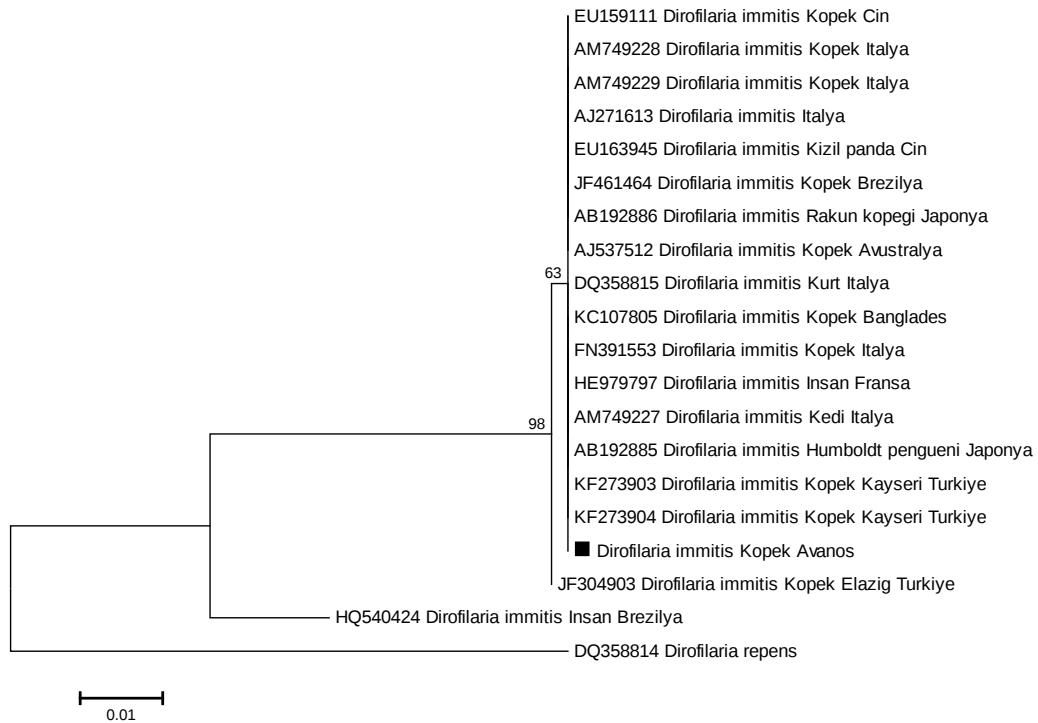
Avanos yöresinde köpeklerden elde edilen *D. immitis* izolatlarıyla COI gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki diğer bazı *D. immitis* izolatlarının COX1 gen dizilimlerinin pairwise analizlerine ait bilgiler Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Avanos yöresi *Dirofilaria immitis* izolatu ve Dünyadan analizleri yapılan diğer bazı *Dirofilaria immitis* izolatlarının COI gen dizilimlerinin pairwise analizleri

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	EU159111_Dirofilaria_immitis_Kopek_Cin																			
2	AM749228_Dirofilaria_immitis_Kopek_Italya	0,000																		
3	AM749229_Dirofilaria_immitis_Kopek_Italya	0,000	0,000																	
4	AJ271613_Dirofilaria_immitis_Italya	0,000	0,000	0,000																
5	EU163945_Dirofilaria_immitis_Kizil_panda_Cin	0,000	0,000	0,000	0,000															
6	JF461464_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000														
7	AB192886_Dirofilaria_immitis_Rakun_kopegi_Japonya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000													
8	AJ537512_Dirofilaria_immitis_Kopek_Avustralya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
9	JF304903_Dirofilaria_immitis_Kopek_Elazig_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
10	DQ358815_Dirofilaria_immitis_Kurt_Italya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000										
11	KC107805_Dirofilaria_immitis_Kopek_Banglades	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000									
12	FN391553_Dirofilaria_immitis_Kopek_Italya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000								
13	HE979797_Dirofilaria_immitis_Insan_Fransa	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000							
14	AM749227_Dirofilaria_immitis_Kedi_Italya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
15	AB192885_Dirofilaria_immitis_Humboldt_pengueni_Japonya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
16	HQ540424_Dirofilaria_immitis_Insan_Brezilya	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,065	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057	0,057				
17	DQ358814_Dirofilaria_repens	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,119	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,106			
18	KF273903_Dirofilaria_immitis_Kopek_Kayseri_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,057	0,136		
19	KF273904_Dirofilaria_immitis_Kopek_Kayseri_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,057	0,136	0,000	
20	Dirofilaria_immitis_Kopek_Avanos	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,057	0,136	0,000	0,000

D. immitis izolatının parsiyel COI gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlardan Brezilya’da insandan izole edilen *D. immitis* izolatı (Aksesyon No: HQ540424) ile %5.7’lik bir farklılık gösterdiği, diğer izolatlarla ise %100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir.

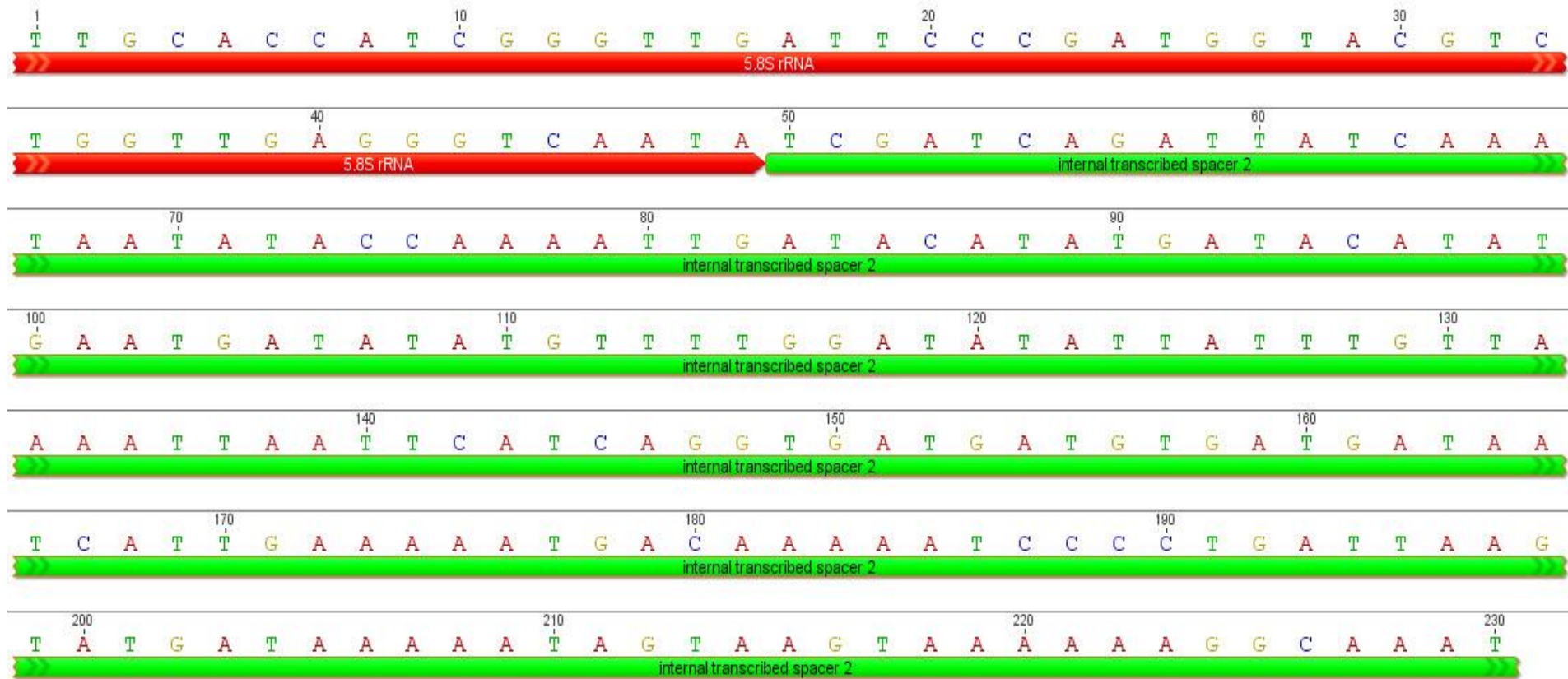
Avanos yöresinde köpeklerde saptanan *D. immitis* izolatı ile Dünyadan diğer bazı *D. immitis* izolatlarının parsiyel COI gen bölgesinin Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.7’da verilmiştir.



Şekil 4.7. Avanos yöresinde saptanan *Dirofilaria immitis* izolatı ile GenBank’a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Tamura Nei modeli, Bootstrap:1000). ■ Avanos izolatı; Dış grup olarak *D. repens* (DQ358814) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

4.7. 5.8S-ITS2-28S Geninin Amplifikasyonu ve Sekans Analizi

5.8S-ITS2-28S genini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile yapılan PCR sonucu pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan 1 izolat sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Bu izolatın sekans kalitesini artırabilmek için amplikon jel pürifikasyon sonrası tekrar aynı primerler ile PCR amplifikasyonuna tabii tutulmuştur. Örnek, PCR amplifikasyonunu takiben tekrar jel pürifiye edilerek sekans için hazır hale getirilmiş ve sonrasında sekanslanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Dirofilaria immitis* izolatının parsiyel 5.8S-ITS2 gen bölgesi sekans dizilimleri

4.8. *Dirofilaria immitis* izolatının 5.8S-ITS2-28S Geninin Pairwise Kıyaslaması ve Filogenetik Analizi

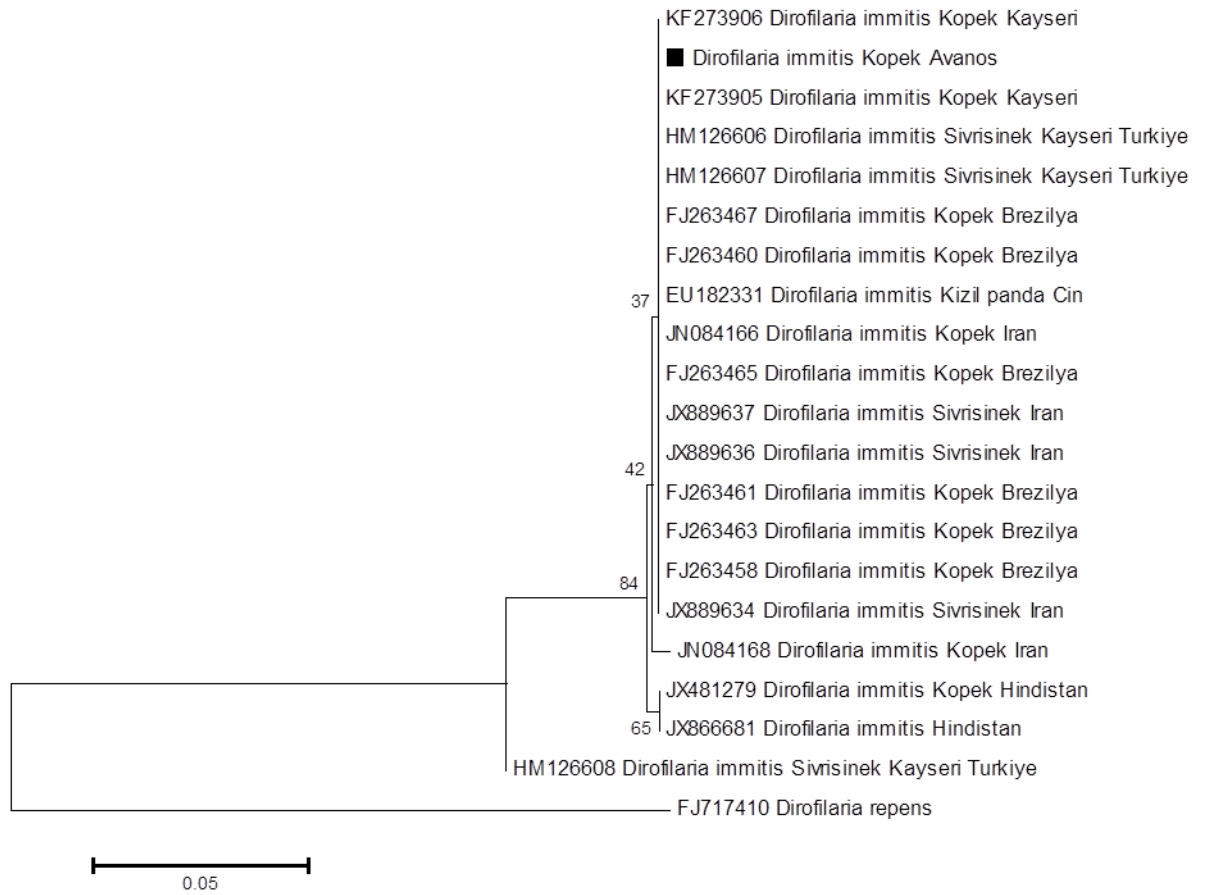
Avanos yöresinde köpeklerden elde edilen *D. immitis* izolatlarıyla 5.8S-ITS2-28S gen bölgesi yönünden blastn kıyaslaması yapılan GenBank veri tabanında kayıtlı Dünya'daki diğer bazı *D. immitis* izolatlarının 5.8S-ITS2-28S gen dizilimlerinin pairwise analizlerine ait bilgiler Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Avanos yöresi *Dirofilaria immitis* izolatu ve Dünyadan analizleri yapılan diğr bazı *Dirofilaria immitis* izolatlarının 5.8S-ITS2-28S gen dizilimlerinin pairwise analizleri

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	FJ263461_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya																				
2	FJ263463_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000																			
3	HM126608_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Kayseri_Turkiye	0,000	0,000																		
4	FJ263458_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000	0,000	0,000																	
5	JX889634_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Iran	0,000	0,000	0,000	0,000																
6	JX889636_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Iran	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000															
7	JX889637_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Iran	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000														
8	FJ263465_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000													
9	JN084166_Dirofilaria_immitis_Kopek_Iran	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000												
10	EU182331_Dirofilaria_immitis_Kizil_panda_Cin	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000											
11	JX481279_Dirofilaria_immitis_Kopek_Hindistan	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005										
12	JX866681_Dirofilaria_immitis_Hindistan	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,000									
13	FJ263460_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005								
14	FJ263467_Dirofilaria_immitis_Kopek_Brezilya	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000							
15	JN084168_Dirofilaria_immitis_Kopek_Iran	0,005	0,005	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,011	0,011	0,005	0,005						
16	HM126607_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Kayseri_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,005					
17	HM126606_Dirofilaria_immitis_Sivrisinek_Kayseri_Turkiye	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,005	0,000				
18	FJ717410_Dirofilaria_repens	0,304	0,304	0,233	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304	0,304			
19	KF273905_Dirofilaria_immitis_Kopek_Kayseri	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,304		
20	KF273906_Dirofilaria_immitis_Kopek_Kayseri	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,304	0,000	
21	Dirofilaria_immitis_Kopek_Avanos	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,005	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,304	0,000	0,000

D. immitis izolatının parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla %99.5-%100 oranlarında identiklik gösterdiği saptanmıştır.

Avanos yöresinde köpeklerde saptanan *D. immitis* izolatı ile Dünyadan diğer bazı *D. immitis* izolatlarının parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinin Neighbor Joining Metodu (Kimura 2 Parameter Modeli) ile oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.9’de verilmiştir.



Şekil 4.9. Avanos yöresinde saptanan *Dirofilaria immitis* izolatı ile GenBank’a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining – Tamura Nei modeli, Bootstrap:1000). ■ Avanos izolatı; Dış grup olarak *D. repens* (FJ717410) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpeklere yerleşen filarial nematodlar, hem hayvanlarda meydana getirdikleri hastalık hem de zoonoz özellik göstermesi nedeniyle dünyada artan bir öneme sahiptir. İnsan ve hayvanların enfeksiyona maruz kalmasında arakonak görevi üstlenen çeşitli cinslere bağlı arthropod türlerinin dünyada geniş bir yayılışa sahip olması konunun önemini daha da artırmaktadır (42, 43). Çeşitli ülkelerde bu parazitlerin yayılışı ve epidemiolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar, daha çok köpeklerde ağır kardiopulmoner bozukluklara ve bazen de ölüme yol açan *D.immitis* üzerinde yoğunlaşmıştır (8, 11).

Filarial nematodların dünyadaki yayılışı bölge, duyarlı vektör, ekolojik faktör, uygulanan teknikler ile daha birçok faktöre bağlı değişmektedir. *Dirofilaria immitis*'in Türkiye'de ve Dünya'da köpeklerde yaygınlığının artmasının nedenlerinin başında; askeri birliklerde yurt dışından getirilen köpeklerin kullanılması, turistlerin seyahatlerini pet hayvanlarıyla birlikte yapması, bir bölgeye dışarıdan hayvan getirilmesi, evlerde yetiştirmek için kökeni daha çok dış ülkeler olan köpeklere ilgi duyuluyor olmasının geldiği bildirilmektedir. Aynı zamanda parazitin arakonağı olan *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* soyunda yer alan sivrisinek türleri Türkiye'de ve Dünya'nın birçok ülkesinde oldukça yaygındır (58, 71, 99, 107, 114, 127, 133).

Dünya'nın çeşitli ülkelerinde yapılan çalışmalarda (43, 107-109, 116, 118, 125) *D. immitis*'in prevalansının %0.0- 73.5 arasında değiştiği görülmektedir.

Amerika kıtasında yapılan çalışmalar sonucunda *D. immitis*'in kıta genelinde geniş bir yayılış gösterdiği bildirilmiştir. Ancak Şili, Fransız Guyanası ve Uruguay ülkelerinde

konuyla ilgili ya çalışma yapılmadığından ya da yeterli veri sunulmadığından dolayı parazitin yayılışı hakkında net bir bilgi sağlanamamıştır (112, 131, 221, 222). *D. immitis*'in prevalansının; Amerika Birleşik Devletleri'nde % 0.3-39.7 (105, 133, 223-226), Meksika Körfezinde %20-42, Karayipler'de %20.4-63.2, Brezilya'da %2.3-45, Arjantin'de %5-74 ve Kanada'da %0.24-8.4 oranlarında olduğu bildirilmiştir (112, 113, 221, 227-230).

Dirofilariosis Avrupa'da geniş bir yayılım göstermesine karşın özellikle son yıllarda yeni teşhis metotlarının geliştirilmesiyle birlikte tanıda sensivite ve spesifitenin artması sonucu 2001 yılından itibaren daha önce endemik olmayan bazı ülkeler endemik bölge kapsamına girmiştir (98). *D. immitis*, İspanya'da %1.6-58.89 (42, 109, 231, 232), Hollanda'da %9 (233), İtalya'da %0.6 (234) ve Avusturya'da %3.6-6.4 (46, 60) oranlarında yayılım göstermektedir.

Asya ve Avustralya kıtalarında bulunan birçok ülkede, *D. immitis*'in prevalansı ile ilgili ilk veriler Artamonova ve ark. (235) yaptıkları bir çalışmada derlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu *D. immitis* kaynaklı canine dirofilariosis olgularının Malezya'da %70 (236), Avustralya'da %1.1-15 (53, 108), Tayvan'da %12,1-13,4 (43) ve Japonya'da (59, 237) %46.8-62.8 oranında yayılışa sahip olduğu bildirilmektedir.

Afrika Kıtasında yeterli sayıda çalışma yapılmadığından net bir yayılım oranı tespit edilememiştir (236). Genchi et al. (236) yaptıkları çalışmalar sonucu *D. immitis* enfeksiyonlarının Fas, Tunus, Mısır, Tanzanya, Kenya, Mozambik, Malavi, Senegal, Angola, Gabon, ve Nijerya'da görüldüğü bildirilmiştir (236).

Dirofilaria immitis Türkiye'de ilk kez 1951 ve 1959 yıllarında yabancı orijinli iki köpekte bulunmuştur (2, 65). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda dirofilariosisin prevalansının %0-46.22 arasında değiştiği görülmüştür (47, 66, 95).

Ankara yöresinde Pamukçu ve Ertürk (65), 1933-1960 yılları arasında nekropsisi yapılan 627 köpekten 1 inde (%0.6); Zeybek (67), 27 köpekten 3 ünde (ayrıca gebe 1 köpekte *D. immitis* mikrofilerleri görmüştür); Zeybek ve ark. (68) ise 33 köpekten 3 ünde (%9.09) *D. immitis*'in olgunlarını tespit etmişlerdir. Yine Ankara'da, Borkü ve ark. (49), ELISA testi ile 32 köpekten 9 unda (%28); Öge ve ark. (54) Membran Filtrasyon-Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama ve ELISA yöntemleri ile 280 köpekten 26 sında (%9.3); Yıldırım (31) Membran Filtrasyon-Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama yöntemi ile 300 köpekten 19 unda (%6.3) *D.immitis* enfeksiyonu belirlemişlerdir.

Taşan (93), Elazığ bölgesinde, 283 köpekten 53 ünün (%18.7) perifer kanında mikrofiler tespit etmiştir. Enfekte köpeklerin 20'sinde *D. repens*, 28'inde nonspesifik mikrofilerler belirlenmiş, 5 köpekte de her iki tür mikrofilerin saptandığı bildirmiştir. Çalışmada *D. repens* mikrofilerleri yönünden pozitif bulunan köpeklerin 6'sına nekropsi yapılmış ve olgun *D. repens*'ler bulunmuş, nonspesifik mikrofiler bulunan köpeklerin 17'sine yapılan nekropside ise olgun filarialara rastlanmamıştır. Taşan (76), Elazığ bölgesinde 120 köpeğin nekropsisinin yapıldığı başka bir çalışmada, 6 köpekte (%5) *D.immitis*'i, 3 köpekte de (%2.5) *D. repens*'i tespit etmiştir. Balıkcı ve Sevgili (1), Elazığ'da ELISA testi ile 120 köpekten 11 inde (%9.1) *D. immitis* tespit etmişlerdir. Elazığ, Mersin, Sakarya, Kocaeli ve Ankara'dan toplanan 211 tam kan ve serum örneğinin incelendiği bir başka çalışmada ise 27 köpekte (%12.8) saptanmış, ancak aynı örneklerle yapılan PCR'da parazite özgü bantlar elde edilememiştir (238). Ağaoğlu ve ark. (47), Van yöresinde yaptıkları bir çalışmada 106 köpekten 49'unda (%46.22), Göz ve ark. (82) ise 101 köpekten 18 inde (%17.8) parazit antijeni belirlemişlerdir.

Çakıroğlu ve Meral (66) Samsun'da ELISA ile 100 köpek serumu incelemiş ancak hiçbirinde *D. immitis* antijeni tespit edememişlerdir.

Yıldız ve ark. (86) Kırıkkale'de Modifiye Knott testi ile yapılan incelemede 172 köpekten 10 unda (%5.8) *D. immitis* mikrofilari belirlenmişlerdir. Ayrıca incelenen 142 köpek serumundan 49 unda (%34.5) parazit antijeni tespit edilmiş ve bu köpeklerden 39 unda enfeksiyonun gizli seyrettiği (okult enfeksiyon) kaydedilmiştir.

Sarnıç ve Alkan (75) Eskişehir'de askeri birimde ölen 2 köpeğin nekropsisi sonrasında olgun *D.immitis*'lere rastlamışlar, sonrasında incelenen 20 köpekten 6'sında (%30) *D.immitis* mikrofilerleri saptamışlardır.

Afyonkarahisar ve Eskişehir'de kalın damla ve Modifiye Knott tekniği ile 283 köpekten 7'sinde (%2.5) *Dirofilaria* sp. mikrofilerlerine rastlanmıştır. Dirofilariosisin yaygınlığı Afyonkarahisar'da %3.6, Eskişehir'de %1.4 oranında belirlenmiştir (90). Afyonkarahisar'da yapılan bir başka çalışmada ise genel durumu bozuk olan 4 köpeğin nekropsisinde erişkin *D. immitis*'e rastlanmıştır (239).

Tınar ve ark. (240), Bursa yöresi köpeklerinde yaptıkları bir çalışmada 100 köpekten 2'sinde (%2) olgun *D. immitis* bildirmişlerdir. Yine Bursa'da Civelek ve ark. (241)'nin yaptığı bir çalışmada 100 köpekten 2 sinde *D. immitis* belirlenmiş, Yalçın ve ark. (57) da, Modifiye Knott tekniği ile 1000 köpekten 2 sinde *D. immitis* mikrofilari tespit

etmişlerdir. Coşkun ve ark. (87) Gemlik Askeri Veteriner Araştırma Enstitüsü ve Eğitim Merkezi Komutanlığı'nda yetiştirilen 168 köpekten 5'inin (%2.98) *D. immitis* ile enfekte olduğunu kaydetmişlerdir.

Aydın'da Voyvoda ve Paşa (79) Modifiye Knott tekniği ile 158 köpekten 22 sinde (%13.9) *D. immitis* mikrofilari tespit etmişlerdir. İzmir'den 28 ve Aydın'dan 122 olmak üzere toplam 150 köpek üzerinde Saralı (78)'nin yaptığı bir çalışmada direkt kan muayenesi ile 4, modifiye knott yöntemi ile 7, membran filtrasyon yöntemi ile 6 ve PCR ile 15 köpekte *D. immitis* belirlenmiştir.

Şahin ve ark. (91) Şanlıurfa'da 92 köpekten 7 sinde (%7.6) *Dirofilaria* sp. mikrofilari belirlemişlerdir.

Umur ve Arslan (70), Kars yöresinde 42 köpeğin otopsisini sonrasında 6'sında (%14.3) *D. immitis* erişkinlerine, Taşçı (92) ise Saponin test ile 209 köpekten 31 inde (%14.83) *Dirofilaria* sp. mikrofilarielerine rastlamışlardır. Yine Taşçı (242)'nin Kars yöresinden 120 ve Iğdır yöresinden 120 olmak üzere toplam 240 köpek üzerinde yaptığı bir çalışmada *D. immitis*'in prevalansı PCR ile %25, ELISA ile %30 ve Membran Filtrasyon-Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama yöntemi ile %21.7 olarak belirlenmiştir. Sarı ve ark. (97) ise Iğdır'da 100 köpekten 40'ında *D. immitis* antijeni belirlemişlerdir.

Konya'da Cantoray ve ark. (72), yaptığı bir çalışmada otopsi sonrasında 4 köpeğin, Aydenizöz (84)'ün yaptığı bir çalışmada ise 60 köpekten 3'ünün *D. immitis* ile enfekte olduğu görülmüştür.

Ataş ve ark. (243), Sivas'ta 50 sokak köpeğinin nekropsisi sonrasında 3 köpeğin (%6) *D. immitis* ile enfekte olduğunu kaydetmişlerdir.

Kayseri'de Şahin ve ark. (71) yaptığı bir çalışmada nekropside 50 köpekten 6'sında (%12) *D. immitis* görüldüğü kaydedilmiştir. Kayseri'deki bir diğer çalışmada ise, Membran Filtrasyon-Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama, ELISA ve PCR yöntemleri ile incelenen 280 köpekten 27 sinde (%9.6) *D. immitis* tespit edilmiş, parazit ile enfekte köpeklerin 8 inde (%29.6) de gizli enfeksiyon belirlenmiştir (50).

Şimşek ve ark. (94) Bingöl'den 22 ve Erzurum'dan 101 olmak üzere toplam 123 köpek üzerinde yaptıkları bir çalışmada 6 köpekte (%4.9) natif muayene ile, 10 köpekte (%8.1) ise PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Bingöl'deki 22 köpekten 1 inde hem natif hem de PCR ile, Erzurum'daki 101 köpekten 5 i natif, 9 u ise PCR ile pozitif bulunmuştur. Erzincan'da Köse (2005)'nin yaptığı bir çalışmada incelenen 100 köpekten 12 sinde

D. immitis tespit edilmiştir. Natif muayene ile 1, Modifiye Knott yöntemi ile 6, serolojik yöntemle 12 köpekte enfeksiyon belirlenmiştir.

Hatay'da Yaman ve ark. (85) yaptığı çalışmada Modifiye Knott ve ELISA ile incele-nen 269 köpekten 70 inde (%26) *D. immitis* tespit edilmiş, %61.4 oranında okult enfeksiyon belirlenmiştir.

Öncel ve Vural (80) İstanbul'dan 263 ve İzmir'den 117 olmak üzere toplam 380 sokak köpeğinden 4 ünde ELISA ile *D. immitis* antijeni tespit etmişlerdir. Seroprevalans İstanbul'daki köpeklerde %1.52 olarak bulunurken İzmir'den temin edilen köpek serumlarında pozitifliklik saptanmamıştır.

İçen ve ark. (244) Diyarbakır'da ELISA yöntemi ile inceledikleri 82 köpekten 2 sinde (%2.4) *D. immitis* antijeni belirlemişlerdir.

Kayseri yöresinde sivrisineklerin vektörlük rolleri üzerine yapılan bir çalışmada, 46 odaktan 6153 adet sivrisinek toplanmış ve oluşturulan havuzlardan genomik DNA ekstrakte edilmiştir. Bu DNA'lar 16S rRNA ve cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) gen bölgelerinden dizayn edilen iki ayrı primer kullanılarak PCR ile incelenmiş ve *Culex pipiens* ile *Aedes vexans*'ların baş, toraks (L₃ dönemi-enfektif) ve gövdelerinden (L₂ dönemi-enfekte) oluşan havuzlarda *D. immitis* DNA'ları saptanmıştır. Çalışma sonucunda, başta *Aedes vexans* olmak üzere her iki sivrisinek türünün de Kayseri yöresinde *D. immitis*'e aktif olarak vektörlük yaptığı anlaşılmıştır (245). Kayseri'nin Felahiye yöresinde yapılan bir başka çalışmada ise *Aedes vexans*'lardan oluşturulan havuzlarda *D. immitis* DNA'larına rastlanırken *Culex pipiens*'lerden oluşturulan havuzlarda *D. immitis* DNA'larına rastlanmamış, *Aedes vexans* türünün araştırma bölgesinde *D. immitis*'e aktif olarak vektörlük yaptığı görülmüştür (37).

Dünyanın hemen her yerinde olduğu gibi Türkiye'nin de çoğu bölgesinde *D. immitis* çalışması yapılmış ve enfeksiyon prevalansının değişik oranlarda seyrettiği tespit edilmiştir. Araştırma yapılan yörenin de dahil olduğu, karasal iklimin hüküm sürdüğü İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan ve çeşitli teşhis yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu *D. immitis* prevalansının bölgede %0.6-%34.5 oranlarında seyrettiği görülmektedir. Çalışmamızda örneklemeye alınan farklı yaş, cinsiyet ve ırka ait 138 sokak köpeğinin 3'ünün (%2.17) *D. immitis* pozitif olduğu saptanmıştır. Söz konusu oranın diğer araştırmacıların saptadığı yüzdelik dilim içerisinde olması dolayısıyla elde edilen bulguların diğer bulgularla uyumlu olduğu görülmektedir. Prevalans oranlarının çalışma yörelerine göre değişkenlik göstermesinin örnek toplanan alanlardaki sivrisinek

popülasyonu ile direkt ilgili olabileceği düşünülmektedir. Sivrisinek türlerinin yayılışında coğrafik bölge ve ekolojik özelliklerin önemli olduğu bilinmektedir. Değişik habitatları seçen sivrisinek türlerinin çevresel faktörlere karşı tolerans göstermekte, buna karşın az sayıda habitat tipinde üreyebilen türlerin ise toleransı az olmaktadır (246). Genel olarak da toleransı yüksek olan türlerin geniş alanlara yayılabildiği ve popülasyon yoğunluklarının da diğer türlere göre yüksek olduğu bilinmektedir (246, 247). Avanos yöresi arakonak sivrisinekler için uygun sıcaklık, nem, su kaynakları, bitki örtüsü, iklim, yağış, rüzgâr gibi çevresel faktörlere sahip bir yapıda ve elde edilen sonuçlar çerçevesinde yörenin *D. immitis* enfeksiyonları için son derece elverişli bir alan olduğu görülmüştür.

Dirofilaria immitis'in mikrofilerlerinin kanda günün her saatinde görülebildiği, ancak mikrofilerlerinin pulmoner arterler ile venalar arasındaki oksijen basıncı akşam saatlerinde düşmesi ve larvaların perifer kana karışması nedeniyle akşam saatlerinde daha çok arttığı bilinmektedir. *D. immitis*'in mikrofilerlerinin kanda görülme saatleri ülkelere göre farklılık göstermektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde minimum mikrofileri saat 11.00'da maksimum mikrofileri ise 16.30'da görülmektedir. Fransa'da en az mikrofiler saat 8.00'da, en fazla ise saat 20.00'da, Çin Halk Cumhuriyeti'nde en az mikrofiler saat 06.00'da, en çok mikrofiler ise saat 18.00'da (5); Tanzanya'da ise en fazla mikrofiler saat 22.00'de tespit edilmiştir (248). Kore'de yapılan bir çalışmada mikrofilerlerinin minimum olduğu saat 11.00, maksimum olduğu saat ise 21.00 olarak belirlenmiştir (61). Türkiye'de yapılan çalışmalarda da en az mikrofiler saat 12.00'da (63), en fazla mikrofiler ise 16.00, 24.00 ve sabah 06.00 saatlerinde görülmüştür (6, 93). Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada ise en az mikrofiler saat 06.00'da, en fazla mikrofiler ise 20.00, 22.00 ve 24.00 saatlerinde görülmüştür (62). Ayrıca mikrofilerlerin %5-20 sinin perifer dolaşımında, geri kalanının ise iç organlarda özellikle de akciğerin küçük solunum kanallarının kan damarlarında yerleştiği (20) ve mikrofiler varlığının patent enfeksiyonun kanıtı olmadığı (102) ifade edilmektedir. Avanos yöresinde yapılan bu çalışmada da literatür bilgileri çerçevesinde saat 16.00'dan sonra köpeklerden kan alınmaya çalışılmıştır.

Filaria tipi nematodların teşhisinde kanda mikrofiler saptanmasında konvansiyonel yöntemler günümüzde özellikle rutin analizlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerden membran filtrasyon yönteminin, natif, sürme preparat ve Modifiye Knott yöntemlerine oranla daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (18, 150, 153, 155). Bununla

birlikte bazı araştırmacılar (41, 157, 249) membran filtrasyon ve Modifiye Knott yöntemlerinin eşit duyarlılıkta olduğunu ve natif yöntemle oranla konsantrasyon yöntemlerinin %50-90 daha duyarlı olduğunu kaydetmektedirler. Williams et al. (157), membran filtrasyon ve Modifiye Knott yöntemlerinin, 1 mikrofil/ml yoğunluğunda bile oldukça başarılı olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca membran filtrasyon yönteminin daha hızlı ve güvenli olmasıyla Modifiye Knott yönteminden daha avantajlı olduğu ve bu testin rutinde tavsiye edilebilir olduğu bildirilmektedir (153, 155). Modifiye Knott yönteminde, özellikle mikrofilin ayrımında baş ve kuyruk kısımlarının net görüldüğü ve morfolojik ölçümlerin daha sık olarak bu teste göre yapıldığı, maliyetinin düşük olduğu ancak, santrifüje gereksinim duyulması ve yetersiz santrifüj sonucunda mikrofil kaybının olabileceği kaydedilmektedir (41, 145, 163, 249). Membran filtrasyon yönteminde ise daha hızlı sonuçlar alındığı ve belirli bir sahada fazla sayıda mikrofilin incelenemediği, buna karşın, saptanan mikrofilin bazen baş veya kuyruk kısımlarının membran üzerindeki porlara girmesiyle bu bölgelerin incelenmesinin zor olduğu ve filtrasyon tertibatındaki temizlik yetersizliğinin pozitif örneklerde bulunan mikrofilin bir diğer kan örneğine bulaşmasına yol açabildiği belirtilmektedir (41, 157, 163). Williams et al. (157), 8 µm por genişliği olan filtrelerde % 3.5'a kadar mikrofil kaybının şekillenebildiğini, 5 µm por genişliğindeki filtrelerde ise % 1'den fazla kayıp görülmediğini bildirmişler ancak, bu kayıpların elde edilen sonuçları % 3'den fazla değiştiremeyeceği Wylie (153) tarafından belirtilmiştir. Çalışmamızda kullanılan söz konusu üç yöntemde de aynı sayıda pozitiflik saptanmış yöntemler arası herhangi bir duyarlılık farklılığı gözlenmemiştir. Bunun yanında, mikrofil saptanması açısından membran filtrasyon yönteminin, Modifiye Knott ve natif yöntemle oranla daha kolay ve zaman kazandırıcı olduğu fakat filtrasyon testinde mikrofil ölçümleri esnasında filtre üzerindeki porların çoğu durumlarda mikrofilin çeşitli kısımlarını (baş, gövde bölümleri, kuyruk) gizlediği, dolayısıyla mikrofil ölçülerini ve morfolojik yapılarını (baş, gövde bölümleri, kuyruk) tespit etmek açısından Modifiye Knott yönteminden daha dezavantajlı olduğu gözlenmiştir. Antijen testinin sensitivitesine bağlı olarak, antijenemi önce fark edilebilir ancak bazen mikrofilin birkaç hafta sonra görülebilir. Parazit yükünün az olduğu durumlarda veya makrosiklik laktonlarla tedavi uygulandığında antijenemi 9 ay sonra da fark edilebilir. Ayrıca dişi parazitlerin immatür olduğu veya az olduğu, sadece erkek parazitlerin var

olduğu, ticari kitlerin veya serum örneklerinin oda ısısında bekletildiği durumlarda yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (250).

Dirofilaria immitis'in teşhisinde kullanılan Antijen ELISA testlerinin sensitivitesinin erişkin parazit sayısına ve parazitin cinsiyetine bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada erişkin parazit sayısının 5 ten az olduğu durumlarda antijen testlerinin sensitivitesinin düştüğü görülmüştür (173).

Son yıllarda moleküler teknolojilerde büyük ilerlemeler sağlanmıştır. Bu gelişmeler parazitlerin gelişimi ve reproduksiyonun daha iyi anlaşılmasının yanında parazitlerin kontrolü için yeni yaklaşımların geliştirilmesi gibi parazitolojinin birçok alanında da geniş şekilde kullanılmaya başlanmıştır (251). Bunun yanında parazitlerin spesifik teşhisi (gelişim dönemi ve cinsiyete bakılmaksızın) ve genetik karakterizasyonları, sistematik (taxonomy ve phylogeny), popülasyon genetiği, ekoloji ve epidemiyoloji için kilit rol üstlenmiş ve ayrıca parazitlerin yol açtığı hastalıkların teşhis, tedavi ve kontrolünde oldukça önemli bir merkezi oluşturmuştur (252). Parazitlerin konvansiyonel olarak teşhis ve ayrımları morfolojik özellikleri, enfekte ettikleri konak, bulaşma şekilleri, konaklarındaki patolojik etkileri ve coğrafik orijinlerine göre yapılmaktadır. Ancak bu kriterler sıklıkla spesifik identifikasyonda yetersiz kalmaktadır. Özellikle nükleik asitlerin amplifikasyonu tabanlı çeşitli nükleik asit teknikleri geleneksel yöntemlerin bu sınırlamalarını aşmada güçlü bir alternatif oluşturmuştur (253). Mikrofilaremi görülen köpek ve kedilerde başta PCR, Nested PCR ve Real Time PCR gibi moleküler tanı yöntemleri ile filarial enfeksiyonların kesin teşhisi sağlanmış ve konvansiyonel yöntemlerde ortaya çıkabilen hatalı identifikasyonların önüne geçilmiştir (34, 174, 179, 254, 255). Ayrıca söz konusu teknikler miks enfeksiyonların saptanmasında da oldukça duyarlıdır. Filarial enfeksiyonlarda kullanılan moleküler biyolojik tekniklerde hedef gen bölgeleri olarak daha çok internal transcribed spacer 2 (ITS2), 5S rRNA, 12 S rRNA, 16S rRNA, 28S rRNA ve mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 gibi gen bölgelerinin kullanıldığı ve bu bölgelerden dizayn edilen spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu teşhise gidildiği görülmektedir. Aynı zamanda bu PCR ürünlerinin pürifiye edilip klonlanması ve sekanslanması ile de olası intra ve interspesifik varyasyonlar tespit edilebilmekte ve filogenetik analizler yapılabilmektedir (175, 255-257). Çalışmamızda spesifik COI ve 5.8S-ITS2-28S gen bölgeleri yönünden PCR analizine tabii tutulan 138 kan örneğinde daha önce yapılan natif muayene, modifiye knott ve membran filtrasyon testleri sonucu

pozitif bulunan 2 örneğin dışında 1 örnekte daha *D. immitis* pozitifliği saptanmıştır. Bu nedenle moleküler tabanlı yöntem olan PCR'nın konvansiyonel yöntemlere kıyasla daha duyarlılığı olduğu görülmüştür. Ancak PCR tekniği ile yapılan teşhis her ne kadar yüksek sensivite ve spesifiteye sahip olsa da köpeğin kalbinde erişkin parazit var olup kanda mikrofilin olmadığı durumlarda yani gizli (okult) enfeksiyonlarda PCR ile *D. immitis* teşhisi yapılamayacağı göz önüne alınmalı ve teşhis serolojik testler ile desteklenmelidir.

Dirofilaria immitis enfeksiyonlarının bulaşma dinamiklerinin belirlenmesi, epidemiyolojik faktörlerinin analizi ve hastalığa karşı kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde enfeksiyona yol açan türün moleküler karakterizasyonu ve GenBank'taki diğer izolatlarla filogenetik ilişkilerine yönelik çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. Çalışmamızda, Avanos yöresindeki sokak köpeklerinde *D. immitis*'in izolatlarında olası intra ve interspesifik varyasyonlar tespit edilebilmek amacıyla söz konusu izolatların 5.8S-ITS2-28S ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgelerinin moleküler analizi yapılmış ve filogenetik karakterizasyonları ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlarla izolatımızın parsiyel COI gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlardan Brezilya'da insandan izole edilen *D. immitis* izolatu (Aksesyon No: HQ540424) ile %5.7'lik bir farklılık gösterdiği, Türkiye'den GenBank'a sınırlı sayıda kaydedilmiş izolatlar ve dünyadan kaydedilen diğer izolatlarla ise %100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Yine aynı izolatın parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinin pairwise kıyaslamalarına göre dünyadan alignmenta dahil edilen diğer izolatlarla %99.5-%100 oranlarında identiklik gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarla sekans analizi yapılan izolat konfirme edilmiştir. Ancak Dünya'nın çeşitli ülkelerinden, farklı hayvanlardan ve insandan elde edilen spesifik COI ve 5.8S-ITS2-28S gen bölgelerine göre pairwise kıyaslamaları ve filogenetik analizleri yapılan diğer izolatların köpek kanından elde ettiğimiz izolat ile tür içi %100 identiklik göstermiş olması ve dış dal olarak seçilen *D. repens* ile yapılan türler arası kıyaslamalarda ise COI gen bölgesi için %13.6, 5.8S-ITS2-28S gen bölgesi için %30.4'lük bir farklılığın olması, söz konusu spesifik gen bölgelerinin intraspesifik varyasyonları tespit etmede düşük interspesifik varyasyonları tespit etmede ise yüksek duyarlılığa sahip olduğu göstermektedir. Bu nedenle özellikle tür içi varyasyonların belirlenmesinde diğer spesifik gen bölgelerinin kullanılmasının daha yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Dirofilaria immitis enfeksiyon riskinin yaş faktörü ile ilgili olarak değişkenlik gösterdiği kaydedilmekle birlikte (42, 43, 223, 231, 258), bazı araştırmacılar (45, 46, 259) *D.immitis* enfeksiyonunda köpeğin yaşının etkili olmadığını, tüm yaş gruplarında enfeksiyonun görülebileceğini kaydetmektedir. Diğer araştırmacılar (42, 132, 231, 232, 258) ise yaşın artması ile orantılı olarak enfeksiyon oranının artış gösterdiğine, özellikle 3-7 yaş arasında daha yaygın (%6.1-53.8) olduğuna dikkat çekmektedirler. Aranda et al. (109), 5 yaş üstü köpeklerde *D.immitis*'in %73 yayılış gösterdiğini, Sears et al. (260), 1-3, 4-6, 7-9 ve 10-12 yaş gruplarındaki köpeklerde enfeksiyon prevalansını sırasıyla %6, %11, %15, %19 bildirerek yaş ile birlikte enfeksiyon oranlarının arttığını kaydetmişlerdir. Benzer şekilde Fan et al. (43), *D.immitis* enfeksiyonunu 6 yaş üstü köpeklerde (%23.7), 1-3 (%6.3) ve 3-6 (%14.1) yaş arası köpeklere oranla daha yaygın bulmuşlardır. Çalışmamızda değişik yaşlarda olan köpekler örneklemeye alınmış olup *D. immitis* pozitif bulunan 3 köpeğin 6 ay, 1 ve 4 yaşlarında oldukları belirlenmiştir. Bu nedenle enfeksiyonun prevalansının yaşla birlikte arttığının kesin kanıtı olabilecek bir yargıya varılamamıştır.

Köpeklerde *D.immitis* enfeksiyonunda, cinsiyetin etkisinin olmadığı kaydedilmekte (43, 46, 109, 133, 223, 261) veya genel olarak bu parazite erkek köpeklerde dişilerden daha çok rastlandığı bildirilmektedir (42, 258). Bu farklılığın diş köpeklerin durağan yapısına karşın erkek köpeklerin koruyucu, av veya spor amacıyla daha çok tercih edilmesi, erkek köpeklerin dolaşma eğilimlerinin fazlalığı sebebiyle, sivrisinelere maruz kalma risklerinin dişilere göre daha yüksek olmasından ileri gelebileceği kaydedilmektedir (42, 258). Çalışmamızda 2 diş köpek ve bir erkek köpekte *D. immitis* pozitifliği belirlenmiştir. Ancak elde edilen sonuçlar çerçevesinde prevalansın çok düşük olması nedeniyle *D.immitis* enfeksiyonunda, cinsiyetin etkisinin olup olmadığı yönünde kesin bir sonuca varılamamıştır.

Dirofilaria immitis'in prevalansını köpek ırklarının etkileyip etkilemediğinin araştırıldığı bir çalışmada safkan ve melez köpekler arasında enfeksiyon oranları açısından önemli istatistiksel farklılıklar olmadığı görülmüştür (52). Çalışmamızda *D. immitis* pozitif bulunan üç köpeğin de farklı ırklarda olması araştırmacıların görüşleri ile uyumluluk göstermektedir.

Dışarıda barınan ve profilaksi uygulanmayan köpeklerde *D.immitis* enfeksiyon riskinin yüksek olduğu, bunun da sivrisinelere maruz kalma riski ile orantılı olduğu kaydedilmiştir (42, 133). Bu çalışmada enfeksiyon saptanan köpeklerin tümünün

dışarıda barınan, dolayısıyla sivrisinekler tarafından ısırılma olasılığı yüksek olan ve profilaksi uygulanmayan köpekler olması, sonuçlarımızın ilgili literatürlerle (42, 133) uygunluk gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Avanos yöresi sokak köpeklerinde *D. immitis* enfeksiyonlarının moleküler prevalansı %2.17 olarak bulunmuş ve elde edilen izolatin 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin moleküler analizi ve filogenetik karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar hem Nevşehir ili hem de Avanos yöresi sokak köpeklerinde dirofilariosis'in moleküler prevelansı için ilk veri olma özelliği taşımaktadır. Bunun yanında çalışmada konvansiyonel yöntemlere kıyasla moleküler tabanlı teşhis yöntemlerinin daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ayrıca genotipleme ve filogenetik analizlerde Dünya'da sık olarak kullanılan 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin intraspesifik varyasyonları tespit etmede düşük, interspesifik varyasyonları tespit etmede ise yüksek duyarlılığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle özellikle tür içi varyasyonların belirlenmesinde diğer spesifik gen bölgelerinin kullanılmasının daha yararlı olabileceği kanısına varılmıştır. Diğer taraftan bu moleküler epidemiyolojik çalışmayla, *D. immitis*'in zoonotik karakterli bir parazit olması sebebiyle risk faktörlerinin değerlendirilmesi, etkin kontrol ve mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde halk sağlığı açısından özellikle hayvan sahipleri, veteriner hekimler, epidemiyolojistler ve halk sağlığı uzmanlarının işbirliğinin gerekliliği ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

1. Balıkcı E, Sevgili M. Elazığ ve çevresindeki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in seroprevalansı. Fırat Üniv Sağ Bil Vet Derg 2005; 19: 103-106.
2. Güralp N. Helmintoloji. 2. Baskı. Ankara: Ankara Üniv. Basımevi 1981; 505-515.
3. Levine ND. Nematode parasites of domestic animals and man. Burgess Publishing Company 1968; 440-454.
4. Sarımeahmetoğlu HO, Doğanay A. Zoonoz özelliği gösteren nematodlar. Kafkas Üniv Vet Fak Derg 1999; 5: 233-241.
5. Soulsby EJJ. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals (7 th ed). Baillere Tindall 1986; 307-312.
6. Toparlak M, Tüzer E. Veteriner Helmintoloji, İstanbul Üniv Vet Fak Yayını Ders Notu. No: 102. İstanbul Üniv Vet Fak, Masaüstü Yayımcılık Ünitesi, İstanbul, 1999.
7. Jackson RF. History of heartworm disease (Special edition). Calif Vet 1989; 6-7.
8. Anderson RC. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission (2nd ed.), NewYork, CABI Publishing 2000; 467-509.
9. Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in Dog and Cat and Human Infections (1st ed), Mapped Parassitologiche 8, Litografia Vigilante srl, Rolando Editore Via Nuova Poggioreale, Naples, Italy 2007; pp: 39-209.

10. Murata K, Yanai T, Agatsuma T et al. 2003. *Dirofilaria immitis* infection of a snow leopard (*Uncia uncia*) in a Japanese Zoo with mitochondrial DNA analysis. J Vet Med Sci 2003; 65(8): 945-947.
11. Barriga OO. Dirofilariasis. In: Steele JH, Schultz MG (eds), Parasitic zoonoses. Vol II. Florida 1982; pp 93-110.
12. Löwenstein VM, Meissel H, Koller J. Zum *Dirofilaria immitis* Befall beim Hund in Österreich. Wien Tierarztl.Mschr 1988; 75: 420-424.
13. Rommel M, Eckert J, Kutzer E, et al. Veterinarmedizinische Parasitologie, Berlin, Blackwell Wissenschafts-Verlag 2000; 609-622.
14. Onmaz AC, İnci A, Yildirim A ve ark. Bir Köpekte *Dirofilaria immitis* enfeksiyonu ve bu köpekten elde edilen *D. immitis* ve *Taenia hydatigena* izolatlarının moleküler karakterizasyonu, 10. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi Bildiri Kitabı, s 88-89, 27-30 Haziran 2013, Nevşehir, Türkiye.
15. Otto GF, Bauman PM. Canine filariasis. Vet Med 1959; 54: 87-96.
16. Lindsey JR. Identification of canine microfilariae. J A V M A 1965; 146: 1106-1114.
17. Jackson RF. Diagnosis of heartworm disease bay examination of the blood. J A V M A 1969; 154: 374-376.
18. Kelly JD. Detection and differentiation of microfilariae in canine blood. Aust Vet J 1973; 49: 23-27.
19. Euzeby J. Diagnostic Expérimental des Helminthoses animales Livre 1. Paris, Boulevard de Grenelle 1981; 277-312.
20. Umur Ş, Hökelek M. Filariasis, Dirofilariasis, Gnathostomiasis, Gongylonemiasis, Lagochilascoriosis. In: Doğanay M, Altıntaş N (eds), Zoonozlar, Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2009: ss 1025-1031.

21. Kasap H, Alptekin D. Sivrisinekler, Vektörlükleri ve Kontrolü. In: Özcel MA, Daldal N (eds), Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları, Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın, No: 13, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir. 1997: ss 1-46.
22. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyo-morfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılımı ve sağlık önemleri). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, İstanbul 1984. Yayın No: 3215.
23. Nayar JK. Mosquito-borne dog heartworm disease. University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, <http://hammock.ifas.ufl.edu> (15.05.2014).
24. Snow KR. Mosquitoes, Naturalist' Handbook, 14. Richmond Publ Co Ltd, England 1990; p 63.
25. Grieve RB, Lauria S. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in canine and murine hosts. Acta Trop 1983; 40: 121-127.
26. Courtney CH. Transmission and lifecycle of heartworm. Calif Vet 1989; 8.
27. Grieve RB, Lok JB, Glickman LT. Epidemiology of canine heartworm infection. Epidemiol Rev 1983; 5: 220-246.
28. Johnstone C. Parasites and parasitic diseases of domestic animals: Heartworm. http://cal.nbc.upenn.edu/merial/hrtworm/hw_top.htm, (15.05.2014).
29. WEB_1. (2000). *Dirofilaria immitis*. [http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/nemas/Dirofilaria immitis](http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/nemas/Dirofilaria%20immitis) (15.05.2014).
30. Haddock KC. Canine heartworm disease: A review and pilot study. Soc Sci Med 1987; 24: 225-246.
31. Yıldırım A. Ankara ve Çevresindeki Köpeklerde Filarial Etkenlerin Prevalansı, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2003.
32. Murdoch DB. Heartworm in the United Kingdom. J Small Anim Pract 1984; 25: 299-305.

33. Budak S. Parazit ve vektör ilişkileri. Türkiye Parazitol Derg 1994; 18: 362-370.
34. Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, et al. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilari immitis* in Italy. Veterinary Parasitology 2003; 118: 195-202.
35. [Licitra B](#), [Chambers EW](#), [Kelly R](#) et al. Detection of *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) by polymerase chain reaction in *Aedes albopictus*, *Anopheles punctipennis*, and *Anopheles crucians* (Diptera: Culicidae) from Georgia, USA. [J Med Entomol](#) 2010; 47: 634-638.
36. Brito AC, Fontes G, Rocha EMM, et al. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (Say) from Maceio, Alagoas, Brazil. Mem Inst Cruz 1999; 94(4): 575-576.
37. Bişkin Z. Kayseri'nin Felahiye yöresinde *Dirofilaria immitis*'in vektör sivrisineklerde moleküler biyolojik tanısı. Türkiye Parazitol Derg 2010; 34: 200-205.
38. [Yıldırım A](#), [İnci A](#), [Duzlu O](#) et al. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. [Vet Parasitol](#) 2011; 178: 143-147.
39. Yıldırım A, İnci A, Şahin İ ve ark. *Dirofilaria immitis*'in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı ve Kayseri Yöresinde Vektör Sivrisineklerin Ekolojisi. TUBİTAK Proje No: 107O533, 2010.
40. WEB_2. (2001). Heartworm. <http://www.marvistavet.net/html/heartworm.html> (15.05.2014).
41. Whiteley HE. Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. Vet Med 1988; 83: 328-345.
42. Montoya JA, Morales M, Ferrer O, et al. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). Vet Parasitol 1998; 75: 221-226.

43. Fan CK, Su KE, Lin YH, et al. Seroepidemiologic survey of *Dirofilaria immitis* infection among domestic dogs in Taipei City and mountain aboriginal districts. Vet Parasitol 2001; 102: 113-120.
44. Song KH, Lee SE, Hayasaki M, et al. Seroprevalence of canine dirofilariosis in South Korea. Vet Parasitol 2003; 114: 231-236.
45. Rowley J. The prevalence of heartworm infection in three countries in North Carolina. Canine Pract 1981; 8: 46-48.
46. Martin TE, Collins GH. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in greyhounds. Aust Vet J 1985; 62: 159-163.
47. Ağaoğlu Z, Akgül Y, Ceylan E ve ark. Van yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in yaygınlığı. YYÜ Vet Fak Derg 2000; 11: 41-43.
48. Beugnet F, Bima-Blum S, Chardonnet L. Etude epidemiologique de la Dirofilariose cardiaque du chien en Nouvelle-Caledonie choix d'une methode diagnostique. Revue Med Vet 1993; 144: 891-897
49. Börkür MK, Kurtdele A, Azizoğlu ve ark. *Dirofilaria immitis* ile doğal enfekte köpeklerde thiacetarsamide sodium uygulamaları. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1996; 43: 247-256.
50. Yıldırım A, İça A, Atalay Ö, Düzlü Ö ve ark. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri province, Turkey. Res Vet Sci 2007; 82: 358-363.
51. Rawlings CA, Calvert CA. Heartworm disease. In: Ettinger SJ (ed), Textbook of Veterinary Internal Medicine. W.B. Saunders Comp, Philadelphia, London, Toronto, 2010: p 1163-1184.
52. Rosa A, Ribicich M, Betti A et al. Prevalence of canine dirofilariosis in the city of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). Vet Parasitol 2002; 109: 261-264.
53. Copland MD, O'Callaghan MG, Hajduk P et al. The occurrence of *Dirofilaria immitis* in dogs in South Australia. Aust Vet J 1992; 69: 31-32.

54. Öge H, Doğanay A, Öge S, et al. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. Deut Tierarztl Wochenschr 2003; 110:69-72.
55. Yıldırım A. Ankara ve çevresindeki köpeklerde filarial etkenlerin prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 35-40.
56. Duran-Struuck R, Jost C, Hernandez AH. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic)-June 2001. Vet Parasitol 2005; 133: 323-327.
57. Yalçın E, Şenlik B, Yılmaz Z ve ark. Bursa'daki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in prevalansı. JTVS 2007; 13: 23-27.
58. Doğanay A, Şahal M. Türkiye'de köpeklerdeki dirofilariasis sorunu ve insan sağlığı açısından önemi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1987; 34: 277-287.
59. Nogami S, Sato T. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in cats in Saitama, Japan. J Vet Med Sci 1997; 59: 869-871.
60. Marks CA, Bloomfield TE. Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. Vet Parasitol 1998; 78: 147-154.
61. Rhee JK, Yang SS, Kim HC. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. Korean J Parasitol 1998; 36 (4): 235-239.
62. Burgu A, Şahal M, Gazıyağcı S ve ark. *Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerde mikrofilere perodisitesinin kantitatif analizi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51: 117-125.
63. Şahal M, Doğanay A, İmren H. Doğal olarak *Dirofilaria immitis* ve *Dirofilaria repens* ile enfekte olmuş köpeklerde parazitin mikrofilere ve olgunlarına karşı Citartin-L^R ve Aricyl^R etkinliği üzerine araştırmalar. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1986; 33: 297-308.
64. Knight DH. Pathophysiology of heartworm disease. Calif Vet 1989; 16-17.

65. Pamukçu AM, Ertürk E. 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1961; 8: 323-346.
66. Çakıroğlu D, Meral Y. Samsun bölgesinde köpeklerde *Dirofilaria immitis* enfestasyonu insidansı incelenmesi. JIVS 2007 2: 1-12.
67. Zeybek H. Ankara yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis* olguları. Etlik Vet Mikrob Derg 1989; 6: 1-9.
68. Zeybek H, Tatar N, Tokay A. Ankara yöresi kırsal alan köpeklerinde görülen parazitler ve bunların yayılışı. Etlik Vet Mikrob Derg 1992; 7: 17-26.
69. WEB_3. (2002). *Dirofilariasis*. <http://www.emedicine.medscape.com/article/997417-overview> (18.05.2014).
70. Umur Ş. Arslan M.Ö. Kars yöresi sokak köpeklerinde görülen helmint türlerinin yayılışı. Türkiye Parazitol Derg 1988; 22:188-193
71. Şahin İ, Gödekmerdan A, Ekinci N ve ark. Kayseri yöresi köpeklerinde *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) ve diğer parazitlerin yayılışı. Türkiye Parazitol Derg 1992;17: 77-82.
72. Cantoray R, Dik B, Gülbahçe S. Konya’da dört köpekte saptanan *Dirofilaria immitis* (Leidy,1856) olgusu. Veterinarium 1990; 1: 32-34.
73. Altas K, Akmut T. İnsanda *Dirofilaria conjunctivae* (Addario 1885) olgusu. T Mik Cem Derg 1986; 16: 12-16.
74. Dik B. Başoğlu A. Kaya M. Köpeklerde *Dirofilaria immitis*’in sağıtımında levamizol ve ivermectin’in etkileri. Selçuk Üniv Vet Fak Derg 1992; 8: 48-50.
75. Sarnıç H, Alkan M. Köpeklerde dirofilariasis olguları ve insan sağlığı yönünden önemi. Türkiye Parazitol Derg 1986; 1-2: 169-174.
76. Taşan E. Elazığ kırsal yöre köpeklerinde helmintlerin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi. Doğa Bilim Derg 1984; 8: 160-167.

77. Öge H, Öge S, Yıldırım A et al. Immunoblotting analysis of somatic components of *Dirofilaria immitis*. Parasite 2005; 12: 179-182.
78. Sarali H. Köpeklerdeki *Dirofilaria* Türlerinde *Wolbachia*'nın Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın 2009.
79. Voyvoda H, Paşa S. Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde leishmaniosis ve dirofilariosis'in prevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2004; 28: 1105-1111.
80. Öncel T, Vural G. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs in İstanbul and İzmir. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 785-789.
81. Sarı B, Gıcık Y, Taşçı GT. Iğdır yöresinde köpeklerde *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* ve *Borrelia burgdorferi*'nin seroprevalansının araştırılması, 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s 247, 2009, Adana.
82. Göz Y, Kotlaş İS, Altuğ N ve ark. Van yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in seroprevalansı. YYÜ Vet Fak Derg 2008; 18: 5-8.
83. Köse K. Erzincan Yöresindeki Köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in Prevalansı Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van 2005.
84. Aydenizöz M. Konya yöresi köpeklerinde helmintolojik araştırmalar. Türkiye Parazit Derg 1997; 21: 429-434.
85. Yaman M, Güzel M, Koltas IS et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province, Turkey. J Helminthol 2009; 28: 1-6.
86. Yıldız K, Duru SY, Yağcı BB et al. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Kırıkkale. Türkiye Parazit Derg 2008; 32(3): 225-228.
87. Coşkun ŞZ, Tınar R, Akyol ÇV ve ark. Doğal enfekte köpeklerde *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerine ivermektinin etkisi. Uludağ Univ Vet Fak Derg 1992; 11: 121-128.

88. Doğanay A. Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1983; 30: 550-561.
89. Toparlak M, Gargılı A, Esatgil MU, et al. Canine filariosis around İstanbul, Turkey employing naphthol AS-TR phosphatase. Acta Veterinaria Brunensis 2005; 2: 233-236.
90. Kozan EA, Kırçalı Sevimli F, Birdane FM. Afyonkarahisar ve Eskişehir İl'lerindeki sokak köpeklerinde *Dirofilaria* sp.'nin yayılışı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2007; 54: 117-119.
91. Şahin T, Sevgili M, Çamkerten İ. Şanlıurfa yöresi köpeklerinde *Dirofilaria* sp.'nin yayılışı. Türkiye Parazitoloj Derg 2004; 28: 140-142.
92. Taşçı GT. Kars Yöresi Köpeklerinde *Dirofilariosis*'in Yaygınlığı, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars 2005.
93. Taşan E. Elazığ ve yöresindeki köpeklerde filaria'ların yayılışı, Doğa Bilim Derg 1983; 7: 63-70.
94. Şimşek S, Balkaya İ, Özkanlar YE ve ark. Erzurum ve Bingöl illerindeki sahipli ve sokak köpeklerinde *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinin PZR ve natif kan muayenesiyle belirlenmesi, 16. Ulusal Parazitoloj Kong Bildiri Kitabı, s 237, 2009 Adana.
95. Taşçı GT. *Dirofilariosis*'in Türkiye'deki durumu, 17. Ulusal Parazitoloj Kongresi Bildiri Kitabı, s 128-133, 5-10 Eylül 2011, Kars, Türkiye.
96. Simsek S, Ozkanlar Y, Balkaya I et al. Microscopic, serologic and molecular surveys on *Dirofilaria immitis* in stray dogs, Turkey. Vet Parasitol 2011; 183: 109-113.
97. Sarı B, Taşçı GT, Kılıç Y. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* in Dogs in Iğdır Province, Turkey. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2013; 19: 735-739.
98. Otranto D, Dantas-Torres F, Brianti E et al. Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. Parasit Vectors 2013; 16: 6-16.

99. Kazacos KR. The prevalence of heartworms (*Dirofilaria immitis*) in dogs from Indiana. J Parasitol 1978; 64: 959-960.
100. Klotins KC, Martin SW, Bonnett BN et al. Canine heartworm testing in Canada. Are we being effective? Can Vet J 2000; 41: 929-937.
101. Owen J, Slocombe D, Villeneuve A. Heartworm in dogs in Canada in 1991. Can Vet J 1993; 34: 630-633.
102. Retnasabapathy A, San KT. Incidence of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in Malaysia. Vet Rec 1976; 98: 68-69.
103. Nelson TA, Gregory DG, Laursen JR. Canine heartworms in coyotes in Illinois. J Wildl Dis 2003; 39(3): 593-599.
104. Patton S, Faulkner CT. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infection in dogs: 805 cases (1980-1989). J Am Vet Med Assoc 1992; 200:1533-1534.
105. Theis JH, Stevens F, Law M. Distribution, prevalence, and relative risk of filariasis in dogs from the state of Washington (1997-1999). J Am Anim Hosp Assoc 2001; 37: 339-347.
106. Pratt SE, Corwin RM, Selby LA et al. Prevalance of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infections in Missouri dogs. J Am Vet Med Assoc 1981; 179: 592-593.
107. Hesselink JW. The prevalence of heartworm (*Dirofilaria immitis*) in dogs of Curacao, Netherlands. Tijdschr Diergeneeskd 1998; 113: 853-859.
108. Bidgood A, Collins GH. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney. Aust Vet J 1996; 73: 103-104.
109. Aranda C, Panyella O, Eritja R et al. Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). Vet Parasitol 1998; 77: 267-275.
110. Cancrini G, Allende E, Favia G et al. Canine dirofilariosis in two cities of southeastern Spain. Vet Parasitol 2000; 92: 81-86.

111. [Solano-Gallego L](#), [Llull J](#), [Osso M](#) et al. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. [Vet Res](#) 2006; 37: 231-244.
112. Vezzani D, Eiras FD, Wisnivesky C. Dirofilariasis in Argentina: historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Vet Parasitol* 2006; 136: 259-273.
113. Alves LC, Almeida-Silva LV, Gloria-Faustino MA et al. Survey of canine heartworm in the city of Recife, Pernambuco, Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz On-Line* 1999; 94: 587-590.
114. Araujo RT, Marcondes CB, Bastos LC et al. Canine dirofilariasis in the region of Conceição Lagoon, Florianópolis, in the Military Police Kennel, São José, State of Santa Catarina, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 113: 239-242.
115. Brito AC, Vila-Nova MC, Martins Rocha DA et al. Prevalence of canine filariasis by *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Maceiã, Alagoas State, Brazil. *Cad, Saude Publica* 2001; 17: 1497-1504.
116. Carlos RS, Muniz Neta ES, Spagnol FH et al. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus-Itabuna, State of Bahia, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2007; 16: 117-120.
117. Furtado AP, Do Carmo ES, Giese EG et al. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. *Parasitol Res* 2009; 105: 1509-1515.
118. Garcez LM, de Souza NF, Mota EF. Focus of canine heartworm disease in Marajo Island, North of Brazil: A risk factor for human health. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39: 333.
119. Labarthe N, de Campos Pereira M, Barbarini O. Serologic prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* infections in Brazil. *Vet Ther* 2003; 4: 67-75.

120. Wang LC. Evaluation of quantitative buffy coat analysis in the detection of canine *Dirofilaria immitis* infection: a model to determine its effectiveness in the diagnosis of human filariasis. *Parasitol Res* 1998; 84: 246-248.
121. Wu CC, Fan PC. Prevalence of canine dirofilariosis in Taiwan. *J Helminthol* 2003; 77: 83-88.
122. Bolio-Gonzalez ME, Rodriguez-Vivas RI, Sauri CH et al. Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2007; 148: 166-169
123. [Cantó GJ](#), [García MP](#), [García A](#) et al. The prevalence and abundance of helminth parasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico. [J Helminthol](#) 2010; 20: 1-7.
124. [Caro-Gonzalez JA](#), [Bolio-Gonzalez ME](#), [Escobedo-Ortegón FJ](#) et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Celestun, Mexico, using polymerase chain reaction test. [Vector Borne Zoonotic Dis](#) 2011; 11: 193-196.
125. [Pantchev N](#), [Norden N](#), [Lorentzen L](#) et al. Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. [Parasitol Res](#) 2009; 105: 63-74.
126. [Davoust B](#), [Normand T](#), [Bourry O](#) et al. Epidemiological survey on gastrointestinal and blood-borne helminths of dogs in north-east Gabon. [Onderstepoort J Vet Res](#) 2008; 75: 359-364.
127. Meyer HP, Wolvekamp P, Van Maanen C et al. Seven cases of heartworm disease (dirofilariosis) in dogs in the Netherlands. *Vet Q* 1994; 16: 169-174.
128. Knapp SE, Rognlie MC, Stackhouse L. Range of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in Montana dogs. *J Parasitol* 1993; 79: 618-620.
129. Lee JC, Lee CY, Shin SS et al. A survey of canine heartworm infections among German Shepherds in South Korea. *The Korean J Parasitol* 1996; 34: 225-231.

130. Matsuda K, Baek BK, Lim CW. Eurasian otter (*Lutra lutra*), a definitive host for *Dirofilaria immitis*. J Zoo Wildl Med 2003; 34: 200-201.
131. Vieira C, Velez ID, Montoya MN et al. *Dirofilaria immitis* in Tikuna Indians and their dogs in the Colombian Amazon. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92: 123-125.
132. Pappas LG, Lunzmann AT. Canine heartworm in the domestic and wild canids of Southeastern Nebraska. J Parasit 1985; 71: 828-830.
133. Theis JH, Stevens F, Theodoropoulos G et al. Studies on the prevalence and distribution of filariasis in dogs from Los Angeles County, California (1996-1998). Canine Pract 1999; 24: 8-16.
134. Hoover JP, Campbell GA, Fox JC et al. Comparison of eight diagnostic blood tests for heartworm infection in dogs. Canine Pract 1996; 21: 11-19.
135. Fioretti DP, Diaferia M, Grelloni V et al. Canine filariosis in Umbria: an update of the occurrence one year after the first observation of autochthonous foci. Parassitologia 2003; 45:79-83.
136. Schwan EV, Durand DT. Canine filariosis caused by *Dirofilaria immitis* in Mozambique: a small survey based on the identification of microfilariae. J S Afr Vet Assoc 2002; 73:124-126.
137. Nakagaki K, Suzuki T, Hayama SI et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in Raccoon dogs in Japan. Parasitol Int 2000; 49: 253-256.
138. Tarish JH, Al-Saqr IM, Abbassy SN et al. The prevalence of parasitic helminths in stray dogs in the Baghdad, Iraq. Ann Trop Med Parasitol 1986; 80: 329-331.
139. Euclid JM, Copeman DB. A comparison of two antigen-detection ELISA for detecting infection of *Dirofilaria immitis* in dogs. Parasite 1997; 4: 287-289.
140. Polizopoulou ZS, Koutinas AF, Saridomichakakis MN et al. Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece. Vet Rec 2000; 15: 466-468.

141. Kramer L, Genchi C. Feline heartworm infection: Serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Vet Parasitol* 2003; 104: 43-50.
142. Grieve RB, Mika-Johnson M, Jacobson RH. Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody responses to *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. *Am J Vet Res* 1981; 42: 66-69.
143. Corwin RM, Nahm J. Heartworm, www.missouri.edu/~vmicrorc/Nematoda/Spirurids/Dimmitis.htm (15.05.2014).
144. WEB_4. (1999). Heartworm. <http://www.marvistavet.net/html/heartworm.html> (10.05.2014).
145. Rizzo DM, Ware WA. Canine heartworm disease. *Iowa State Univ Vet* 1989; 51: 78-83.
146. O'Grady MR. (1999). Canine heartworm disease. <http://www.ovcnet.uoguelph.ca/ClinStudies/Courses/Public/Cardiology/Concepts/Concepts122-133.htm> (10.05.2014).
147. Katoch VC, Jithendran KP. A short note on the *Dirofilaria immitis* infection in a dog. *Indian Vet J* 1999; 76: 459-460.
148. Grauer GF, Culham CA, Dubiezic RR, et al. Experimental *Dirofilaria immitis*-associated glomerulonephritis induced in part by in situ formation of immune complexes in the glomerular capillary wall. *J Parasitol* 1989; 75: 585-593.
149. Kına O. *Dirofilaria immitis*'li Köpeklerde Paraoksonaz Aktivitesi ve Lipid Profilin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay 2009.
150. Seward RL (2001). Canine heartworm disease. <http://heartwormsociety.org/>, (15.05.2014).
151. Courtney CH, Zeng QY. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. *Vet Parasitol* 2001; 94: 199-204.

152. A practitioner's guide for the differentiation of canine microfilariae. Southwest Vet 27: 178-182 (1974).
153. Wylie JP. Detection of microfilariae by a filter technique. JAVMA 1970; 156: 1043-1405.
154. Dennis DT, Kean BH. Isolation of microfilariae: Report of a new method. J Parasitol 1971; 57: 1146-1147.
155. Acevedo RA, Ciencias L, The,s JH. Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. Am J Vet Res 1981; 42: 537-540.
156. Chularerk P, Desowitz RS. A simplified membrane filtration technique for the diagnosis of microfilaremia. J Parasitol 1970; 56: 623-624.
157. Williams JF, Williams CSF, Signs M et al. Evaluation of a polikarbonat filter for the detection of microfilaremia in dogs in central Michigan. JAVMA 1977; 170: 714-716.
158. Nolan T. (2002). Appendix lab 5, Laboratory methods for parasitological diagnosis of canine heartworm infection. <http://cal.vet.upenn.edu/paraav/labs/append5.htm> (15.05.2014).
159. Leuterer G, Gothe R. Die Herzwurmkrankheit des Hundes: Erregerbiologie und-ökologie, Pathogenese, Klinik, Diagnose, Therapie und Prophylaxe. Kleintier Prax 1993; 38: 633-646.
160. Peribañez MA, Lucientes J, Arce S et al. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. Vet Parasitol 2001; 102: 173-175.
161. Chalifou L, Hunt RD. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. JAVMA 1971; 158: 601-605.

162. Whitlock HV, Porter CJ, Kelly JD. The PKW asit fosfataz modification for the recovery and histochemical identification of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in blood. Aust Vet Pract 1978; 8: 201-207.
163. Courtney CH. Detection and differentiation of microfilariae. Calif Vet Special Edition 1989; 9-11.
164. Mehlitz D. Flarien Bei Hunden in Liberia: Vorkommen, Bestimmung, Experimentelle Infektion Des Zwischenwirtes Und Darstellung Der Larvenstadien, Dissertation, Veterinarmedizin an der Freien Universitat Berlin, 1988.
165. Tarello W. (2001). Importance in the dog of concentration tests for the diagnosis of heartworm disease in non endemic areas. <http://www.priory.com/vet/cardioworm.htm>. (15.05.2014).
166. Taşan E. Elazığ ve Yöresindeki Köpeklerde Filaria'ların Yayılışı, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ 1977.
167. Omar MS. Distribution of asit fosfataz activity in the larval stages of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B.pahangi* and *Dirofilaria immitis* in the mosquito. Tropenmed Parasit 1977; 28: 100-108.
168. Rojas L, Dumenigo BE, Fonte L et al. Identification of *Dirofilaria immitis* *Dirofilaria immitis*-infected dogs with a Coagglutination Assay. J Parasitol 1992; 78: 166-168.
169. American heartworm society recommended procedures for the diagnosis, prevention, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. Canine Pract 22: 8-15 (1997).
170. Thilsted JP, Whorton J, Hibbs CM et al. Comparison of four serotests for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. Am J Vet Res 1987; 48: 837-841.
171. Song KH, Hayasaki M, Cho KW et al. Cross-reactivity between sera from dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* and crude extract of *Toxocara canis*. Korean J Parasitol 2002; 40: 195-198.

172. Atwell RB, Sheridan AB, Baldock FC. An evaluation of the Dirochek® test for detection of *Dirofilaria immitis* antigen in dog. Aust Vet J 1988; 65: 161-162.
173. Courtney CH, Zeng QY. Sensitivity and specificity of two heartworm antigen tests. Canine Pract 1995; 20: 15-17.
174. Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). Vet Parasitol 2006; 141: 368-372.
175. Rishniw M, Barr SC, Simson KW et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet Parasitol 2006; 135: 303-314.
176. von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Schnieder T. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. Int J Parasitol 2002; 32: 1529-1535.
177. Roeber F, Jex AR, Campbell AJD et al. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. Infect Genet Evol 2011; 11: 849-854.
178. Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö. Parazitolojide teşhis amaçlı kullanılan moleküler biyolojik teknikler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011; 8: 43-51.
179. Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V et al. Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. Vet Parasitol 2010; 168: 255-260.
180. Albonico F, Loiacono M, Gioia G et al. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. Vet Parasitol 2014; 200: 128-132.
181. Kronefeld M, Kampen H, Sassnau R et al. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. Parasit Vectors 2014; 7: 30.

182. Thomas RE. A case of canine heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in the UK. Vet Rec 1985; 117: 14-15.
183. Goggin JM, Biller DS, Rost CM et al. Ultrasonographic identification of *Dirofilaria immitis* in the aorta and liver of a dog. JAVMA 1997; 210: 1635-1637.
184. Knight DH. (1999). Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immtis*) infection in dogs. <http://heartwormsociety.org/> (15.05.2014).
185. Köksal F. Parazitolojik tanıda ileri teknolojinin kullanılması. Türkiye Parazitol Derg 1994; 18: 151-163.
186. Kaya G. Antiparaziter İlaçlar ve Kullanım Stratejileri. Mustafa Kemal Üniv Yayınları, No: 17 Vet Fak Yayınları No: 2, 1. Baskı, Doğuş Ofset Basımevi, Antakya, 2005.
187. McGuire A, McGuire D. Heartworm test and heartworm treatment, <http://www.golden-retriever.com/heartwrm.html> (12.05.2014).
188. Dillon R. Pharmacology of heartworm therapeutics. Calif Vet Special Edition 1989; 23-25.
189. Burgu A, Sarımeahmetoğlu O. Köpek ve Kedilerin Parazit Hastalıklarında Tedavi, Helmint Hastalıklarında Tedavi In: Burgu A. Karaer Z (eds), Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıklarında Tedavi. Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No: 19, Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir, 2005. ss 133-156.
190. Jackson RF. Treatment of heartworm disease. Calif Vet Special Edition 1989: 26-30.
191. Paul AJ, Todd KS, Acre KE et al. Efficacy of ivermectin chewable tablets and two new ivermectin tablet formulations against *Dirofilaria immitis* larvae in dogs. Am J Vet Res 1991; 52: 1922-1923.
191. Sarıtaş ZK, Akın F, Şahal M et al. Open heart surgery applications in dogs suffering from natural infection of *Dirofilaria immitis*. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 713-721.

192. Bishop BF, Bruce CI, Evans NA. Selamectin: A novel broad-spectrum endectocide for dogs and cats. *Vet Parasitol* 2000; 91: 163-176.
193. Hertig M, Wolbach SB. Studies on rickettsia- like microorganisms in insects. *J Med Res* 1924; 44: 329-374.
194. Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K et al. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *IJSEM* 2007; 57: 654-657.
195. Werren JH.. Biology of *Wolbachia*. *Ann Rev Entomol* 1997; 42: 587-609.
196. Cordaux R, Michel-Salzat A, Bouchon D. *Wolbachia* infection in crustaceans: novel hosts and potential routes for horizontal transmission. *J Evol Biol* 2001; 14: 237-243.
197. Sinkins SP, O'Neill LS. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Handler AM, James AA (eds), *Insect transgenesis- methods and applications*. Boca Raton, CRC Press, 2000: p 271-284.
198. Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. *Wolbachia pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 71-102.
199. Bordenstein SR, Fitch DA, Werren JH. Absence of *Wolbachia* in Nonfilariid Nematodes. *J Nematol* 2003; 35: 266-270.
200. Jeyaprakash A, Hoy MA. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* 2000; 9: 393-405.
201. Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc London Ser B* 1995; 261: 55-71.
202. Bandi C, Trees AJ, Bratting NW. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Vet Parasitol* 2001; 98: 215-238.
203. Merçot H, Poinot D. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *CR Biologies* 2009; 332: 284-297.

204. Hise AG, Gillette-Ferguson I, Pearlman E. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. *Cell Microbiol* 2004; 6: 97-104.
205. Van Meer MMM, Witteveldt J, Stouthamer R. Phylogeny of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* based on the wsp gene. *Insect Mol Biol* 1999; 8: 399-408.
206. Kramer LH. Immunopathogenesis of filarial infections in dogs and cats: a role for *Wolbachia* endosymbiont? In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds), *Mappe Parassitologiche 8-Dirofilaria. Dirofilaria immitis and D. repens in Dog and Cat and Human Infections*. Naples, Italy, 2007: p 69-72.
207. Foster J, Ganatra M, Kamal I et al. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology* 2005; 3: 121-129.
208. Taylor MJ, Cross HF, Ford L et al. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunol* 2001; 23: 401-409.
209. Morchon R, Ferreira AC, Martin- Pachó J. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Vet Parasitol* 2004; 125: 313-321.
210. Pfarr KM, Hoerauf A. A niche for *Wolbachia*. *Trend Parasitol* 2006; 5-7.
211. Simon F, Kramer LH, Morchon R, Genchi C. A possible role for *Wolbachia* in the diagnosis of *Dirofilaria* infections. In: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (eds), *Mappe Parassitologiche 8-Dirofilaria. Dirofilaria immitis and D. repens in Dog and Cat and Human Infections*, Naples, Italy, 2007: p 75-80.
212. Bişkin Z. Dirofilariosis ve Endosimbiyont *Wolbachia*, 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi Bildiri Kitabı, ss 125-128, 5-10 Eylül 2011, Kars, Türkiye.
213. Kim MK, Kim CH, Yeom BW et al. The first human case of hepatic dirofilariosis. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 686-690.
214. Rodriguez B, Marengo S, Orihel TC. Human pulmonary dirofilariosis in El Salvador. *Parasite* 2002; 9: 192-196.

215. Kabukçuoğlu S, Arslantaş A, Durmaz R et al. A case of *Dirofilaria repens*. Turk J Dermatopathology 1998; 8: 1-3.
216. Koltas İS, Özcan K, Duran N. Subconjunctival infection with *Dirofilaria repens*. Ann Saudi Med 2002; 22: 75-76.
217. Hirano H, Kizaki T, Sashikata T et al. Pulmonary dirofilariosis - Clinicopathological study. Kobe J Med Sci 2002; 48: 79-86.
218. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic Acids Symposium Series 1999; 41: 95-98.
219. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al (2014). Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com> (22.04.2014).
220. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 2011 (submitted).
221. Labarthe N, Guerrero J. Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico? Vet Parasitol 2005; 133:149-156.
222. Montaña JMF, Árraga de Alvarado CM, Morillo MA, Sandoval Martínez JE. Diagnóstico de la dirofilariosis canina: un estudio comparativo usando las pruebas de ELISA y WOO. Rev. Cientif. FCV-LUZ 2002; 5: 351-357.
223. Graham JM. Canine filariasis in northeastern Kansas. J Parasitol 1974; 60: 322-326.
224. Kocan AA, Laubach HE. *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* infections in Oklahoma dogs. JAVMA 1976; 168: 419-420.
225. Todaro WS, Morris CD, Heacock NA. *Dirofilaria immitis* and its potential mosquito vectors in central New York State. Am J Vet Res 1977; 38(8): 1197-1200.
226. Mackenzie GW, Waldie JM. Heartworms in dogs in British Columbia. Can Vet J 1991; 32: 501.

227. Kozek WJ, Vazquez AE, Gonzalez C et al. Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and the Caribbean. In: Soll MD, Knight DH (eds), Proceedings of the Heartworm Symposium '95. American Heartworm Society, Batavia, IL, 1995: p 55-64.
228. Labarthe N, Almosny N, Guerrero J et al. Description of the occurrence of canine dirofilariasis in the State of Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 47-51.
229. Mancebo OA, Russo AM, Bulman GM et al. *Dirofilaria immitis*: características, prevalencia y diagnóstico de la dirofilariasis en la población canina en áreas urbanas, suburbanas y rurales de la Prov. de Formosa (Argentina) y descripción de la enfermedad en el coatí común (*Nasua solitaria*). Ciencia Pet's 1992; 8: 95-117.
230. Slocombe JO, Villeneuve A. Heartworm in dogs in Canada in 1991. Can Vet J 1993; 34: 630-633.
231. Perez-Sanchez R, Gomez-Bautista M, Encinas Grandes A. Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain). Ann Trop Med Parasitol 1989; 83: 143-150.
232. Ortega-Mora LM, Gomez-Bautista M, Rojo-Vazquez FA, et al. A survey of the prevalence of canine filariasis in Spain. Prev Vet Med 1991; 11: 63-68.
233. Saleh FC, Kirkpatrick CE, Haseth OD, et al. Occurrence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curaçao, Netherlands Antilles. Trop Geogr Med 1988; 40: 318-321.
234. Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, et al. A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. Vet Parasitol 2001; 102: 243-252.
234. Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, et al. Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. Parasitol 1996; 6: 567-571.
235. Artamonova A, Nagorny S, Strelnikova G, Levchenko L. Human and canine dirofilariosis in Rostov Region. Proceedings of the 7th USSR Congress of the

Society of Epidemiologists, Microbiologists, Parasitologists, p 326–327. 1997, USSR Congress of the Society of Epidemiologists, Microbiologists, Parasitologists, Moscow, Russia.

236. Genchi C, Kramer LH, Prieto G. Epidemiology of canine and feline dirofilariasis: a global view. In: Simón F, Genchi C (eds), Heartworm infection in humans and animals. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, 2001: p 121-134.

237. Tada Y, Ohta T, Soohara S et al. Helminth infections of dogs in Shiga, Japan with reference to occult infection of *Dirofilaria immitis*. J Vet Med Sci 1991; 53: 359-360.

238. Simsek S, Utuk AE, Koroglu E et al. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. J Helminthol 2008; 82: 181-186.

239. Kırçalı Sevimli F, Kozan E, Bülbül A et al. Köpeklerde *Dirofilaria immitis* enfeksiyonu, Beklenmeyen lokalizasyon ve bulgular, 15 Ulusal Parazitolojisi Bildiri Kitabı, s 140, 2007, Kayseri ve Ürgüp.

240. Tınar R, Coşkun ŞZ, Doğan H ve ark. Bursa yöresi köpeklerinde görülen helmint türleri ve bunların yayılışı. Türkiye Parazitolojisi Derg 1989; 13: 113-120.

241. Civelek T, Yıldırım A, İça A. Bursa ili Gemlik yöresi köpeklerde kalp kurdu hastalığının prevalansı. Vet Bil Der 2006; 22: 65-68.

242. Taşçı GT. Kars ve Iğdır Civarındaki Köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in Prevalansı ve Potansiyel Vektör Sivrisinek Türleri Üzerine Araştırmalar, Doktora Tezi, Kafkas Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars, 2011.

243. Ataş AD, Özçelik S, Saygı G. Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. Türkiye Parazitolojisi Derg 1997; 21: 305-309.

244. İcen H, Sekin S, Simsek A et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* infection in dogs from Diyarbakir in Turkey. Asian J Anim Vet Adv 2011; 6: 371-378.

245. Yildirim A, Inci A, Duzlu O et al. *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Vet Parasitol* 2011; 178: 143-147.
246. Şimşek FM. Şanlıurfa İli Sınırları İçerisinde Bulunan Sivrisinek Türleri (Diptera: Culicidae) ve Sıtma Vektörlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar, Doktora tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2004.
247. Eisen L, Bolling BG, Blair BJ, et al. Mosquito species richness, composition, and abundance along habitat- climate- elevation gradients in the northern Colorado Front Range. *J Med Entomol* 2008; 45(4): 800-811.
248. Matola YG. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in a dog from Muheza district, Tanzania. *J Helminthol* 1991; 65: 76-78.
249. Calvert A. Confirming a diagnosis of heartworm infection in dogs. *Vet Med* 1987; 82: 232-237.
250. [Nelson CT](#), [McCall JW](#), [Rubin SB](#) et al. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. [Vet Parasitol](#) 2005; 133: 255-266.
251. Nisbet AJ, Cottee P, Gasser RB. Molecular biology of reproduction and development in parasitic nematodes-progress and opportunities. *Int J Parasitol* 2004; 34: 125-138.
252. Gasser RB, Chilton NB. Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of parasitic nematodes. *Vet Parasitol* 2001; 101: 201-213.
253. Monis PT, Andrews RH, Saint CP. Molecular biology techniques in parasite ecology. *Int J Parasitol* 2002; 32: 551-562.
255. Lee SE, Kim HC, Chong ST, et al. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Veterinary Parasitology* 2007; 148: 149-155.

255. Mar PH, Yang IC, Chang GN. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). Vet Parasitol 2002; 106: 243-252.
256. Liu J, Song KH, Lee SE, et al. Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea. Vet Parasitol 2005; 130: 125-129.
257. Santa-Ana M, Khadem M, Capela R. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (Nematoda: Filarioidea) on Maderia Island, Portugal. J Met Entomol 2006; 43(1): 104-106.
258. Selby LA, Corwin RM, Hayes HM. Risk factors associated with canine heartworm infection. JAVMA 1980; 176: 33-36.
259. Thraser JP, Gould KG, Lynch MJ et al. Filarial infections of dogs in Atlanta, Georgia. JAVMA 1968; 153: 1059-1062.
260. Sears BW, McCallister GL, Heideman JC. *Dirofilaria immitis* in West Colorado. J Parasitol 1980; 66: 1070.
261. Panday RS, Joe LA, Moll KFG et al. *Dirofilaria* in dogs of Surinam. Vet Quart 1981; 3: 25-30.

**ERCİYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Ünl. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 12.12.2012

Toplantı Sayısı: 12

Karar No: 12/122

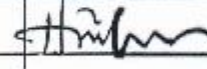
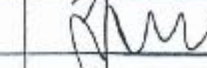
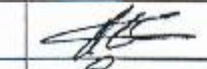
Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

12.12.2012

tarhinde

Prof. Dr. Harun ÖLGER

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

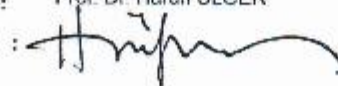
Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölüm	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsun F. Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	Vet. Fakültesi	Katılmadı
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan.	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Veteriner Fakültesinden **Prof. Dr. Abdullah İNCİ** tarafından sunulan **"Avanos Yöresi Sokak Köpeklerinde Dirofilaria immitis'in PCR ile Arştırılması "** adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

Tarih : 12.12.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÖLGER

İmzası



ASLINDA AYNI DİR

Prof. Dr. Harun ÖLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Feray YABANERİ

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 6 Şubat 1981, Gaziantep

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 506 4022937

email: yabanerim@hotmail.com

Yazışma Adresi: ERU Sağlık Bilimleri Ens. Veteriner Parazitoloji ABD/ KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Ü. Sağlık Bilimleri Fakültesi	2011
Lise	Kilis Sağlık Meslek Lisesi	1999

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2001-2011	GATA Genel Cerrahi	Hemşire
2011-	Kayseri Askeri Hastanesi	Hemşire

YABANCI DİL

İngilizce