



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA İLİ KÖPEKLERİNDE
DIROFILARIA IMMITIS'İN PREVALANSI**

Veteriner Hekim Abdüllatif EMİRİKCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ramazan ADANIR

BURDUR-2024

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA İLİ KÖPEKLERİNDE
DIROFILARIA IMMITIS'İN PREVALANSI**

**Veteriner Hekim Abdüllatif
EMİRİKCİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ramazan ADANIR

*Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0872-YL-23 proje numarası ile desteklenmiştir*

BURDUR- 2024

KABUL ve ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Abdüllatif EMİRİKCİ tarafından *Prof. Dr. Ramazan ADANIR* yönetiminde hazırlanan ““*Antalya İli Köpeklerinde Dirofilaria immitis’in Prevalansı*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi:
09/08/2024

Doç. Dr. Cenk Soner BÖLÜKBAŞ
On Dokuz Mayıs Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Başkan

Doç. Dr. Onur KÖSE
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan ADANIR
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresi boyunca tez konumun seçilmesinden çalışmalarımın yürütülmesine kadar her aşamada benden bilgi, öneri ve sonsuz desteğini esirgemeyen, sağladığı rehberlik ve akademik birikimiyle kendimi geliştirmemde destek olan danışmanım, Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ramazan ADANIR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek Lisans sürecim boyunca destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Bayram Ali YUKARI, Doç. Dr. Onur KÖSE'ye sağladıkları huzurlu çalışma ortamı ve paylaştıkları değerli bilgiler için teşekkürlerimi borç bilirim. Yüksek lisans sürecim boyunca bütün çalışmalarımda bana destek olan akademik abim Arş. Gör. Mustafa Furkan PALA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez örneklerinin toplanması ve laboratuvar çalışmalarının yürütülmesine kadar tüm aşamalarda yanımda olan Veteriner Hekim Talha TAŞ, Veteriner Hekim Selen Nur GÜRKAN ve Uzman Veteriner Hekim Batuhan NEYSE' ye teşekkür ederim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca hiçbir zaman benden şüphe etmeyen maddi manevi desteklerini sunan değerli aileme teşekkürlerimi borç bilirim.

ETİK BEYAN

“Antalya İli Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*’in Prevalansı” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ramazan Adanır danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Abdüllatif EMİRİKCİ

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Taksonomi	3
2.2. Morfoloji	4
2.2.1. Mikrofiler	4
2.2.2. Erişkin	5
2.3. Epidemiyoloji	6
2.3.1. Çevresel Faktörler	9
2.3.1.1. İklim Değişikliği	9
2.3.2. Konağa Bağlı Faktörler	10
2.3.3. Vektörler Bağlı Faktörler	11
2.4. Biyoloji	11
2.4.1. Ara Konaktaki Gelişim	12
2.4.2. Son Konaktaki Gelişim	13
2.4.3. <i>Dirofilaria</i> Türlerinin Yaşam Döngüsünde <i>Wolbachia</i> Simbiyotik Bakterilerinin Rolü	14
2.5. Patogenez	15
2.6. Klinik Belirtiler	16
2.7. Teşhis Yöntemleri	22
2.7.1. Klinik Teşhis	22
2.7.2. Tanısal Görüntüleme Yöntemleriyle Teşhis	23
2.7.2.1. Radyografi	23
2.7.2.2. Ekokardiyografi	24
2.7.3. Laboratuvar Yöntemleriyle Teşhis	24
2.7.3.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Nativ)	24

2.7.3.2. Sürme Preparat Yöntemi	24
2.7.3.3. Saponin Konsantrason Yöntemi	24
2.7.3.4. Mikrohematokrit-Kapiller Sedimentasyon Yöntemi	25
2.7.3.5. Modifiye Knott Tekniği	25
2.7.3.6. Membran Filtrasyon Tekniği	26
2.7.3.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi	26
2.7.4. Serolojik Yöntemler ile Teşhis	27
2.7.5. Moleküler Teknikler ile Teşhis	28
2.8. Tedavi Yöntemleri	28
2.8.1. Adulticidler ile Hızlı Elemine Edici Tedavi	29
2.8.2. Yavaş Eliminasyon Yöntemi	31
2.8.3. Mikrofilaricidal Tedavi	32
2.8.4. Cerrahi Tedavi	32
2.9. Koruma ve Kontrol	33
2.10. <i>Dirofilaria immitis</i> ve Halk Sağlığı	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Etik Onay ve Hasta Sahiplerinin Bilgilendirilmesi	35
3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması	35
3.2.3. DNA Ekstraksiyonu	36
3.2.4. Mikroskopik Teşhis	37
3.2.4.1. Direkt Kan Muayenesi (Nativ)	37
3.2.4.2. Modifiye Knott Tekniği	37
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	38
3.2.6. PCR Ürünlerinin Jel Elektrophorez yöntemi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmesi	38
4. BULGULAR	40
4.1. Mikroskopik Bulgular	40
4.1.1. Direkt Kan Muayenesi (Nativ)	40
4.1.2. Modifiye Knott	40
4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları	40
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ	49
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER

	Sayfa	
Şekil 2.1	<i>Dirofilaria immitis</i> 'in taksonomideki yeri	3
Şekil 2.2	<i>Dirofilaria immitis</i> mikrofiler'inin (ok başı) 20x büyütmede mikroskopik görüntüsü (Martinescu ve ark., 2022)	5
Şekil 2.3	<i>Dirofilaria immitis</i> erkek ve dişi görünümü (Onmaz ve ark., 2013)	6
Şekil 2.4	<i>Dirofilaria immitis</i> Yaşam döngüsü (Ettinger ve ark., 2016)	12
Şekil 2.5	Bir köpek kalbinde bulunan erkek ve dişi <i>D. immitis</i> lerin makroskopik görünümü (Simon ve ark., 2012)	13
Şekil 2.6	<i>Dirofilaria immitis</i> enfeksiyonlu bir köpeğin akciğer görünümü (Onmaz ve ark., 2013)	16
Şekil 2.7	Köpeklerde kalp kurdu hastalığının ilerleyişi (Simon ve ark., 2012)	18
Şekil 2.8	Köpek Kalp Kurdu Hastalığı ile İlişkili Pulmoner Arterlerdeki Patolojik Değişiklikler (Simon ve ark., 2012)	18
Şekil 2.9	Kutanöz dirofilariasisli bir köpektaki dermatolojik belirtiler (Rocconi ve ark., 2012)	20
Şekil 2.10	<i>D. immitis</i> enfeksiyonu bulunan bir köpeğin lateral torasik radyografisi (Simon ve ark., 2012)	24
Şekil 4.1.	PCR ürünlerinin ultraviyole ışık altında görünümü	40

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Dirofilaria immitis</i> olgularının dünya prevalansı	7
Tablo 2.2 <i>Dirofilaria immitis</i> olgularının Türkiye prevalansı	8
Tablo 2.3 Klinik bulguların şiddetinin sınıflandırılması (Nelson ve ark., 2012)	21
Tablo 2.4 Adulticidleri elimine edici tedavide kullanılan tedavi protokolleri (Umur ve ark., 2006)	29
Tablo 2.5 AHS Tarafından Önerilen Tedavi Protokolü (Ettinger ve ark., 2016)	30
Tablo 2.6 Mikrofilerleri elimine edici tedavide kullanılan tedavi protokolleri (Umur ve ark., 2006)	32
Tablo 3.1 Kan alınan köpeklerin ilçelere göre yaş ve cinsiyet dağılımı	36
Tablo 3.2 <i>Dirofilaria immitis</i> için Polimeraz Zincir Reaksiyonu Isı Döngüsü	38
Tablo 4.1 İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun ırklara göre dağılımı	41
Tablo 4.2 İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun ilçelere göre dağılımı	41
Tablo 4.3 İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun yaş ve cinsiyete göre dağılımı	43

SİMGELER ve KISALTMALAR

L1	Larva 1
L2	Larva 2
L3	Larva 3
L4	Larva 4
L5	Larva 5
SDMA	Simetrik Dimetilarjinin
UPC	İdrar Protein Keratinin
RPM	Revolutions Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
MiRNA	Mikro Ribonükleik asid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
COX-1	Cytochrome Oxidase
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
%	Yüzde
µl	Mikrolitre
spp.	Türleri
dk	Dakika
sn	saniye
bp	Base pair (baz çifti)
pmol	Pikomolar
°C	Santigrat derece
Mm	Mikrometre
gr	Gram
mm	Milimetre
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
KM	Mikrofiler tespiti için kan muayenesi
ST	Serolojik testler

ÖZET

Antalya İli Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in Prevalansı

Bu çalışma, Antalya ilindeki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in yayılışını tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Kepez, Konyaaltı, Muratpaşa ve Gazipaşa ilçelerinde yer alan sahipli/sahipsiz, klinik belirti gösteren/göstermeyen, farklı ırk ve yaştaki 109 erkek, 96 dişi olmak üzere toplam 205 köpekten kan örnekleri alınmıştır. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'na getirilen kan örnekleri Natif ve Modifiye Knott yöntemleri ile mikrofil varlığı araştırılmıştır. Daha sonra tüm kan örnekleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi moleküler olarak *Dirofilaria immitis* yönünden değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda Natif Yöntem ve Modifiye Knott yönteminde mikrofiler tespit edilememiştir. Spesifik COI* gen bölgesinin 203 bp büyüklüğündeki korunmuş bölgeyi çoğaltan DICOI-F1 (F; AGTGTAGAGGGTCAGCCTGAGTTA) ve DICOI-R1 (R; ACAGGCACTGACAATACCAAT) primerleri kullanılarak yapılan PCR yönteminde de herhangi bir pozitiflik saptanmamıştır. Bu tez çalışması, Antalya yöresinde *Dirofilaria immitis*'in yayılışının ortaya konulması ile ilgili ilk moleküler çalışmadır. Paraziter faunaya olan katkısıyla araştırma sonuçları, çalışma alanının genişletilerek bakısı yapılan hayvan sayısının arttırılmasıyla yeni çalışmaların planlanmasının ve sivrisineklerin vektörlük potansiyellerinin ortaya konulmasının gerektiğini göstermiştir. Sonuç olarak, *Dirofilaria immitis*'in son konaklardaki etkileri ve zoonoz özellikleri göz önüne alındığında, parazitin epidemiyoljisinin daha iyi anlaşılması ve parazite karşı koruma kontrol programlarının oluşturulabilmesi açısından bu çalışmaların belirli aralıklarla sürekli yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antalya, *Dirofilaria immitis*, Yayılış, PCR

ABSTRACT

Investigation of *Dirofilaria immitis* prevalence in dogs in Antalya province

This study was conducted to determine the prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in the Antalya province. For this purpose, blood samples were collected from a total of 205 dogs, including 109 males and 96 females, from the districts of Kepez, Konyaaltı, Muratpaşa, and Gazipaşa. The dogs were of different breeds and ages, and included both owned/stray dogs with and without clinical symptoms. The blood samples were brought to the Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, where they were examined for the presence of microfilariae using the Native Examination and Modified Knott methods. Subsequently, all blood samples were molecularly evaluated for *Dirofilaria immitis* using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. As a result of the study, no microfilariae were detected using the Native Examination and Modified Knott methods. Additionally, no positive results were obtained in the PCR method, which was performed using the DICOI-F1 (F; AGTGTAGAGGGTCAGCCTGAGTTA) and DICOI-R1 (R; ACAGGCACTGACAATACCAAT) primers that amplify the conserved region of the specific COI* gene region with a size of 203 bp. This thesis represents the first molecular study to reveal the distribution of *Dirofilaria immitis* in the Antalya region. The findings contribute to the parasitic fauna and indicate the necessity for planning new studies by expanding the study area and increasing the number of animals examined. Additionally, the vector potential of mosquitoes should be further investigated. In conclusion, considering the effects of *Dirofilaria immitis* on its definitive hosts and its zoonotic characteristics, it is recommended that these studies be conducted periodically to better understand the epidemiology of the parasite and to develop effective control and prevention programs.

Keywords: Antalya, *Dirofilaria immitis*, Prevalence, PCR

1.GİRİŞ

Dirofilaria immitis, yaygın olarak "kalp kurdu" olarak bilinen, başta köpekler olmak üzere birçok evcil ve yabani karnivor türünde ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. Taksonomik olarak, *Dirofilaria immitis*, Nematoda sınıfının, Onchocercidae ailesine ve *Dirofilaria* cinsine bağlıdır. Bu sınıflandırma, parazitin biyolojik özelliklerinin ve yaşam döngüsünün anlaşılmasında yardımcı olmaktadır. *Dirofilaria immitis*, enfekte sivrisineklerin ısırması yoluyla bulaşır ve konakçı hayvanın kalp ve akciğer arterlerinde yerleşerek yaşam döngüsünü tamamlar. *Dirofilariosis* olarak adlandırılan bu enfeksiyon, tedavi edilmediğinde konağın yaşamını tehdit eden ciddi kalp ve solunum sorunlarına yol açabilir.

Dirofilaria immitis, köpekler ve kediler dışında, kurtlar, tilkiler, çakallar gibi vahşi karnivorlarda ve nadiren de olsa foklar, deniz aslanları gibi deniz memelilerinde hatta nadir de olsa insanlarda görülebilir. İnsanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilen bu parazit, genellikle akciğerlere yerleşir ve yanlışlıkla akciğer tümörü olarak teşhis edilebilir. Bu nedenle, *Dirofilaria immitis*'in zoonotik potansiyeli, halk sağlığı açısından da önem taşımaktadır.

Dirofilaria immitis'in karmaşık biyolojisi ve yaşam döngüsünün anlaşılması, hastalığın kontrolü ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Parazitin yaşam döngüsü, sivrisineklerin mikrofilari konaktan almasıyla başlar ve sivrisineğin içinde gelişerek enfektif forma dönüşmesiyle devam eder. Enfektif larvalar, sivrisineğin başka bir konağı ısırmasıyla yeni bir hayvana bulaşır. Konak, bu larvalar erginleştikçe kalp ve akciğer arterlerine göç eder ve burada yetişkin kurtlara dönüşürler.

Kalp kurdu hastalığı, küresel ölçekte önemli bir sağlık sorunudur ve özellikle sıcak ve nemli iklimlerde daha yaygındır. Bu nedenle, hastalığın yayılmasını önlemek için etkili koruma ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesi büyük önem taşır. Ayrıca, küresel ısınma ve iklim değişikliği, hastalığın yayılma alanlarını genişleterek yeni coğrafi bölgelere yayılmasına neden olabileceği için, *Dirofilaria immitis*'in epidemiyolojisi ve yayılma dinamikleri üzerine yapılan araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

Bu tezde, Antalya Bölgesindeki *Dirofilaria immitis* enfeksiyonunun prevalansı araştırılmış ve bu prevalansın potansiyel risk faktörleri ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca *Dirofilaria immitis*'in biyolojisi, yaşam döngüsü, patogenezi, epidemiyolojisi ve mevcut tedavi yöntemleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Böylece, Antalya bölgesindeki kalp kurdu enfeksiyonlarının yaygınlığını ve risk faktörlerini belirleyerek, hastalığın koruma ve kontrolüne yönelik stratejilere katkı sağlaması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Taksonomi

Dirofilaria immitis, birçok karnivor türünde özellikle de köpeklerde nadir olarak insanlarda görülen, enfekte ettiği canlıların arteria pulmonarisine ve sağ ventrikülüne yerleşen, *Dirafilariosis* olgusuna neden olan bir parazit türüdür (Soulsby, 1982; Kassai, 1999). Dirafilariosis, *Dirofilaria* soyunda bulunan nematodların meydana getirdiği hastalıktır. Bu soya bağlı türler morfoloji ve yaşam döngüsü olarak birbirlerine benzerlik göstermektedir. Birçok parazitin sınıflandırması bu özelliklere göre yapılmaktadır. *Dirofilaria* cinsine bağlı türlerin sınıflandırması aşağıda verilmiştir (Anderson 2000, Watts ve ark 1999).

Sınıf: Nematoda
Sınıf altı: Secernentea
Familya üstü: Filarioidea
Familya: Onchocercidae
Familya altı : Dirofilarinae
Cins : Dirofilaria
Tür:
<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>D.repens</i>
<i>D.ursi</i>
<i>D.tenius</i>
<i>D.striata</i>
<i>D.conjunctivae</i>
<i>D.subdermata</i>
<i>D.corynodes</i>
<i>D.spectans</i>
<i>D.roemeri</i>
<i>D.acutiuscula</i>

Şekil 2.1. *Dirofilaria immitis*'in taksonomideki yeri (Anderson 2000).

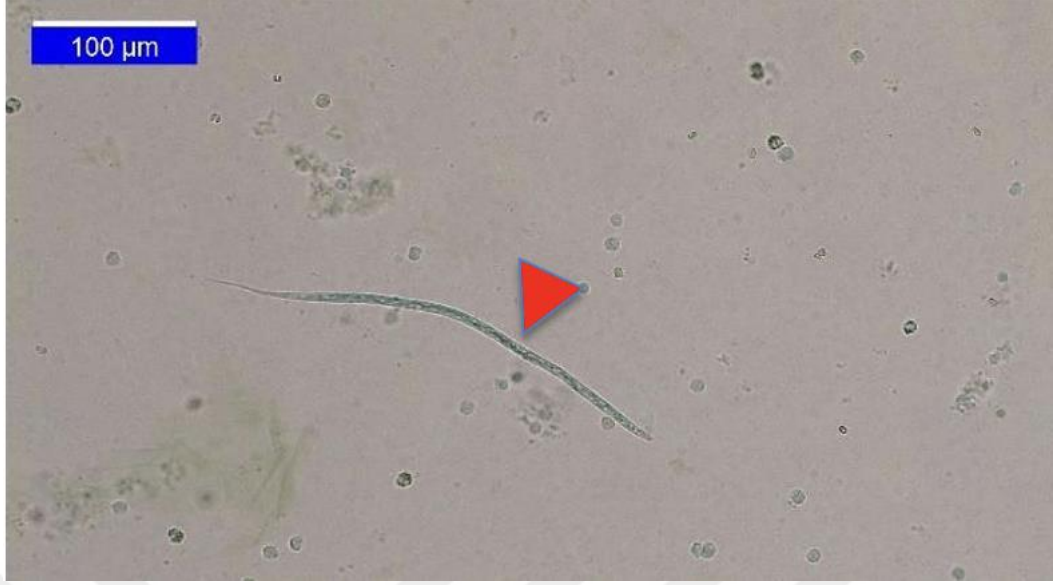
Dirofilaria immitis, veteriner sahada büyük öneme sahip olan bir parazittir. Dünya genelinde birçok konak türünde görüldüğü bilinen bu parazit, ilk kez 1850'de Philadelphia'da, doktor J. Leidy tarafından *Filaria canis cordis* adıyla tanımlanmıştır. Daha sonra 1856'da Leidy tarafından *Filaria immitis* olarak yeniden adlandırılmıştır ve *Dirofilaria* cinsi, Railliet ve Henry tarafından 1911'de *Filaria immitis*'in tip türü olarak kabul edilerek oluşturulmuştur. Yukarıda belirtilenlerin yanı sıra, eşanlamlılar arasında *Filaria spirocauda*, *F. haematica*, *F. sanguinis*, *F. hebetata*, *Dirofilaria nasuae*, *D. pongoi*, *D. fausti*, *D. louisianensis*, *D. indica* ve *D. magalhaesi* de bulunmaktadır. *Dirofilaria* cinsinin taksonomisi Anderson tarafından incelenmiştir (Anderson, 2000) Süperfamilya Filarioidea'nın diğer üyeleri gibi, *Dirofilaria* cinsi, bağırsak dışında yaşayan uzun, ince nematodlardan oluşur ve vivipar olarak hareketli ilk aşama larvalar olan mikrofilerleri doğururlar. Tüm filaryalarda olduğu gibi, bu cinse ait üyelerin yaşam döngülerini tamamlamak için bir eklem bacaklı ara konağa ihtiyaçları vardır, genellikle bir sivrisinek veya kara sinek olur. Genel olarak, birinci dereceden veteriner öneme sahip olarak kabul edilen türler iki alt cinse aittir. *Dirofilaria* alt cinsi, genellikle düz kesimli olan ve yetişkin olarak genellikle kardiyovasküler sistemde bulunan *D. immitis* gibi nematodları içerir. Diğer yandan, *D. ursi*, *D. repens*, *D. striata* ve *D. tenuis* gibi Nochtiella alt cinsinin üyeleri, kesimlerinde belirgin uzunlamasına sırt çıkıntıları ve ince çizgiler bulunan alt cilt dokularında yaşarlar (Manfredi ve ark., 2007; Jackson, 1969).

2.2. Morfoloji

Dirofilaria immitis'in mikrofiler ve erişkin olmak üzere iki farklı morfolojik formu bulunmaktadır (Toparlak ve Tüzer, 2012).

2.2.1. Mikrofiler

Dirofilaria immitis'in 5 larval evresi vardır larva 1, larva 2, larva3, larva 4 larva5 (L1, L2, L3, L4 ve L5). Parazitin üreme organları 4. evrede gelişmeye başlar ve 5. evrede gelişimlerini tamamlarlar. Gelişimini tamamlamış L5 evresindeki larvalar genç erişkin olarak adlandırılırken L1 L2 L3 L4 evreleri mikrofiler olarak adlandırılır (Lok, 1988).



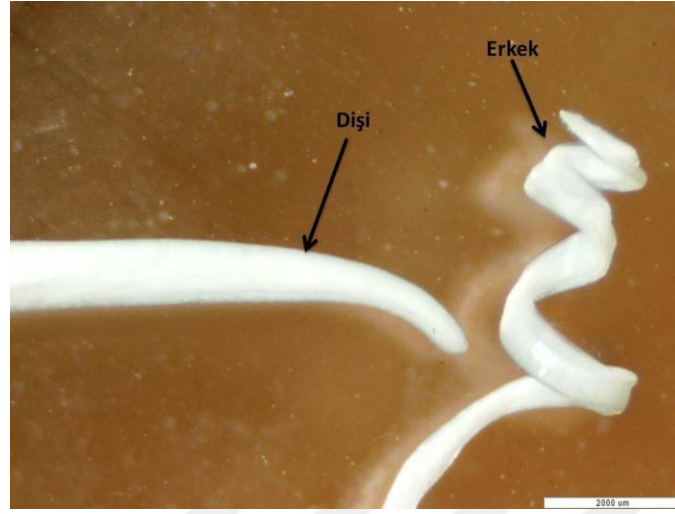
Şekil 2.2. *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinin (ok başı) 20x büyütmede mikroskopik görüntüsü (Martinescu ve ark., 2022).

D. immitis mikrofilerleri ortalama olarak 270-325 µm uzunluğunda ve 7 µm genişliğindedir. Mikrofilerler genellikle periferik dolaşımında, kanın 103 ila 105 /ml arasında değişen konsantrasyonlarında bulunurlar. Taze kanın antikoagülanlı doğrudan yaymalarında, *D. immitis* mikrofilerleri ilerleme göstermeyen bir harekete sahiptir. Bu özellik, köpeklerde görülebilecek diğer mikrofilaria türlerinden *D. immitis*'i ayırt etmeye yardımcı olması için önerilmiştir. Rutin Knott preparatlarında görülen *D. immitis* mikrofilerleri, kılıfsız, düz bir vücut ile kuyruğa sahip olup ön kısmı gittikçe incelerek sonlanmaktadır. *D. immitis*'in baş ve kuyruk boşlukları sırasıyla 11,5 µm ve 28 µm ölçülmektedir (Manfredi ve ark., 2007; Toparlak ve Tüzer, 2012).

2.2.2. Erişkin

Dirofilaria immitis, erişkinleri *Dirofilaria* türleri arasında en uzunudur. Dişi *D. immitis* solucanları yaklaşık 250 ila 310 mm uzunluğunda, 1 ila 1,3 mm genişliğindedir. Ucu geniş olan kuyruk uçları, vulva açıklığını yaklaşık olarak 2,7 mm önde bulundurur. Erkek *D. immitis* erişkinleri ise 120 ila 200 mm uzunluğunda ve 0,7 ila 0,9 mm genişliğindedir. Spiral şekilde kıvrılmış kuyruk uçları, beş çift preanal ve altı çift postanal papillaya sahiptir. Sol spikül 300 ila 375 µm uzunluğunda iken, sağ spikül 175 ila 299 µm uzunluğundadır. Her iki cinste de stoma, dışarıdan altı belirsiz

papilla tarafından çevrenlenmiştir (Martinescu ve ark., 2022; Toparlak ve Tüzer, 2012)



Şekil 2.3. *Dirofilaria immitis* erkek ve dişi görünümü (Onmaz ve ark., 2013).

2.3. Epidemiyoloji

Dirofilariosis epidemiyolojik olarak incelendiğinde dünya çapında hızla yayıldığı gözlenmektedir. Köpeklerde enfeksiyonu önlemek ve kontrol altına almak için gösterilen çabalara rağmen, endemik bölgelerde hastalık prevalansı artmakta ve yeni bölgeler belirlenmektedir. Küresel ısınma, vektörlerin mevsimsel popülasyon dinamiklerindeki değişiklikler, ülkeler arasındaki hayvan dolaşımı, parazite bağlı, konağın yaşı ve bağışıklık tepkisi gibi faktörler, hastalığın mevcut coğrafi yayılımında rol oynayabilmektedir (Simon ve ark., 2009).

Dirofilariasis prevalansının belirlenmesi üzerine dünyada ve ülkemizde çalışmalar yapılmıştır (Tablo 2.1.) (Tablo 2.2.).

Tablo 2.1. *Dirofilaria immitis* olgularının dünya prevalansı

Ülke	Yıl	Numune sayısı (N)	Metot	Prevalans (N,%n)	Kaynakça
Amerika Birleşik Devletleri	2009	3.182.301	ST	43.500, (%1.4)	Bowman ve ark., 2009
Cezayir	2009	184	KM	45, (%24.46)	Meriem ve Mohamed, 2009
Kanada	2011	86.251	ST	187 (%0.22)	Villeneuve, 2011
Çin	2011	868	PCR	213 (%24.0)	Hou ve ark., 2011
			KM	147 (%16.6)	
Irak	2022	90	KM	49 (%54.4)	Al-Farwachi ve Melachi, 2022
			ST	25 (%27.8)	
İspanya	2011	547	ST	106 (%19.2)	Montoya-Alonso ve ark., 2011
Meksika	2007	676	KM	56 (%8.2)	Bolio-Gonzalez ve ark., 2007
Yunanistan	2010	341	ST	61 (%17.9)	Lefkaditis ve ark., 2010
Romanya	2016	458	ST	41 (%8.9)	CiucĂf ve ark., 2016
			PCR	109 (%13.93)	
Hindistan	2015	782	KM	89 (%11.38)	Borthakur ve ark., 2015
			ST	141 (%18.03)	
Avusturya	2021	115	PCR	1 (%0.8)	Sonnberger ve ark., 2021
		111	ST	6 (%5)	
		115	KM	0 (%0)	

KM, mikrofiler tespiti için kan muayenesi; PCR, Polimeraz zincir reaksiyonu ve ST serolojik testler.

Tablo 2.2. *Dirofilaria immitis* olgularının Türkiye prevalansı

Bölge/ Şehir	Yıl	Numune sayısı (N)	Metot	Prevalans (N,%n)	Kaynakça
Burdur	2013	142	ST	31 (%22)	Adanır ve ark., 2013
Antalya	2018	225	ST	0 (%0)	Küçüker ve Şahinduran, 2018
Sivas	2022	100	ST	2 (%2)	Ağaoğlu ve ark., 2022
Afyon	2023	400	ST	3 (%0.75)	Başer ve ark.,2023
Ardahan	2022	100	ST	100 (%12)	Ayvazoğlu ve ark., 2022
Kayseri	2007	280	ST	27 (%9.6)	Yıldırım ve ark., 2007
Trakya Bölgesi	2016	402	KM	3 (%0.8)	Çetinkaya ve ark., 2016
			PCR	11 (%2.6)	
			ST	27 (%6.7)	
Iğdır	2013	100	ST	40 (%40)	Sarı ve ark., 2013
İzmir	2005	117	ST	0 (%0)	Öncel ve Vural, 2005
İstanbul	2005	263	ST	4 (%1.52)	Öncel ve Vural, 2005
Bursa	2006	100	KM	0 (%0)	Civelek ve ark., 2006
			ST	2 (%2)	
Şanlıurfa	2004	92	KM	7 (%7.6)	Şahin ve ark., 2004
Samsun	2007	100	ST	0 (%0)	Çakıroğlu ve Meral, 2007
Osmaniye	2019	100	ST	1 (%1)	Gökmen ve ark., 2019
Erzurum	2020	250	ST	11 (%4.4)	Demir ve Aktaş, 2020
			KM	52 (%21.7)	Taşçı ve Kılıç, 2012
Kars/Iğdır	2012	240	PCR	60 (%25)	
			ST	72 (%30)	Yıldız ve ark., 2008
Kırıkkale	2008	172	KM	10 (%5.8)	

KM, mikrofiler tespiti için kan muayenesi; N, PCR, Polimeraz zincir reaksiyonu ve ST serolojik testler.

2.3.1. Çevresel Faktörler

Çevresel faktörler, vektör ve yaşam döngüsü üzerine etkisinden dolayı filarial nematodların dağılımını etkileyebilmektedir. Çevresel faktörler arasından öncelikle, sıcaklık, nem ve yükseklik etkili olmaktadır (Attenborough ve ark., 1997; Brooker ve Michael, 2000). Sıcaklık, yağış ve bağıl nem, vektör yoğunluğu ve *Dirofilaria* enfeksiyonu gibi vektör kaynaklı hastalıkların yaygınlığını belirleyen üç ana faktördür (Genchi ve ark., 2009).

Vektör sivrisinekler, belirli bir sıcaklık ve nem aralığında hayatta kalabilirler. Ancak, mikrofilerlerin vektörde gelişebilmesi için ideal sıcaklığın 24-32°C derece arasında olması gerekmektedir. Sıcaklık 21°C derecenin altına düştüğünde mikrofilerin gelişme süresinin uzadığı, 16°C nin altına düştüğünde ise vektörlerde gelişme olmadığı gözlemlenmiştir (Anderson, 2000). Mikrofiler sayısı, çevresel sıcaklığa bağlı olarak yaz aylarında artmaktadır. Kış mevsimi vektörlerin aktif olmaması sebebiyle mikrofilerle bulaşma riski düşüktür. Bu nedenle, parazite en sık rastlanma oranı genellikle yaz aylarında, sivrisinek popülasyonunun arttığı dönemlerde gözlenmektedir (Budak, 1994).

Hayvan, insan, sivrisinek ve nematod biyolojisinin etkileşimi, *Dirofilaria*'nın klinik ve coğrafi dağılımına etki etmektedir. Her bir parametre bir diğerine etki etmekte ve hepsinin arka planında ekoloji ve iklim değişikliği bulunmaktadır (Genchi ve ark., 2009).

2.3.1.1. İklim değişikliği

Küresel ısınma ve bunun hastalıklar üzerindeki potansiyel etkisi, devam eden bilimsel araştırmalar, hayvan ve insan enfeksiyonları ile küresel ısınma arasındaki bağlantı dikkat çekmektedir. İklim değişikliği, bu küresel çevreyi değiştirerek, özellikle vektörler tarafından iletilen belirli hastalıkların artmasında önemli bir potansiyele sahiptir (Khasnis ve Nettleman, 2005; Rinaldi ve ark., 2006). Küresel iklim değişikliği hastalık-vektör davranışını etkilemektedir ve bu da hematofaj artropodların ısırığıyla iletilen vektör kaynaklı hastalıkların mevcut durumunu

değiştirebilmektedir (Rogers ve Randolph, 2006). Arthropod vektörleri soğukkanlı hayvanlardır, yani iç sıcaklıkları çevre sıcaklığından büyük ölçüde etkilenir. Bu nedenle, pek çok karasal eklem bacaklı türü için, öngörülen iklim değişikliğine yanıt olarak kuzeye doğru bir yayılma beklenmektedir (Root ve ark., 2003). Ayrıca, vektör kaynaklı patojenler özellikle iklime karşı hassastır; bu durum, antropojenik iklim değişikliğinin bulaşma sıklığını ve yoğunluğunu artıracığı yönünde düşüncelere yol açmaktadır (Purse ve ark., 2005). Son yıllarda, Avrupa'da yeni eklem bacaklı vektörlerin istilas, bu vektörlerin vektörel kapasitelerinin gelişmesi ve yeni eklem bacaklı vektör türlerinin ortaya çıkması, birçok vektör kaynaklı hastalığın (yeniden) ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olmuştur. Bu durumun ardındaki başlıca nedenler arasında küresel ve bölgesel değişiklikler bulunmaktadır. Bu değişiklikler arasında iklim değişikliği, uluslararası ticaret ve kentsel gelişim ve arazi kullanımındaki değişiklikler, biyolojik çeşitliliğin azalması ve çevresel faktörler yer almaktadır. Bu faktörler, vektörlerin yayılmasını ve yeni alanlara uyum sağlamasını kolaylaştırmakta ve bu da hastalıkların coğrafi dağılımını ve sıklığını artırmaktadır. (Hendrickx ve diğerleri, 2004; Rogers ve Randolph, 2006).

2.3.2. Konağa Bağlı Faktörler

Dirofilariosis köpeklerde görülme sıklığını araştıran çalışmalarda, erkek köpeklerin dişi köpeklere kıyasla *D. immitis* ile enfekte olma oranının daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Selbey ve ark., 1980). Ancak Adanır ve ark. (2013) yılında farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki köpeklerde *Dirofilaria immitis* prevalansını araştırdıkları bir çalışmada erkek köpeklerde enfeksiyon oranının dişi köpeklerden daha yüksek olmasına karşın, erkek ve dişi köpekler arasında seroprevalans açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediğini bildirmişleridir.

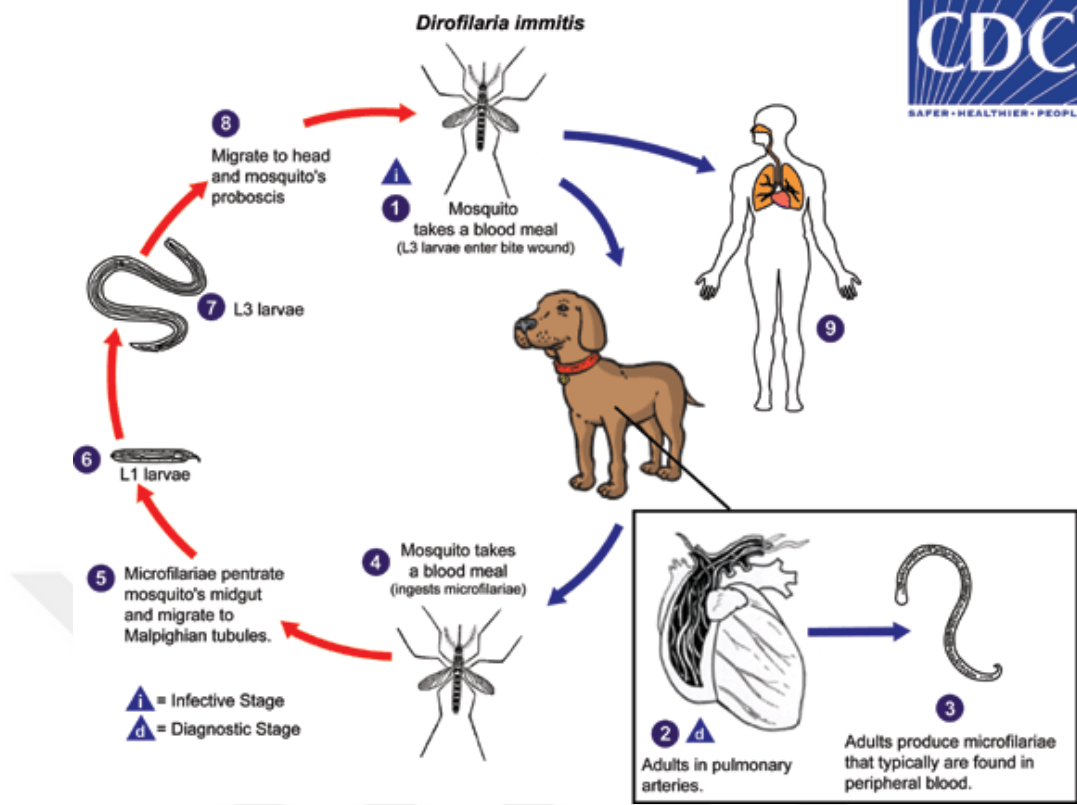
Montoya ve ark. (1998), köpeklerin yaşının kalp kurdu enfeksiyonu açısından önemli bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca endemik bölgelerde köpeklerin uzun süreli olarak patojene maruz kalması nedeniyle, yaşlı köpeklerde enfeksiyon gelişiminin genç köpeklere oranla daha yaygın olduğu gözlemlenmiştir (Öge ve ark., 2003).

2.3.3. Vektöre Bağlı Faktörler

Dirofilariosis vektörleri, yaklaşık 70 türle parazite duyarlı olan Culicidae familyasına ait sivrisineklerdir ve bu nedenle potansiyel vektörler olarak kabul edilirler (Genchi ve ark., 2009). Dirofilariosis vektörleri, kalp kurdu ekolojisi ve epidemiyolojisindeki rolü, duyarlı konak ve mikrofilaremik rezervuarların karşılaşma oranları, sivrisineklerin sirkadiyen ve mevsimsel aktivite döngüleri, sivrisinek vektör popülasyonunda kalp kurdu gelişiminin sıklığı, omurgalı konaklarda dolaşan mikrofilariyaların sıklığı, vektörlerin kan öğünlerinin kaynağı ve konak ve sivrisinek habitatlarının etkileşimi gibi faktörlere bağlı olarak şekillendiği bildirilmiştir (Ledesma ve Harrington, 2011).

2.4. Biyoloji

Dirofilaria türlerinin yaşam döngüsü, kesin bir omurgalı konak ve bir vektörden oluşur. *Dirofilaria immitis*, heteroksen gelişim gösteren bir nematoddur ve ara konak olarak Diptera takımında, Nematocera alttakımında, Culicidae ailesinde, Toxorhynchitinae, Culicinae ve Anophelinae alt ailelerinde yer alan *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Myzorrhynchus*, *Taeniorhynchus*, *Ayzorrhynchus*, *Mansonia* ve *Armigeres* cinsi sivrisineklerde bulunur. Son konak olarak ise başta köpekler olmak üzere kedi, kurt, aslan, kaplan, geyik, tavşan, rakun, tilki, ayı, su samuru, dingo, fok balıkları, denizaslani, at, şempanze, orangutan gibi hayvanlar ve insanlarda gelişim göstermektedir (Bowman ve Atkins, 2009; Soulsby, 1982) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *Dirofilaria immitis* yaşam döngüsü (Ettinger ve ark., 2016).

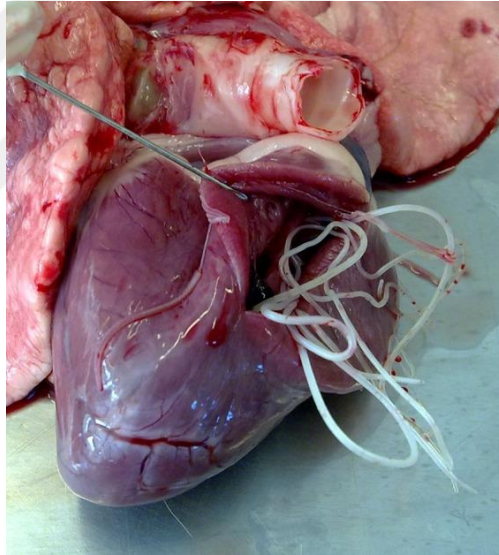
2.4.1. Ara konaktaki değişim

D. immitis'in mikrofilerleri enfekte bir vektör tarafından alınır. Yaklaşık 24 saat içinde alınan mikrofilerler sindirim sistemi boyunca malpighi tüplerine ulaşır, burada yaklaşık olarak 8 ila 10 gün sonra L2 larva formuna dönüşür ve ardından yaklaşık 3 gün içinde L2'den L3'e geçer. Çevresel sıcaklık, sivrisineklerde L3 gelişim süresini belirleyen temel faktördür. Enfektif L3 larvaları, vektörün tükürük bezlerine göç eder ve bir sonraki kan öğününe kadar burada kalır. L3 larvaları yaklaşık olarak 1 mm uzunluğundadır ve kesin konak alt deri dokularına enjekte edildiklerinde 1.5 mm'ye kadar büyürler (Manfredi ve ark., 2007). Malpighi tüplerine invazyon ve parazitin tükürük bezlerine göçü, vektörlerin hayatta kalması için hayati öneme sahiptir. Vektörler, antijenik tanıma ve humoral ile hücrel savunma mekanizmaları aracılığıyla L3'e ilerleyebilecek larva sayısını sınırlar (Castillo ve ark., 2011). Ara konaktaki gelişme 26 C'de yaklaşık 14-17 gün sürer. Bu süre, 30°C'de 8 gün ile 1-8°C arasında 28 gün arasında değişir. Gelişim, çevre sıcaklığının 14°C'nin altına düştüğünde

durur. Sivrisinekler bir konaktan kan emmek üzere geldiğinde, bu larvalar (L3), konak organizmasına girer (Toparlak ve Tüzer, 2012).

2.4.2. Son Konaktaki Gelişim

L3 konağa aktarıldıktan 3 ila 12 gün içinde L3'ten L4'e dönüşüm gerçekleşir ve 50-70 gün sonra genç erişkin parazitler meydana gelir. İlk genç erişkin parazitler, kalbin pulmoner arterine ve sağ ventrikülüne 70 ile 85 gün arasında ulaşır ve cinsel olgunluğa 120 gün sonra erişirler. Yetişkin *D. immitis*'lerin dişilerinin uzunluğunun 250 ila 300 mm, çapının ise 1 ila 1,3 mm olduğu, erkeklerin ise uzunluğunun 120 ila 200 mm, çapının ise 0,7 ila 0,9 mm olduğu bilinmektedir ve parazitler ipliksi bir görünüme sahiptir (Şekil 2.5) (Manfredi ve ark., 2007).



Şekil 2.5. Bir köpek kalbinde bulunan erkek ve dişi *D. immitis*'lerin makroskobik görünümü (Simon ve ark., 2012).

Dişiler, enfeksiyondan sonraki 6 ila 9 ay içinde ilk larval evreyi (mikrofilerleri) üretmeye başlar (McCallve ark., 2008). Yetişkinler 7 yıldan fazla yaşayabilirken, mikrofilerler 2 yıla kadar yaşayabilirler (Venco ve ark., 2011). Bazı enfekte köpeklerde mikrofiler bulunmaz, bu da gizli enfeksiyonlara yol açabilir; bu durum, dişi parazitlerin yaşlanması, tek cinsiyetli parazit enfeksiyonları, kan nakli ve/veya konak bağışıklık tepkileri gibi faktörlere bağlı olabilir (Simon ve Genchi 2000). Kedilerde, yetişkin *D. immitis*'lerin erginleşmesi 8 ayı bulabilir; bu solucanlar

köpeklerde bulunanlardan daha kısadır ve daha kısa bir yaşam süresine sahiptir (maksimum 2 yıl) ve genellikle mikrofiler üretmezler. Bu konakta mikrofilaremi oluştuğunda ise geçici ve düşük yoğunlukta olabilir (Manfredi ve ark., 2007; McCallve ark., 2008).

2.4.3. *Dirofilaria* Türlerinin Yaşam Döngüsünde *Wolbachia* Simbiyotik Bakterilerinin Rolü

Filarial nematodlarda ilk intrasellüler bakteri benzeri yapılar *D. immitis*'te bulunmuştur (Harada ve ark., 1970). Elektron mikroskopisi ve moleküler teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar, bu bakterilerin Rickettsiales takımına (alfa-2-proteobakteri) ve *Wolbachia* cinsine ait olduğunu ortaya koymuştur (Sironi ve ark., 1995). *Wolbachia* bakterileri intrasellülerdir, izolasyon halinde veya küme halinde gözlenirler ve diğer organizmalarla simbiyotik bir ilişki geliştirdikleri görünmektedir. Bu organizmalar içerisinde *D. immitis* ve *D. repens* de vardır (Simon ve ark., 2012).

Enfekte konaklarda antibiyotik tedavisi ve *Wolbachia* genom dizilemesi çalışmaları, bakteri ve filarial nematodlar arasındaki etkileşimlerin doğası ve ilgili moleküller hakkında bilgi sağlamıştır (Foster ve ark., 2005; Wu ve ark., 2004). Bu çalışmalar, *Wolbachia* bakterilerinin filariaların deri değişimi ve embriyogenezisinde rol aldığını, filariaların ise bakteri büyümesi için amino asitler sağladığını öne sürmüştür (Foster ve ark., 2005; Bandi ve ark., 2001). *Wolbachia*, maternal olarak iletilir, tüm filarial gelişim evrelerinde tüm bireylerde bulunur ve özellikle omurgalı konaklarda gelişen larvalarda (L3 ve L4), her iki cinsin hipodermal kordlarında ve dişi genital organlarında yoğundur.

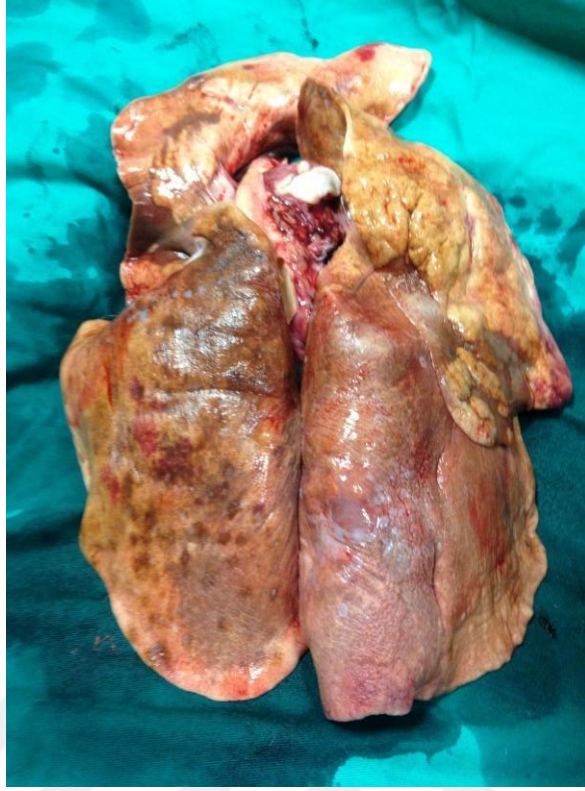
Bu bulgular, simbiyotik bakterilerin omurgalı konaklarda larval gelişimi için ve yetişkin solucanların uzun süreli hayatta kalması için hayati öneme sahip olduğunu düşündürmektedir (McGarry ve ark., 2004). *Wolbachia*'nın son zamanlarda Onchocercidae familyasından yeni filaria türlerinde somatik gonadlarda (epitelyal tabaka) ve barsak duvarında bulunduğu göz önüne alındığında, bakteri-filaria ilişkisinin önceden tahmin edilenden çok daha karmaşık ve çeşitli olduğu düşünülmektedir (Ferri ve ark., 2011).

2.5. Patogenez

Dirofilaria immitis kalpte ve pulmoner arterlerde lokalize olur ve kan yoluyla beslenir. Bu durum, pulmoner dolaşımı etkileyerek kalp, karaciğer ve böbreklerde çeşitli patolojik bozukluklara neden olabilir (Simon ve ark., 2012).

Hastalığın şiddeti ve evresine bağlı olarak postmortem incelemede akciğerlerin görünümü değişken olabilmektedir. Genel olarak, klinik belirtiler ortaya çıkmadan önce doğal enfeksiyon ileri seviyededir. Hem doğal hem de deneysel enfeksiyon olup olmadığına bakılmaksızın patolojik gözlemlerde benzerlikler bulunmasına rağmen, hastalığın şiddeti ve gelişme hızı enfeksiyonun büyüklüğü ile ilişkilidir. Örneğin, enfektif larvaların subkutan enjeksiyonuyla yapay olarak enfekte edilen köpekler, 5 ila 6 ay içinde orta ila şiddetli arter hastalığı geliştirebilirken çoğu doğal enfeksiyonlar birkaç yıl içinde ilerleyici bir şekilde gelişir. Ortalama bir köpekte (25 kg), genellikle akciğer arterlerinde bulunan olgun parazit sayısı 25'i aştığında kalbin sağ karıncığında bulunabilir. 50 veya daha fazla sayıdaki parazit, sağ atriyum ve vena cava'da bulunmalarına neden olabilir. Dolayısıyla, temel patoloji pulmoner damar sistemindedir ancak akciğerlerin interstisyel dokusundaki diğer değişiklikler, sağ taraflı konjestif kalp yetmezliğinin varlığı ve karaciğer yetmezliği veya kaval sendromunun gelişimi, enfeksiyonun büyüklüğüne bağlı olarak bir dereceye kadar belirlenir. Bu da klinik ve post-mortem bulgulara yansır. Bu nedenle, bireysel bir vakada patolojik görünüm önemli ölçüde değişebilir (Kittleson ve Kienle, 1998).

Dirofilariosis'te akciğerlerin lekeli bir görünüme sahip olması birçok faktöre bağlı olabilir. Parazite karşı oluşan inflamatuvar hücrelerin aşırı artışı ve yüksek antikor seviyeleri, akciğerlerdeki mikrofililerin yok edilmesi sonucu non-enfeksiyöz bir akciğer hastalığı olan pulmoner eozinofilik granülomatosis (pulmoner eozinofilik granülom) tablosuna yol açabilir. Parazitlerin doğal olarak ölmesi veya tedavi sonrası ölümü, akciğer dokusunda arterlerin çevresinde granülomların oluşmasına neden olarak pulmoner tromboembolizme sebep olabilmektedir (Şekil 2.6.) (Cheepsattayakorn ve Cheepsattayakorn, 2014).



Şekil 2.6. *Dirofilaria immitis* enfeksiyonlu bir köpeğin akciğer görünümü (Onmaz ve ark., 2013).

Hidrotoraks, akciğer loblarının ventral yüzlerinde atelektazi oluşumuyla birlikte olabilir. Bu, dirofilariosis'te nadir görülen bir durumdur ve bazen sağ taraflı konjestif kalp yetmezliğinden kaynaklanan asites ile birlikte görülür. Ayrıca, fazla perikardiyal sıvı da bazen bulunabilmektedir. Hidrotoraks, aynı zamanda pulmoner pleura yüzeyindeki lenfatiklerin genişlemesi ile birlikte görülebilir. Hidrotoraks'ın patogenezinin net olmadığı bilinir çünkü bu genellikle yaygın bir ödem olarak meydana gelmez ancak dolaşım yetmezliğinin bir parçası olarak görülmesi mümkündür, ancak düzensiz varlığı sebebiyle karmaşık olduğunu düşünülmektedir (Sutton, 1988).

2.6. Klinik Belirtiler

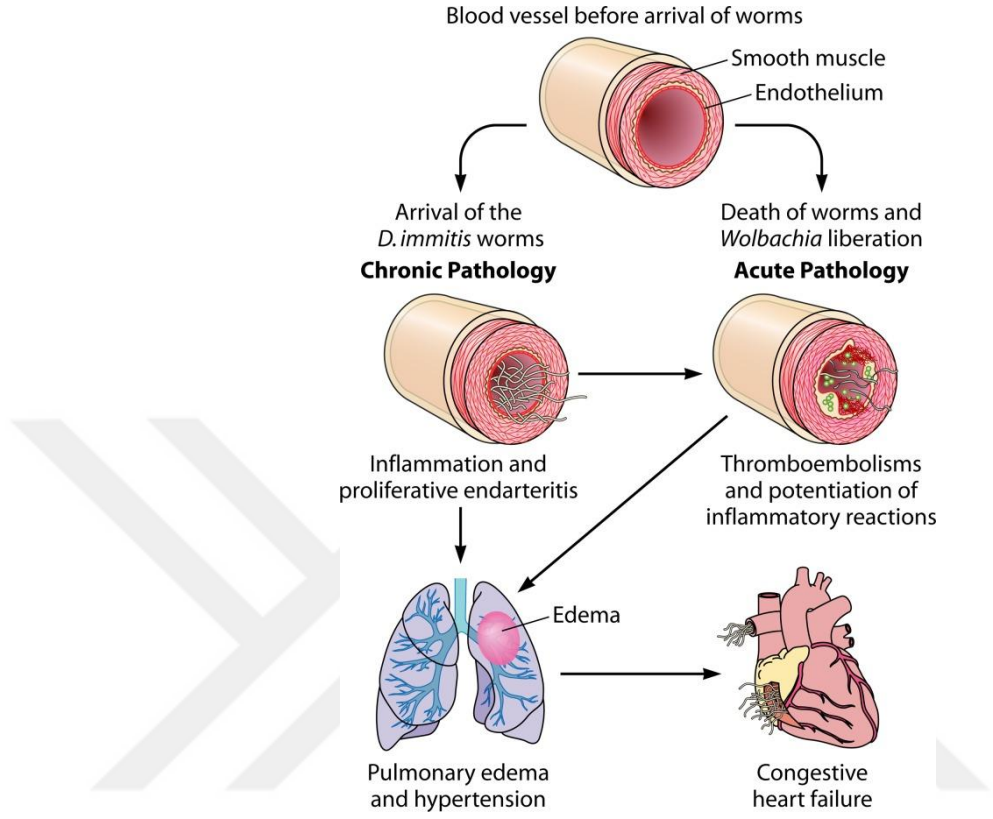
Köpeklerde kardiyopulmoner dirofilariosis (kalp kurdu hastalığı), öncelikle yetişkin *D. Immitis* 'lerin ve bunların *Wolbachia* simbiyotik bakterileri dahil antijenik ürünlerinin neden olduğu ciddi ve potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktır

(Simón ve ark., 2009).

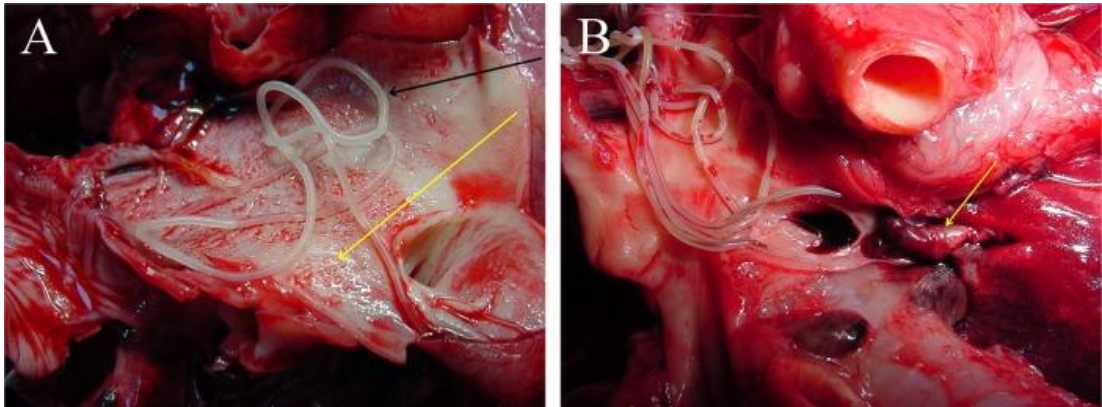
Dolaşım bozukluğuyla başlayan enfeksiyon ilerleyen dönemlerde vasküler ve pulmoner sistemi hatta ciddi vakalarda sağ kalp odacıklarını etkileyen bir hastalıktır. İlk belirtiler hafif kalıcı öksürük ve egzersiz yapma isteksizliğini içerir. Köpeklerde iştah azalması görülebilir ve egzersiz intoleransı ortaya çıkabilir. Sonunda, pulmoner endotele verilen hasar ve erişkinlerin ölümü nedeniyle damar tıkanması, kalp debisini azaltacaktır. Ortaya çıkan pulmoner hipertansiyon, sağ kalp büyümesine ve sağ kalp yetmezliğine ilerlemesine yol açabilir (Noack ve ark., 2021)

Kalp kurdu hastalığı genellikle kronik bir ilerleme gösterir; ilk olarak vasküler ve pulmoner etkiler gösterir ve sonunda kalbin sağ odacıklarını etkiler (Venco, 2007). İlk lezyonlar pulmoner arterlerin duvarlarında meydana gelir ve daha sonra pulmoner ve kardiyak patoloji gelişir. Parazitlerin pulmoner arterlere ulaşmasından sonra, vasküler tunika intima'daki endotel hücrelerinde genişleme meydana gelir ve bu da damarların daralmasına (endarterit) neden olur. Ek olarak hücreler arası boşluklar artar, hücreler deforme olmaya başlar (mekanik travma nedeniyle uzunlamasına eksenleri değişir) ve arter duvarlarının elastikiyeti değişir (Venco ve Vezzoni, 2001; Kaiser ve ark., 1989). Hasarlı arteriyel yüzey, albümin, plazma ve kan hücrelerinin perivasküler boşluğa geçişini kolaylaştırır, vasküler tunika medyasındaki düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyarır, bunlar lümene göç eder ve intravasküler villus oluşumunu (proliferatif pulmoner endarterit) indükler (Şekil 2.7.)(Simón ve ark., 2009). Villus proliferasyonunun şiddeti, enfeksiyon süresi, parazit yükü ve konakçının bağışıklık tepkisinin gücü ile doğrudan ilişkilidir. Arteriyel duvar, görünüm olarak pürüzlü ve kadifemsi hale gelir ve buna bağlı olarak pulmoner arterlerin hem lümeni hem de uyum yeteneği zarar görür (Venco ve Vezzoni, 2001; Genchi, ve ark., 2012). Hasar görmüş damar duvarlarından yayılan sıvılar ve proteinler, akciğer parankiminde ödem ve iltihaplanmaya neden olur. Vasküler lezyonlar, eforla ilişkili kalp yükünün ani artışı ve hemoptizi veya şiddetli akciğer kanaması nedeniyle pulmoner arterlerin yırtılmasına yol açabilir (Simón ve ark., 2009). Sarı ok, Kalp kurdu hastalığına sahip bir köpeğin pulmoner arterinden alınan damar endotelinin yüzeyi, iyi gelişmiş intravasküler villusları göstermektedir. Siyah ok, bir yetişkin solucanın varlığını göstermektedir. Sarı ok kardiyopulmoner dirofilaryazis nedeniyle ölen bir köpeğin

pulmoner arterinde bir tromboembolizm (Şekil 2.8.) (Simon ve ark., 2012).



Şekil 2.7. Köpeklerde kalp kurdu hastalığının ilerleyişinin şematik görünümü (Simon ve ark., 2012).



Şekil 2.8. Köpek kalp kurdu hastalığı ile ilişkili pulmoner arterlerdeki patolojik değişiklikler (Simon ve ark., 2012).

Hastalığın kronik ilerlemesi ile eş zamanlı olarak parazitlerin kendiliğinden veya filarisitler ile tedavi edilmesi sonucu ölmesi, tromboembolizm ile karakterize edilen akut olgulara neden olur (Simon ve ark., 2012).

Arteriyel duvarın dejenere olması ve/veya solucanların varlığı ile tıkanabilen pulmoner arterlerin lümen çapındaki hasar, inflamatuvar mediatörlerle birlikte pulmoner hipertansiyona yol açabilir. Bu, kalbin sağ tarafında aşırı yük oluşmasına neden olur ve buna karşılık gelen hipertrofi ve dilatasyonla birlikte konjestif sağ kalp yetmezliğini tetikler Triküspit kapaktaki değişikliklerle daha da kötüleşir. Konjestif sağ kalp yetmezliğinde sistemik venöz basıncın artması sonucu genel venöz tıkanıklık meydana gelir (Şekil 2.8.) (Simón ve ark., 2009; Noack ve ark., 2021).

Dirofilariosis enfeksiyonlarının en ciddi komplikasyonlarından birisi de kaval sendromudur. Yoğun parazit yükü ve/veya sağ kalpte çok sayıda parazit durumunda gelişebilir. Ancak, kaval sendromunun gelişimi yalnızca parazit yüküne bağlı değildir. Hem yüksek hem de düşük parazit yüküne sahip köpeklerde kaval sendromu bildirilmiştir. Yüksek parazit yüküne sahip bazı köpekler kaval sendromunun klinik belirtilerini geliştirmezler (Romano ve ark., 2021).

Kaval sendromunun etiyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır. Hemodinamik bir olay, pulmoner arter kan akışında geçici veya sürekli bir azalmaya neden olduğunda ve bu durum parazitlerin sağ atrium ve ventriküle düşmesi ile birlikte ortaya çıkabilir. Kaval sendromu, artan pulmoner vasküler dirence bağlı olarak azalan kardiyak çıkıştan veya kalp kurtlarının gecikmiş olgunlaşmasından da kaynaklanabilir. Kaval sendromu, ciddi, akut triküspit yetmezliği ve zayıf kardiyak çıkış ile karakterizedir. İntravasküler hemoliz, kalp kurtları tarafından kan akışının fiziksel olarak engellenmesi sonucu kırmızı kan hücrelerinin hasar görmesiyle meydana gelir. Sekonder hemoglobinüri, şok ve hipotansiyon da ortaya çıkabilmektedir (Nelson ve ark., 2012; Romano ve ark., 2021).

Dirofilaria immitis, genellikle kalp akciğer ve bazı damarlarda görülsede bazı olgularda bacaklarda ve ciltte apseli lezyonlar ile birlikte de görülebilmektedir. Bu lokalizasyonlar düzensiz ve alışılmadık olup, bu bölgelerde kaşıntılı papülonodüler dermatit ile ilişkilendirilmiştir ve muhtemelen yetişkin parazitlerin ciltte bulunmasına karşı gelişen aşırı duyarlılığın bir sonucudur. Kalp kurdu ile ilişkili dermatit bulunan köpekler tipik olarak kronik kaşıntı, ülserli papüller, nodüller ve plaklar gösterirler. Lezyonlar en sık baş ve uzuvlarda bulunur, ancak her yerde de ortaya çıkabilir (Şekil 2.9.) (Scott 1979).



Şekil 2.9. Kutanöz dirofilariasisli bir köpektaki dermatolojik belirtiler (Rocconi ve ark., 2012).

Dirofilaria immitis, akciğerler ve kalp dışında diğer organları da etkileyebilmektedir. Erişkin parazitler kaudal vena kavada yer alabilir, bu da hepatik ve renal yetmezliğe yol açar. Bağışıklık kompleksi glomerüler hastalık, kalp kurdu hastalığının en yaygın komplikasyonlarından biridir. Antijen-antikor kompleksleri üretilir ve glomerüllerde birikerek glomerülo nefrit ve ardından proteinüriye neden olur (Nelson ve ark., 2012). Kalp kurdu hastalığı olan 47 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada, %19'unda proteinüri ve %17'sinde sınırdan proteinüri bulunmuştur (Carretón ve ark., 2020) Proteinüri, plazma antitrombin III seviyelerini azaltarak trombüs oluşumunu da artırabilir (Kittleson ve Kienle, 1998).

Tablo 2.3. Klinik bulguların şiddetinin sınıflandırılması (Nelson ve ark., 2012)

Derece	Bulgular
Birinci Derece	Birinci derece vakalarda, klinik, radyografik veya laboratuvar bulguları mevcut değildir ya da yalnızca çok hafif semptomlar (örneğin, öksürük) gözlemlenir. Bu vakalar genellikle rutin tarama testleri aracılığıyla tespit edilir.
İkinci Derece	İkinci derece vakalarda öksürük, yorgunluk ve kilo kaybı gibi klinik belirtiler gözlenebilir, ancak kalp yetmezliği belirtileri bulunmaz. Anormal akciğer sesleri mevcut olabilir. Radyografik bulgular arasında pulmoner arter genişlemesi, çevresel perivasküler yoğunluklar ve karışık alveolar-interstisyel lezyonlar yer alabilir. Kardiyomegali mevcut olabilir veya olmayabilir. Laboratuvar anormallikleri arasında kronik anemi ve hafif proteinüri görülebilir.
Üçüncü Derece	Subjektif belirtiler arasında kardiyak kaşeksi, sürekli yorgunluk, kalıcı öksürük, nefes darlığı, anormal kalp ve akciğer sesleri ve juguler nabız bulunur. Bu vakalarda genellikle sağ kalp yetmezliği, hepatomegali, asit ve senkop görülür. Radyografik anormallikler arasında şiddetli sağ ventrikül ve atriyum genişlemesi, şiddetli pulmoner arter genişlemesi, çevresel karışık pulmoner paternler, yaygın pulmoner yoğunluklar ve/veya pulmoner emboli belirtileri bulunur. Laboratuvar anormallikleri arasında anemi, proteinüri, hepatik enzim yükselmesi ve/veya azotemi yer alır. Kalp kurtları genellikle ekokardiyografi ile pulmoner arterlerde veya kalp odacıklarında tespit edilir.
Dördüncü Derece	Dördüncü derece vakalarda kaval sendromu belirtileri görülür. Kalp kurtları, büyük sayılarda vena cava ve sağ atriyumda bulunur ve genellikle hepatik yetmezlik mevcuttur. Hemoglobinemide ve hemoglobinüride sıklıkla tespit edilir.

2.7. Teşhis Yöntemleri

2.7.1. Klinik Teşhis

Dirofilaria immitis olgularında fiziksel muayene genellikle normaldir (Nelson ve ark., 2012). Maerz'in (2020) *Dirofilaria immitis* tanısı konulan 37 köpek üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada; köpeklerin %32'sinin asemptomatik olduğu bildirilmiştir (Maerz, 2020). Klinik bulguların varlığı ve şiddeti, köpeğin boyutuna, mevcut parazit sayısına, enfeksiyon süresine, kalp kurtlarına karşı bireysel enflamatuvar yanıtına ve hastanın aktivite düzeyine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Nelson ve ark., 2012). Semptomatik olguların klinik bulguları arasında kilo kaybı, egzersiz intoleransı, öksürük, taşipne, dispne, anormal solunum sesleri, anormal kalp sesleri (örn. şiddetli pulmoner hipertansiyonda ikinci kalp sesi) ve triküspit yetersizliğinden kaynaklanan kalp üfürümü yer almaktadır (Maerz, 2020; Nelson ve ark., 2012). Akut pulmoner tromboembolizm vakalarında ateş görülebilir. Ciddi şekilde etkilenen olgularda, küçük pulmoner arterlerin yırtılması ve parazit ölümleri nedeniyle hemoptizi gelişimi gözlemlendiği bildirilmektedir (Kittleson, 2005).

Çoğu olguda tam kan sayımı normaldir. Ancak eozinofili, lökositoz, lenfopeni ve bazofili görülebilir (Kittleson, 2005). Şiddetli olgularda hafif, rejeneratif olmayan anemi yaygındır ve yayma sitolojisinde anizositoz görülebilir (Kim ve ark., 2014).

Serum biyokimyada gözlenebilecek olası anormallikler arasında hepatik enzimlerin yükselmesi (örn. ALT, ALP, AST), hiperglobulinemi ve azotemi yer almaktadır (Nelson ve ark., 2012). Simetrik dimetilarjinin (SDMA) seviyeleri bazı hastalarda yükselebilir. Choi ve arkadaşlarının (2017) yapmış oldukları bir çalışmada, orta ila şiddetli klinik belirtileri olan köpeklerin, asemptomatik veya hafif klinik belirtileri olan köpeklere kıyasla daha yüksek SDMA seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark., 2017).

İdrar tahlilinde proteinüri en yaygın anormallik olarak bildirilmektedir. Carretón ve arkadaşlarının (2020) yapmış oldukları bir çalışmada kalp kurdu görülen

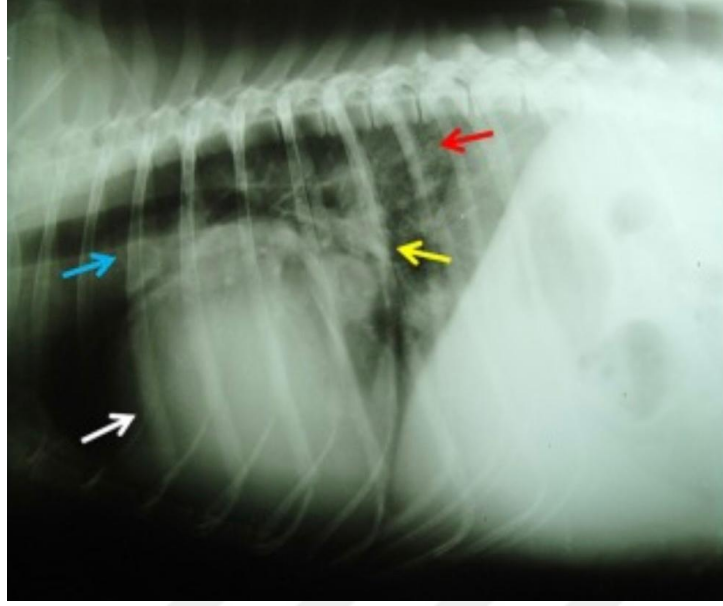
47 köpeğin %19,1'inin proteinürik olduğu bulunmuştur. Proteinüri derecesini değerlendirmek için idrar protein: kreatinin (UPC) oranı önerilmektedir. UPC oranı, yüksek parazit yükü ve mikrofilaremi olan köpeklerde önemli ölçüde artmaktadır (Carretón ve ark., 2020).

2.7.2. Tanısal Görüntüleme Yöntemleri ile Teşhis

2.7.2.1. Radyografi

Klinik bulguların varlığına veya yokluğuna bakılmaksızın, her olguda toraks radyografisi değerlendirilmelidir. Kaudal pulmoner arterler genellikle en büyük solucan yüküne sahip bölgedir. Radyografik değişiklikler arasında ana pulmoner arterlerin ve dallarının genişlemesi, kıvrımların artması ve embolize ölü solucanlar nedeniyle küntleşme yer almaktadır. Pnömoni ve yaygın, şiddetli kalp kurdu hastalığı ile etkilenen arterlerin bitişiğinde artmış parankimal akciğer yoğunlukları görülebilir. Sağ kalp genişlemesi, dorsoventral veya ventrodorsal yönlü radyografilerde en iyi şekilde fark edilir ve ters D şeklinde görülebilir. Bazı olgularda kalp kurdu varlığı nedeniyle kaudal vena cavada genişleme gözlenebilir (Nelson ve ark., 2012).

Seçici olmayan anjiyografi, dirofilariasis teşhisi için daha invaziv bir yöntemdir ve nadiren tercih edilir. Pulmoner arterlerin dilatasyonunu, damar kıvrımlılığını, distal dalların küntleşmesini ve parazitlerin varlığından kaynaklanan dolum kusurlarını gösterebilir (Kittleson, 2005). *D. immitis* tarafından yoğun bir şekilde parazitlenmiş 8 yaşındaki bir köpeğin lateral torasik radyografisi. Sağ kalpte kardiomegali (beyaz ok), karışık bir pulmoner desen (kırmızı ok), genişlemiş pulmoner damarlar (mavi ok), perihiler ödem (sarı ok) ve geniş alanlarda pulmoner yoğunlaşma gözlenmiştir (Şekil 2.10.) (Simon ve ark., 2012).



Şekil 2.10. *D. immitis* enfeksiyonu bulunan bir köpeğin lateral torasik radyografisi. (Simon ve ark., 2012).

2.7.2.2. Ekokardiyografi

Hafif olgularda genellikle ekokardiyografi normal sonuçlar verebilir. Orta derecede hastalığı olan olgularda sağ ventrikül genellikle genişlemiş ve serbest duvarı kalınlaşmış olabilir. Şiddetli hastalığı olan olgularda ise sağ ventrikülde orta ila şiddetli derecede dilatasyon ve hipertrofi gözlenebilir. Ayrıca sağ ve ana pulmoner arterlerde dilatasyon görülebilir. Triküspid veya pulmonik yetersizlik tespit edilirse, Doppler ultrasonografi ile pulmoner hipertansiyon belirtileri tahmin edilebilir. Bazı olgularda kalp kurdu larvaları ana pulmoner arter ve dallarında, sağ kalp boşluklarında ve vena cavae'de bulunabilir. Ana pulmoner arter ve proksimal dallarda görülebilmeleri için genellikle çok sayıda parazit bulunması gerekmektedir. Daha hafif enfeksiyonlarda parazitler daha distal arterlerde bulunabilir. Parazitler, aralarında berrak bir doğrusal bölge bulunan 2 paralel doğrusal yoğunluk olarak görünürler (Maerz, 2020).

2.7.3. Labaratuvar Yöntemleri ile Teşhis

2.7.3.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Nativ)

Bir damla kan numunesinin bir lamel altında incelenmesi bazı durumlarda

mikrofilerleri tespit edebilir. Ancak düşük sayıda mikrofiler mevcut olduğu durumlarda bu teşhis yöntemi duyarsızdır (Marcos ve ark., 2016). Doğru sonuçlar elde etmek için, mikrofiler varlığını belirlemek ve *D. immitis*'i patojen olmayan filaryal türlerden (örneğin, *Acanthocheilonema reconditum*) ayırt etmek amacıyla bir konsantrasyon tekniği (örneğin, modifiye Knott testi, filtrasyon testi) kullanılır. Vücut boyutlarının ölçümü ve anatomik, morfolojik özellikler *D. immitis*'in tanımlanmasına yardımcı olur. Vakaların %80'ine kadarında mikrofiler tespit edilemeyebilir. Mikrofiler eksikliği tek cinsiyetli enfeksiyonlarla, üremeyi baskılayan konak bağışıklık tepkileriyle ve kalp kurdu önleyici ilaç uygulamasıyla ilişkili olabilir. Mikrofiler, erişkin ilacı ile tedavi edilen köpeklerde ve kalp kurdu enfeksiyonunu doğal olarak temizleyen köpeklerde mevcut olabilir. Bu köpeklerde antijen testi negatif olabilir ve mikrofiler pozitif çıkabilir (Nelson ve ark., 2012).

2.7.3.2. Sürme Preparat Yöntemi

1 damla kan örneğinin lam üzerine alınıp sürme preparat yapıldıktan sonra hareketli mikrofilerlerin görülmesi ya da hazırlanan preparatın fikse edilip çeşitli boyalarla boyandıktan sonra morfolojik özelliklerinin sayesinde tanınması prensibine dayanır (Euzeby, 1981; Seward, 2001).

2.7.3.3. Saponin Konsantrasyon Yöntemi

5 ml'lik enjektörde 2 ml'lik kan ve %2'lik 1 ml saponin homojenize edilir ve elde edilen homojen karışım 4500 rpm'de santirüfjü edilir. Santrifüj edilen karışımın süpernatant kısmı atılarak geri kalan sıvı lam lamel arasında mikrofilerler yönünden incelenir (Kelly, 1973; Lindsey, 1965).

2.7.3.4 Mikrohematokrit-Kapillar Sedimentasyon Yöntemi

Yöntem, mikrohematokrit kapillar tüplere alınan kan örnekleri 8500 rpm'de 4-5 dk santrifüj edildikten sonra kanın plazması ve şekilli elemanları arasında kalan sarı renkli kısım ile birlikte mikroskop yardımıyla mikrofiler yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Elde edilen sıvıya bir damla formalinli metilen mavisi (5 ml

metilen mavisi solüsyonu, 15 ml distile su, 5 ml %10 formalin) ilave edilerek mikrofilerlerin morfolojik özellikleri incelenir (Kelly, 1973; Whiteley 1988).

2.7.3.5. Modifiye Knott Tekniği

Bir ml antikoagulanlı 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 edilir, karışımdan süpernatant alınır (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 (Euzeby, 1981; Kelly, 1973).

2.7.3.6. Membran Filtrasyon Tekniği

Bir mililitre antikoagulanlı kan örneği, 9 ml lizis çözeltisi (8 gr Na₂CO₃, 1000 ml distile su, 5 ml Triton X-100; %2 formalin; fizyolojik tuzlu su ile homojenize edilmiş Teepol) ile 10 ml'lik bir enjektörde karıştırılır. Daha sonra, bu karışım 25 mm çapında ve 3, 5 veya 8 µm por genişliğinde plastik, selüloz veya polikarbonat filtrelerden geçirilir. Aynı enjektör kullanılarak filtrelerden 2-3 kez distile su geçirilir ve ardından 2-3 kez hava enjekte edilerek filtre üzerinde sıvı kalmaması sağlanır (Acevedo ve ark., 1981; Jackson, 1969). Filtreler tutucudan çıkartıldıktan sonra lam-lamel arasında mikroskopta incelenmeye hazır hale gelir. Mikrofilerlerin daha rahat görülmesi amacıyla filtre üzerine bir damla %0.01 metilen mavisi eklenir veya mikrofilerlerin yapısını daha detaylı incelemek için filtreler havada kurutulup tespit edildikten sonra amaca yönelik olarak boyanır (Nolan, 2002; Wylie, 1970;).

2.7.3.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi

Dirofilaria immitis'in teşhisinde asit-fosfataz yöntemi, parazitin belirli enzimatik aktivitelerini tespit etmeye yönelik kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, mikrofilerlerin asit fosfataz aktivitesini belirleyerek teşhis koymayı sağlar. Kan örneği,

antikoagülan (örneğin EDTA) içeren bir tüpe konur ve santrifüj edilerek mikrofilerler izole edilir. Üstteki plazma ve diğer hücresel bileşenler uzaklaştırılır. İzole edilen mikrofilerler temiz bir lam üzerine yerleştirilir ve ince bir tabaka halinde yayılır. Preparat kurutulur ve tespit edilir. Preparat, asit fosfataz aktivitesini belirlemek için spesifik bir boya ile boyanır. Bu boyalar genellikle asit fosfataz substratları ile reaksiyona giren ve renk değişikliği oluşturan bileşiklerdir. Yaygın olarak kullanılan boyama çözeltileri arasında naftol AS-BI fosfat ve pararozanilin bulunur. Boyanmış preparat uygun bir sıcaklıkta (genellikle 37°C) inkübe edilir. Bu süre zarfında, mikrofilerlerde bulunan asit fosfataz enzimi substratı parçalar ve renkli bir ürün oluşturur. Preparat inkübasyondan sonra su ile durulanır ve kurutulur. Boyanmış preparat mikroskop altında incelenir. Mikrofilerlerde asit fosfataz aktivitesi olan bölgeler renk değişikliği gösterir ve bu da mikrofilerlerin teşhis edilmesini sağlar (Acevedo ve ark., 1981; Whitlock ve ark., 1978).

2.7.4. Serolojik Yöntemler ile Teşhis

Kalp kurdu enfeksiyonunun klinik uygulamada teşhisi, hastalardan alınan serum, plazma veya tam kan örneklerinde *Dirofilaria immitis* antijeninin tespitine dayanır. Bu testler, *D. immitis*'e özgü antijenleri tespit eder ve genellikle ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ve ICT (Immunochromatographic Test) formatlarında bulunur (Little ve ark., 2018).

Bu testlerin kullanımı kolay olup, yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermektedir. Ancak ELISA testleri, enfeksiyonun ilk 5-8 aylık döneminde, sadece erkek solucanlarla enfekte olan hayvanlarda veya az sayıda dişi solucanla enfekte olmuş hayvanlarda yanlış negatif sonuçlar verebilir. Dişi parazitler tarafından üretilen antijen konsantrasyonuna dayalı olarak solucan yükünü ölçmek için tasarlanan ELISA çeşitleri de bulunmaktadır; fakat bu testler, erkek parazitlerin varlığında veya ölümü nedeniyle artan antijen seviyelerine bağlı olarak yanlış sonuçlar verebilir. (Bowman ve Atkins, 2009; Nelson ve ark., 2012). Bu yöntemlerin her biri, *D. immitis* teşhisinde belirli avantajlar ve sınırlamalara sahiptir. Teşhis sürecinde, mevcut tüm yöntemlerin kombinasyonları, özellikle semptomatik olmayan vakalarda daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlar (Little ve ark., 2018).

2.7.5. Moleküler Teknikler ile Teşhis

Gerçek Zamanlı PCR (qPCR), *Dirofilaria immitis*'in teşhisinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, spesifik primerler kullanılarak *D. immitis*'in mitokondriyal 12S genini hedefleyen bir PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. Bu teknik, enfekte hayvanların kan örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapılarak enfeksiyonun varlığını ve yoğunluğunu belirlemekte etkilidir (Rojas ve ark., 2015).

Gen Amplifikasyon Teknikleri, *Dirofilaria immitis*'in teşhisinde kullanılan bir diğer moleküler yöntemdir, bu yöntem, enfekte hayvanlarda *D. immitis*'in belirli gen bölgelerini amplifiye ederek enfeksiyonun tespitine olanak tanır. Örneğin, bir çalışmada *D. immitis*'in cytochrome oxidase (cox1) geninin amplifikasyonu kullanılarak enfeksiyonların tespit edilmesi ve nicel analizinin yapılması gibi (Barrantesve ark., 2024; Rojas ve ark., 2015).

Nükleik Asit Tespiti ve MiRNA Analizinde ise bazı çalışmalarda, nükleik asit tespiti ve miRNA derin dizileme yöntemleri de denenmiştir. Bu yaklaşımlar, *D. immitis* enfeksiyonlarının erken teşhisi için umut vaat etmekte, ancak mevcut bulgular, daha fazla optimizasyon gerektiğini göstermektedir (Barrantesve ark., 2024).

2.8. Tedavi Yöntemleri

Kardiyopulmoner dirofilariosis olgularının sağaltımı, karmaşık parazit yaşam döngüsü, klinik belirtiler ve şiddetindeki belirgin değişkenlik, profilaktik hususlar, adultisidal ve mikrofilarisidal tedavi yöntemleri ile adultisidal tedaviye bağlı göreceli toksisite ve komplikasyonlar nedeniyle karmaşıktır. Bu sebeplerle, kardiyopulmoner dirofilariosisin teşhisi, önlenmesi ve tedavisi zorlu bir süreç olarak değerlendirilmektedir (Ettinger ve ark., 2016).

Dirofilaria immitis olgularında tedaviye başlamadan önce, kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri yapılmalı ve bu testlerin sonuçlarına göre tedavi yöntemleri belirlenmelidir. Ayrıca, uygulanacak ilaçların dozajlarının dikkatle ayarlanması gerekmektedir. İlaçlar yetersiz dozda verildiğinde erişkin parazitler

eradike edilemez, yüksek dozda verildiğinde ise hepatotoksik ve nefrotoksik etkiler nedeniyle karaciğer ve böbreklerde doku hasarına yol açabilir (Rishniw ve ark., 2022).

2.8.1. Adulticidler ile Hızlı Elemine Edici Tedavi

Adulticidlerin elemine edilmesi amacıyla uzun yıllar boyunca onaylanmış tek ilaç olan Thiacetarsamide (Caparsolate) kullanılmaktadır. Ancak Thiacetarsamide yüksek komplikasyon riski nedeniyle artık önerilmemektedir (Ettinger ve ark., 2016). Bu nedenle Melarsomine dihydrochloride, Thiacetarsamide'in zaman içinde yerini almış ve kalp kurtları için Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç idaresi tarafından onaylanmış tek erişkin öldürücü ilaç olarak bildirilmiştir (Nelson ve ark., 2012).

Tablo 2.4. Adulticidleri elimine edici tedavide kullanılan tedavi protokolleri (Umur ve ark., 2006)

İlaç	Dozu	Uygulama şekli
Thiacetarsamide sodium (Caparsolate)	Günlük 2.2 mg/kg	İv/iki gün
Melarsamine (İmmicide)	Günlük 2.5 mg/kg	İm/iki gün
Levamisole (citarin)	10-15 mg/kg	Oral/14 gün

Adultisit tedavisi gerektiren tüm olgular için bu 3 dozlu bir protokol önerilmektedir (Ettinger ve ark., 2016).

Tablo 2.5. AHS Tarafından Önerilen Tedavi Protokolü (Ettinger ve ark., 2016)

Gün	Tedavi
0. gün	Kalp kurdu pozitif olarak teşhis edilmiş ve doğrulanmış bir olguda: Olgu, Mikrofilarya (MF) testi ile doğrulanmış pozitif antijen (Ag) testi ile doğrulanır. Sivrisinekleri uzaklaştırmak ve öldürmek için topikal uygulama yapılır. Egzersiz kısıtlaması uygulanır belirtiler ne kadar belirginse, egzersiz kısıtlaması o kadar katı olmalıdır. Eğer olgu semptomatikse: Uygun terapi ve bakım ile stabilize edilmelidir. Prednizon ilk hafta 0,5 mg/kg dozunda günde iki defa, ikinci hafta 0,5 mg/kg dozunda günde bir kez, üçüncü ve dördüncü haftalar için 0,5 mg/kg dozunda gün aşırı reçete edilir.
1. gün	Hastanın genel durumuna uygun kalp kurdu önleyici ilaçları uygulanmalıdır. MF tespit edilirse, anafilaksi riskini azaltmak için antihistaminik ve prednizon uygulanmalı veya glukokortikosteroidler ile tedavi edilmelidir. Hasta, ilaç reaksiyon belirtileri gelişimine karşı en az 8 saat gözlemlenmelidir.
1-28. günler	4 hafta boyunca 10 mg/kg dozunda günde iki kez doksisisiklin uygulanmalıdır. Bu uygulama ölü kalp kurtlarıyla ilişkili gelişen patolojileri azaltır ve bulaşını engeller.
30. gün	Hastanın genel durumuna uygun kalp kurdu önleyici ilaçları uygulanması ve sivrisinekleri uzaklaştırmak ve öldürmek için topikal uygulama tekrarlanır.
31-60. gün	Melarsomin uygulamadan önce doksisisiklinden sonra bir aylık bir bekleme süresi önerilmektedir, çünkü yetişkin solucanları öldürmeden önce Wolbachia yüzey proteinlerinin ve diğer metabolitlerin dağılması için zaman tanıdığı varsayılmaktadır. Ayrıca, Wolbachia endosimbiontları ortadan kaldırıldıktan sonra solucanların kuruyup elemine olması için daha fazla zaman tanınmaktadır.
61. gün	Hastanın genel durumuna uygun kalp kurdu önleyici ilaçları uygulanması tekrarlanır. İlk melarsomin 2,5 mg/kg dozunda intramüsküler enjeksiyon ile uygulanır. Prednizolon, ilk hafta 0,5 mg/kg dozunda günde iki kere, ikinci hafta 0,5 mg/kg dozunda günde bir kere, üçüncü ve dördüncü haftalar için 0,5 mg/kg dozunda gün aşırı uygulanmalıdır. Bu süreçte egzersiz kısıtlaması artırılmalıdır.
90.gün	Hastanın genel durumuna uygun kalp kurdu önleyici ilaçları uygulanması tekrarlanır. 61. gün ile aynı şekilde ikinci melarsomin enjeksiyonunu ile birlikte prednizolon uygulaması tekrarlanır.

Tablo 2.5. (Devam) AHS Tarafından Önerilen Tedavi Protokolü (Ettinger ve ark., 2016).

91.gün	Üçüncü melarsomin enjeksiyonunu uygulanır. Son melarsomin enjeksiyonlarını takiben 6 ila 8 hafta boyunca egzersiz kısıtlamasına devam edilir.
120.gün	Olgu, MF varlığı yönünden test edilir. Eğer pozitifse mikrofilarisite ile tedavi başlanılır ve 4 hafta içinde tekrar test edilir. Risk değerlendirmesine bağlı olarak yıl boyunca kalp kurdu önleme programına devam edilir.
365.gün	Son melarsomin enjeksiyonundan 9 ay sonra antijen testi gerçekleştirilir; MF için tarama sonucu hala Ag pozitifse, doksisisiklin ve ardından 24 saat arayla iki doz melarsomin uygulaması tekrarlanır.

*Bu protokol komplikasyon oranlarını azaltma ve güvenliği artırma avantajına sahiptir çünkü ilk melarsomin enjeksiyonu ile yetişkin solucanların sadece bir kısmı öldürülür ve kalan solucanların çoğu ikinci ve üçüncü enjeksiyonlarla öldürülür.

Melarsomin toksisitesinin belirtileri çoğunlukla pulmoner ödem ile ilişkilidir. Hepatotoksisite gelişimi gözlenmemektedir. Melarsomin alan 382 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada, hiçbir hastanın hepatik veya renal toksikoz nedeniyle tedavinin kesilmesini gerektirmediği bildirilmiştir. Diğer toksisite belirtileri arasında titreme, uyuşukluk, dengesizlik, ataksi, huzursuzluk, nefes nefese kalma, sık solunum, hipersalivasyon ve kusma yer almaktadır. Nadir durumlarda, geri dönüşümlü olabilen veya olamayan ciddi nörolojik belirtiler (örn. felç, miyelomalazi) gelişebilir. 3 doz protokolü uygulanan 55 köpek üzerinde yapılan bir çalışmada, %96'sında iyi veya çok iyi sonuçlar elde edilmiş ve >%98'i tedaviden 90 gün sonra antijen negatif hale gelmiştir. En yaygın yan etkiler tedaviden sonraki 5-7 gün boyunca ateş, öksürük ve iştahsızlık bildirilmiştir (Atkins, 2002).

2.8.2. Yavaş Eliminasyon Yöntemi

Yavaş eliminasyon yöntemi ilk tercih edilen tedavi seçeneği olarak kabul edilmemektedir. Yavaş eliminasyon yöntemi, 4 hafta boyunca oral doksisisiklin ile birlikte bir makrosiklik laktonun profilaktik dozlarının sürekli, aylık olarak uygulanmasını ile gerçekleştirilir (Kramer ve ark., 2018). Yavaş eliminasyon yöntemi klinik araştırmacılar tarafından önerilmez çünkü daha yaşlı parazitler bu tedavi prosedürüne daha az duyarlıdır ve dirençli alt popülasyonların gelişme potansiyelinin mevcut olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu yaklaşımda egzersiz kısıtlaması için

zamanlama bilinmemektedir. Bu yöntemin gerektirdiği uzun tedavi süresi boyunca (yetişkin kalp kurtlarının %95'ini temizlemek için muhtemelen >2 yıl), patolojik değişiklikler ilerleyebileceği bildirilmiştir (Nelson ve ark., 2012).

2.8.3. Mikrofilaricidal Tedavi

Melarsomin tedavisinin, genç evre parazitlere (4 aylıktan küçük) karşı yetersiz etkinliği nedeniyle, kalp kurdunun tüm evrelerinin tam olarak temizlenemediği bildirilmektedir. *Dirofilaria immitis*'in bazı evrelerinin melarsomine duyarlı olmadığı dönemler, melarsomin tedavisine başlamadan önce 2 ay boyunca makrosiklik lakton önleyici kullanılarak en aza indirilebilir makrosiklik laktonlar arasında ivermektin, eprinomectin, selamectin, doramectin, moksidektin ve milbemisin oksim bulunmaktadır. Makrosiklik laktonlar, L3 ve L4 evrelerini hedef alarak larvaların yetişkin hale gelmesini engeller. Ayrıca, makrosiklik laktonlar dolaşımdaki mikrofilarya sayısını da azaltır. Bu ilaç kombinasyonu, yeni enfeksiyonları azaltır ve mevcut duyarlı larvaları yok eder. Mikrofilarisidal tedaviye başlamadan önce egzersiz kısıtlaması ve kortikosteroidler de endikedir (Blagburn ve ark., 2016; Nelson ve ark., 2012).

Tablo 2.6. Mikrofilerleri elimine edici tedavide kullanılan tedavi protokolleri (Umur ve ark., 2006)

İlaç	Dozu	Uygulama şekli
Levamisole (Citarin)	Günlük 10-15 mg/kg	Oral/14 gün
İvermectin	0.2-0.5 mg/kg	Deri altı
Selamectin	6 mg/kg	Spot-on/ doz/ay x3

2.8.4. Cerrahi Tedavi

Şiddetli olgularda, parazitlerin sağ atriyum ve triküspit kapaktan cerrahi olarak uzaklaştırılması hayati önem taşımaktadır. Bu işlem, floroskopi rehberliğinde sert veya esnek aligatör forseps ya da juguler venden yerleştirilen intravasküler geri alma tuzağı kullanılarak uygulanabilir. Cerrahi yaklaşımlar nadiren uygulansa da, parazit çıkarma

işlemi en ağır enfekte ve yüksek riskli köpeklerde tercih edilen bir prosedürdür. İntraoperatif mortalite düşüktür. Başarılı bir transvenöz kalp kurdu ekstraksiyonu geçiren ve taburcu olana kadar hayatta kalan köpeklerin uzun vadeli prognozu iyidir. Pulmoner tromboembolizm riski yüksek olan köpeklerde, adultisit tedavisine başlamadan önce mümkün olduğunca çok sayıda parazitin fiziksel olarak uzaklaştırılması, genel sağkalım ve iyileşme oranını önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Ettinger ve ark., 2016; Nelson ve ark., 2012).

2.9. Korunma ve Kontrol

Korunma ve kontrolde en önemli hususlardan birisi vektör sivrisinek ve konak arasındaki etkileşimi minimuma indirmektir. Bunun için vektör üreme alanlarını kurutmak, larva ve erişkinlerle ayrı ayrı mücadele etmek sivrisineklerin hayvan ve insan barınaklarına girmesinin engellenmesi oldukça önemlidir. Fakat sivrisinek mücadelesi pratikte zor olduğundan, bu amaçla sadece köpeklerde gelişmekte olan larvalara (L3 ve L4) etkili ilaçlar kullanılır. Endemik olduğu bölgelerde, sağlam köpeklerin korunmasında yaklaşık bir aylık etki süresine sahip olan ivermektin, moksidektin ve milbemisin oksim en uygun ilaçlardır. Bu ilaçlar ayda bir kez uygulanır. Sivrisinek aktivitesinin başlamasından bir ay önce başlayarak, sivrisineklerin azaldığı bir ay sonrasına kadar devam edilir. İvermektin'in bu amaçla kullanılan dozu 0,006 mg/kg'dır ve koli ırkı köpeklerde toksik etki yapmaz. Ancak koli ırkı köpeklerin uygulamadan sonraki 8 saat boyunca yakından izlenmesi gereklidir. Milbemisin oksim, yukarıdaki dozda uygulanır. Moksidektin ise ayda bir kez 0,003 mg/kg dozda uygulanır. Selamektin ise 6 mg/kg dozda verilir ve bu doz koli ırkı köpekler için toksik değildir (Toparlak ve Tüzer 2012).

2.10. *Dirofilaria immitis* ve Halk Sağlığı

Dirofilaria immitis halk sağlığı açısından endişe verici bir durumdur, ancak insanlarda enfeksiyon raporları oldukça azdır. Bununla birlikte, enfeksiyonu tespit etmek için serolojik bir test bulunmamaktadır, bu nedenle genellikle lezyon biyopsisi gibi invaziv prosedürler gereklidir. İnsan enfeksiyonlarında en yaygın klinik sendrom, akciğer parankiminde pulmoner nodül veya nodüllerin oluşumudur. Bu lezyonlar

radlyograflarda dairesel bir yoğunluk olarak görünür ve genellikle "madeni lezyon" olarak tanımlanır. Bu lezyonlar, pulmoner adenokarsinomlara benzeyebilir ve genellikle bir kişi, akciğer lobunun çıkarılması için torakotomi geçirdikten sonra teşişis edilir. Histopatolojik bulgular, olgunlaşmamış bir kalp kurdu kalıntılarını çevreleyen granülomatöz inflamasyondur. Granülomatöz lezyonlar göz, deri, testis ve diğer dokularda da kaydedilmiştir.

En iyi korunma yöntemi, sivrisinekleri azaltma programları ve sivrisinek kovucuları kullanmak, koruyucu giysi giymek ve sivrisineklerin beslenme dönemlerinde kapalı alanlarda kalmaktır (Nelson ve ark., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Çalışmanın gerecini; yaş, cinsiyet, ırk, barınma koşulları veya sağlık durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulmaksızın rastgele seçilmiş 205 köpeğin ön kol toplardamarından EDTA'lı tüplere alınmış kan örneklerinden oluşmaktadır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Etik Onay ve Hasta Sahiplerinin Bilgilendirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında kan örnekleri alınan köpeklerin sahipleri, yapılan araştırmayla ilgili bilgilendirilmiş ve imzalı 'Bilgilendirilmiş Onam Formu' alınmıştır. Ayrıca bu çalışma için Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurularak Etik Kurul Onayı (05.10.2022 / 953) alınmıştır.

3.2.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışması dahilinde Antalya Kepez, Konyaaltı, Muratpaşa ve Gazipaşa ilçelerinden Fakültemiz Hayvan Hastanesi ile Anabilim Dalımıza ve özel veteriner kliniklerine çeşitli hastalıklar nedeniyle getirilmiş sahipli ve hayvan barınaklarda barındırılan sahipsiz köpeklerden kan örnekleri toplanmıştır. Her bir köpekten yalnızca bir kereye mahsus olmak üzere *vena cephalica antebrachii* (ön bacak toplardamarı)'den, her köpek için yeni ve kullanılmamış bir steril kanül (iğne ucu) kullanılarak 1 tüp kan örneği toplandı. Kan alınan bölgeler batikon veya benzer bir antiseptik emdirilmiş temiz pamuk ile temizlendi. Toplanan kan örnekleri, soğuk zincir ile en hızlı şekilde Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırılarak ve laboratuvar analizleri burada yürütüldü. Toplanan kan örnekleri mikroskopik muayene ve ticari kit yardımıyla yapılan DNA izolasyonu sonrasında tüm DNA'lar Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile *D. immitis* yönünden taranmıştır.

Tablo 3.1. Kan alınan köpeklerin ilçelere göre yaş ve cinsiyet dağılımı

İlçe	İncelenen köpek sayısı		Yaş aralığı		
	Dişi	Erkek	(0-3)	(3-6)	(6-10)
Kepez	57	76	44	68	21
Muratpaşa	15	4	12	5	2
Konyaaltı	13	16	11	13	5
Gazipaşa	11	13	3	12	9
Toplam	96	109	70	98	37

3.2.3. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu, ticari bir kit (Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak kit içerisindeki protokole göre yapılmıştır. Buna göre; daha önceden izolasyon için 1,5 ml'lik steril ependorf içerisine ayrılmış olan 300 µl kan örneği, -20°C derin dondurucudan çıkarılarak, oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı, vorteks yardımıyla homojenize edildi. Üzerine 900 µl Cell Lysis Solution eklenip homojenize edilerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 14000 rpm'de 1,5 dk santrifüj edildi. Dipteki çöküntü oynatılmadan üstteki süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırıldı, üzerine yeniden Cell Lysis Solution eklenerek aynı işlem yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve dipteki çöküntü vortekslenerek süspanse olması sağlandı. Üzerine 300 µl Nuclei Lysis Solution eklendi ve sonrasında ısı bloğu üzerinde 37°C sıcaklıkta bir saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası tüp içerisine 100 µl Protein Precipitation Solution eklenerek yüksek ayarında vortekslendi ve devamında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant pipet yardımıyla alındı ve içerisinde oda sıcaklığında 300 µl isopropanol bulunan başka bir 1,5 ml'lik ependorf içerisine transfer edildi. Ependorf 8-10 defa alt üst edilerek süpernatant ile isopropanolün karışması sağlandı. Oda sıcaklığında tekrar santrifüj edilerek DNA'nın küçük beyaz bir pelet şeklinde tüpün dibine yapışması sağlandı. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılarak pelet üzerine 300 µl %70 etanol

eklendi ve etanol ile yıkanması sağlandı. Yeniden santrifüj edilerek dipteki pelet oynatılmadan etanol uzaklaştırıldı.

Tüp temiz bir kurutma kâğıdı üzerine yan şekilde bırakıldı ve kapağı açık olarak oda sıcaklığında 10-5 dk bekletilerek içerisinde kalmış olan etanolün tamamen uçması sağlandı. Sonrasında tüp içerisine 100 µL DNA Rehydration Solutation eklendi ve ısı bloğu üzerinde 65°C’de bir saat inkube edilerek DNA’nın rehidre olması sağlandı.

İnkubasyon sonrası kısa bir santrifüj ile kapakta toplanan sıvı tüpün dibine toplandı ve +4°C’de bir gece bekletilerek daha iyi bir rehidrasyon sağlandı. Elde edilen DNA hemen kullanılacaksa (birkaç hafta süre için) +4°C’de, daha uzun süre için ise -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.4. Mikroskopik Teşhis

Laboratuvara getirilen kan örneklerinin mikroskopik parazitolojik incelemeleri mikrofilierlerin varlığı yönünden nativ muayene ve Modifiye Knott Testi ile yapıldı.

3.2.4.1. Direkt Kan Muayenesi (Nativ)

Lam ve lamel arasına alınan 1-2 damla kan örneği, eritrosit yoğunluğu nedeniyle mikrofilaryaların görülmesini zorlaştırdığından, eritrositleri liz etmek amacıyla incelenecek kan örneğine bir damla %2 saponin veya %0,04 amonyum hidroksit ilave edildi ve mikroskop altında incelendi.

3.2.4.2. Modifiye Knott Tekniği

Bir mililitre (ml) antikoagülanlı kan örneği, 9 ml %2 formalin çözeltisi (2 ml konsantre [%37] formaldehit, 98 ml distile su) ile 10 mililitreye tamamlandı. Ardından, 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve sediment, eşit hacimde

%0,1 metilen mavisi ile karıştırıldı. Sedimentten alınan örnekler, lam ve lamel arasında mikroskop altında *Dirofilaria immitis* mikrofiliterleri açısından incelendi.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Dirofilaria immitis tanısı için soy spesifik COI* gen bölgesinin 203 bp büyüklüğündeki korunmuş bölgeyi çoğaltan DICOI-F1 (F; AGTGTAGAGGGTCAGCCTGAGTTA) ve DICOI-R1 (R; ACAGGCACTGACAATACCAAT) primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır (Rishniw ve ark., 2006). PCR için her bir ependorf tüpünde 2 µl hedef DNA içeren 23 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Bu karışımda 100 µM dNTP (deoksiniükleosidtrifosfat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP) (Solis BioDyne OÜ Estonia), 25 pmol forward-reverse primerleri (100pmol/µl), 1.25 U Taq DNA Polymerase hot FIRER ol 5U/ µl (Solis BioDyne OÜ Estonia), 25 mM MgCl₂ (Solis BioDyne OÜ Estonia), 10 × PCR buffer (200 mM Tris-HCL, pH 8,3 (25 °C); Nuclease Free Water (NFW) kullanıldı. PCR aşamaları Maxilab PCR96 cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. *Dirofilaria immitis* için Polimeraz Zincir Reaksiyonu Isı Döngüsü

PCR aşamaları	Ön Denatürasyon	Denatürasyon-Primer Bağlanması- Uzama	Son Uzama
Döngü sayısı, Sıcaklık ve Süreler	1x [95°C'de 12dk]	35x [94°C'de 50sn; 50°C'de 50 sn; 68°C'de 30 sn]	1x [68 °C 10dk]

3.2.6. PCR ürünlerinin jel elektroforez yöntemi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmesi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ürünlerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için %1,5'lik Agaroz jel elektroforezis yöntemi kullanıldı. Agaroz jel, 1x TAE (Tris-asetik asit-EDTA) tamponu ile hazırlandı. PCR ürünlerinden her biri için 25 µl'lik son hacimden dokuzar µl alındı ve steril parafilm üzerinde bir damla yükleme boyası (6x loading dye) ile karıştırıldı, ardından ilgili kuyucuklara yüklendi.

Örneklerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için her sıranın başına, ortasına ve sonuna üçer µl hacminde moleküler ağırlık standardı (molecular weight marker) (abm 100bp Plus Opti-DNA Marker) yüklendi. Ürünler, ortalama yarım saat boyunca 120 voltluk elektroforeze tabi tutuldu ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. Ardından jel, ultraviyole ışık altında görüntülendi ve örneklerin pozitiflikleri belirlendi.



4. BULGULAR

4.1. Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Direkt Kan Muayenesi (Nativ)

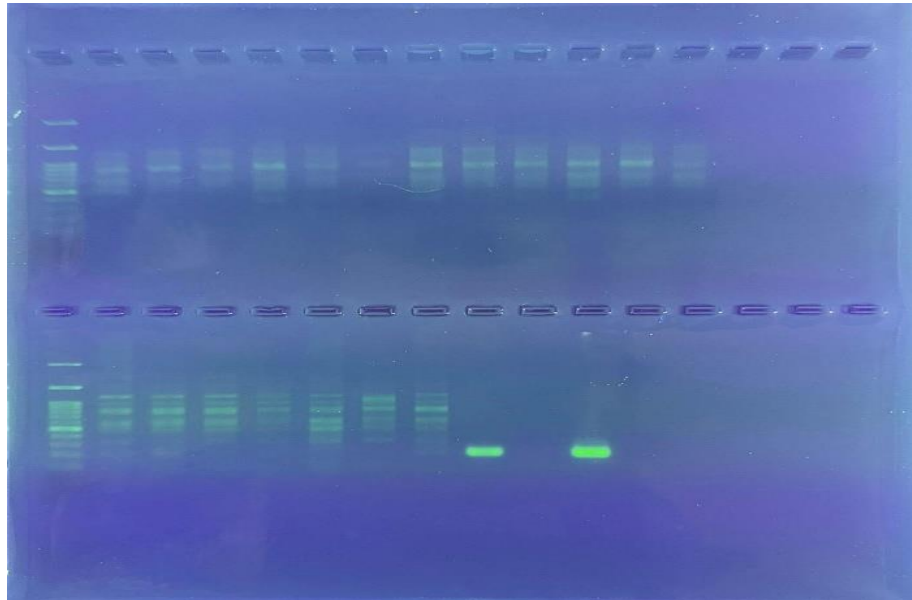
Direkt kan muayenesi ile araştırılan 205 köpeğe ait kan numunesinde *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerine rastlanmamıştır.

4.1.2. Modifiye Knott Tekniği

Modifiye Knott tekniği ile incelenen 205 köpeğe ait kan numunesinde *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerine rastlanmamıştır.

4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Bulguları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile araştırılan 205 köpeğe ait kan örnekleri incelenmiş pozitif kontrollerin çalışmasına rağmen kullanılan örneklerin hiçbirinde pozitif DNA'ya rastlanmamıştır.



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin ultraviyole ışık altında görünümü

Tablo 4.1. İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun ırklara göre dağılımı

İrk	İncelenen köpek sayısı	Natif Muayene	Modifiye Knott	PCR
Melez	124	0	0	0
Çoban Köpeği	22	0	0	0
Golden	9	0	0	0
Kangal	11	0	0	0
Alman Çoban	8	0	0	0
Pitbull	7	0	0	0
Pointer	10	0	0	0
Terrier	4	0	0	0
Labrador	4	0	0	0
Amerikan Cocker Spaniel	2	0	0	0
Jack Russell	1	0	0	0
Belçika Kurdu	1	0	0	0
Cane Corso	1	0	0	0
Akbaş	1	0	0	0
Toplam	205	0	0	0

Tablo 4.2. İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun ilçelere göre dağılımı

İlçe	İncelenen köpek sayısı	<i>D. immitis</i> pozitif köpek sayısı
Kepez	133	0
Muratpaşa	19	0
Konyaaltı	29	0
Gazipaşa	24	0
Toplam	205	0

Tablo 4.3. İncelenen köpeklerde enfeksiyon durumunun yaş ve cinsiyete göre dağılımı

		İncelenen köpek sayısı	Pozitif köpek sayısı
Yaş	0-3 Yaş	70	0
	3-6 Yaş	98	0
	6-10 Yaş	37	0
Cinsiyet	Dişi	109	0
	Erkek	96	0

5. TARTIŞMA

Köpeklerde parazitlenen *Dirofilaria immitis* hem konağa verdiği zararlar hem de zoonoz karakterli olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Parazit biyolojisini tamamlamak için muhakkak bir ara konağa ihtiyaç duymaktadır. Parazitin ara konakları *Culex*, *Aedes* ve *Anopheles* cinsi sivrisineklerdir. Bahse konu sivrisineklerin dünyada yaygın bir şekilde bulunması konunun önemini daha da artırmakta ve buna karşı koruma kontrol ve tedavi protokolleri konusunda çalışmaların sayısını artırmaktadır.

Türkiye ve Dünyada *Dirofilaria immitis*'in yayılışı konusunda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar araştırmanın tekniği, araştırmanın yapıldığı bölge, bölgedeki vektör potansiyeli, iklimsel faktörler gibi birçok etkene göre değişmektedir.

Çin'de *D.immitis*'in yaygınlığı üzerine yapılan bir çalışmada araştırmacılar 886 köpekten alınan örnekleri konvansiyonel ve moleküler olarak incelemişler ve parazitin yayılışını mikroskopik yöntemlerle %16.6, PCR sonucunda ise %24 olarak tespit etmişlerdir (Hou ve ark., 2011). İspanya'nın Gran Canaria adasında yapılan bir çalışmada bölgede bulunan köpeklerde *D.immitis*'in yaygınlığı %19.2 oranında tespit edilmiştir. Dişi köpeklerde parazit erkek köpeklerle göre daha yaygın tespit edilmiş olup aradaki bu fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur (Montoyo-Alonso ve ark., 2011). Bolio-Gonzalez ve ark. (2007), yaptıkları bir çalışmada köpeklerde *D.immitis*'in yaygınlığını bulmayı hedeflemiş olup ırk, yaş ve cinsiyetin prevalansa nasıl etki ettiğini araştırmışlardır. Çalışmada toplamda 676 köpek incelenmiştir. Çalışma materyalini nekropsi sonucunda toplanan parazitler ve köpeklerden alınan kanlar oluşturmuştur. Köpeklerden alınan kanla Modifiye Knott tekniğiyle incelenmiştir. Sonuçta 676 köpeğin 56'sı enfekte bulunmuştur. Dişi köpeklerde parazite daha sık rastlanmış olup bunun yanında genç hayvanlarda parazit daha yaygın tespit edilmiştir. Avustralya'da *D.immitis*'in prevalansının araştırıldığı bir çalışmada araştırmacılar 404 köpeği serolojik ve konvansiyonel olarak incelemiş olup ayrıca 100 köpeği de nekropsi sonucu incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda incelenen 404 köpekte parazitin prevalansı %11.4 oranında bulunurken dolaşımda mikrofilerleri

tespit edilen köpeklerin oranı ise % 5.9 olarak bulunmuştur. Nekropsisi yapılan 100 köpeğin 15'inde ise erişkin parazitlere rastlanmıştır. Araştırmacılar dirofilariozisin bölgede önemli bir halk sağlığı problemi olduğunu bildirmişlerdir (Biggood ve Collins, 2006). Sırbistan'da yapılan bir çalışmada araştırmacılar yabani karnivorların dirofilariozisteki rolünü araştırmışlardır. 2009-2013 yılları arasında yürütülen bu çalışmada çakallarda %7.32, kızıl tilkilerde % 1.55, kurtlarda %1.43, yaban kedilerinde ise %7.69 oranında prevalans tespit edilmiştir (Penezic ve ark., 2014). Malezya'da yapılan bir çalışmada araştırmacılar Malezya'nın drofilariozis açısından yüksek riskli olduğunu belirtmişlerdir. 2017-2018 yılları arasında serolojik olarak incelenen 130 örneğin 5 (%3.85)'inde parazit tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha önce bu bölgede yapılan çalışmaları derlemişler ve 2000 yılından sonra parazitin prevalansında önemli bir düşüş gözlemlemişlerdir (Chelliah ve Šlapeta, 2019). 2022 yılında Irak'ta yapılan çalışmada araştırmacılar serolojik ve mikroskopik boyama teknikleri kullanarak dirofilariozisin prevalansını belirlemeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışmanın sonucunda incelenen 90 köpeğin 49'u (%54.4) mikroskopik boyama yöntemleriyle pozitif bulunurken 25'i (%27.8) sero-pozitif tespit edilmiştir (AL-Farwachi ve Almelachi, 2022). *D. immitis* Yunanistan'da %17.9 (Lefkaditis ve ark, 2010), Romanya'da %8.9-%13.93(CiucĂf ve ark., 2016), Hindistan'da %11.38-%18.03 (Borthakur ve ark., 2015), Avusturya'da %0.8-%5(Sonnberger ve ark., 2021), Amerika Birleşik Devletleri'nde %1.4 (Bowman ve ark., 2009), Kanada'da %0.22 (Meriemve Mohamed, 2009) oranlarında tespit edilmiştir.

1951 ve 1959 yıllarında Türkiye'de *D. immitis* olgusuna ilk kez rastlanılmış olup bu köpeklerin öyküsünde yabancı orijinli olmaları dikkat çekmektedir. 1933-1960 yılları arasında 627 köpeğin nekropsisi sonucunda 1 köpekte *D. immitis*'e rastlanılmış olup incelemesi yapılan 27 köpeğin 3'ünün kanında mikrofiler tespit edilmiştir (Pamukçu ve Ertürk, 1961). Ankara'da örneklemin 33 köpek olduğu bir diğer çalışmada ise Zeybek ve ark. (1992), 3 köpeği (%9.09) pozitif bulmuşlardır. Aynı bölgede serolojik yöntemlerin kullanıldığı bir diğer çalışmada Borkü ve ark. (1996), 32 köpeğin 9'unu (%28) pozitif tespit etmişlerdir. Öge ve ark. (2003), farklı teknikleri bir arada kullanarak (Membran Filtrasyon- Asit Fosfataz Boyama ve ELISA) inceledikleri 280 köpeğin 26'sını (%6.3) pozitif bulmuşlardır. Yıldırım ve ark., (2007)

Kayseri yöresinde yaptıkları çalışmada 280 köpeğin 27'sini sero-pozitif bulurken modifiye knott yöntemiyle inceledikleri kanlardan ise 3'ünü (%0.8) pozitif tespit etmişlerdir. Şahin ve ark., (2004) Şanlıurfa yöresinde inceledikleri 92 kanın 7'sini (%7.6) pozitif bulmuşlardır. Kars ve Iğdır bölgesinde Taşçı ve Kılıç, (2012) yürüttükleri çalışmada moleküler ve serolojik yöntemleri kullanarak 240 numuneyi incelemişler ve bunun sonucunda PCR tekniğiyle 60 (%25) hayvanı, serolojik yöntemlerle ise 72 hayvanı (%30) pozitif tespit etmişlerdir. Iğdır'da yapılan bir çalışmada parazitin prevalansı %40 olarak bulunmuş olup araştırmacılar numuneleri serolojik yöntemlerle incelemişlerdir (Sarı ve ark., 2013). Yine bu bölgeye komşu Ardahan'da yapılan bir diğer çalışmada Ayvazoğlu ve ark., (2022) %12 oranında bir prevalans tespit etmişlerdir. Çakıroğlu ve Meral, (2007) Samsun'da *D.immitis*'in prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada serolojik yöntemleri kullanmış ancak pozitif sonuç elde edememişlerdir. Kırıkkale yöresinde 172 hayvanın incelendiği bir çalışmada modifiye knott yöntemi kullanılarak 10 (%5.8) hayvan pozitif tespit edilmiştir (Yıldız ve ark., 2008). Çetinkaya ve ark., (2016) Trakya yöresinde yürüttükleri bir çalışmada moleküler ve serolojik yöntemleri kullanarak toplamda 402 numuneyi incelemişler ve sonuçta PCR yöntemiyle 11 (%2.6), serolojik yöntemle ise 27 (%6.7) numuneyi pozitif bulmuşlardır. İstanbul'da 263 hayvanın incelendiği bir çalışmada araştırmacılar 4 hayvanı pozitif bulmuşlardır (Öncel ve Vural, 2005a). Aynı araştırmacılar İzmir'de yürüttükleri başka bir çalışmada 117 hayvanı incelemiş ancak pozitif bir sonuç elde edememişlerdir (Öncel ve Vural, 2005b). Civelek ve ark., (2006) Bursa'da yürüttükleri bir çalışmada inceledikleri 100 hayvanın 2'sini pozitif bulmuşlardır. Erzurum yöresinde yapılan çalışmada 250 hayvan farklı tekniklerle incelenmiş 11'i sero-pozitif bulunmuş, modifiye knott yöntemiyle ise 52'si pozitif tespit edilmiştir (Demir ve Aktaş, 2020). Gökmen ve ark., (2019) Osmaniye yöresinde yaptıkları bir çalışmada 1 hayvanı sero-pozitif bulmuşlardır. Başer ve ark., (2023) Afyon yöresinde inceledikleri 400 hayvanın 3'ünü sero-pozitif bulmuşlardır. Adanır ve ark., (2013) Burdur'da inceledikleri 142 hayvanın 31'ini sero-pozitif bulmuşlardır. Antalya yöresinde sınırlı çalışmaya rastlanılmıştır. Bu bölgede 2018 yılında yapılan bir çalışmada incelenen 225 hayvanda sero-pozitif olguya rastlanılmamıştır (Küçüker ve Şahinduran, 2018).

D.immitis'in yayılışına etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Bu değişkenleri konağa bağlı, vektöre bağlı ve çevresel faktörler olarak sınıflandırabiliriz.

Dirofilaria türlerinin yaşam döngüsü, kesin bir omurgalı konak ve bir vektörden oluşur. *Dirofilaria immitis*, heteroksen gelişim gösteren bir nematoddur ve ara konak olarak Diptera takımında, Nematocera alttakımında, Culicidae ailesinde, *Toxorhynchitinae*, *Culicinae* ve *Anophelinae* alt ailelerinde yer alan *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Myzorrhynchus*, *Taeniorhynchus*, *Ayzorrhynchus*, *Mansonia* ve *Armigeres* cinsi sivrisineklerde bulunur (Bowman ve Atkins, 2009; Soulsby, 1982).

Kayseri'de *Dirofilaria immitis*'in vektörlük potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada toplanan 6153 sivrisinekten genomik DNA ekstre edilerek yapılan moleküler incelemeler sonucu *D.immitis* DNA'sına rastlanılmıştır. *Aedes vexans* ve *Culex pipiens*'in *D.immitis*'e aktif vektörlük yaptığı çalışmanın sonucunda ortaya konmuştur (Yıldırım ve ark., 2011). Kayseri'nin Felahiye bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada ise *Aedes vexans*'lardan oluşturulan havuzda *D.immitis* DNA'larına rastlanırken *Culex pipiens*'ten oluşturulan havuzda parazitin DNA'larına rastlanılmamıştır (Bışkın ve ark., 2010). Aras vadisinde yapılan bir çalışmada araştırmacılar bölgedeki sivrisineklerin *D.immitis* açısından vektörlük potansiyelini çalışmışlardır. Çalışmada üç farklı sinek mevsiminde toplamda 17995 sinek toplanmış ve toplanan sinek örnekleri PCR yöntemiyle incelenmiştir. Vektörlük potansiyeli yönünden en yüksek oran *Ae. vexans* (%6.6), en düşük oran ise *Ae. caspius* (%1.26)'ta bulunmuştur. Bu sinekler dışında *Anopheles maculipennis sl*, *Culex theileri* ve *Cx. pipiens*'in *D.immitis* açısından vektörlük potansiyeli bulunduğu çalışmanın sonucunda ortaya konmuştur (Demirci ve ark., 2020). Bu çalışmanın yapıldığı Antalya bölgesinde *D.immitis*'in vektörlerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

D.immitis'in yayılışında cinsiyetin istatistiki açıdan önemli bulunduğu (Bolio-Gonzalez ve ark., 2007; Montoyo-Alonso ve ark., 2011) çalışmalar bulunduğu gibi istatistiksel açıdan bir farklılığın olmadığını savunan çalışmalar da bulunmaktadır (Fan ve ark., 2001; Martin ve Collins, 1985; Börkü ve Ark., 1996; Aranda ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda erkek köpeklerde dişilere göre daha yüksek prevalans tespit edilmiş çalışmalar bulunmaktadır (Selby ve ark., 1980; Montayo ve ark., 1998). Bunun

sebebinin mizacen erkek köpeklerinin daha hareketli olması ayrıca av ve spor faaliyetlerinde daha çok kullanılması, çiftleşme dönemlerinde erkek köpeklerin daha hareketli olması gibi nedenlerden dolayı vektör sineklerle karşılaşma ihtimalinin arttığı sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Bu durumun aksine bazı araştırmacılar dişi köpeklerde erkeklere göre parazitin prevalansını daha yüksek bulmuşlardır (Bolio-Gonzalez ve ark., 2007; Montoyo-Alonso ve ark., 2011). Çalışmanın yapıldığı bölgelerdeki dişi köpeklerin, erkek köpeklere göre potansiyel vektör olan sivrisineklerle daha sık karşılaştığı, yukarıda bahsedilen durumlar dışında dişi köpeklerin de bazı bölgeler de erkek köpeklere göre daha hareketli olduğu bu sayede etkenle karşılaşma ihtimalinin arttığı düşünülebilir. Antalya yöresinde yapılan bu çalışmada pozitif örnek bulunamadığından cinsiyet-parazit ilişkisi açısından yeterli bir yorum yapılamamıştır.

D.immitis'in yayılışında yaş faktörünün önemli olduğunu savunan çalışmalar (Montoya ve ark., 1998; Fan ve ark., 2001) yanında her yaş grubundan köpeğin enfeksiyona aynı oranda duyarlı olduğunu savunan çalışmalar (Rowley, 1981; Martin ve Collins, 1985) da bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar yaş ile birlikte köpeklerde parazitin görülme sıklığının orantısız olarak arttığını savunmuşlardır. Örneğin Fan ve ark., (2001) inceledikleri köpekler içerisinde 6 yaş ve üzeri yaşlı köpeklerde etkenin görülme sıklığının hem 1-3 yaş hem de 3-6 yaş köpeklere göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sears ve ark., (1980) incelemiş olduğu örneklemdeki köpekleri 1-3, 4-6, 7-9 ve 10-12 yaş gruplarına ayırmış ve yaş gruplarında bulunan hayvanlardaki prevalansın yaş arttıkça daha da arttığını belirtmiştir. Antalya'da yapılan bu çalışmada pozitif sonuç bulunamadığından bu konu hakkında detaylı yorum yapılamamıştır.

Parazitin yayılışında ırk faktörünün istatistiki açıdan önemli olmadığını savunan çalışmalara (Rosa ve ark., 2002; Yabaneri ve ark., 2017) rastlanırken ırkın parazitin prevalansında önemli olduğunu savunan çalışmalara rastlanmamıştır. Antalya'da yapılan bu çalışmada pozitif örneğe rastlanmadığından ırkların prevalansa etkisi ile ilgili yorum yapılamamıştır.

Antalya bölgesinde yürütülen bu çalışmada örnekler moleküler ve konvansiyonel yöntemlerle incelenmiş olup pozitif sonuç bulunamamıştır.

Parazitin teşhisi amacıyla günümüzde konvansiyonel yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Yabaneri ve ark., (2017) membran filtrasyon yönteminin diğer yöntemlere göre (natif, sürme preparat, modifiye knott) daha duyarlı olduğu bildirilmişlerdir. Bunun yanında Whiteley, (1988) modifiye knott ve mebran filtrasyon tekniğinin aynı duyarlılıkta olduğunu ancak natif yöntemden daha etkili olduklarını savunmuştur. Mikrofilerlerin arandığı teşhis yöntemlerinde parazitlerin tamamının erkek olması, parazitlerin steril olması, kan nakli yapılması ve mikrofilarioid kullanılması gibi nedenler yanlış negatifliğe neden olmaktadır (Soulsby, 1982). Serolojik testlerin parazitler hastalıklarda kullanımı tartışma konusudur. *D.immitis*'in teşhisinde yanıltıcı sonuçlar verebilmektedir. Özellikle makrosiklik laktonlarla tedavi edilmiş köpeklerde ve paraziteminin az olduğu durumlarda antiijen oluşumu 9 ayı bulmakta bu durum da yanlış negatiflik oluşabilmektedir. Bunun yanında genç dişi parazitlerin bulunması ve parazitlerin tamamının erkek olması durumu da sonucun yanlış yorumlanmasına neden olmaktadır (Yabaneri ve ark., 2017). Son yıllarda kullanımı yaygınlaşan moleküler teknikler parazitin teşhisi açısından en güvenilir yöntemdir. Moleküler yöntemlerin yaygınlığının artmasıyla parazitin varlığının tespitiyle parazitle daha iyi mücadele edilmektedir. Moleküler yöntemler hem konvansiyonel hem de serolojik yöntemlere göre teşhiste daha efektiftir ancak occult enfeksiyonlarda moleküler yöntemler ile teşhis yapılamayacağı bilinmelidir (Yabaneri ve ark., 2017).

6. SONUÇ

Bu çalışma Antalya ili köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in prevalansını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla toplamda 205 hayvandan alınan numuneler incelenmiştir. Çalışmada hem moleküler hem de konvansiyonel teknikler kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda incelenen hayvanların hiçbiri *D.immitis* pozitif bulunamamıştır.

Antalya ilinde daha önce parazitin prevalansını belirlemek amacıyla çalışmalar yapılmış olsa da bu çalışma moleküler tekniklerin ilk kez kullanıldığı çalışmadır. Çalışmanın sonucunda pozitif hayvan bulunmasa da *D.immitis* önemsenmesi gereken bir parazittir. Özellikle iklim değişiklikleri sonrası parazitin ilerleyen yıllarda daha da yayılacağı bilinmektedir. Bunun yanında parazitin hem konak hayvana verdiği zarar hem de zoonoz karakterli olması sebebiyle epidemiyolojisi, biyolojisi bilinerek daha etkili koruma ve kontrol programları hazırlanarak parazitile etkili mücadele edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Acevedo RA, Theis JH, Kraus JF, Longhurst WM (1981).** Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. 537-540.
- Adanir R, Sezer K, Onur K (2013).** The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs with different breed, ages and sex. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, **60(4)**, 241-244.
- Ağaoğlu ZT, Basbug O, Aydoğdu U, Coşkun A (2022).** Prevalence of Ehrlichia Canis, Borrelia Burgdorferi and *Dirofilaria immitis* in Sivas Stray and Shelter Dogs. *Balıkesir Sağ. Bil. Derg.*, **11(3)**, 383-388
- Al-Farwachi MI, Al-Melachi HB (2022).** Prevalence of Canine Cardiac Dirofilariasis in Nineveh Governorate of Iraq. *Atatürk Univ Vet Sci*, **17(1)**, 31-34.
- Anderson RC (2000).** Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. 2nd ed. New York: *CABI Publishing*, pp. 467-509.
- Aranda C, Panyella O, Eritja R (1998).** Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain). *Vet Paras.*, **77**, 267-275.
- Atkins C (2002).** Canine heartworm disease: Current treatment and prevention approaches. *In Proc Waltham/OSU Symp Small Anim Cardiol*.
- Attenborough RD, Burkot TR, Gardner DS (1997).** Altitude and the risk of bites from mosquitoes infected with malaria and filariasis among the Mianmin people of Papua New Guinea. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **91(1)**, 8-10.
- Ayvazoğlu C, Akyüz E, Ögün M, Demir PA, Kızıltepe Ş (2022).** Investigation of the Prevalence of *Dirofilaria immitis* in Dogs in Ardahan Region. *IJVAR*, **5(2)**, 50-53.
- Bandi, C., Dunn, A. M., Hurst, G. D., Rigaud, T. (2001).** Inherited microorganisms, sex-specific virulence and reproductive parasitism. *Trends in parasitology*, **17(2)**, 88-94.
- Barrantes Murillo DF (2024).** Molecular and serological diagnosis of *Dirofilaria immitis* in companion animals, USA.
- Başer DF, Civelek T, Tunç AC, Acar A (2023).** Prevalence of Dirofilariasis, Lyme, Anaplasmosis, and Ehrlichiosis in Dogs in Afyonkarahisar Province. *Kocatepe Vet. Jour.*, **16(3)**.
- Blagburn BL, Arther RG, Dillon AR, Butler JM, Bowles JV, Simson Cv, Zolynas R (2016).** Efficacy of four commercially available heartworm preventive products against the JYD-34 laboratory strain of *Dirofilaria immitis*. *Parasit Vect.* **9**, 191.

Bolio-Gonzalez ME, Rodriguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH, Gutierrez-Blanco E, Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF (2007). Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Vet. Parasit.*, **148(2)**, 166-169.

Borthakur SK, Deka DK, Islam S, Sarma DK, Sarmah PC (2015). Prevalence and molecular epidemiological data on *Dirofilaria immitis* in dogs from Northeastern States of India. *Sci World J*, **(1)**, 265385.

Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Vet. Parasit.*, **160(1-2)**, 138-148.

Bowman DD, Atkins CE (2009). Heartworm biology, treatment, and control. *Vet. Clin. Small Anim. Pract.*, **39(6)**, 1127-1158.

Börkür MK, Kurtdele A, Azizoğlu (1996). *Dirofilaria immitis* ile doğal enfekte köpeklerde thiacetarsamide sodium uygulamaları. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **43**, 247-256.

Brooker S, Michael E (2000). The potential of geographical information systems and remote sensing in the epidemiology and control of human helminth infections. *Adv. Parasitol.*, **47**, 245-288.

Budak S (1994). Parazit ve vektör ilişkileri. *Türk Parazitol. Derg*, **18(3)**, 362-370.

Carretón E, Falcón-Cordón Y, Rodón J, Matos JI, Morchon R, Montoya-Alonso JA (2020). Evaluation of serum biomarkers and proteinuria for the early detection of renal damage in dogs with heartworm (*Dirofilaria immitis*). *Vet. Parasitol.* **283**, pp. 109144.

Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos I (2011). Insect immune responses to nematode parasites. *Trends Parasitol*, **27(12)**, 537-547.

Cetinkaya H, Akyazi I, Ozkurt M, Matur E (2016). The serologic and molecular prevalence of heartworm disease in shelter dogs in the Thrace Region of Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **22(5)**.

Cheepsattayakorn A, Cheepsattayakorn R (2014). Parasitic pneumonia and lung involvement. *BioMed research international*, **(1)**, 874021.

Choi BS, Moon H, Suh S-I, Changbaig H (2017). Evaluation of serum symmetric dimethylarginine in dogs with heartworm infection. *Can. J. Vet. Res.* **81(3)**, pp. 228-30.

CiucÄf L, Musella V, Miron LD, Maurelli MP, Cringoli G, Bosco A, Rinaldi L (2016). Geographic distribution of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in stray dogs of eastern Romania. *Geospatial Health*, **11(3)**.

Civelek T, Yıldırım A, Iça A (2006). Prevalence of canine heartworm disease in the Gemlik Area, Bursa. *Eurasian J Vet Sci*, **22(1)**, 65-68.

Çakıroğlu D, Meral Y (2007). Investigation of *Dirofilaria immitis* enfestation in dogs in Samsun Region. *J. Istanbul Vet. Sci.*, **(2)**, 1-12.

Demir A, Aktaş MS (2020). Erzurum yöresindeki köpeklerde *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* ve *Anaplasma spp.* seroprevalansının araştırılması. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, **34(2)**, 91-96.

Demirci B, Bedir H, Taskin Tasci G, Vatansever Z (2021). Potential Mosquito Vectors of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* (Spirurida: Onchocercidae) in Aras Valley, Turkey, *J Med Entomol*, **58(2)**, March 2021, Pages 906–912,

Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E (2016). *Canine and Feline Heartworm Disease* Textbook of Veterinary Internal Medicine. Elsevier health sciences. pp: 3166-3237.

Euzeby J (1981). Diagnostic Expérimental des Helminthoses Animales, Livre 1. Paris: Boulevard de Grenelle, 277-312.

Fan CK, Su KE, Lin YH (2001). Seroepidemiologic survey of *Dirofilaria immitis* infection among domestic dogs in Taipei City and mountain aboriginal districts. *Vet Paras.* **102**, 113-120.

Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Casiraghi, M. (2011). New insights into the evolution of Wolbachia infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PloS one*, 6(6), e20843.

Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, Vincze T, Ingram J, Moran L, Lapidus A, Omelchenko M, Kyrpides N, Ghedin E, Wang S, Goltsman E, Joukov V, Ostrovskaya O, Tsukerman K, Mazur M, Comb D, Koonin E, Slatko B (2005). The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS biology*, **3(4)**, 121.

Genchi C, Ferrari N, Venco L, Billi M, Bataille KS, Genchi M (2012). Utilizzo dei test antigenici e anticorpali nella diagnosi sierologica della filariosi cardiopolmonare del cane e del gatto. *Veterinaria*, **26(4)**, 35.

Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet. Parasitol.*, **163(4)**, 286-292.

Gokmen TG, Günaydın E, Turut N, Akın B, Koç Ö, Ütük AE (2019). A serosurvey on some canine vector-borne zoonoses (*Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis* and *Leishmania spp.*) in Osmaniye. *Atatürk Univ Vet Sci J*, **14(2)**, 151-158.

Göz Y, Koltas İS, Altug N, Demirkazık M, Yüksek N, Agaoglu Z (2007). Van Yöresi Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*' in Seroprevalansı. *Yuzuncu Yıl Univ. Vet. Fak. Derg.*, **18(2)**, 5-8.

Harada R, Maeda T, Nakashima A, Sadakata Y, Ando M, Yonamine K, Sato H (1970). *Electronmicroscopical studies on the mechanism of oogénesis and fertilization in Dirofilaria immitis.* Electronmicroscopical studies on the mechanism of oogénesis and fertilization in *Dirofilaria immitis*. pp. 99-121.

Henry LG, Brunson KJ, Walden HS, Wenzlow N, Beachboard SE, Barr KL, Long MT (2018). Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. *Vet. Parasitol.* **254**, pp. 178-82.

Hou H, Shen G, Wu W, Gong P, Liu Q, You J, Zhang, X (2011). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Dandong, China. *Vet. Parasit.*, **183(1-2)**, 189-193.

<https://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?pid=27748&catId=&id=10462319&said=&meta=&authorid=&preview=> (Erişim Tarihi: 25.06.2024).

Kaiser L, Spickard RC, Sparks Jr HV, Williams JF (1989). *Dirofilaria immitis*: alteration of endothelium-dependent relaxation in the in vivo canine femoral artery. *Exp. Parasitol.*, **69(1)**, 9-15.

Kassai T (1999). Veterinary Helminthology. Butterworth–Heinemann, Linacre House, Jordon Hill, Oxford, pp. 121–124.

Kelly, J.D. (1973). Detection and differentiation of microfilariae in canine blood. *Austr. Vet. Jour.*, **49**, 23-27

Kim SJ, Suh SI, Hyun C (2017). Evaluation of red blood cell profiles in dogs with heartworm disease. *Can. J. Vet. Res.*, **81(3)**, pp. 228-30.

Kittleson MD (2005). Heartworm infection and disease (dirofilariasis). <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?id=3854125&pid=11196> (Erişim Tarihi 22.08.2024).

Kittleson MD, Kienle RD (1998). *Congenital pulmonic stenosis*, Small animal cardiovascular medicine. pp: 248-259.

Kramer L, Crosara S, Gnudi G (2018). *Wolbachia*, doxycycline and macrocyclic lactones: New prospects in the treatment of canine heartworm disease. *Vet. Parasitol.* **254**, 95-97.

Küçük S, Şahinduran Ş (2018). Research in to the seroprevalance of dirofilariasis, borreliosis, ehlichiosis and anaplasmosis in Antalya. 191-200.

Ledesma N, Harrington L (2011). Mosquito vectors of dog heartworm in the United States: vector status and factors influencing transmission efficiency. *Top. Companion Anim. Med.*, **26(4)**, 178-185.

Lefkaditis M, Koukeri S, Cozma V (2010). An endemic area of *Dirofilaria immitis* seropositive dogs at the eastern foothills of Mt Olympus, Northern Greece. *Helminthologia*, **47(1)**, 3-7.

Lindsey JR (1965). Identification of canine microfilariae. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **146**, 1106-1114

Little S, Saleh M, Wohltjen M, Nagamori Y (2018). Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasites & vectors*, **11**, 1-10.

Lok BJ (1988). *Dirofilaria sp.: Taxonomy and Distribution*. In: Boreham P.F.L, Atwell R.B. (Eds), *Dirofilariasis*. Brisbane, Australia: CRC Press, p: 1-28.

Maerz I (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in 37 rescued dogs with heartworm disease in Germany. *Vet. Parast.*, **283**, pp. 109156.

Manfredi MT, DiCerbo A, Genchi M (2007). Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. *Mappe parassi.*, **8**, 40-45.

Marcos R, Pereira C, Santos M, Luzzago C, Lauzi S, Maia JP, Faustino A, Puente-Payo P (2016). Buffy coat smear or Knott's test: which to choose for canine microfilaria screening in field studies?. *Vet. Clin. Pathol.* **54 (1)**, pp. 201-05.

Martin TE, Collins GH (1985). Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in greyhounds. *Aust Vet J*, **62**, 159-163.

Martinescu GV, Petrescu C, Andronic L, Mîndru R, Ivanescu L, Miron L (2022). Should global warming influence the occurrence of canine dirofilariosis infection in Romania?. *Sci. Pap. Vet. Med. Lucr. Sti. Ser. Med. Vet.*, **48**, 56.

McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L (2008). Heartworm disease in animals and humans, *Adv. Parasitol.*, **66**, 193-285.

McGarry, H. F., Egerton, G. L., Taylor, M. J. (2004). Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Molecular and biochemical parasitology*, **135(1)**, 57-67.

Meriem-Hind BM, Mohamed M (2009). Prevalence of canine *Dirofilaria immitis* infection in the city of Algiers, Algeria. *Afr J Agric Res*, **4(10)**, 1097-1100.

Montoya JA, Morales M, Ferrer O (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). *Vet Paras.*, **75**, 221-226.

Montoya JA, Morales M, Ferrer O, Molina JM, Corbera JA (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994- 1996). *Vet. Paras.*, **75**, 221-226.

Montoya-Alonso JA, Carretón E, Corbera JA, Juste MC, Mellado I, Morchón R, Simón F (2011). Current prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs, cats and humans from the island of Gran Canaria, Spain. *Vet. Parasit.*, **176(4)**, 291-294.

Nelson CT, Sykes J, Greene CE (2012). Heartworm Disease. Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th ed. Elsevier Saunders, St, Louis.

Noack S, Harrington J, Carithers DS, Kaminsky R, Selzer PM (2021). Heartworm disease—Overview, intervention, and industry perspective. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **16**, 65-89.

Nolan T (2002). Appendix lab, Laboratory methods for parasitological diagnosis of canine heartworm infection. <http://cal.vet.upenn.edu/paraav/labs/append5.html> (Erişim Tarihi: 20.05.2024).

Onmaz AC, İnci A, Yıldırım A, Atasever A, Düzlü Ö, Önder Z, Çiloğlu, A (2013). Bir Köpekte *Dirofilaria immitis* Enfeksiyonu ve Bu Köpekten Elde Edilen *D. immitis* ve *Taenia hydatigena* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu. In 10. Ulusal Veteriner İç Hastalıkları Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Nevşehir/Türkiye, s: 88-89.

Öge H, Doğanay A, Öge S, Yıldırım A (2003). Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, **110**, 69-72.

Öncel T, Vural G (2005). Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs in Istanbul and Izmir. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **29(3)**, 785-789.

Pamukcu M, ve Ertürk E. (1961). 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **8(4)**, 323-346.

Rishniw M, Barr S. C, Simpson K. W, Frongillo M. F, Franz M, Alpizar J. L. D. (2006). Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary parasitology*, **135(3-4)**, 303-314.

Rishniw M, Palermo V, Rothrock K (2022). Dirofilariasis (Heartworm Disease) (Canine). <https://www.vin.com/members/cms/project/defaultadv1.aspx?pid=607&id=4953585&f5=1> (Erişim Tarihi: 25.06.2024).

Rocconi, F., Di Tommaso, M., Traversa, D., Palmieri, C., Pampurini, F., & Boari, A. (2012). Allergic dermatitis by *Dirofilaria repens* in a dog: clinical picture and treatment. *Parasitology research*, **111**, 493-496.

Rojas A, Rojas D, Montenegro VM, Baneth G (2015). Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasites & vectors*, **8**, 1-10.

Romano AE, Saunders AB, Gordon SG, Wesselowski S (2021). Intracardiac heartworms in dogs: Clinical and echocardiographic characteristics in 72 cases (2010-2019). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **35(1)**, 88-97.

Rowley J (1981). The prevalence of heartworm infection in three countries in North Carolina. *Canine Pract.*, **8**, 46-48.

Sarı B, Taşçı GT, Kilic Y (2013). Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, Ehrlichia canis and Borrelia burgdorferi in dogs in Iğdır province, Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **19(5)**.

Scott DW (1979). Nodular skin disease associated with *Dirofilaria immitis* infection in the dog. *The Cornell Veterinarian*, **69(3)**, 233-240.

Sears BW, McCallister GL, Heideman JC (1980). *Dirofilaria immitis* in West Colorado. *J Parasitol.*, **66**, 1070.

Selbey LA, Corwin RM, Hayes HM (1980). Risk factors associated with canine heartworm infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc*, **176**, 33-35.

Selby LA, Corwin RM, Hayes HM (1980). Risk factors associated with canine heartworm infection. *JAVMA*, **176**, 33-36.

Seward RL (2001). Canine heartworm disease. <http://heartwormsociety.org/> (Erişim Tarihi: 20.05.2024).

Simón F, Morchón R, González-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M (2009). What is new about animal and human dirofilariosis?. *Trends Parasitol.*, **25(9)**, 404-409.

Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA (2012). Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*, **25(3)**, 507-544.

Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E., Montoya-Alonso JA (2012). Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin. Microbi. Rev.*, **25(3)**, 507-544.

Simon Martin F, Genchi C (2000). Dirofilariosis and other zoonotic filariases: an emerging public health problem in developed countries. *Res. Rev. Parasitol.*, **60(1/2)**, 1-16.

Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Sacco BD, Damiani G, Genchi C (1995). Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. **74 (2)**, 223-227.

Sonnberger K, Fuehrer HP, Sonnberger BW, Leschnik M (2021). The incidence of *Dirofilaria immitis* in shelter dogs and mosquitoes in Austria. *Pathogens*, **10(5)**, 550.

Soulsby EJJ (1982). *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. Baillere Tindall, London, pp. 307–311.

Sutton RH (1988). *Pathology and pathogenesis of dirofilariasis*. *Dirofilariasis*, p:99, 132.

Şahin T, Sevgili M, Çamkerten İ (2004). Şanlıurfa yöresi köpeklerinde *Dirofilaria sp*’nin yayılışı. *Türkiye Parazitol. Derg.*, **28(3)**, 140-142.

Taşçı GT, Kılıç Y. (2012). Kars ve Iğdır Civarındaki Köpeklerde *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)’nin Prevalansı ve Potansiyel Vektör Sivrisinek Türleri Üzerine Araştırmalar. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **18**, 29-34.

Toparlak M, Tüzer E (2012) Veteriner Helmintoloji. 1.Baskı, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, s: 400-411.

Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Tınar R. (2006). *Helmintoloji*. 1.Baskı Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, s: 420-423

Venco L (2007). *Mappe Parassitologiche 8-Dirofilaria immitis and D. repens in dog and cat and human infections.*

Venco L, Genchi C, Simón F (2011). La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. Barcelona, Spain: *Merial Laboratorios*, 19-60.

Venco L, Vezzoni A (2001). Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs and cats. pp: 161 177.

Villeneuve A, Goring J, Marcotte L, Overvelde S (2011). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. *Can Vet J*, **52(5)**, 527.

Watts KJ, Courtney CH, Reddy GR (1999). Development of a PCR and probe based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host, *Mol. Cell. Probes.*, **14**, p: 425- 430.

Whiteley HE (1988). Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Veterinary Medicine*, **83**, 328-345.

Whitlock HV, Porter CJ, Kelly JD (1978). The PKW acid phosphatase modification for the recovery and histochemical identification of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in blood. 201-207.

Wu M, Sun LV, Vamathevan J, Riegler M, Deboy R, Brownlie JC, Eisen JA (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* w Mel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS biology*, **2(3)**, e69

Yabaneri F, İnci A, Yıldırım A, Önder Z (2017). Avanos Yöresi Sokak Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in Prevalansının Belirlenmesi. *Sağ. Bil. Derg.*, **26(2)**, 140-146.

Yıldız K, Yasa Duru S, Yagci BB (2008). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Kırıkkale. *Turk J Parasitol*, **32(3)**, 225-228.

Yildirim A, Ica A, Atalay O, Duzlu O, Inci A (2007). Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Res. Vet. Sci.*, **82(3)**, 358-363.

Bışkın Z, Düzlü O, Yıldırım A, Inci A. (2010). The molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in vector mosquitoes in Felahiye district of Kayseri. *Turkiye parazitoloji dergisi*, **34(3)**, 200-205.

Yildirim A, Inci A, Duzlu O, Biskin Z, Ica A, Sahin I. (2011). *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary parasitology*, **178(1-2)**, 143-147.

Zeybek H, Tatar N, Tokay A. (1992). Ankara yöresi kırsal alan köpeklerinde görülen parazitler ve bunların yayılışı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, **7(2)**, 17-26.

