



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI  
VRP-YL-2009-0001

KÖPEKLERDEKİ *DIROFILARIA*  
TÜRLERİNDE *WOLBACHIA*'NIN  
BELİRLENMESİ

HAZIRLAYAN: Veteriner Hekim Hakan SARALI

DANIŞMAN: Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ

AYDIN-2009

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE  
AYDIN

Parazitoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Veteriner Hekim Hakan SARALI tarafından hazırlanan 'Köpeklerdeki *Dirofilaria* Türlerinde *Wolbachia*'nın Belirlenmesi' başlıklı tez, 24/11/2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

| <u>Ünvanı, Adı ve Soyadı :</u> | <u>Üniversitesi :</u>   | <u>İmzası:</u> |
|--------------------------------|-------------------------|----------------|
| Prof.Dr.Hasan EREN (Başkan)    | ADÜ Veteriner Fakültesi | .....          |
| Doç.Dr.Tülin KARAGENÇ          | ADÜ Veteriner Fakültesi | .....          |
| Doç.Dr.Hatice ERTABAKLAR       | ADÜ Tıp Fakültesi       | .....          |

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun ..... Sayılı kararıyla .../.../..... tarihinde onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü  
Doç.Dr. Muharrem BALKAYA

## ÖZET

Bu çalışma, Haziran 2007-Ağustos 2009 tarihleri arasında Aydın ve İzmir yöresinde 150 köpekte filarial enfeksiyonların yayılışını belirlemek ve *Dirofilaria* türlerinde *Wolbachia*'nın varlığını ortaya koymak amacı ile yapılmıştır. Bu amaçla alınan kan örnekleri natif, modifiye knott, membran filtrasyon ve PCR yöntemleri ile *Dirofilaria* türleri açısından incelenmiş; ayrıca asit fosfataz boyama yapılmıştır. Pozitif olduğu belirlenen örneklerde ticari kit kullanılarak kalplerinde erişkin parazitin varlığı araştırılmış ve kalbinde erişkin *Dirofilaria immitis* belirlenen 3 köpekte nekropsi yapılarak erişkin parazitleri alınmıştır. Kan örneği alınan köpeklerin bulunduğu bölge, kan alma tarihi ve zamanı, yaşı, cinsiyeti, sahipli/sahipsiz, içeride/dışarıda barınma, varsa klinik belirtileri protokol numarası verilerek kayıt edilmiştir.

Aydın bölgesinde köpekleri *Dirofilaria*'nın prevalansı %12.3 olarak belirlenmiş, İzmir'den alınan örneklerde *Dirofilaria* tespit edilememiştir. En yüksek enfeksiyon oranının %80 ile Aydın'ın Germencik ilçesinde olduğu, Merkez, Köşk ve Umurlu'da enfeksiyon oranının %6,66 olduğu belirlenmiştir. Perifer kanda mikrofiler varlığının belirlenmesinde en etkili yöntemin moleküler tekniklerden PCR olduğu, mikroskopik incelemeler arasında ise modifiye knott ve membran filtrasyon tekniklerinin natif yöntemle oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

*Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinin natif yöntemde yavaş ve yılanvari hareket edip mikroskop sahası dışına çıkmadığı, modifiye knott ve membran filtrasyon yöntemlerinde kılıfsız, ön kısmının konik biçimde sivrilerek sonlanıp kuyruklarının düz olduğu saptanmıştır. Asit fosfataz boyamada mikrofilerlerin EP ve AP bölgelerinde nokta tarzında boya aldığı ve ortalama uzunluklarının 254,1 µm, ön nihayeti-EP uzunluğu 79,2 µm, EP-AP uzunluğu 119,8 µm ve AP-arka nihayeti 55,1 µm, kalınlıkları 4,1 µm ölçülmüştür. Bu bölgelerin vücut uzunluğuna oranının sırasıyla % 30,7 ve % 79,2 olduğu belirlenmiş ve nekropsi sonrası kalpten alınan 12 erişkin dişinin yapılan uzunluk (en ve boy olarak) ölçümlerinde ortalama uzunlukları 284 mm, kalınlıkları 1,21 mm ve 30 erişkin erkeğin ortalama uzunlukları 178 mm ve kalınlıkları 0,78 mm olarak belirlenmiştir.

Nekropsi sonucunda elde edilen erişkin *Dirofilaria immitis*'ler *Wolbachia* açısından PCR ile incelenmiş ve bütün örneklerde *Wolbachia* varlığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Dirofilaria*, Köpek, Mikrofiler, *Wolbachia*, PCR

# İÇİNDEKİLER

|                                                         | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------------------------------------|-----------------|
| KABUL ve ONAY                                           | i               |
| ÖZET                                                    | ii              |
| İÇİNDEKİLER                                             | iii             |
| ŞEKİLLER DİZİNİ                                         | vi              |
| ÇİZELGELER DİZİNİ                                       | viii            |
| 1.GİRİŞ                                                 | 1               |
| 1.1. <i>Dirofilaria</i>                                 | 1               |
| 1.1.1. Sınıflandırma ve Tarihçe                         | 1               |
| 1.1.2. Morfoloji                                        | 2               |
| 1.1.2.1. <i>Dirofilaria immitis</i>                     | 2               |
| 1.1.2.2. <i>Dirofilaria repens</i>                      | 4               |
| 1.1.3. Biyoloji                                         | 4               |
| 1.1.4. Epizootiyoloji                                   | 9               |
| 1.1.5. Patogenez ve Klinik Bulgular                     | 13              |
| 1.1.6. Teşhis Yöntemleri                                | 15              |
| 1.1.6.1. Direk Kan Muayene Yöntemi                      | 16              |
| 1.1.6.2. Sürme Preparat Yöntemi                         | 16              |
| 1.1.6.3. Saponin Konsantrasyon Yöntemi                  | 16              |
| 1.1.6.4. Mikrohemotokrit-Kapillar Sedimentasyon Yöntemi | 16              |
| 1.1.6.5. Modifiye Kontt Tekniği                         | 17              |
| 1.1.6.6. Membran Filtrasyon Tekniği                     | 17              |

|                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1.6.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.1.6.8. Serolojik Teşhis Yöntemleri</b>                  | <b>21</b> |
| <b>1.1.6.9. Moleküler Teşhis Yöntemleri</b>                  | <b>21</b> |
| <b>1.2. <i>Wolbachia</i></b>                                 | <b>22</b> |
| <b>1.2.1. Sınıflandırma ve Tarihçe</b>                       | <b>22</b> |
| <b>1.2.2. Çoğalma ve Bulaşma</b>                             | <b>24</b> |
| <b>1.2.3. Konak Üzerine Etkileri</b>                         | <b>25</b> |
| <b>1.2.3.1. Feminizasyon</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>1.2.3.2. Partenogenezis</b>                               | <b>26</b> |
| <b>1.2.3.3. Erkek Öldürücülük</b>                            | <b>26</b> |
| <b>1.2.3.4. Stoplazmik Uyumsuzluk</b>                        | <b>27</b> |
| <b>1.2.4. <i>Dirofilaria</i> – <i>Wolbachia</i> ilişkisi</b> | <b>30</b> |
| <b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                    | <b>33</b> |
| <b>2.1. Direk Kan Muayene Yöntemi</b>                        | <b>36</b> |
| <b>2.2. Modifiye Knott Yöntemi</b>                           | <b>36</b> |
| <b>2.3. Membran Filtrasyon Yöntemi</b>                       | <b>36</b> |
| <b>2.4. Asit Fosfataz Boyama Yöntemi</b>                     | <b>36</b> |
| <b>2.5. Nekropsi</b>                                         | <b>38</b> |
| <b>2.6. DNA Ekstraksiyonu</b>                                | <b>39</b> |
| <b>2.7. PCR (Polimerase Chain Reaktion)</b>                  | <b>40</b> |
| <b>2.8. Sekans Analizi</b>                                   | <b>43</b> |
| <b>3. BULGULAR</b>                                           | <b>45</b> |
| <b>3.1. Direk Kan Muayene Yöntemi (Natif)</b>                | <b>45</b> |

|                                             |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2. Modifiye Knott Yöntemi</b>          | <b>48</b> |
| <b>3.3. Membran Filtrasyon Yöntemi</b>      | <b>49</b> |
| <b>3.4. Nekropsi</b>                        | <b>50</b> |
| <b>3.5. PCR (Polimerase Chain Reaction)</b> | <b>52</b> |
| <b>3.6. Serolojik Teşhis</b>                | <b>54</b> |
| <b>3.7. Sekans Analizi Sonuçları</b>        | <b>56</b> |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                          | <b>61</b> |
| <b>5. SONUÇ</b>                             | <b>68</b> |
| <b>ÖZET</b>                                 | <b>69</b> |
| <b>SUMMARY</b>                              | <b>70</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                            | <b>72</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                             | <b>87</b> |

## ŞEKİL DİZİNİ

|                                                                                                                                                    | <u>Sayfa No</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| Şekil 1.1.1. Erişkin erkek <i>Dirofilaria immitis</i>                                                                                              | 3               |
| Şekil 1.1.2. <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofileri                                                                                                | 3               |
| Şekil 1.1.3. Erişkin <i>Dirofilaria repens</i>                                                                                                     | 4               |
| Şekil 1.1.4. Sivrisinekte malpighi kanalında <i>Dirofilaria immitis</i> larvası (L <sub>1</sub> )                                                  | 6               |
| Şekil 1.1.5. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in biyolojik siklusu                                                                                      | 7               |
| Şekil 1.1.6. Kalpte <i>Dirofilaria immitis</i> erişkinleri                                                                                         | 10              |
| Şekil 1.1.7. Konjuktivadan çıkarılan bir <i>Dirofilaria repens</i>                                                                                 | 10              |
| Şekil 1.1.8. Membran filtrasyon tertibatı                                                                                                          | 19              |
| Şekil 1.1.9. <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilerlerinde asit fosfataz aktivitesi                                                                 | 20              |
| Şekil 1.10. <i>Dirofilaria repens</i> mikrofilerinde asit fosfataz aktivitesi                                                                      | 20              |
| Şekil 1.2.1. <i>Wolbachia</i> 'nın sınıflandırmadaki yeri                                                                                          | 23              |
| Şekil 1.2.2. <i>Wolbachia</i> 'nın , <i>ftsZ</i> , <i>groEL</i> , <i>gltA</i> ve <i>dnaA</i> gen sekansına bağlı olarak türlere göre dağılımı      | 22              |
| Şekil 1.2.3. İkiye bölünerek çoğalan bir <i>Wolbachia</i> 'nın elektron mikroskopik görüntüsü.                                                     | 24              |
| Şekil 1.2.4. Sitoplazmik uyumsuzluğun şematize gösterimi                                                                                           | 28              |
| Şekil 1.2.5. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in lateral kortundaki <i>Wolbachia</i> 'ların immunohistokimyasal boyama ile kırmızı renkte görülmektedir | 30              |
| Şekil 1.2.6. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in lateral kordundaki <i>Wolbachia</i> 'lar.                                                              | 31              |
| Şekli 2.1. Membran filtrasyon yöntemi                                                                                                              | 37              |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekli 2.2.</b> Asit fosfataz yöntemi ile boyanmış mikrofilerin mikroskopik görünümü                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Pozitif örneklerin alındığı yerler                                                                                                                                                                                                                                           | 47 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Modifiye knott tekniği ile teşhis edilen <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofileri                                                                                                                                                                                              | 48 |
| <b>Şekil 3.3:</b> Membran Filtrasyon tekniği ile tespit edilen <i>Dirofilaria immitis</i> mikrofilerleri oklar ile gösterilmiştir                                                                                                                                                              | 49 |
| <b>Şekil 3.4.</b> Asit fosfataz yöntemi ile boyanmış <i>Dirofilaria immitis</i>                                                                                                                                                                                                                | 50 |
| <b>Şekil 3.5.</b> 61 nolu köpeğin sağ kalbindeki <i>Dirofilaria immitis</i> erişkinleri                                                                                                                                                                                                        | 51 |
| <b>Şekil 3.6.</b> 62 nolu köpeğin kalp ve <i>Arteria pulmonalis</i> yolu ile akciğer lobuna kadar gelmiş olan <i>Dirofilaria immitis</i> erişkinleri                                                                                                                                           | 52 |
| <b>Şekil 3.7.</b> <i>Dirofilaria immitis</i> PCR jel elektroforez görüntüsü                                                                                                                                                                                                                    | 53 |
| <b>Şekil 3.8.</b> <i>Wolbachia</i> soy PCR jel elektroforez görüntüsü                                                                                                                                                                                                                          | 53 |
| <b>Şekil 3.9.</b> Heska™ Solo Step™ CH Batch Test Kit ile <i>Dirofilaria</i> pozitif bulunan bir örnek                                                                                                                                                                                         | 54 |
| <b>Şekil 3.10.</b> <i>Wolbachia ftsZ</i> genini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri kullanarak yapılan PCR sonucunda elde edilen üç <i>Wolbachia</i> izolatının dizilim analiz sonuçlarının Clustal 2.0 bilgisayar programı kullanarak birbirleri arasında yapılan karşılaştırılma sonuçları | 60 |

## ÇİZELGE LİSTESİ

|                                                                                                                                                                 | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Çizelge 1.1.1.</b> <i>D.immitis</i> 'in köpek ve arakonak sivrisinekte gelişimi                                                                              | 8                      |
| <b>Çizelge 1.1.2.</b> <i>Dirofilaria repens</i> 'in köpek ve arakonak sivrisinekte gelişimi                                                                     | 9                      |
| <b>Çizelge 1.1.3.</b> Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda <i>Dirofilaria immitis</i> 'in yaygınlığı                                                            | 12                     |
| <b>Çizelge 1.1.4.</b> Ticari Kitlerin Karşılaştırılması                                                                                                         | 21                     |
| <b>Çizelge 1.2.1.</b> <i>Wolbachia</i> 'nın farklı konaklardaki karakterizasyonu                                                                                | 25                     |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Aydın ve İzmir'de incelenen köpeklerin yerleşim yerlerine, sahipli / sahipsiz olma, içerde/ dışarıda barındırılma durumlarına göre dağılımı | 34                     |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Aydın ve İzmir'de incelenen köpeklerin yerleşim yerine, yaş ve cinsiyetine göre dağılımı                                                    | 35                     |
| <b>Çizelge 2.3.</b> PCR ile teşhisinde kullanılan primer çiftleri, bunların çoğalttığı gen bölgeleri ve çoğaltılan ürünlerin uzunlukları                        | 42                     |
| <b>Çizelge 3.1.</b> <i>Dirofilaria immitis</i> bulunan kan örneklerinin farklı teşhis yöntemleri ve toplandıkları yerleşim yerlerine göre dağılımı              | 46                     |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Pozitif bulunan örneklerin yerleşim yeri, yaş cinsiyete göre dağılımı                                                                       | 55                     |
| <b>Çizelge 3.3.</b> H1-HR (HS156 – M) <i>Wolbachia</i> 'nın ftsZ geni ile karşılaştırılması                                                                     | 57                     |
| <b>Çizelge 3.4.</b> H2-HR (Köpek-27) <i>Wolbachia</i> 'nın ftsZ geni ile karşılaştırılması                                                                      | 58                     |
| <b>Çizelge 3.5.</b> H3-HR (HS161 – M) <i>Wolbachia</i> 'nın ftsZ geni ile karşılaştırılması                                                                     | 59                     |

# 1.GİRİŞ

## 1.1. *DIROFILARIA*

### 1.1.1.Sınıflandırma ve Tarihçe

Köpeklerde bulunan *Dirofilaria* etkenlerinin sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir (Watts ve ark 1999, Anderson 2000, Rommel ve ark 2000).

Sınıf: *Nematoda*

Sınıf altı: *Secernentea*

Familya üstü: *Filarioidea*

Familya: *Onchocercidae*

Familya altı : *Dirofilarinae*

Cins : *Dirofilaria*

Tür : *Dirofilaria immitis*

*Dirofilaria repens*

*Dirofilaria tenius*

*Dirofilaria striata*

*Dirofilaria conjunctivae*

*Dirofilaria ursi*

*Dirofilaria subdermata*

*Dirofilaria corynodes*

*Dirofilaria spectans*

*Dirofilaria roemeri*

*Dirofilaria acutiuscula*

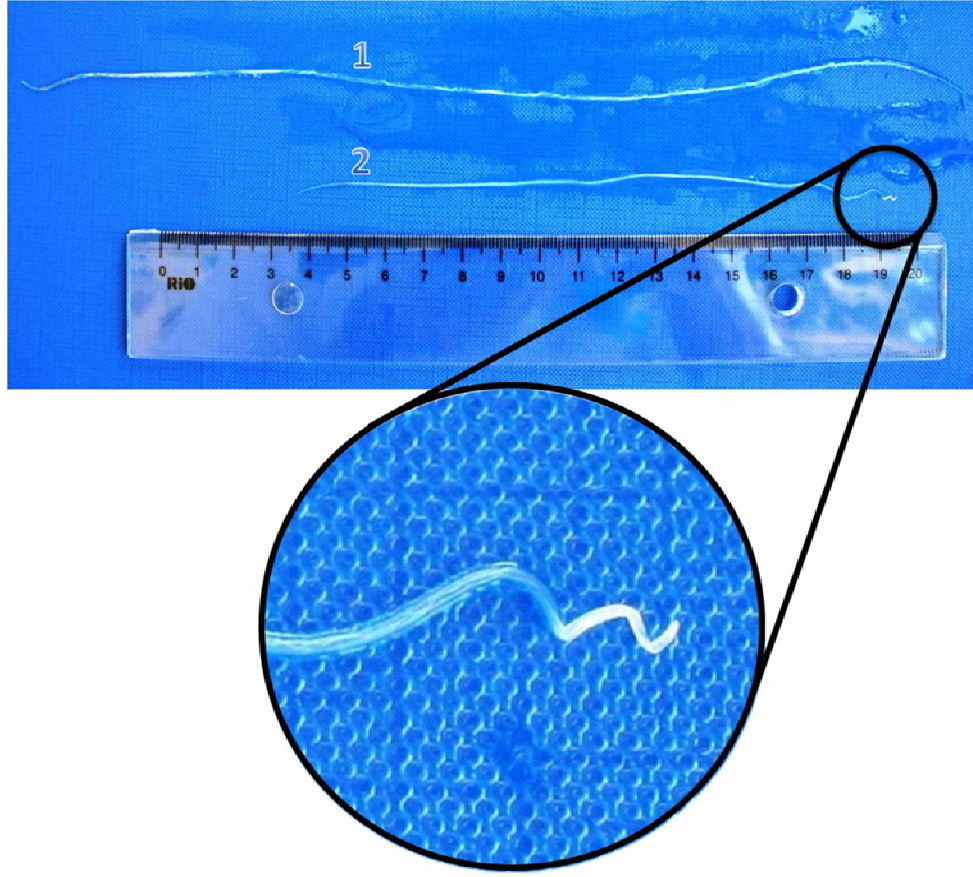
*Dirofilaria immitis* ilk olarak 1856 yılında Filedelfiya’da fizikçi ve doğa bilimci olan Joseph Leidy tarafından Alabama’dan gelen bir köpekte tanımlanmış ve *Filaria immitis* olarak isimlendirilmiştir. 1911 yılında Fransız parazitologlar Railliet ve Henry’nin *Dirofilaria* cinsini oluşturmasıyla *Dirofilaria immitis* (Leidy,1856) olarak isimlendirilmiş ve taksonomideki yerini almıştır. *Dirofilaria repens*, ilk olarak 1911 yılında Railliet ve Henry tarafından bulunmuştur (Jackson 1989, Anderson 2000, Genchi ve ark 2007).

Türkiye’de ilk kez Doğanay ve ark. (1951) Ankara’da yurtdışı kökenli bir köpekte *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerine rastlamışlardır. Pamukçu ve Ertürk (1962) 1933-1960 yılları arasında Ankara’da yaptıkları 169 köpek nekropsisinde, yabancı menşeli bir köpekte *D. immitis* erişkinlerini tesbit edilmiştir. Yerli ırk köpeklerde *D. immitis* ilk olarak Elazığ yöresinde bulunmuştur. *Dirofilaria repens* Türkiye’de ilk olarak 1970 yılında İstanbul’da birbirinden bağımsız bir köpek ve bir insanda bildirilmiştir (Merdivenci 1970b, Merdivenci ve İçli 1970, Berkin ve Alçigir 1986, Sarnıç ve Alkan 1986).

### **1.1.2.Morfoloji**

#### **1.1.2.1. *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)**

*Dirofilaria immitis*’in erişkinleri uzun, ince ve beyaz renkte olup küçük yuvarlak bir ağıza sahiptir. Ağız organeli, 6 küçük median papil ve 2 lateral papille çevrelenmiştir. Erişkin dişiler 250-310 mm uzunluğunda ve 1-1,3 mm genişliğindedir. Arka uçları yuvarlak bir şekilde sonlanır. Erişkin erkekler ise 120-200 mm uzunluğunda ve 0,7-0,9 mm genişliğinde olup arka uçları spiral şeklinde kıvrım yaparak sonlanır (Şekil 1.1.1). Kuyrukta, küçük kaudal kanat ile 5 çift perianal, 6 çift postanal papil yer alır. Spikülümner eşit olmayıp sağ spikülüm 175-229 µm, sol spikülüm 300-375 µm’dir. Dişilerde vulvanın ön uca uzaklığı 2,7 mm, anüsün arka uca uzaklığı ise 175 µm’dir (Genchi ve ark 2007). Kanda görülen mikrofilerleri 290-330 µm uzunluğunda ve 5-7 µm genişliğinde, kılıfsız, düz bir vücut ile kuyruğa sahip olup ön kısmı gittikçe incelerek sonlanmaktadır (Şekil 1.1.2) (Barriga 1982, Genchi ve ark 2007, Rommel ve ark 2000).



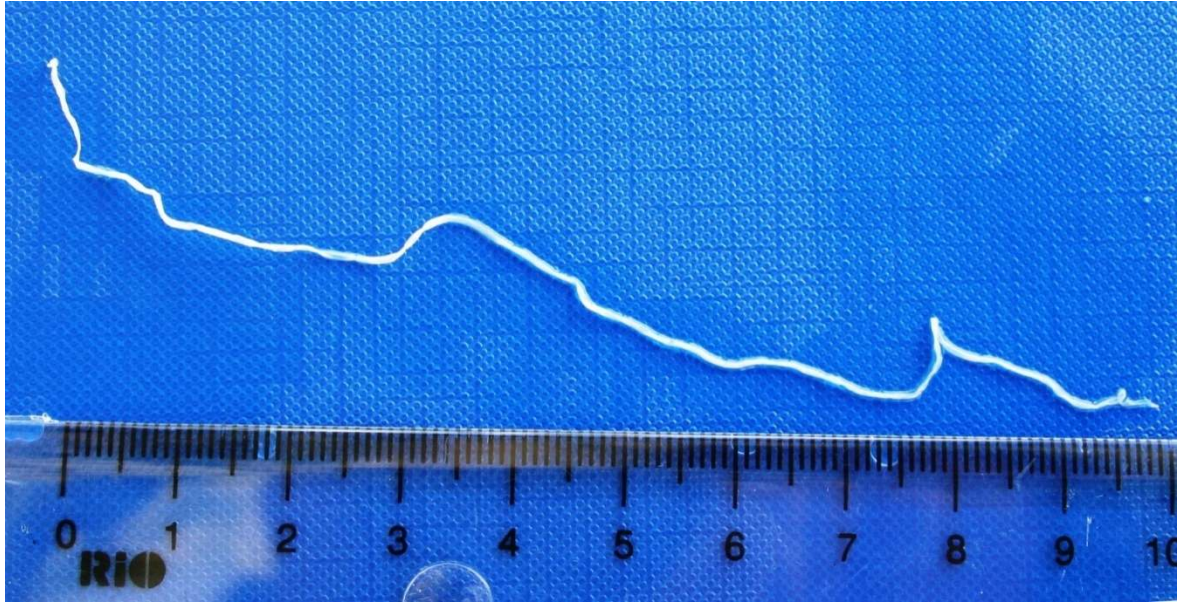
Şekil 1.1.1. Erişkin dişi (1) ve erkek (2) *Dirofilaria immitis* (Orijinal)



Şekil 1.1.2. *Dirofilaria immitis* mikrofilari (Orijinal)

### 1.1.2.2. *Dirofilaria repens* (Railliet ve Henry, 1911)

*Dirofilaria repens* erişkinleri beyaz sarı renkte, uzun, ince olup ön ve arka uçları incelererek konik biçimde sonlanır. Kütikula düz ve parlaktır. Ön uçta küçük bir ağız boşluğu yer alır. Erişkin dişileri 100-170 mm uzunlukta ve 4,6-6,5 mm genişliğinde olup vulva önden 1150-2710  $\mu\text{m}$ , anüs arkadan 70-119  $\mu\text{m}$  uzaktadır. Erkekler 50-70 mm uzun ve 370-450  $\mu\text{m}$  geniş olup arka uçta kaudal kanatta sağda 2-6, solda 4-5 preanal papil ile 2-6 postanal papil taşırlar. Spikülömler eşit olmayıp sağ 180-210  $\mu\text{m}$ , sol 460-590  $\mu\text{m}$ 'dir. Mikrofilerleri 300-360 mm uzunluğunda ve 6-8  $\mu\text{m}$  genişliğindedir (Şekil 1.1.3) (Genchi ve ark 2007, Taşan 1983, Yıldırım 1998).



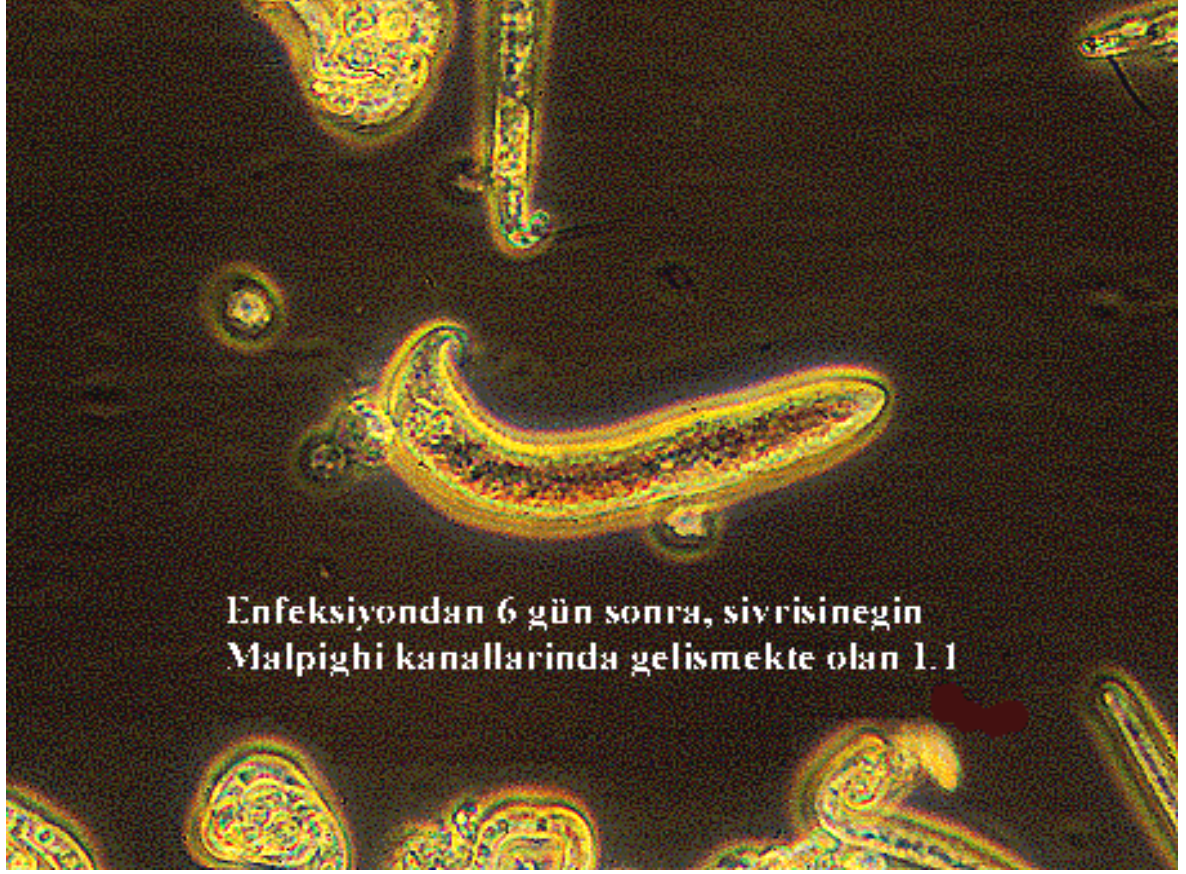
Şekil 1.1.3. Erişkin *Dirofilaria repens* (Orjinal)

### 1.1.3. Biyoloji

Filarial nematodlar ara konaklı bir gelişim göstermektedir. Son konağın perifer kan dolaşımı veya doku lenf aralıklarında bulunan mikrofilerler (1. dönem larvalar) başta bazı sinek ve sivrisinek türleri olmak üzere çeşitli artropodlar tarafından kan emme sırasında kanla birlikte alınırlar. Ara konakta enfektif döneme ulaşan larvalar vücut boşluğuna

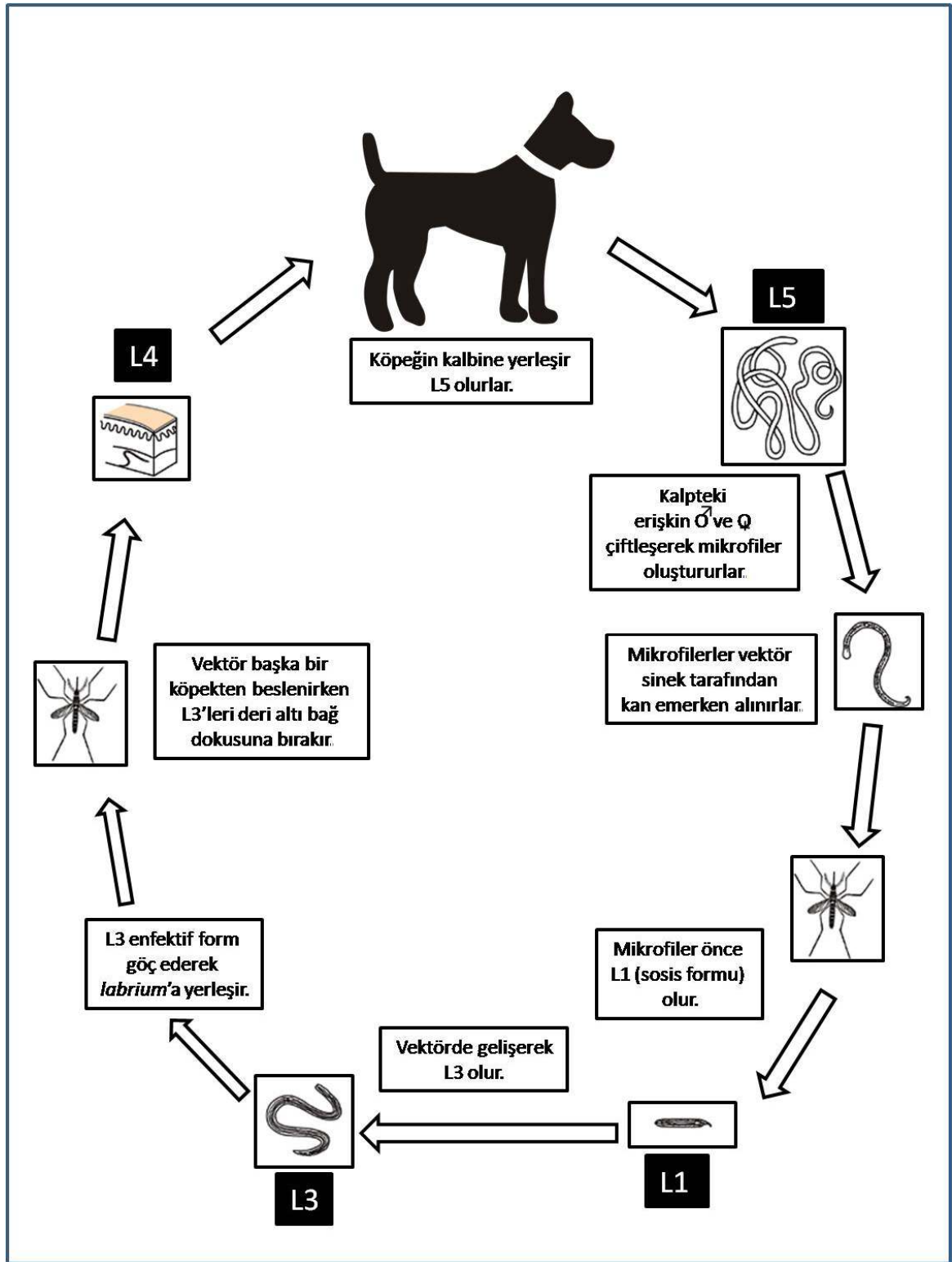
geçip, proboscise yerleşmektedir. Bir sonraki kan emme esnasında enfektif 3. dönem larvalar son konağa geçerek gelişimlerini tamamlamaktadır (Soulsby 1982).

*Dirofilaria immitis*'in biyolojisinde *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* ve *Psorophora* cinslerine bağlı 60'ın üzerinde sivrisinek türü vektör görevini görmektedir. Olgun parazitler karnivorlarda, kalbin sağ ventrikulusu ile pulmoner arterlere yerleşirken mikrofilerleri perifer kan, iç organlar ve serebrospinal sıvıda bulunur (Bowman 1999, Fırat ve ark 2005, Çakıroğlu ve Meral 2007, Genchi ve ark 2007, Yalçın ve ark 2007). Erişkin dişi parazitte gelişen yumurtalar ince bir zarla çevrilidirler. Daha sonra ebriyonun gelişip uzaması ile bu zar kılıf halini alır. Mikrofilerler yumurtayı terk ederken kılıf kaybolur ve periferal kana geçen mikrofiller kılıfsız görülürler. Dişi sivrisinekler kan emerken mikrofilerleri alırlar. Mikrofilerler uygun sıcaklıkta (26<sup>0</sup>C'de) orta bağırsak kısmını terk edip malphighi kanallarına göç ederler. Yaklaşık 4. güne doğru larvalar hareketsizleşir, kalınlaşır ve boyları kısalarak sosis formunu alırlar (Şekil 1.1.4). Sonra 10. günde malphighi kanallarında gömlek değiştirir ve 2. dönem larvalar gelişir. Bu aşamada larvalar yeniden uzayarak sindirim ve genital kanalları gelişir. Enfestasyondan 13 gün sonra ikinci gömlek değiştirme meydana gelir ve 3. dönem larvalar oluşur. Bu dönemdeki larvalar 1 mm uzunluğundadır. Bu 3. dönem larvalar, sivrisineğin mikrofilerleri alımından yaklaşık 15 gün sonra malphighi kanallarını parçalarlar ve hemosel yoluyla sivrisineğin baş ve ağız kısmına göç ederek labriuma yerleşirler (Grieve ve ark 1983, Yıldırım 1998, Bowman 1999, Çakıroğlu ve Meral 2007, Genchi ve ark 2007).



**Şekil 1.1.4.** Sivrisinekte malpighi kanalında *Dirofilaria immitis* larvası (L<sub>1</sub>) (Johnstone, 2000)

Köpekler enfekte sivrisineklerin kan emmesi sırasında 3. dönem larvaları alırlar. Son konağın kas dokusuna geçen 3. dönem larvalar aktif göçle derialtı bağ dokusuna girer. Daha sonra üst karın bölgesi ve göğüs boşluğundaki kaslara göç ederek 4. dönem larva halini alırlar. Dördüncü dönem larvalar enfeksiyondan 70-80 gün sonra tekrar gömlek değiştirerek 5. dönem larva (4-20 gün) veya genç olgun olurlar. Bunlar enfeksiyondan yaklaşık 70-100 gün sonra kalbe ulaşırlar ve 100-150 inci güne kadar göçlerini tamamlayıp seksüel olgunluğa erişirler. Seksüel olgunluğa ulaşan erkek ve dişi *Dirofilaria* etkenleri çiftleşirler ve sivrisinek tarafından ilk etkenin konağa nakledilmesinden 190-240 gün sonra mikrofilerler kanda görülmeye başlar (Şekil 1.1.5) (Çizelge 1.1.1) (Grieve ve ark 1983, Yıldırım 1998, Bowman 1999, Hise ve ark 2004, Genchi ve ark 2007).



Şekil 1.1.5. *Dirofilaria immitis*'in biyolojik siklusu (Orijinal)

**Çizelge 1.1.1. *Dirofilaria immitis*'in köpek ve arakonak sivrisinekte gelişimi**  
(Genchi ve ark 2007)

| Sivrisinekteki<br>gün sayısı | Köpekdeki<br>gün sayısı | Evre                | Uzunluk(mm) | Konak      | Lokalizasyon             |
|------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------|------------|--------------------------|
|                              |                         | Mikrofiler          | 0,030       | Köpek      | Kan                      |
| 1                            |                         | Mikrofiler          | 0,030       | Sivrisinek | Orta bağırsak            |
| 5                            |                         | Sosis formu         | 0,015       | Sivrisinek | Malpighi tubul hücreleri |
| 10                           |                         | L2                  | 0,05        | Sivrisinek | Malpighi tubul lümeni    |
| 15                           |                         | L3                  | 1           | Sivrisinek | Hortum                   |
|                              | 1-15                    | L3                  | 1,5         | Köpek      | Subkutanöz doku          |
|                              | 3-80                    | L4                  | 3-7         | Köpek      | Subkutanöz/Kas doku      |
|                              | 70-150                  | L4-L5               | 4-13        | Köpek      | Subkutanöz/Kas doku      |
|                              | 100-160                 | L5                  | 4-20        | Köpek      | Karın/Göğüs boşluğu      |
|                              | 150-270                 | Gebe dişi-<br>Erkek | 25-30       | Köpek      | Pulmoner arter/Sağ kalp  |

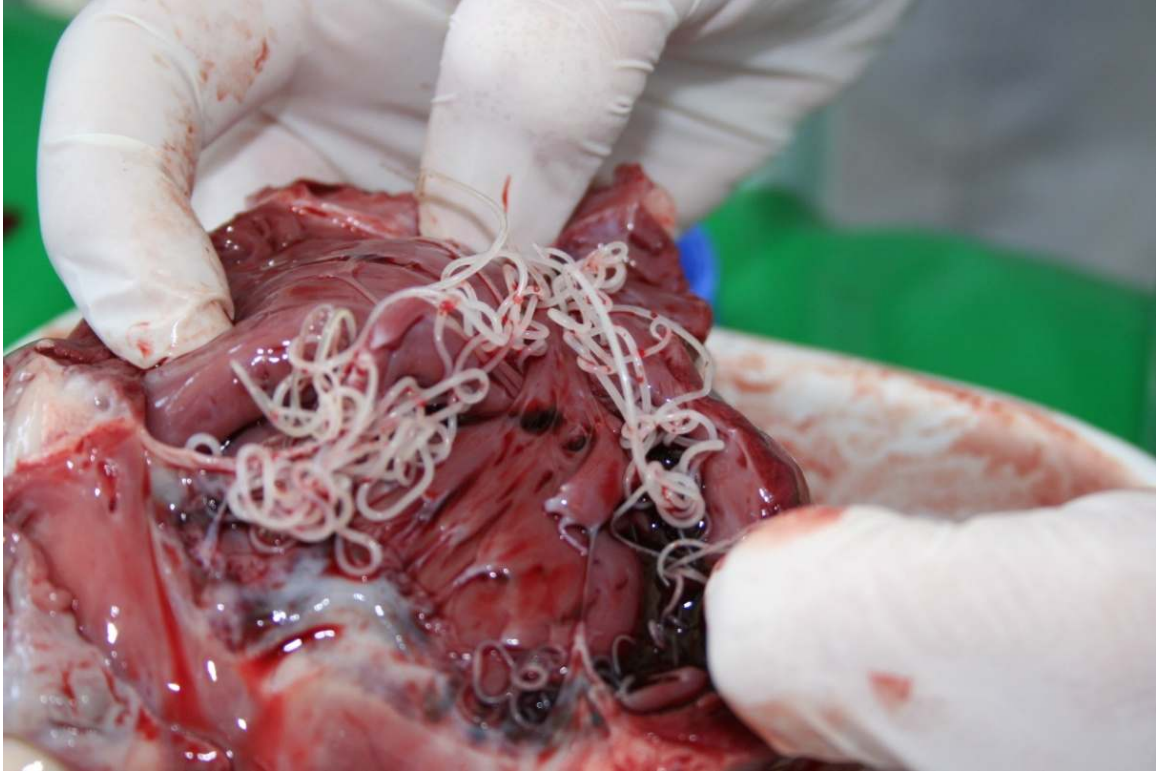
*Dirofilaria repens*'in biyolojisi *D. immitis*'e benzer, arakonak görevini *Anopheles*, *Aedes*, *Armigeres*, *Mansonia* ve *Culex* cinslerine bağlı sivrisinekler ile Tabanidae ailesine bağlı *Haematopoda variegata*'nın üstlendiği kaydedilmektedir. Son konak tarafından alınan enfektif 3. dönem larvalar gelişimini tamamlayıp derialtı dokulara yerleşerek olgun *D. repens* haline gelmektedir. Prepatent süre 25-34 haftadır (Çizelge 1.1.2) (Grieve ve ark 1983, Yıldırım 1998, Bowman 1999, Anderson 2000, Genchi ve ark 2007).

**Çizelge 1.1.2. *Dirofilaria repens* 'in köpek ve arakonak sivrisinekte gelişimi**  
(Genchi 2007)

| Sivrisinekteki<br>gün | Köpekteki<br>gün | Evre               | Uzunluk(mm) | Konak      | Lokalizasyon                         |
|-----------------------|------------------|--------------------|-------------|------------|--------------------------------------|
|                       |                  | Mikrofiler         | 0,035       | Köpek      | Kan                                  |
| 1                     |                  | Mikrofiler         | 0,035       | Sivrisinek | Orta bağırsak                        |
| 2-7                   |                  | Sosis<br>formu     | 0,015       | Sivrisinek | Malpighi tubul<br>hücreleri          |
| 6-9                   |                  | L2                 | 0,05        | Sivrisinek | Malpighi tubul lümeni                |
| 10-20                 |                  | L3                 | 1           | Sivrisinek | Hortum                               |
|                       | 1-15             | L3                 | 1           | Köpek      | Subkutanöz doku                      |
|                       | 3-70             | L4                 | Bilinmiyor  | Köpek      | Bilinmiyor                           |
|                       | 70-150           | L4-L5              | Bilinmiyor  | Köpek      | Bilinmiyor                           |
|                       | 180-240          | Gebe<br>Dişi-Erkek | 10-17       | Köpek      | Subkutanöz doku<br>Perimusküler doku |

#### 1.1.4. Epizootiyoloji

*Dirofilaria immitis* başta köpek olmak üzere kedi, tilki, kurt, dingo, kaplan, panda, şempanze, orangutan, fok balıkları, su samuru, tavşan, geyik, at ve insanda kalbin sağ ventrikulusu, pulmoner arter, sağ atrium ve vena cava'ya, ender olarak *Camera oculi anterior* ve periton boşluğuna yerleşmektedir (Şekil 1.1.6). Mikrofilerleri ise perifer kanda görülür. *Dirofilaria repens* köpek, kedi, genet kedisi, aslan, tilki sporadik olarak da insanların deri altı bağ dokusuna yerleşen bir parazittir (Şekil 1.1.7) (Genchi ve ark 2007, Lee ve ark 2007).



Şekil 1.1.6. Kalpte *Dirofilaria immitis* erişkinleri (Orijinal)



Şekil 1.1.7. Konjuktivadan çıkarılan bir *Dirofilaria repens* (<http://kutyavari.blog.hu/>)

Filarial parazitlerin epidemiyolojisinde iklim ve çevre koşulları (sıcaklık, nem), konak ve arakonak popülasyonu, konak bağışıklığı ile parazitin konaktaki yaşam süresi önemlidir. *Dirofilaria immitis* enfeksiyonunda, olgun parazitlerin üreme periyodunun 2-7 yıla, yaşam sürelerinin 7 yıla kadar sürebildiği kaydedilmektedir. Perifer kandaki mikrofilerlerin ise 2-7,5 yıl canlılıklarını sürdürebildiği belirtilmekte ve transplasental geçiş sonucunda neonatal yavrularda mikrofilerlerin görülebileceği kaydedilmektedir. Son konağa giren larvaların yaklaşık %30-50'sinin olgun döneme ulaşabildiği bildirilmektedir. *Dirofilaria immitis* enfeksiyonlarında mikrofilareminin günlük ve sezonluk periyotlar gösterdiği (Barriga 1982), subperiodik olarak karakterize edildiği, mikrofilerlerin her zaman görülebilmesine karşın perifer kandaki en yüksek düzeyin akşam ve gece saatlerine (nokturnal) rastlandığı kaydedilmiştir. Ayrıca perifer kandaki mikrofilerlerin, kısmen çevre sıcaklığına bağlı olarak, sıcak aylarda belirgin bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Tınar 2006).

Vektör görevi gören sivrisinekler tatlı ve tuzlu su, büyük veya küçük su birikintileri, bataklık alanlar gibi farklı akuatik ortamlarda gelişebilmekte ve bu bölgeler enfeksiyon için risk taşımaktadır. *Dirofilaria immitis* ve diğer filarial türler üzerinde yapılan çalışmalarda, arakonaktaki gelişim için 24-32°C'nin ideal olduğu, 21°C'nin altındaki sıcaklıkların gelişmeyi geciktirdiği, 16°C'nin altındaki sıcaklıkların ise parazitler için ölümcül olduğu bildirilmektedir (Anderson 2000). Köpeklerin enfeksiyona duyarlı olması, yeterli sayıda sivrisinek yoğunluğu ve uygun sıcaklıktaki patent enfeksiyon alanlarının bulunması yeni enfeksiyon odaklarının oluşması için yeterlidir. Filaria türlerine karşı konak bağışıklığı oluşmamakta ancak bazen *D.immitis* enfeksiyonlarında, immun kökenli reaksiyonlar sebebiyle mikrofilerlerin ortadan kalkabildiği kaydedilmektedir (Barriga 1982).

*Dirofilaria* türleri dünya genelinde yaygın olarak bulunmaktadır. Türkiye'de *Dirofilaria* türleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. *Dirofilaria* türlerine vektörlük yaptığı bilinen *Anopheles*, *Aedes*, *Culex* ve *Mansonia* cinsine bağlı sivrisinek türleri, kene türlerinden *Rhipicephalus sanguineus* ile pire türlerinden *Ctenocephalides felis*, *C.canis* ve *Pulex irritans*'ın (Barriga 1982; Grove 1982; Anderson 2000) Türkiye'deki varlığı bilinmekle birlikte (Merdivenci 1970a; Özcel ve Daldal 1997) bu

artropodların filariaların biyolojisindeki vektörlüklerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Türkiye’de yapılan bazı çalışmalarda *Dirofilaria immitis*’in yaygınlığı aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.1.3).

**Çizelge 1.1.3.** Türkiye’de yapılan bazı çalışmalarda *Dirofilaria immitis*’in yaygınlığı

| Yer       | Yaygınlık (%) | Kaynak                                                                  |
|-----------|---------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Ankara    | 0,6-9,3       | Pamukçu ve Ertürk, 1961; Zeybek 1989; Zeybek ve ark 1992, Yıldırım 1998 |
| Afyon     | 3,6-5         | Doğanay 1983; Kozan ve ark 2007                                         |
| Elazığ    | 5-9,1         | Taşan, 1984; Balıkcı ve Sevgili 2005                                    |
| Eskişehir | 1,4-30        | Sarnıç ve Alkan 1986; Kozan ve ark. 2007                                |
| Bursa     | 0,2-2,98      | Tınar ve ark, 1989; Coşkun ve ark; 1992, Yalçın ve ark 2007             |
| Kayseri   | 9,6-12        | Şahin ve ark 1993; Yalçın ve ark 2007                                   |
| Sivas     | 6             | Ataş ve ark 1997                                                        |
| İstanbul  | 1,52          | Öncel ve Vural 2003                                                     |
| Aydın     | 13,9          | Voyvoda ve ark 2004                                                     |
| Şanlıurfa | 5,5-10,5      | Şahin ve ark 2004                                                       |
| Van       | 17.8          | Göz ve ark 2007                                                         |
| Samsun    | 0             | Çakıroğlu ve Meral 2007                                                 |
| Kırıkkale | 27,46         | Yıldız ve ark 2008                                                      |
| Hatay     | 26            | Yaman ve ark 2009                                                       |

### 1.1.5. Patogenez ve Klinik Bulgular

Köpeklerde *Dirofilaria sp.*'nin oluşturduğu patojenite, parazitin türü, sayısı, lokalizasyon yeri, hayvanın genel durumu gibi faktörlere bağlıdır.

*Dirofilaria immitis*, köpeklerde meydana getirdiği enfeksiyon bakımından diğer filarial etkenlere göre daha patojendir. Kalp ve pulmoner arterlerde lokalize olarak kanla beslenen *D.immitis*'in olgunları pulmoner sirkülasyonu, kalp, karaciğer ve böbrekleri etkileyen çeşitli sistematik bozukluklara sebep olmaktadır (Yıldırım 1998, Bowman 1999).

*Dirofilaria immitis*'in neden olduğu pulmoner arterlerdeki genişleme, emboli ve düzensiz görünüm; pulmoner hipertansiyon, sağ ventriküler dilatasyon ve hipertrofiye (cor pulmonale) yol açarak sağ ventriküler yetmezliğe neden olmaktadır. Ayrıca parazite karşı ortaya çıkan yangı hücrelerinin artışı ile yüksek antikor düzeyinin pulmoner kapillardaki mikrofilere yıkımlaması sonucu akciğerlerde non-enfeksiyöz pnömoni ("pulmoner eozinofilik granulomatosis") tablosu şekillenebilmektedir. Parazitlerin kendiliğinden veya tedavi sonrası ölümü, pulmoner thromboembolisme sebep olarak akciğer parankimasında periarteriel granülomlar oluşabilmektedir (Bowman 1999).

Dirofilariasis'in patolojisindeki en önemli faktörlerden birisi de sağ ventrikulusa yerleşen parazitlerin sayısıdır. Fazla sayıda parazit ventrikulus hacminin önemli bir bölümünü işgal ederek buradan akciğerlere pompalanan kan miktarının azalmasına neden olurlar. 100'den fazla sayıda parazit olduğu takdirde kalbin sağ bölümünün tamamen parazitlerle dolmasına ile oluşan 'Caval Sendrom' olarak bilinen tablo en ağır seyreden form olup köpeklerin ölümüne neden olmaktadır (Yıldırım 1998, Anon 1999, Bowman 1999, Simon ve ark 2007).

Enfekte köpekler tedavi edilmediği takdirde immun sistem kronik olarak uyarılır. Yüksek düzeyde bulunan antikorlar göz, böbrek, kan damarları ve eklemlerin hassas membranlarında presipite olarak bir çok bozukluğa sebebiyet verebilir. Bu alanlara yerleşen antikorlar bölgeye yangı hücrelerinin gelmesine sebep olarak büyük bir doku

hasarı ve ağrı tablosunun ortaya çıkmasına neden olur (Yıldırım 1998, Anon 1999, Simon ve ark 2007).

Mikrofillerin kandaki yoğunluğunun artması çeşitli damarlarda tıkanmalara neden olur. Parazitin mikrofillerine karşı gelişen aşırı duyarlılık neticesinde enfekte hayvanda kaşıntı, papüllü ve ülserli dermatit gibi çeşitli deri hastalıkların ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmiştir (Anon 1999, Bowman 1999, Simon ve ark 2007).

*Dirofilaria immitis* enfeksiyonu kalpteki parazit sayısına bağlı olarak daha çok subklinik olarak seyretmektedir. Klinik belirtilerin kalpteki parazit sayısı 25'in üzerine çıktığında daha belirgin olduğu kaydedilmektedir. Kalpte bulunan etkenlerden dolayı ortaya çıkan kalp yetmezliği, hasta hayvanlarda egzersiz intolerans ile birlikte göğüs ve periton boşluğunda sıvı toplanması, kronik öksürük, solunum güçlüğü, anormal akciğer ve kalp sesleri ve aritmi gibi belirtilere neden olmaktadır. Caval sendromda genellikle zayıflama, anoreksi, dispne, müköz membranlarda solgunluk ve sarılık, hepatomegali, sencep, taşipne, taşikardi, ekstremitelerde ödem ve şok ile birlikte bilirubinemi, bilirubinuri ve hastalık için daha spesifik olan hemoglobinuri ortaya çıkmaktadır (Yıldırım 1998, Bowman 1999).

Zaman zaman olgun parazitler geniş damarlar ve kalbin dışında diğer doku ve organlara giderek ektopik enfeksiyon tablosunun oluşmasına neden olabilir. Parazitlerin göze gitmesi sonucunda konjuktival akıntı, fotofobi ve keratit gibi semptomlar ortaya çıkar. Santral sinir sistemine göç durumunda parazitler genellikle serebral arterlere veya lateral ventrikuluslara yerleşir. Semptomlar değişiklik göstermekle birlikte konvülzyon, körlük, ataksi, salyada artış, bitkinlik ve koma gözlenir. Sistemik arterlere ektopik yerleşim en çok arka bacaklarda görülür (Johnstone 2000).

*Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerin %10-67'sinde perifer kanda mikrofiler görülmemekte ve bu duruma gizli enfeksiyon adı verilmekte ve şu şekilde açıklanmaktadır;

- 1- Bütün erişkin parazitler aynı cinsiyette olabilir.
- 2- Parazitler henüz gelişme döneminde olabilir.
- 3- Köpek mikrofilarial etkili bir ilaçla sağaltılmış olabilir.
- 4- Yüksek düzeyde oluşan antikorlar mikrofilerleri ortadan kaldırmış ve aynı zamanda erişkin dişileri steril hale getirmiş olabilir.

Bunun tersi bir durumda söz konusudur. Kalpte erişkin parazitler olmadığı halde, kanda mikrofilerler görülebilir. Bu durum da şöyle açıklanmaktadır;

- 1- Mikrofilerler anneden yavruya transplasental olarak geçmiş olabilirler.
- 2- İlaç uygulaması erişkin parazitleri etkilemiştir. Fakat mikrofilerler 2-4 yıl kadar canlı kalabilirler.
- 3- Kan nakli ile mikrofilerleri almış olabilir.

Köpeklerde derialtı bağdokusuna yerleşen *Dirofilaria repens* çoğunlukla asemptomatik seyretmekle (Rommel ve ark 2000) birlikte bazen kaşıntılı ve ağrılı ekzematöz lezyonlar ile nodüllere sebep olabilebildiği bildirilmektedir (Yıldırım 1998, Bowman 1999, Rommel ve ark 2000, Simon ve ark 2007).

#### **1.1.6. Teşhis Yöntemleri**

Köpeklerdeki filarial nematodların teşhisinde klinik, parazitolojik, moleküler (PCR), immunoserolojik yöntemler ile radyoloji, anjiyografi ve ultrasonografi gibi diğer bazı tanı yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

Klinik olarak dirofilariasiden şüphe edilen hayvanlarda teşhis için; direk kan muayene yöntemi (Natif), sürme preperat yöntemi, saponin konsantrasyon yöntemi, mikrohemitokrit-kapillar sedimentasyon yöntemi, modifiye knott tekniği, membran filtrasyon tekniği, asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemi, IFAT (İndirekt Fleuresan

Antikor Testi), ELISA (Enzyme-linked İmmuno-Assay) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) gibi metotlar kullanılır (Özcel ve Altıntaş 1997, Yıldırım 1998).

#### **1.1.6.1. Direk Kan Muayene Yöntemi**

Lam lamel arasına alınan 1-2 damla kan örneği mikroskop altında incelenerek, kanda mikrofililer aranmaktadır. Eritrosit yoğunluğu nedeniyle mikrofililerin görülmesi zor olduğu için, eritrositleri parçalamak amacıyla, incelenecek kan örneğine bir damla %2 saponin veya %0,04 Amonyum hidroksit ilave edilir (Kelly 1973, Özcel ve Altıntaş 1997).

#### **1.1.6.2. Sürme Preparat Yöntemi**

Lam üzerine alınan bir damla kan örneğinden sürme preparat hazırlanarak ya hareketli mikrofililer yönünden ya da havada kurutulduktan sonra tespit edilerek çeşitli boya yöntemleri ile boyanıp, morfolojik özellikleri bakımından incelenir (Özcel ve Altıntaş 1997).

#### **1.1.6.3. Saponin Konsantrasyon Yöntemi**

İki ml antikoagulantlı kan örneği, 1 ml %2 saponin ile 5 ml'lik enjektörde homojenize edildikten sonra 4500 rpm'de 1 dk santrifüj edilir. Üst sıvı atıldıktan sonra çökeltiden alınan örnekler lam-lamel arasında mikroskopta mikrofililer yönünden incelenmektedir (Kelly 1973).

#### **1.1.6.4. Mikrohematokrit-Kapillar Sedimentasyon Yöntemi**

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

mikrofilerlerin morfolojik özellikleri incelenir (Kelly 1973, Özcel ve Altıntaş 1997, Genchi ve ark 2007).

#### **1.1.6.5. Modifiye Knott Tekniği**

Bir ml antikoagulantlı kan örneği, 9 ml %2'lik formalin (2 ml konsantre [%37] formaldehit, 100 ml distile su) ile 10 ml ye tamamlandıktan sonra 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek, süpernatant atılır (10 ml karışım için yaklaşık 1/4 sediment yeterlidir) ve sediment eşit hacimde %0,1'lik metilen mavisi ile karıştırılır. Sedimentten alınan örnekler lam-lamel arasında mikroskop altında mikrofiler ölçüleri ile diğer morfolojik özellikleri yönünden incelenir (Kelly 1973, Genchi ve ark 2007)

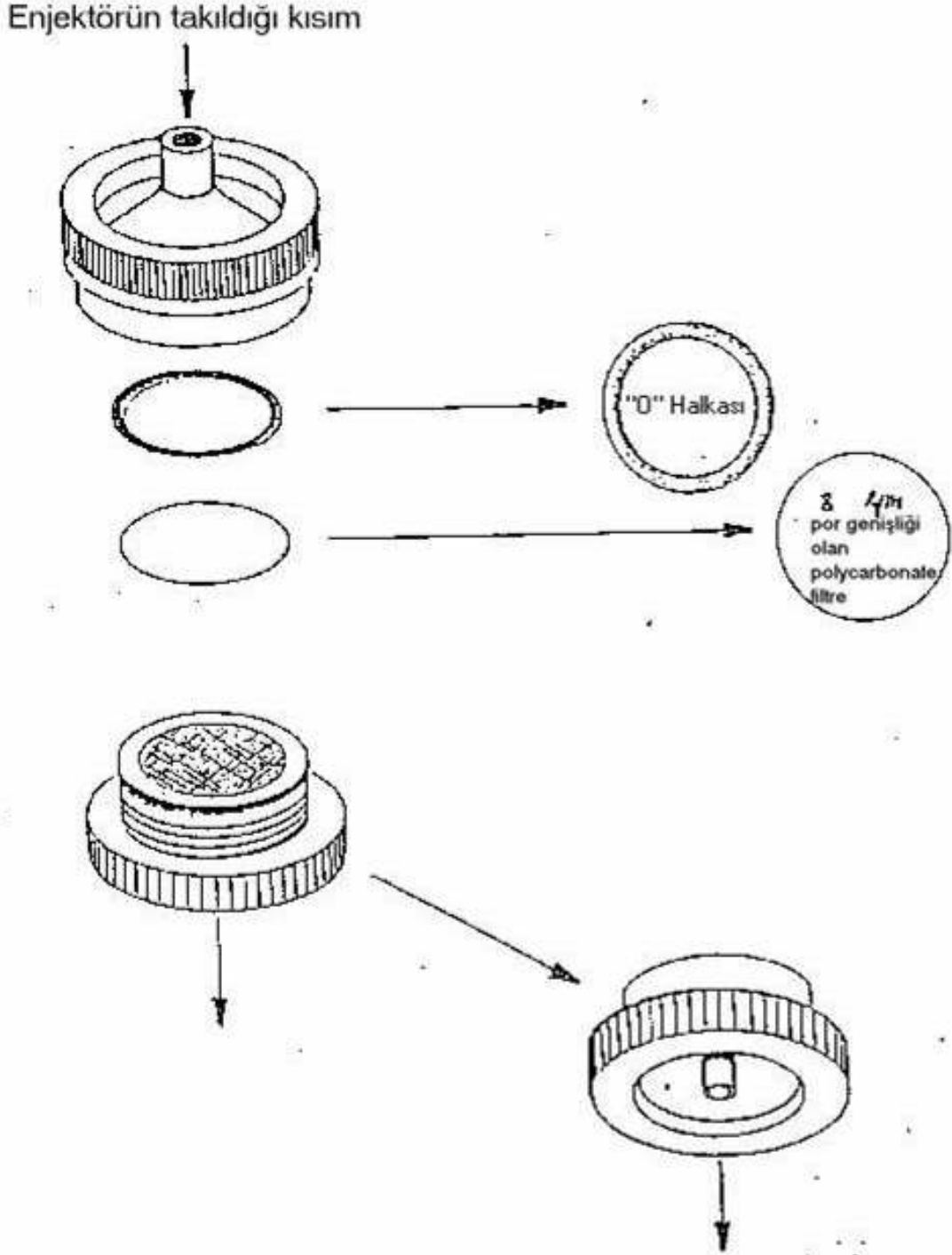
#### **1.1.6.6. Membran Filtrasyon Tekniği**

Bir ml antikoagulantlı kan örneği 9 ml eritici solüsyon (8gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1000 ml distile su, 5 ml Triton X-100; %2 formalin; fizyolojik tuzlu su ile homojenize edilmiş Teepol) ile 10 ml'lik enjektörde karıştırıldıktan sonra içinde 25 mm çapında 3, 5 veya 8µm por genişliğinde plastik, selüloz veya polikarbonat filtreden geçirilir. Aynı enjektör vasıtasıyla 2-3 kez distile su geçirildikten sonra 2-3 defa da hava enjekte edilerek filtre üzerinde sıvı kalmaması sağlanır (Şekil 1.1.8) (Kelly 1973, Genchi ve ark 2007). Tutucudan çıkartılan filtreler lam-lamel arasında mikroskopta incelenir. Mikrofilerlerin daha rahat görülmesi için filtre üzerine bir damla %0,01 metilen mavisi ilave edilir ya da mikrofilerin yapısını incelemek için filtreler havada kurutulur, tespit edilir ve daha sonra amaca yönelik olarak boyanır (Kelly 1973, Özcel ve Altıntaş 1997, Genchi ve ark 2007).

#### **1.1.6.7. Asit Fosfataz Histokimyasal Boyama Yöntemi**

Son zamanlarda mikrofilerlerin ayırıcı teşhisinde yaygın olarak kullanılan ve oldukça başarılı olan asit fosfataz histokimyasal boyama tekniğinde, kırmızı-kahverengi azo boyasının türlere göre farklı bant veya nokta tarzında, mikrofilerlerin çeşitli somatik doku ve hücrelerinde presipite olduğu kaydedilmektedir. Bu amaçla sürme preparat veya membran filtreleri, ya hazır kit ile (LEUCOGNOST-SP<sup>®</sup>, MERCK, 1.16304) ya da

naphtol AS-TR-phosphate boya solüsyonu hazırlanarak boyanmaktadır (Yıldırım 1998). Oda sıcaklığında 2-3 saat histokimyasal boya solüsyonu içerisinde inkübasyona bırakılan preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra %1'lik metilen yeşili veya Mayer's hemalum ile boyanır (Whitlock ve ark 1978, Yıldırım 1998). Tekrar su ile yıkanan preparatlar havada kurutulduktan sonra üzerine lamel kapatılarak mikroskopta, mikrofilerlerdeki asit fosfataz aktivitesi yönünden incelenir. Kan örneklerinin alımında antikoagulant madde olarak kullanılan EDTA'da, enzim aktivitesinin oluşması için gerekli magnezyum bağlandığından heparin sitrat, heparin oxalate veya sodyum sitratın seçiminin daha uygun olduğu kaydedilmektedir (Whitlock ve ark 1978, Peribanez ve ark 2001, Genchi ve ark 2007, ).



Şekil 1.1.8. Membran filtrasyon tertibatı (Nolan 2002).

Asit fosfataz aktivitesinin *D. immitis* mikrofilerlerinde boşaltım deliği (EP) ve anal delikte (AP) kırmızı-kahverenginde, nokta tarzında görüldüğü bildirilirken (Şekil 1.1.9) *D. repens* mikrofilerlerinde yalnızca anal delikte (AP) şekillenip yüzük (halka) tarzında görüldüğü saptanmıştır (Şekil 1.1.10) (Whitlock ve ark 1978, Özcel ve Altıntaş 1997, Yıldırım 1998).



Şekil 1.1.9. *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinde asit fosfataz aktivitesi X40(Orijinal)



Şekil 1.1.10. *Dirofilaria repens* mikrofilerlerinde asit fosfataz aktivitesi (Yıldırım 1998).

Kanda mikrofiler görülen köpeklerde kalpte erişkin parazit olup olmadığı serolojik yada radyolojik yöntemleri ile ortaya konulmalıdır (Toparlak ve Tüzer 2004).

#### 1.1.6.8. Serolojik Teşhis Yöntemleri

Antikor testlerinden ELISA'nın yüksek duyarlılıkta olduğu ancak bağırsakta yerleşen nematodlar ile özellikler *Toxocara canis* ile *Dirofilaria immitis* arasında çapraz reaksiyon vermesinin düşük spesifiteye neden olduğu kaydedilmektedir (Song ve ark 2002). Mevcut antijen testlerinin yalnızca dişi üreme organlarından kaynaklanan antijenlere karşı antikorları saptadığı, gelişmemiş veya sayılarının az olduğu durumlar (<3) ile yalnızca erkek parazitlerin mevcut olduğu durumlarda etkili sonuç alınmadığı kaydedilmektedir (Yıldırım 1998, Toparlak ve Tüzer 2004). Günümüzde bu amaçla antijen testi olarak ELISA, diğer testlere nazaran tercih edilmektedir. Bu amaçla kullanılan ticari kitlerin duyarlılıkları ile ilgili çalışmanın sonuçları çizelge 1.1.4'de belirtilmiştir (Courtney ve Zeng 2001).

**Çizelge 1.1.4.** Ticari olarak kullanılan test kitlerinin birbirleri ile karşılaştırılması (Courtney ve Zeng 2001).

| Ticari Kit (Üretici Firma)                                    | Duyarlılık (%) |
|---------------------------------------------------------------|----------------|
| DiroCHEK <sup>®</sup> (Synbiotics, Inc., san Diego, CA)       | 94             |
| PetChek <sup>®</sup> (IDEXX Laboratories, Inc. Westbrook, ME) | 94             |
| Snap <sup>TM</sup> (IDEXX Laboratories, Inc.)                 | 96             |
| Witness (Synbiotics Compartment, San Diego, CA)               | 94             |
| SoloStep (Heska Comparison, Ft. Collins, CO)                  | 96             |
| AbboScreen (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)             | 96             |

#### 1.1.6.9. Moleküler Teşhis Yöntemleri

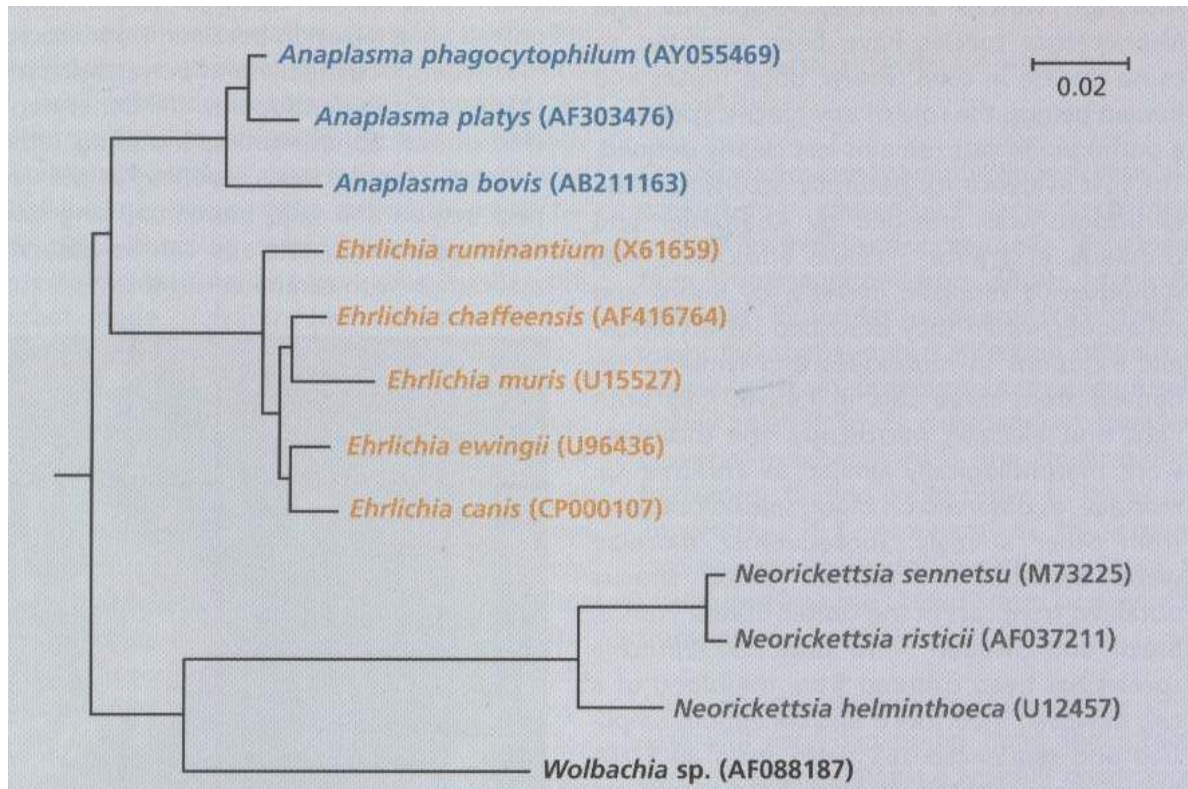
PCR (Polymerase Chain Reaktion) kandaki mikrofilerlerin tür ayrımının yapılmasında diğer bütün metotlardan daha güvenilirdir. Ayrıca anormal morfolojiye sahip olan mikrofilerlerin tür teşhisinin yapılmasını sağlamaktadır (Genchi ve ark 2007, Rishniw ve ark 2006). Ancak, kalpte erişkin parazitin olup, kanda mikrofilerlerin olmadığı durumlarda PCR ile dirofilariasis'in teşhisi imkansızdır (Genchi ve ark 2007).

## 1.2. WOLBACHIA

### 1.2.1. Sınıflandırma ve Tarihçe

*Wolbachia* sp., ilk kez 1924 yılında Hertig ve Wolbach tarafından *Culex pipiens*'in (Diptera:Culicidae) üreme dokularında saptanmıştır. Bunun ilk tanımlanması aynı sinek türünde 1936 yılında *Wolbachia pipiens* olarak Hertig tarafından yapılmıştır (Hertig ve Wolbach 1924, Merçot ve Poinot 2009).

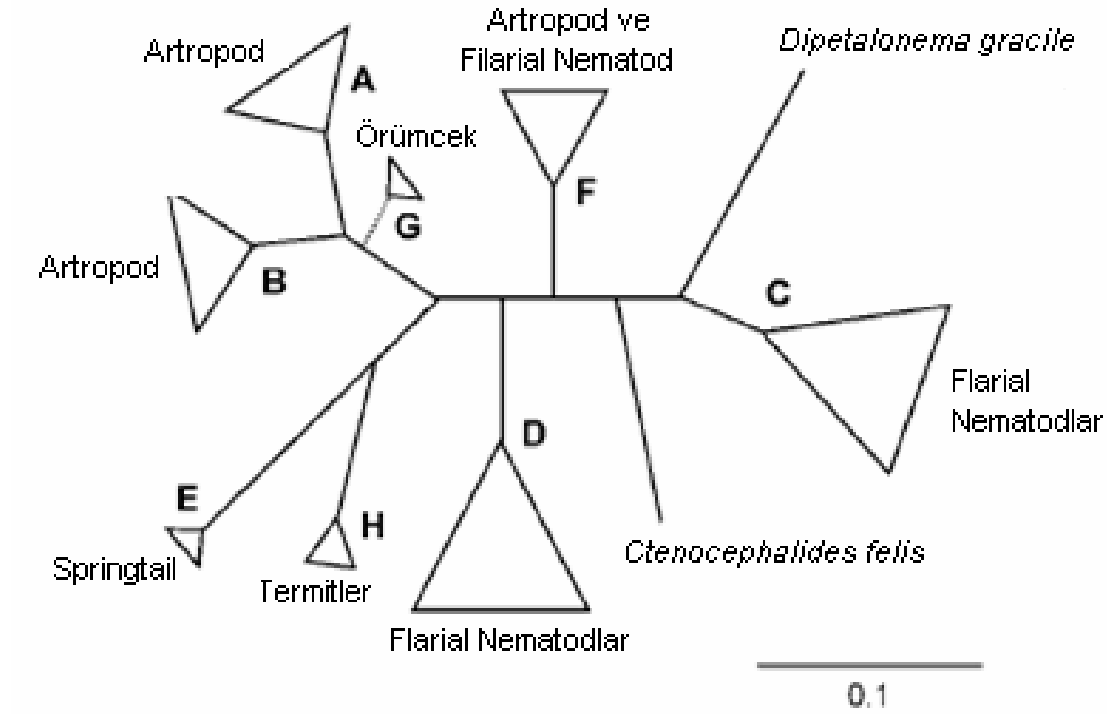
*Wolbachia*, Rickettsiaceae familyasına ait, gram negatif bir alfa proteobakteridir (Şekil 1.2.1) (Breitschwerdt 2007). Günümüze kadar bu cinse ait 3 tür bildirilmiştir. Bunlar *Wolbachia melophagi* Nöller tarafından *Melophagus ovinus*'ta, *W. persica* Suitor and Weiss tarafından *Argus arboreus*'ta ve *W. pipiens* Hertig tarafından *Culex pipiens*'te tespit edilmiştir (Bandi ve ark 2001, Zimmer 2001, Hong ve ark 2002).



Şekil 1.2.1. *Wolbachia*'nın sınıflandırmadaki yeri (Breitschwerdt 2007)

Kokoid veya basilliform şeklinde olan bu bakteriler, çift membranlı, ribozomal granülü ve ortalama 0,8-1,5 µm uzunluğunda olan *Wolbachia* dünya genelinde çok yaygındır. Yapılan araştırmalarda 63 artropod türünden (Aracnida 2, Insecta 61) 48'inde (%76), 20 filarial nematod türünün 18'inde (%90) *Wolbachia* tespit edilmiştir. Bütün artrodların %20'sinde *Wolbachia* olduğu düşünülmektedir (Sinkins ve O'Neill 2000, Bandi ve ark 2001, Hise ve ark 2004, Kozek 2005, Hilgenboecker ve ark 2008,).

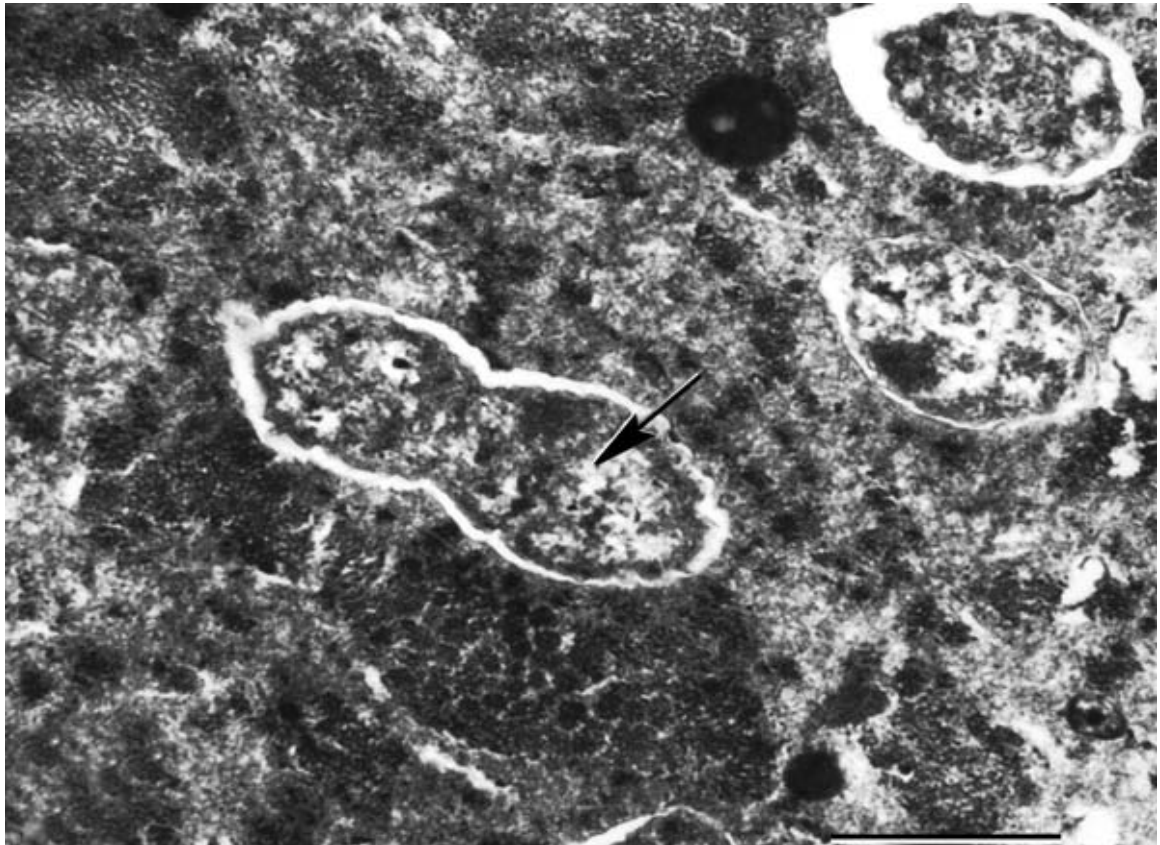
*Wolbachia*, *ftsZ*, *groEL*, *gltA* ve *dnaA* gen sekansına bağlı olarak A'dan H'ye kadar altı gruba ayrılmıştır. *Wolbachia*'nın A ve B ırkları artropodların büyük bir kısmını, C ve D ırkı nematodları, E ırkı springtailleri (yay kuruğu böceği), F ırkı bazı artropod ve nematodları, G ırkı örümcekleri ve H ırkı da termitleri enfekte etmektedir (Lo ve ark 2007, Merçot ve Poinot 2009). *Dipetalonema gracile*, *Dirofilaria repens* (flarial nematod) ve *Ctenocephalides felis* henüz bu sınıflandırmada bir alt gruba yerleştirilememiştir. Flarial nematodlardan *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ve *Litomosoides sigmodontis* D alt grubunda, *Onchocerca* ve *Dirofilaria* C alt grubunda yer almaktadır (Şekil 1.2.2) (Hise ve ark 2004, Lo ve ark 2007, Merçot ve Poinot 2009).



Şekil 1.2.2. *Wolbachia*'nın , *ftsZ*, *groEL*, *gltA* ve *dnaA* gen sekansına bağlı olarak türlere göre dağılımı. (Lo ve ark 2007)

### 1.2.2. Çoğalma ve Bulaşma

*Wolbachia*, ikiye bölünerek çoğalır (şekil 1.2.3) ve yaşam siklusu *Clamidy*a'ların yaşam siklusu ile benzerlik göstermektedir. oğalmaları, sırasıyla küçük form, yoğun form ve basillar form olmak üzere 3 değişik morfolojik evreden oluşur. Küçük form ve yoğun formdaki gelişim dönemleri filariaların lateral kordlarında yoğun olarak görülmektedir (Kozek 2005).



**şekil 1.2.3.** İkiye bölünerek çoğalan bir *Wolbachia*'nın elektron mikroskopik görüntüsü. Skala bar=0,5  $\mu$ m) (Kozek 2005).

Bulaşma artropodlarda vertikal ve horizontal olarak gerçekleşirken, enfekte olan nematodlarda *Wolbachia* sadece vertikal olarak oosit, gelişmekte olan yumurtalar ve mikrofilerlerine geçmektedir. Konakılarının reme sistemleri içinde yaşayan bakteri, bir jenerasyondan diğerine, dişi yumurta sitoplazması yoluyla taşınmaktadır. Nadiren horizontal taşındığının kanıtının olmasına rağmen *Wolbachia* bakterileri, öncelikli olarak anadan yavruya vertikal olarak taşınmakta ve konukçu üremesine müdahale ederek

konakçı üremesini birkaç yolla değiştirmektedirler (Çizelge 1.2.1) (Bandi ve ark 1998, Stevens ve ark 200, Kozek 2005).

**Çizelge 1.2.1.** *Wolbachia*'nın farklı konaklardaki karakterizasyonu (Pfarr ve Hoerauf 2006)

| Konak       | Symbiosis                                     | Taşınmaması           | Etkileri                                                                 | Lokalizasyonu                                   |
|-------------|-----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Artropodlar | Çoğunlukla parazit, bazı durumlarda mutualizm | Vertikal ve Horizotal | CI, MK, Partenogenesis, Feminizasyon , oogenesis                         | Ovaryumlar, testisler, embriyo,vücut boşlukları |
| Nematodlar  | Mutualizm                                     | Vertikal              | Embriyogenesis, larval gelişim ve erişkinin hayatını devam ettirebilmesi | Ovaryumlar, embriyolar ve hipoderma             |

Yapılan çalışmalar, *Wolbachia*'nın artropodlarda konağa bir faydası olmadığı, konak üreme sistemini etkileyerek değişik fenotipleri teşvik ettiği gösterilmiştir. Nematodlarda bunun aksine *Wolbachia*-konak arasında mutualistik bir ilişki vardır (Hoerauf ve ark 2000, Sinkins ve O'Neill 2000, Pfarr ve Hoerauf 2006).

### 1.2.3. Konak üzerine etkileri

*Wolbachia* konaklarının üremesi üzerine etki eder. Konaklarında stoplazmik uyumsuzluk, partenogenesis, erkek öldürücülük ve feminizasyona neden olan bir endosimbionttur (Zhou ve ark 1998, Doran ve Moore 2001, Werren ve Bartos 2001, Hise ve ark 2004, Kozek 2005, Praff ve Hoerauf 2006, Lo ve ark 2007)

#### 1.2.3.1. Feminizasyon

Bu bakteriler, cinsiyet belirlenmesini bozmakta ve genetik erkekler, fonksiyonel fenotipik dişilere dönüşmektedir (Werren 1997, Doran ve Moore 2001). Crustaceelerde, cinsiyet farklılığı androjen bezler tarafından üretilen erkeklik hormonları ile kontrol edilmektedir. Eğer androjen bezleri farklılaşması varsa, hormon, erkek gelişimini teşvik etmektedir. Androjen bez farklılaşması yoksa, dişi gelişmesi gerçekleşmektedir. *Wolbachia*, konakçının feminizasyonunu teşvik eden bezlerin gelişimini baskılayarak

erkekleri dişilere dönüştürmektedir. Bazı *Wolbachia* ırkları, androjen bezler ve androjen hormon üzerinde etkili olarak feminizasyona neden olurken, bazı ırklar sadece androjen bez gelişimini engelleyerek etkili olmaktadır. *Wolbachia*, konakçı hormonlarını dişi gibi değiştirerek yumurta ürettirmektedir (Werren 1997, Bandi ve ark 2001, Charlat ve ark 2003, Gotoh ve ark 2003).

#### **1.2.3.2. Partenogenezis (PI)**

Partenogenezisi teşvik eden *Wolbachia* ırkları, parazitik hymenopterlerde yaygın bir şekilde bulunur. Bunlar *Trichogramma*, *Aphytis*, *Encarsia*, *Leptopilina*, ve *Muscidifurax* cinsleri olarak belirtilmiştir (Werren 1997, Huignes ve ark 2000, Topakçı ve Göçmen 2003). Fakat son yıllarda akarlar ve thripslerde de bulunduğu belirtilmiştir (Merçot ve Poinot 2009). *Wolbachia*, çiftleşmeye gerek olmadan, sadece dişilerin doğmasına izin verecek şekilde, konakçıya müdahale etmekte ve döllenmemiş yumurtalardan dişilerin gelişimi (thelytokie), ergin dişiler tarafından taşınan mikroorganizmaların varlığı ile artmaktadır. Haplodiploid böcek konakçılarında, cinsiyet belirleme ploidiye bağlı olmakta ve döllenmiş yumurtalar diploid dişi üretirken, döllenmemiş yumurtalar haploid erkek üretmektedir. *Wolbachia*, çekirdekte kromozom duplikasyonu sayesinde, döllenmemiş yumurtalardan dişilerin gelişimine izin vermektedir. Böylece partenogenetik dişilerin üretilmesini teşvik etmektedir. Bu partenogenik dişiler, seksüel erkeklerle çiftleştiklerinde, diploid dişiler meydana gelmektedir (Werren 1997, Doran ve Moore 2001, Topakçı ve Göçmen 2003). *Wolbachia*'nın gamet duplikasyonuna nasıl neden olduğunun belirlenmesi ise detaylı moleküler ve sitogenetik çalışmaları gerektirmektedir (Huignes ve ark 2000, Bandi ve ark 2001, Charlat ve ark 2003).

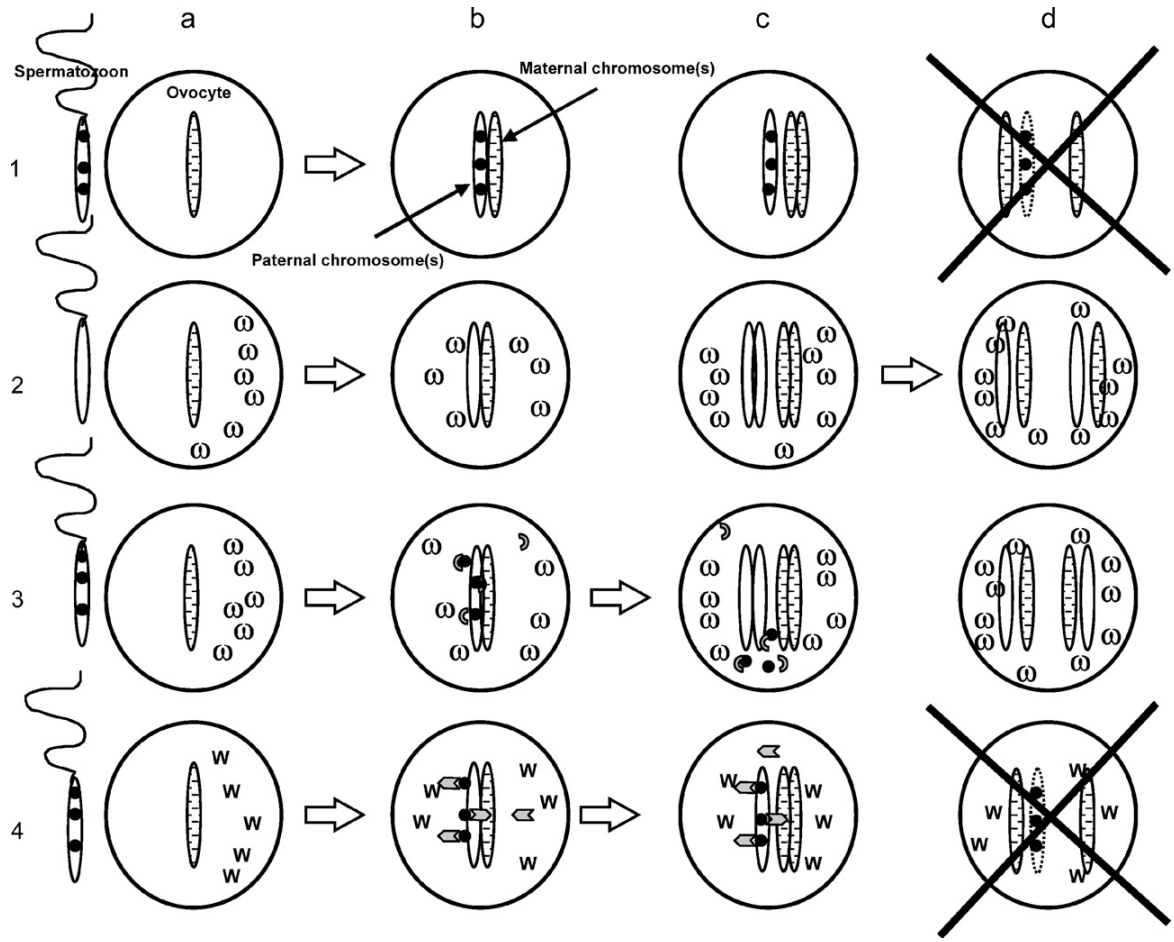
#### **1.2.3.3. Erkek Öldürücülük (MK)**

Bugüne kadar erkek öldürücü *Wolbachia*, Coleoptera (*Adalia bipunctata*), Lepidoptera (*Acraea encedon*) ve Diptera olmak üzere üç soyda bulunmuştur (Doran ve Moore 2001, Merçot ve Poinot 2009). *Wolbachia*, enfekte ettiği dişi yumurtaları enfekte olarak gelişimine devam ederken, erkek yumurtaları öldürmektedir (Merçot ve Poinot 2009). Erkek embriyo öldürücü bakteriler, yumurtadan çıkan bireylerin henüz açılmayan

kardeş yumurtalarla beslendiği türlerde, ya da açılan yumurtadan çıkan kardeşler arasında, besin açısından rekabet olan böceklerde etkili ve yaygındır. Bunlarda dişi konakçılar yumurtadan çıktığı zaman erkeklerle besin açısından rekabete girmemektedirler. Çünkü dişiler, erkekleri oluşturacak yumurtalarla beslenirler. Bu durumda erkek konakçıların ölümü, dişi olan kardeşlerinin hayatta kalma oranını artırmakta ve *Wolbachia* ile enfekte dişilerin hayatta kalma şansı da artmaktadır (Bandi ve ark 2001, Doran ve Moore 2001, Zimmer 2001, Charlat ve ark 2003)

#### **1.2.3.4. Stoplazmik Uyumsuzluk (CI)**

1950’li yıllarda *Culex* spp’de tür içi çaprazlamalarda uyumsuzluk olduğu veya çok az nesil üretebildikleri, ya da hiç üretemedikleri keşfedilmiştir. Bu durum, daha sonra sitoplazmik uyumsuzluk olarak isimlendirilmiştir (Werren 1997). İlk kez 1920’li yıllarda *Culex* spp’de saptanan *Wolbachia* ile bu durum arasında bir ilişki olduğu, 1970’li yıllarda belirlenebilmiştir. Bu çalışmalarda, sitoplazmik uyumsuzluk ile, antibiyotik tedavisi yapılarak elimine edilen *Wolbachia* arasında bağlantı olduğu saptanmıştır (Genchi ve ark.2007).



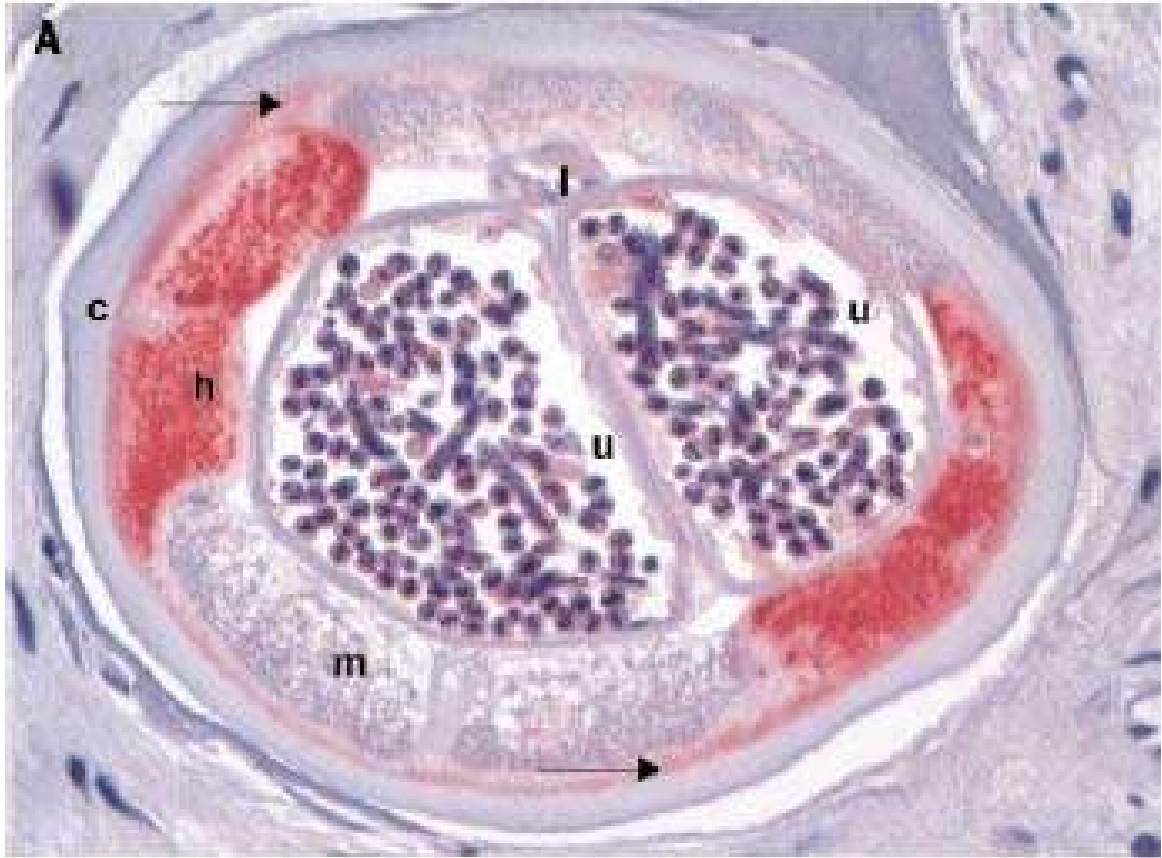
**Şekil 1.2.4.** Sitoplazmik uyumsuzluğun şematize gösterimi (içerisinde nokta olan spermatozoonlar *Wolbachia* enfekte,  $\omega$  ve  $w$  farklı türlerde *Wolbachia* etkenleri) 1) *Wolbachia* ile enfekte olan erkeğin spermatozoonu ile enfekte olmayan dişinin yumurtası birleştiğinde (b) dişiden maternal kromozomları kendini eşlerken, erkekten gelen maternal kromozomlar dublike olamaz (c) ve erken embriyonik ölüm meydana gelir. 2) Enfekte olmayan erkek spermatozoonu ve enfekte olan dişi yumurtası birleştiğinde normal gelişim devam eder. 3) Erkek veya dişi aynı *Wolbachia* türü ile enfekte ise normal gelişim devam eder. 4) Erkek ve dişi farklı *Wolbachia* türleri ile enfekte ise maternal kromozomlar dublike olamaz ve erken embriyonik ölüm gerçekleşir (Merçot ve Poinot 2009).

*Wolbachia*'nın konakçı üremesi üzerine olan en yaygın etkisi sitoplazmik uyumsuzluk olup, bu konuda yapılmış olan çalışmalar çok daha fazladır. *Drosophila*'yı da içeren bazı türlerde, sitoplazmik uyumsuzluğa rastlanmaktadır. Sitoplazmik uyumsuzluk, enfekte erkek ve enfekte olmayan dişiler arasında görülen bir embriyo (dölllenmiş yumurta) ölümüdür. Embriyo ölümünün nedeni sperm ve yumurta arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanmaktadır. Sitoplazmik uyumsuzluğun tek yönlü ve iki yönlü olmak üzere iki formu vardır. Tek yönlü uyumsuzluk, *Wolbachia* ile enfekte spermin,

enfekte olmayan yumurtayı döllemesiyle olmaktadır. Karşıt bir çaprazlanmada, *Wolbachia* ile enfekte dişi ile enfekte olmayan erkek çiftleşmesi ise uyumludur. Diğer bir deyişle, enfekte dişiler, enfekte olmayan yarış dışında olmakta ve *Wolbachia* taşıyanların oranı popülasyonda artmaktadır. İki yönlü uyumsuzluk ise, erkek ve dişi farklı *Wolbachia* ırkları bulundurduğunda olmaktadır (Şekil 1.2.4). Biyokimyasal esasları tam anlaşılamamasına rağmen enfekte erkeklerin *Wolbachia* içermeyen olgun sperm ürettikleri, bakterinin kendini sperme bağlayamamasına rağmen bilinmeyen bir mekanizma ile bir toksin ürettiği ve bu toksinin konukçu spermini değiştirdiği bilinmektedir. Sperm sadece aynı *Wolbachia* ırkını içeren yumurtaları döllemektedir. Böylece enfekte olmayan dişilerle olan üreme azalmaktadır. Tersine *Wolbachia* taşıyan dişi ile enfekte, ya da enfekte olmayan erkekler çiftleşirlerse, yaşayabilir yumurtalar üretilmektedir. Çünkü dişide yaşayan *Wolbachia*, spermelerin tam yaşayabilmesi için her nasılsa eski haline getiren bir antidot üretmektedir. CI'nın etkinliğinin belirlenmesinde bakteriyel ırk, konakçı genotipi ve bakteriyel yoğunluk olmak üzere birkaç faktör bulunmaktadır. Bazı durumlarda bir grupta birden fazla fenotip görülebilmektedir. Örneğin, Lepidoptera'da CI, F ve MK, Tetranychidlerde CI ve PI gözlenir. CI, ilk kez kırmızı örümceklerde (Acarina:Tetranychidae) Koch'de tarafından belirlenmiştir. (Werren1997, Bandi ve ark 2001, Doran ve Moore 2001, Zimmer2001, Hong ve ark 2002, Charlat ve ark 2003).

#### 1.2.4. *Dirofilaria* - *Wolbachia* ilişkisi

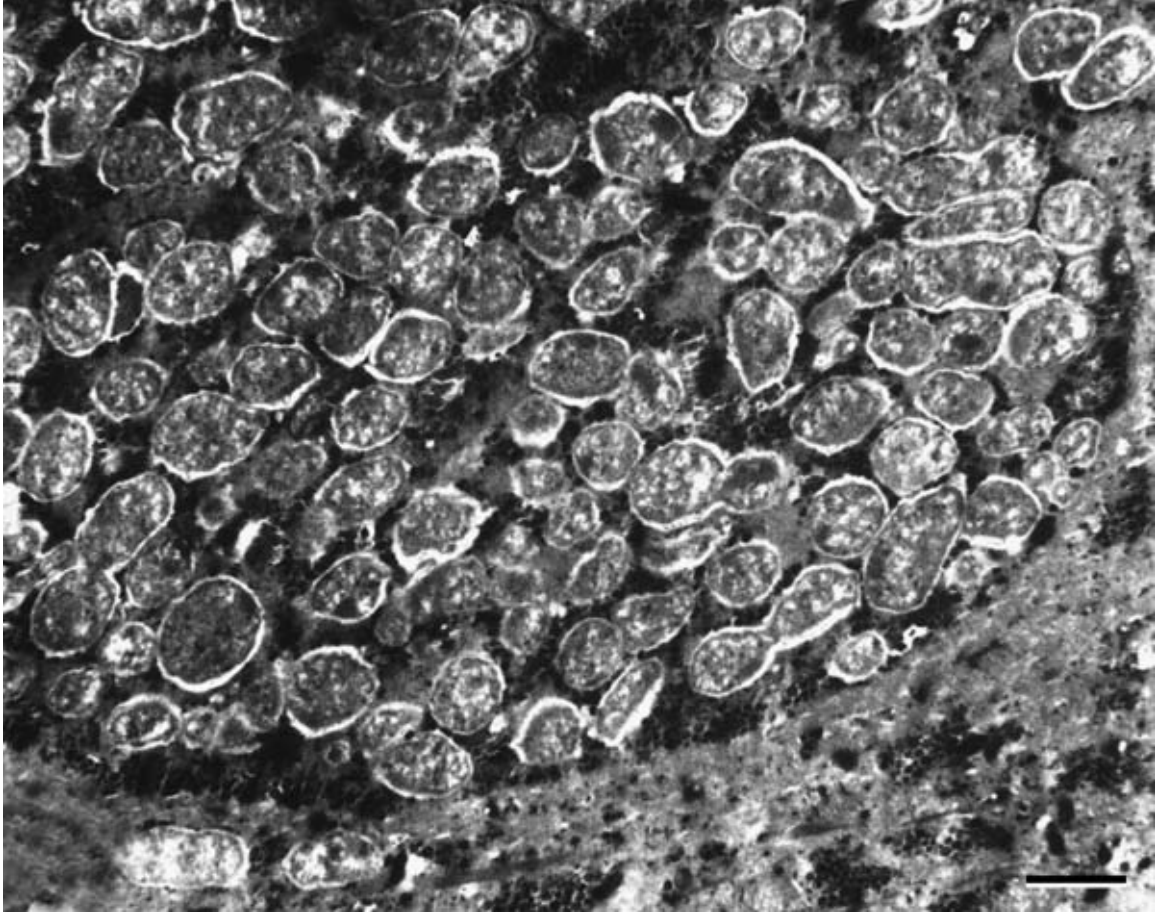
*Wolbachia*, elektron mikroskobu geliştirildikten sonra 1967’de Kozek tarafından *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerinin vücut merkezlerinde belirlenmiştir. 1970’de Harada ve ark. ile 1975’de Lee tarafından alışılmamış bir biçimde *Dirofilaria immitis* oositlerinin miktokondrilerinde tespit edilmiştir. 1975’de Vincent ve ark. ilk olarak *Brugia pahangi*’nin vücut duvarında tespit etmiştir. Daha sonra 1975’de McLaren ve ark. *Dirofilaria immitis* dahil bir çok filaria türünde *Wolbachia*’nın olduğunu bildirmiştir (Kozek 2005).



**Şekil 1.2.5.** *Dirofilaria immitis*’in lateral kortundaki *Wolbachia*’ların immunohistokimyasal boyama ile kırmızı renkte görülmektedir (Hoerauf ve ark 2000)

*Wolbachia*; *Dirofilaria immitis*’in, erkek ve dişilerin hipodermal lateral kordundaki intrasitoplazmik vakuollerde (Şekil 1.2.6), dişilerin üreme organlarında, vektördeki bütün gelişim dönemlerinde, oositlerde ve mikrofilerlerde immunhistokimyasal (Şekil 1.2.5) olarak tespit edilmiştir. Fakat erkeklerin üreme sisteminde tespit edilememiştir. Ayrıca

uterusta serbest olarak, dejenere yumurtalarda ve yumurta fragmentlerinde *Wolbachia*'nın değişik gelişim dönemleri görülmüştür. Dişilerde bulunanlarında büyük bir çoğunluğu üreme organlarına yerleşmektedir (Stevens ve ark 2001, Kramer ve ark 2003, Casiraghi ve ark 2004, Hise ve ark 2004, Kozek 2005, Merçot ve Poinso 2009,).



**Şekil 1.2.6.** *Dirofilaria immitis*'in lateral kordundaki *Wolbachia*'lar. Skala bar=0,5 µm (Kozek 2005)

*Wolbachia* ve filarial nematodlar arasındaki etkileşim hakkında az bilgi olmasına rağmen, filarial hastalıkların immunopatogenezisinde önerilmiş bir yeri olduğu düşünülmektedir (Taylor ve ark 2001, Simon ve ark 2003, Hise ve ark 2004, Kramer ve ark 2005a, Kramer ve ark 2005b). Çünkü anti-wolbachial ilaçlar filarial nematodlarda embriyogenesinin bloklanması, dişilerin sterilizasyonu, larval gelişimde defektler ve erişkin nematodların ölmesine neden olmaktadır (Praff ve Hoerauf 2006). Bu da aralarında mutualistik bir ilişkinin kanıtı olarak gösterilmektedir.

Yapılan çalışmalarda; tetrasiklin, azitromisin ve rifampisin grubu antibiyotikler anti-wolbachial etkili iken, penisilin ve gentamisin grubu antibiyotiklerin böyle bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (Hise ve ark 2004).

Bu alışma; Türkiye’de *Wolbachia* ve *Dirofilaria* ilişkisi konusunda çalışma yapılmamış olması nedeni ile Aydın ve İzmir illerinde *Dirofilaria* türlerinin yaygınlığının araştırılması ve *Dirofilaria* türlerinde *Wolbachia*’nın varlığını ortaya konumak amacı ile yapılmıştır.

## 2.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Aydın ve İzmir yöresindeki köpeklerde *Dirofilaria immitis* ve *Dirofilaria repens* etkenlerinin yaygınlığını saptamak ve filarial etkenlerde *Wolbachia sp.* varlığını araştırmak amacı ile Ağustos 2007 - Ağustos 2009 tarihleri arasında merkez, çevre ilçe ve köylerdeki toplam 150 köpekten toplanan kan örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Araştırma süresince kan örneği alınan köpeklerin yerleşim yeri, sahipli/sahipsiz olmaları, içerde/dışarıda barındırılmaları (Çizelge 2.1), yaş ve cinsiyeti (Çizelge 2.2) kaydedilmiştir. Ayrıca kan alma tarihi ve zamanı ile köpeklerin genel durumu ve varsa klinik belirtileri kaydedilmiştir. İncelenen köpeklerin *Vena cephalica antebrachium*'un dan serum (10 ml) ve heparinli (5 ml) tüplere (vacutainer) kan alınmış ve incelenmek üzere laboratuara getirilerek, aynı gün veya +4°C bekletilip ertesi gün natif, modifiye knott, membran filtrasyon yöntemleri ile incelenmiştir. Kalan kanlar 1,5 ml'lik ependorflara bölünerek DNA ekstraksiyonu yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Köpeklerden serum örnekleri için toplanan kan 1800 devirde 10 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen serum 1,5ml'lik ependorflara koyulmuş ve -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

**Çizelge 2.1.** Aydın ve İzmir’de incelenen köpeklerin yerleşim yerlerine, sahipli / sahipsiz olma, içerde/ dışarıda barındırılma durumlarına göre dağılımı

| Yerleşim yeri      | Bakısı yapılan köpek sayısı |          |         |          | Toplam |
|--------------------|-----------------------------|----------|---------|----------|--------|
|                    | Evde                        | Dışarıda | Sahipli | Sahipsiz |        |
| Aydın / Merkez     | 3                           | 53       | 14      | 42       | 56     |
| Aydın / Bozdoğan   | -                           | 2        | 2       | -        | 2      |
| Aydın / Çine       | -                           | 1        | 1       | -        | 1      |
| Aydın / Didim      | 1                           | -        | 1       | -        | 1      |
| Aydın / Germencik  | -                           | 19       | 18      | 1        | 19     |
| Aydın / İncirliova | -                           | 1        | 1       | -        | 1      |
| Aydın / Karpuzlu   | -                           | 29       | 29      | -        | 29     |
| Aydın / Köşk       | -                           | 2        | 2       | -        | 2      |
| Aydın / Söke       | -                           | 4        | -       | 4        | 4      |
| Aydın / Umurlu     | -                           | 2        | 2       | -        | 2      |
| Aydın / Yenipazar  | -                           | 1        | 1       | -        | 1      |
| Aydın / Kuşadası   | 2                           | 2        | 4       | -        | 4      |
| İzmir / Merkez     | 2                           | 1        | 3       | -        | 3      |
| İzmir / Selçuk     | 1                           | -        | 1       | -        | 1      |
| İzmir / Belevi     | -                           | 24       | 24      | -        | 24     |
| Toplam             | 9                           | 141      | 103     | 47       | 150    |

**Çizelge 2.2.** Aydın ve İzmir’de incelenen köpeklerin yerleşim yerine, yaş ve cinsiyetine göre dağılımı

| Yerleşim yeri      | Bakısı yapılan köpek sayısı |     |    |          |       | Toplam |
|--------------------|-----------------------------|-----|----|----------|-------|--------|
|                    | Yaş (yıl)                   |     |    | Cinsiyet |       |        |
|                    | 0,5-3                       | 4-6 | ≥7 | Dişi     | Erkek |        |
| Aydın / Merkez     | 21                          | 26  | 9  | 23       | 33    | 56     |
| Aydın / Bozdoğan   | 1                           | 1   | -  | 1        | 1     | 2      |
| Aydın / Çine       | -                           | 1   | -  | 1        | -     | 1      |
| Aydın / Didim      | -                           | 1   | -  | -        | 1     | 1      |
| Aydın / Germencik  | 13                          | 5   | 1  | 4        | 15    | 19     |
| Aydın / Incirliova | -                           | 1   | -  | -        | 1     | 1      |
| Aydın / Karpuzlu   | 24                          | 4   | 1  | 4        | 25    | 29     |
| Aydın / Köşk       | 1                           | -   | 1  | 1        | 1     | 2      |
| Aydın / Söke       | -                           | 4   | -  | 2        | 2     | 4      |
| Aydın / Umurlu     | -                           | 1   | 1  | 1        | 1     | 2      |
| Aydın / Yenipazar  | 1                           | -   | -  | -        | 1     | 1      |
| Aydın / Kuşadası   | 2                           | -   | 2  | 3        | 1     | 4      |
| İzmir / Merkez     | 1                           | -   | 2  | 1        | 2     | 3      |
| İzmir / Selçuk     | -                           | 1   | -  | -        | 1     | 1      |
| İzmir / Belevi     | 17                          | 2   | 5  | -        | 24    | 24     |
| TOPLAM             | 81                          | 47  | 22 | 41       | 109   | 150    |

### **2.1. Direkt Kan Muayene Yöntemi (Natif)**

Heparinli kan örneğinden alınan birkaç damla kan önce direkt daha sonra eritici solüsyon (% 2 Formaldehid) ile karıştırılarak lam-lamel arasında mikroskopta mikrofler yönünden incelenmiştir.

### **2.2. Modifiye Knott Yöntemi**

Bir ml heparinli kan örneği %2'lik formalin 9 ml (%37'lik konsantre formaldehit 2 ml, distile su 100 ml) ile karıştırılıp 1500 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş üstteki sıvı dökülerek çökeltiliye %0,1'lik metilen mavisi ilave edilmiştir. Çökeltiden alınan birkaç damla, lam-lamel arasında mikroskopta incelenerek mikroflerlerin varlığı yönünden incelenmiştir.

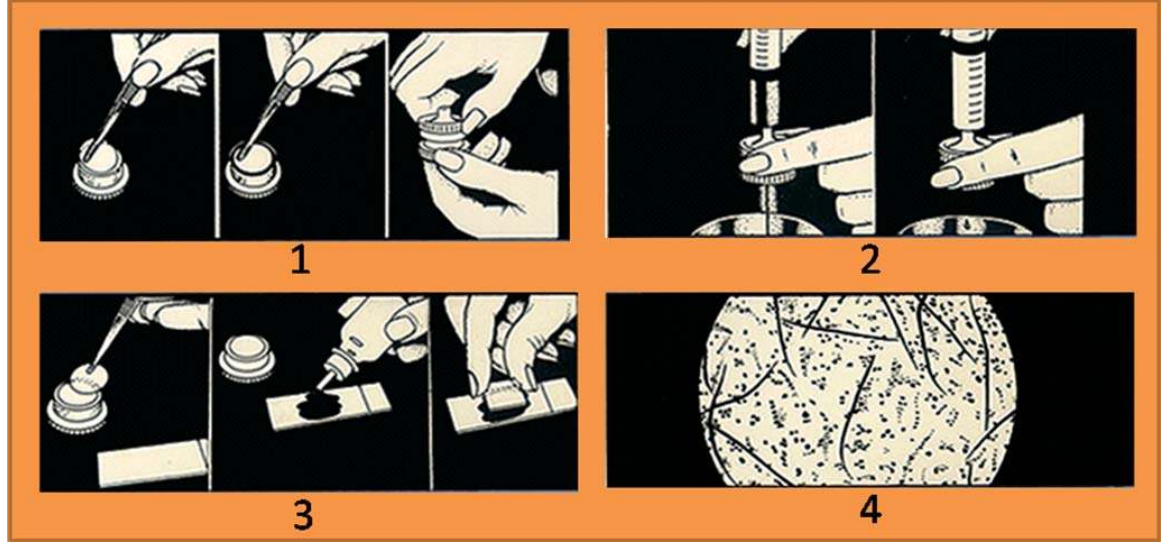
### **2.3. Membran Filtrasyon Yöntemi**

Bir ml heparinli kan örneği 9 ml eritici solüsyon (8gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1000 ml distile su, 5 ml Triton X-100) ile karıştırılmıştır, 25 mm çapında 8 µm por genişliğindeki polikarbonat membran filtre (Millipore™ Membrane Filters, İrlanda), filtre tutucuya (Sartorius, Almanya) yerleştirildikten sonra bir enjektör vasıtasıyla karışım filtreden geçirilmiştir. Aynı enjektörlerden 2-3 kez distile su ve 2-3 kezde hava geçirilerek üzerinde sıvı kalmaması sağlanmıştır. Filtre tutucudan (Sartorius GmbH, Göttingen, Almanya) çıkartılan filtreler, lam üzerine alınıp mikrofler yönünden incelenmiştir (Şekil 2.1).

### **2.4. Asit Fosfataz Boyama Yöntemi**

Perifer kanda saptanan mikroflerlerin histokimyasal ayrımı için kan örneklerinden hazırlanan sürme kan preperatları ile polikarbonat membran filtreler asit fosfataz boyama

yapılmış, mikrofilerlerde reaksiyonun olduğu bölgelere bakılarak mikrofilerlerin tür teşhisi yapılmıştır. Bu amaçla Leucognost-SP (Merck,1.16304) test kiti kullanılmıştır.



**Şekli 2.1.** Membran filtrasyon yöntemi 1- 0,8 µm por genişliğindeki filtrenin, filtre tutucuya yerleştirilmesi, 2- Lize edici solüsyon (%2'lik formaldehit) ile muamele edilmiş kanın enjektör aracılığı ile filtreden geçirilmesi, 3- Filtrenin lam üzerine alınması, filtre üzerine %0,1'lik metilen mavi damlatılması ve lamel ile kapatılması, 4- Filtre üzerinde bulunan mikrofilerlerin mikroskop altındaki görünümü.

#### Leucognost-SP Test Kiti

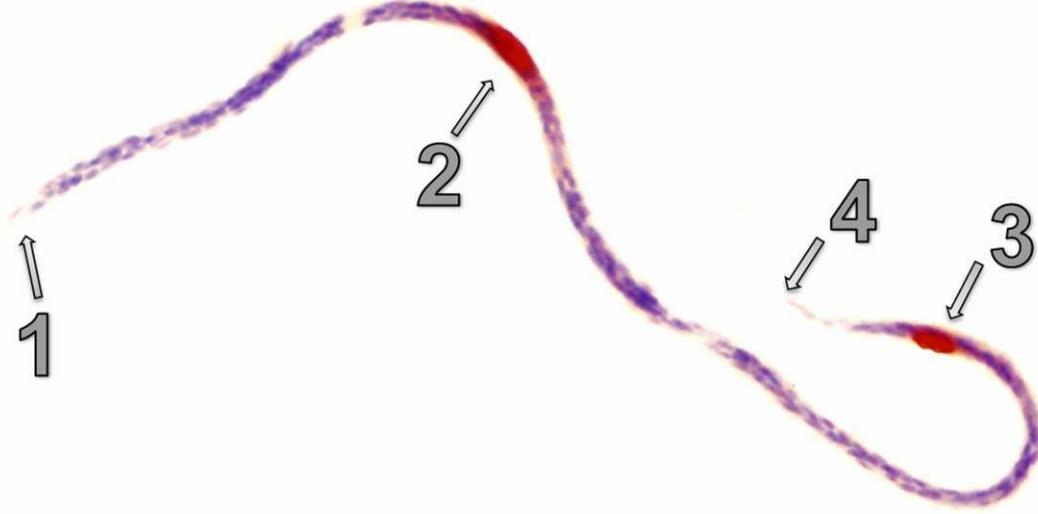
- Reagent 1: Naphthol-AS-OL-phosphoric acid
- Reagent 2: sodyum acetate
- Reagent 3a: Pararosaniline-HCl solüsyonu
- Reagent 3b: Nitrite solüsyonu, % 4
- Reagent 4: di-sodyum tartrate

Asit fosfataz boyasını hazırlamak için 60 ml distile su içerisine 2 ml reagent 1 ve 0,8 g reagent 2 eklenmiştir. Daha sonra 1.5 ml'lik ependorf içerisinde 4 damla reagent 3 ve 5 damla reagent 4 karıştırılmış ve 1 dakika beklendikten sonra ilk karışıma eklenmiştir. Hazırlanan boya solüsyonu 4,45 µm por genişliğindeki (Whatman ,Puradisc™ 25 AS) filtreden geçirilmiştir.

Heparinli kan örneklerinden hazırlanan sürme preparatlar ve yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan polikarbonat membran filtresi absolüt asetonda 1 dakika tespit

edildikten sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra taze hazırlanmış boya solüsyonu ile bu preparatlar karanlık ortamda 2-3 saat boyanmış ve distile su ile 10 sn yıkanmıştır. Mayer's hemalum solüsyonu ile 15-20 dakika boyanan preparatlar çeşme suyu altında 2 dakika yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutularak ve mikroskopta altında incelenmiştir.

Asit fosfataz tekniği ile boyanan sürme preperatlarda mikroskop altında incelenerek (Olympus BX61) Analysis programı kullanılarak mikrofilerleri uzunlukları, ön nihayeti-EP uzunluğu, EP-AP uzunluğu ve AP-arka nihayeti arası mesafeler ölçülmüştür (Şekil 2.2).



**Şekli 2.2.** Asit fosfataz yöntemi ile boyanmış mikrofilerin mikroskopik görünümü 1-Ön nihayeti, 2-EP (Boşaltım deliği), 3-AP (Anal Delik), 4-Arka nihayeti X40 (Orijinal)

## 2.5. Nekropsi

Toplanan kan örnekleri yukarıda anlatılan mikroskopik ve/veya Canine Heartworm serolojik kiti (Heska™ Solo Step™ CH Batch Test Kit) kullanılarak yapılan bakıda pozitif sonuç veren köpekler nekropsi yöntemi ile kalp ve akciğerlerinde bulunan erişkin *Dirofilaria sp.* türleri yönünden incelenmiş ve bulunan erişkin parazitler toplanarak bir kezlik Fosfat tampon solusyonu (1xPBS; 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 450 ml distile su, pH: 7,4) içerisine konularak laboratuara getirilmiş erkek ve

dişi olanlar ayrılmıştır. Daha sonra bütün erişkin *Dirofilaria immitis*'lerin en ve boyları ölçülmüş ve ileride yapılacak testlerde kullanılmak amacıyla -20 derecede muhafaza edilmiştir. Bu amaçla pozitif köpekler sahiplerinin rızası alınarak Lystenon (Fako Actavis İlaçları A.ř. Doz: 10 ml/hayvan) kullanılarak etik kurulda belirtilen şekilde tenazi yapılmıştır. Nekropsi işlemi Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

## 2.6. DNA ekstraksiyonu

DNA, her bir heparinli kan örneğinin 300 µl'sinden Wizard Genomic DNA Purifikasyon Kiti (Promega Corporation, Madison, USA) kullanılarak, protokole uygun olarak hazırlanmıştır. Kısaca; her bir kan rneği steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplere 300 µl konulmuş ve üzerine 900 µl Cell lysis solüsyonu eklenip 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince tüpler 2-3 kez alt üst edilmiştir. 10 dakika sonunda örnekler 14000 devirde 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda dipteki çökeltiye dokunulmadan üst kısımdaki atılmıştır. Yukarıdaki işlemler iki kez tekrar edilmiştir. Elde edilen çöküntü 3-4 kez sıvı azotta dondurulup iyice ezildikten sonra -20°C'ki Cell lysis solüsyonundan 300 µl eklenerek tekrar ezilmiştir. Daha sonra 65°C 15-20 dakika inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda üzerine 3 µl RNase eklenerek 20 dakika 37°C inkübasyona bırakılmıştır. 20 dakika sonunda 200 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendikten sonra 10-20 saniye vorteks işlemine tabi tutulmuş ve 5 dakika buz içerisinde bekletilmiştir. 14000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda dipte kalan koyu kahverengi protein peletine dokunulmadan üstteki sıvı kısım 1,5 ml'lik vida kapaklı tüpler içerisinde alınarak üzerine 600'er µl'lik İsoopropanol eklenmiştir. Tüpler İsoopropanol içerisinde yüzen beyaz küçük DNA bulutu görülünceye kadar hafifçe sallanmış ve sonra 14000 devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda dipteki DNA rahatsız edilmeden isopropanol dökülmüş ve DNA zerine 600 µl %70'lik etanol konularak tüpler hafifçe alt üst edilmiştir. DNA peletinin etanolle yıkanması sağlandıktan sonra 14000 devirde 1 dakika santrifüj edildikten sonra etanol dikkatli bir şekilde dipteki DNA peletine dokunulmadan pipetle çekilerek atılmıştır. Tüpler temiz kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 10-15 dakika kuruması beklenmiştir. Daha sonra tüplere 70 µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek 65°C 1 saat inkübasyona bırakılmış ve

inkübasyon sonunda rehabilitasyon solüsyonu içerisindeki DNA kullanım aşamasına kadar +4 derecede saklanmıştır.

Nekropsi sonucunda elde edilen erişkin *Dirofilaria immitis*'ler 5-6 eşit parçaya bölünerek her bir parça için yukarıda anlatılan DNA ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar daha sonra yapılacak olan *Wolbachia* soy PCR'ına kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

## 2.7. PCR (Polimerase Chain Reaction)

*Dirofilaria immitis*, *D.repens* ve *Wolbachia* türlerinin moleküler bir yöntem olan PCR ile teşhisinde kullanılan primer çiftleri, bunların çoğalttığı gen bölgeleri ve çoğaltılan ürünlerin uzunlukları Çizelge 2.3'de belirtilmiştir.

PCR yöntemi ile *D.immitis*' in teşhisi amacıyla bu türe ait ribozomal DNA' nın 302 bp' lik ITS2 (internal transcribed spacer 2) bölgesi (Genbank no; AF217800) D.imm-F1a (5'-CAT CAG GTG ATG ATG TGA TGA T-3') ileri ve D.imm-R1 (5'-TTG ATT GGA TTT TAA CGT ATC ATT T-3') geri yönlü primerleri kullanılarak çoğaltmıştır (Rishniw ve ark. 2006). PCR reaksiyonu 25 µl son hacimde; 16,5 µl çifte distile su, 2,5 µl PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9.0 ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 0.1% gelatin; 1% Triton X-100) (Fermentas), 0,25 U Taq Bead Hot Start DNA Polymeraz (Promega TaqBead™ Hot Start Polymerase, Amerika), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 200 µM her bir dATP, dCTP, dGTP ile 100 µM DTTP ve dUTP, 25 pmol ileri ve geri yönlü primerler (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Almanya) ve 2 µl hedef DNA örneği olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR Techne TC – 512 marka thermal sikluslu makinede; 94°C'de 2 dakika başlangıç denetrasyon aşaması ve bunu takip eden 32 siklusluk (94°C'de 30 saniye denetürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzatma aşamaları) çoğaltma dönemi ile 72°C'de 7 dakikalık final uzatma aşamasından oluşmaktadır. Reaksiyon sonunda PCR tüpleri +4 derecede tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri 10 µg/mL etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde bir saat boyunca 100 voltluk sabit akımda elektroforeze tabi tutulmuştur. Bunu takiben jel ultraviyole ışık altında (UV transluminatör) incelenmiştir.

*Dirofilaria repens*' in PCR yöntemi ile teşhisi amacıyla 5S rRNA' nın 348 bp' lik (Genbank no; AJ242966, AJ242967) bölgesini çoğaltan D.rep-F1 (5'-TGT TTC GGC CTA GTG TTT CGA CCA-3') ileri ve D.rep-R1 (5'-ACG AGA TGT CGT GCT TTC AAC GTG-3') geri yönlü primerleri kullanılmıştır (Rishniw ve ark. 2006). PCR reaksiyonu 25 µl son hacimde; 16,5 µl çifte distile su, 2,5 µl PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9.0 ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl;0.1% gelatin; 1% Triton X-100) (Fermentas), 0,25 U Taq Bead Hot Start DNA Polymeraz (Promega TaqBead™ Hot Start Polymerase, Amerika), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 200 µM her bir dATP, dCTP, dGTP ile 100 µM DTTP ve dUTP, 25 pmol ileri ve geri yönlü primerler (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Almanya) ve 2 µl hedef DNA örneği olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 2.3.** PCR ile teşhisinde kullanılan primer çiftleri, bunların çoğalttığı gen bölgeleri ve çoğaltılan ürünlerin uzunlukları

| Primer ismi | Dizilim <sup>a</sup>                   | Tür                  | Çoğaltılan<br>Hedef gen<br>bölgesi | Primer<br>uzunluğu<br>(bp) | Çoğaltılan<br>bölgenin<br>uzunluğu<br>(bp) | Genbank<br>numarası |
|-------------|----------------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|---------------------|
| D.imm – F1a | CATCAGGTGATGATGTGATGAT <sup>b</sup>    | <i>D.immitis</i>     | ITS2                               | 22                         | 302                                        | AF217800            |
| D.imm– R1a  | TTGATTGGATTTTAACGTATCATTT <sup>b</sup> | <i>D.immitis</i>     | ITS2                               | 25                         |                                            |                     |
| D.rep – F1  | TGTTTCGGCCTAGTGTTCGACCA <sup>c</sup>   | <i>D.repens</i>      | 5S rRNA                            | 24                         |                                            | AJ242966            |
| D.rep – F1  | ACGAGATGTCGTGCTTTCAACGTG <sup>c</sup>  | <i>D.repens</i>      | 5S rRNA                            | 24                         | 348                                        | AJ242967            |
| ftsZf1      | GTTGTCGCAAATACCGATGC <sup>d</sup>      | <i>Wolbachia sp.</i> | ftsZ                               | 20                         |                                            |                     |
| ftsZr1      | CTTAAGTAAGCTGGTATATC <sup>d</sup>      | <i>Wolbachia sp.</i> | ftsZ                               | 20                         | 1043 – 1055                                |                     |

(<sup>a</sup>); primer dizilimleri 5'→3' yönünde verilmiştir.

(<sup>b</sup>); kullanılan primer çifti Rishniw (2006) tarafından bildirildiği şekildedir.

(<sup>c</sup>); kullanılan primer çifti Favia (2000) ve Mar (2002) tarafından bildirildiği şekildedir.

(<sup>d</sup>); kullanılan primer çifti Werren (1995) tarafından bildirildiği şekildedir.

PCR Techne TC – 512 marka thermal sikluslu makinada; 94°C’de 2 dakika başlangıç denetrasyon aşaması ve bunu takip eden 32 siklusk (94°C’de 30 saniye denetrasyon, 55°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 30 saniye uzatma aşamaları) çoğaltma dönemi ile 72°C’de 7 dakikalık final uzatma aşamasından oluşmaktadır. Reaksiyon sonunda tüpler +4 derecede tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri 10 µg/mL etidyum bromid içeren %2’lik agaroz jelde bir saat boyunca 100 voltluk sabit akımda elektroforeze tabi tutulmuştur. Bunu takiben jel ultraviole ışıltında (UV transluminatör) incelenmiştir.

*Wolbachia* türlerinin PCR yöntemi ile belirlenmesi amacıyla *Wolbachia ftsZ* geninin *Wolbachia* izolatları arasında farklılık gösteren 1043 – 1055 bp uzunluğundaki kısımlarını özgül olarak çoğaltan ftsZf1 (5’- GTT GTC GCA AAT ACC GAT GC-3’) ileri ve ftsZr1 (5’- CTT AAG TAA GCT GGT ATA TC-3’) geri yönlü primerleri kullanılmıştır (Werren ve ark. 1995). PCR reaksiyonu 25 µl son hacimde; 17 µl çifte distile su, 2,5 µl PCR buffer (100 mM Tris-HCL, pH 9.0 ; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM KCl; 0.1% gelatin; 1% Triton X-100) (Fermentas), 0,25 U Taq Bead Hot Start DNA Polymeraz (Promega TaqBead™ Hot Start Polymerase, Amerika), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 250 µM her bir dATP, dCTP, dGTP ile 100 µM DTTP ve dUTP, 25 pmol ileri ve geri yönlü primerler (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Almanya) ve 2 µl hedef DNA örneği olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR Techne TC – 512 marka thermal sikluslu makinede; 95°C’de 1dk. başlangıç denetrasyon aşaması ve bunu takip eden 35 siklusk (94°C’de 1 dakika denetrasyon, 53°C’de 1 dakika bağlanma, 65°C’de 1 dakika uzatma aşamaları) çoğaltma dönemi ile 65°C’de 10 dakikalık final uzatma aşamasından oluşmaktadır. Reaksiyon sonunda tüpler +4 derecede tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri 10 µg/mL etidyum bromid içeren %2’lik agaroz jelde bir saat boyunca 100 voltluk sabit akımda elektroforeze tabi tutulmuştur. Bunu takiben jel ultraviole ışık altında (UV transluminatör) incelenmiştir.

## 2.8. Sekans Analizi

PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan ilgili hedef DNA bölgelerinin dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla eppendorf tüp içerisine konulan PCR ürünleri MacroGen (MacroGen Inc., Güney Kore) firmasına dizilim analizleri için gönderilmiştir. Daha sonra dizilim sonuçları PCR ile çoğaltılan gen bölgelerinin NCBI veri tabanında

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kayıtlı olan dizilimler karşılaştırılarak benzerlikleri araştırılmıştır.

Ayrıca *Wolbachia ftsZ* genini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda üç *Wolbachia* pozitif sonuç veren Germencik (H3; HS156 – M, H1; HS156 – M) ve menşei bilinmeyen (H2; köpek 27) üç *Wolbachia* izolatının sekans analizleri yapılarak elde edilen dizilim sonuçlarının Clustal 2.0 bilgisayar programı kullanılarak birbirleri arasında karşılaştırmaları yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

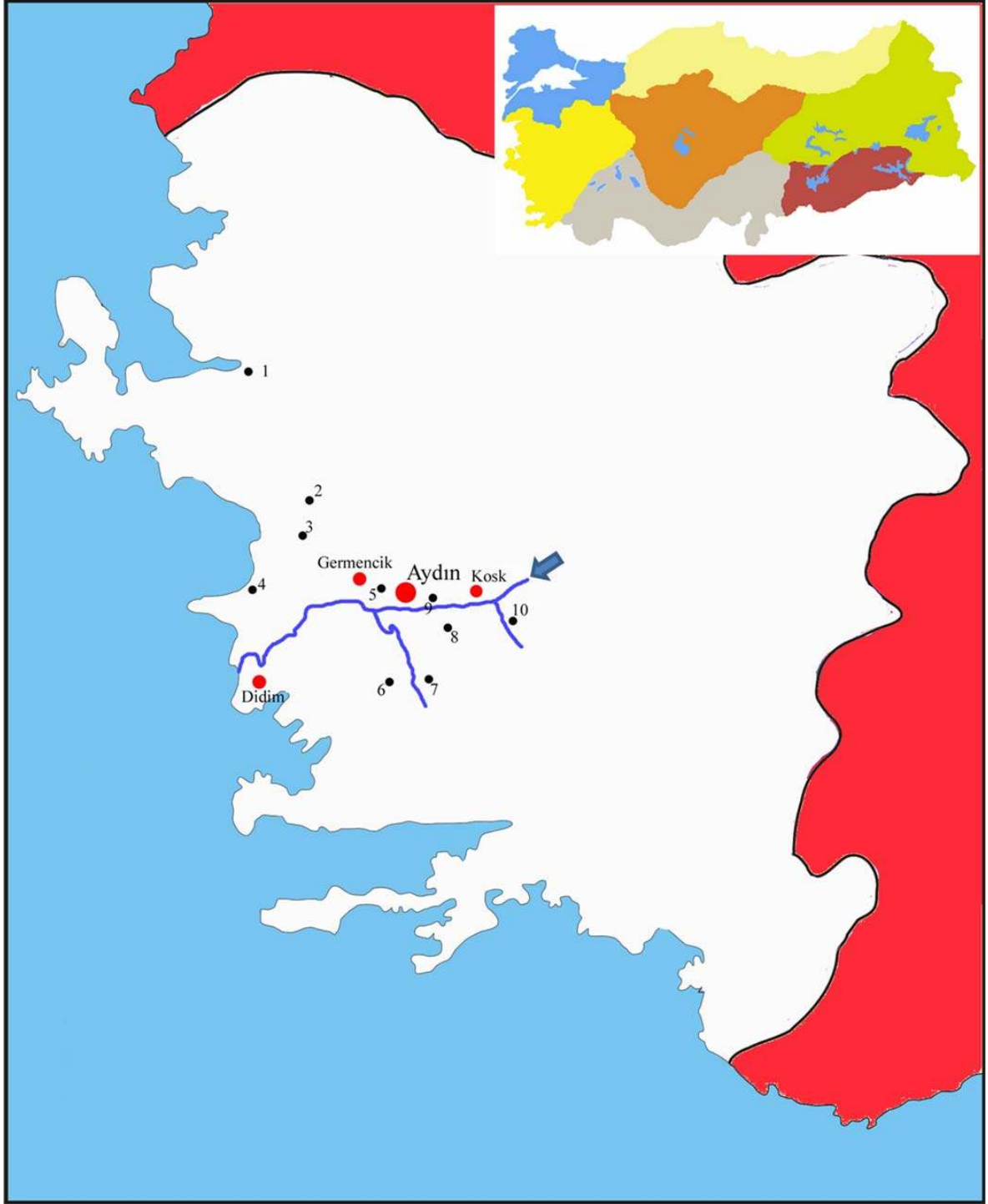
Köpeklerdeki *Dirofilaria* etkenlerinin teşhisi amacı ile toplanan 150 adet kan örneğini direkt kan muayenesi (4 adet), modifiye knott yöntemi (7 adet), membran filtrasyon yöntemi (6 adet) ve PCR (15 adet) ile ayrı ayrı incelenmesi sonucunda toplam 15’inde *Dirofilaria sp.* etkeni belirlenmiş. Diğer filarial etkenlere rastlanmamıştır. *Dirofilaria sp.* pozitif bulunan örneklerin tamamı asit fosfataz boyama tekniği ile boyanmış ve hepsi *Dirofilaria immitis* olarak belirlenmiştir. Bu 15 örneğin 4’ünde natif yöntemle (Aydın/Germencik), 7’sinde modifiye knott yöntemi ile (Aydın/Germencik-6, Aydın/Merkez-1) ve 6’sında membran filtrasyon yöntemi ile (Aydın/Germencik) *Dirofilaria immitis* mikrofiliterleri belirlenmiştir. Ayrıca PCR ile 15 örnekte (Aydın/Germencik-12, Aydın/Didim-1, Aydın/Merkez-1, Aydın/Köşk-1) ve serolojik olarak yine aynı 15 köpekte pozitiflik saptanmıştır (Çizelge 3.1)

#### 3.1. Direk Kan Muayene Yöntemi (Natif)

Toplanan kan örneklerinin tamamı önce natif yöntem ile *Dirofilaria* mikrofiliterleri yönünden incelenmiştir. 150 örnekten sadece Aydın’ın Germencik ilçesindeki köpeklerden alınmış olan 4 kan örneğinde natif yöntem ile *Dirofilaria immitis* mikrofiliterleri teşhis edilmiştir (Çizelge 3.1). Natif yöntemde saptanan mikrofiliterlerin yavaş ve yılanvari, sapık hareketlerle gelişi güzel dolaştığı, aynı zamanda mikroskop sahasının dışına çıkmadığı dikkati çekmiştir. Bu hareket özellikleri ile *D.immitis* mikrofiliterlerine benzerlik göstermiştir.

**Çizelge 3.1.** *Dirofilaria immitis* bulunan kan örneklerinin farklı teşhis yöntemleri ve toplandıkları yerleşim yerlerine göre dağılımı

| Yerleşim Yeri      | <i>Teşhis Yöntemleri</i> |       |                |                    |     |           |        |
|--------------------|--------------------------|-------|----------------|--------------------|-----|-----------|--------|
|                    | Örnek Sayısı             | Natif | Modifiye Knott | Membran Filtrasyon | PCR | Serolojik | Toplam |
| Aydın / Merkez     | 56                       | -     | 1              | -                  | 1   | 1         | 1      |
| Aydın / Bozdoğan   | 2                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Çine       | 1                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Didim      | 1                        | -     | -              | -                  | 1   | 1         | 1      |
| Aydın / Germencik  | 19                       | 4     | 6              | 6                  | 12  | 12        | 12     |
| Aydın / İncirliova | 1                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Karpuzlu   | 29                       | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Köşk       | 2                        | -     | -              | -                  | 1   | 1         | 1      |
| Aydın / Umurlu     | 2                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Yenipazar  | 1                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Aydın / Kuşadası   | 4                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| İzmir / Merkez     | 3                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| İzmir / Selçuk     | 1                        | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| İzmir / Belevi     | 24                       | -     | -              | -                  | -   | -         | -      |
| Toplam             | 150                      | 4     | 7              | 6                  | 15  | 15        | 15     |



**Şekil 3.1.** Örnek alınan yerlerin Ege Bölgesi haritası üzerindeki yerleşimleri. Pozitif örneklerin alındığı yerler kırmızı renklerle gösterilmiştir. Büyük Menderes Nehri ok ile belirtilmiştir. 1-İzmir/Merkez 2-İzmir/Belevi, 3-İzmir/ Selçuk, 4-Aydın/Kuşadası, 5-Aydın/İncirliova, 6- Aydın/Karpuzlu, 7- Aydın/Çine, 8- Aydın/Yenipazar, 9- Aydın/Umurlu, 10- Aydın/Bozdoğan (Orijinal)

### 3.2. Modifiye Knott Yöntemi

Toplanan kan örnekleri natif yöntemle incelendikten sonra modifiye knott tekniği ile incelenmiştir. Toplanan 150 kan örneğinden Aydın merkezden alınan kan örneklerin bir tanesinde ve Aydın Germencik ilçesinden alınan örneklerden 6 tanesinde olmak üzere toplam 7 kan örneğinde modifiye knott tekniği ile *Dirofilaria immitis* mikrofilere teşhis edilmiştir (Çizelge 3.1). Aydın merkezden alınan kan örneğinde bir adet mikrofilere raslanmıştır. Daha sonra yapılmış PCR’da bu örnekte *Dirofilaria immitis* tespit edilmesine rağmen Membran filtrasyon tekniği ile bu kan örneğinde mikrofilere tespit edilememiştir. Modifiye Knott testinde mikrofilere kılıfsız, ön kısmının konik tarzda sivrilerek sonlandığı, gövde ve kuyruklarının düz olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.1).

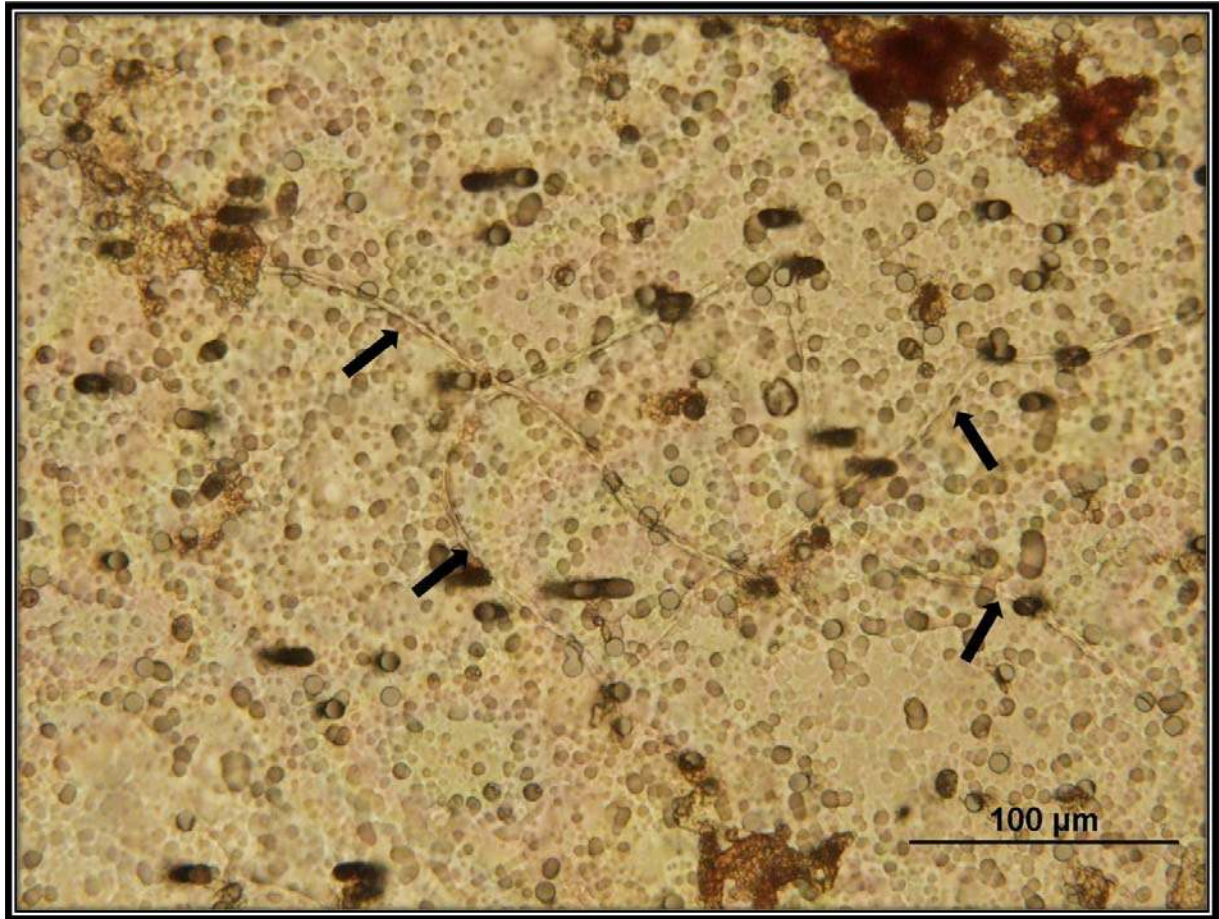


**Şekil 3.2.** Modifiye knott tekniği ile teşhis edilen *Dirofilaria immitis* mikrofilere  
1. Mikrofilere baş kısmı, 2. Mikrofilere kuyruk kısmı (Orijinal)

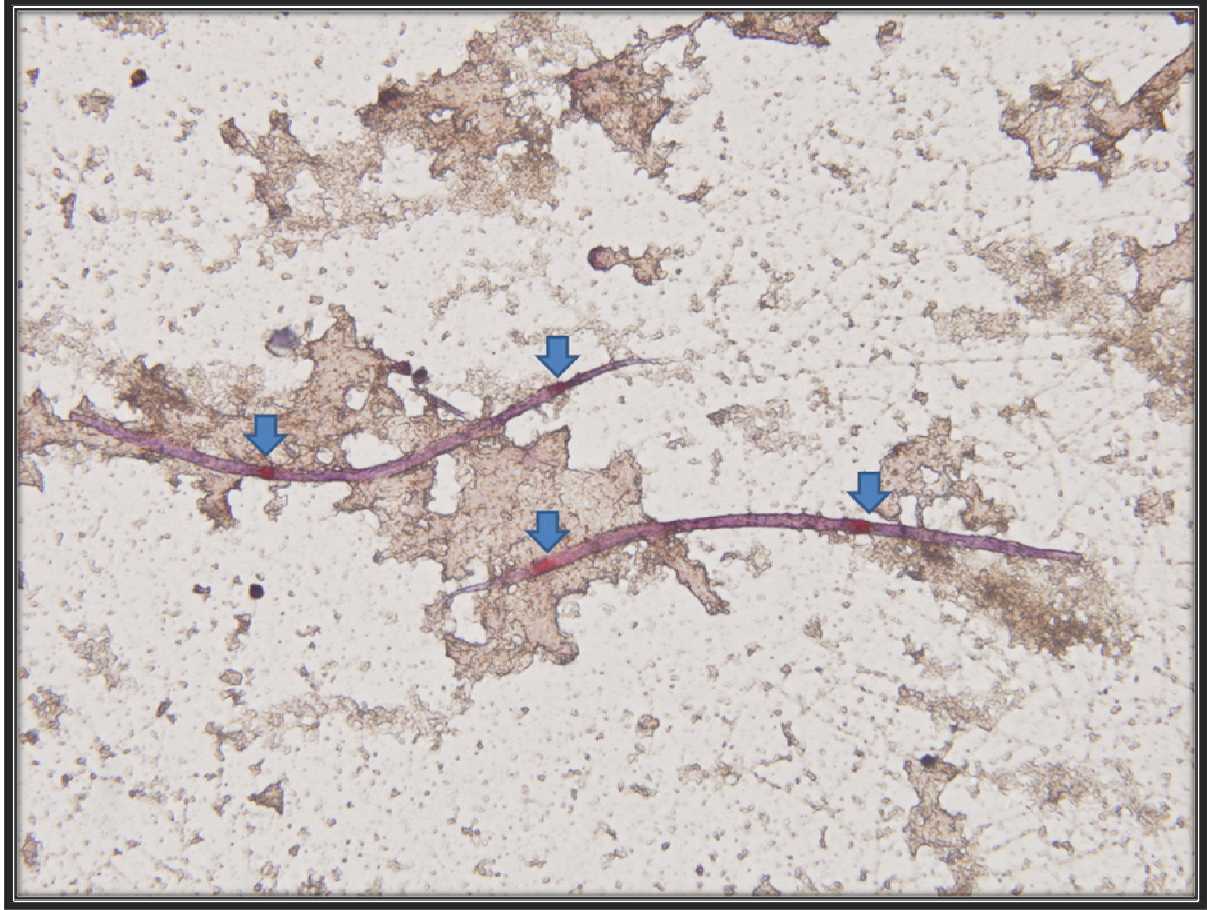
### 3.3. Membran Filtrasyon Yöntemi

Toplanan kan örneklerinde modifiye knott yöntemi ile yapılan inceleme sonrası membran filtrasyon tekniği ile yapılan incelenmede 150 kan örneğinde Aydın'ın Germencik ilçesinden alınan 6 tanesinde membran filtrasyon tekniği ile *Dirofilaria immitis* mikrofilerleri teşhis edilmiştir (Şekil 3.2) (Çizelge 3.1).

Mikrofiler yönünden pozitif bulunan örneklerden 1 ml kan alınarak 14000 devirde 30 saniye santrifüj edilmiş ve dipte kalan çöküntüden hazırlanan sürme preparatlara uygulanan asit fosfataz testinde tüm mikrofilerlerin boşaltım deliği (EP) ile anal deliği (AP) histokimyasal reaksiyon oluştuğu, bu bölgelerin kırmızı-kahverenginde, nokta tarzında boyandığı gözlenmiştir (Şekil 3.4).



**Şekil 3.3:** Membran Filtrasyon tekniği ile tespit edilen *Dirofilaria immitis* mikrofilerleri oklar ile gösterilmiştir (Orijinal).



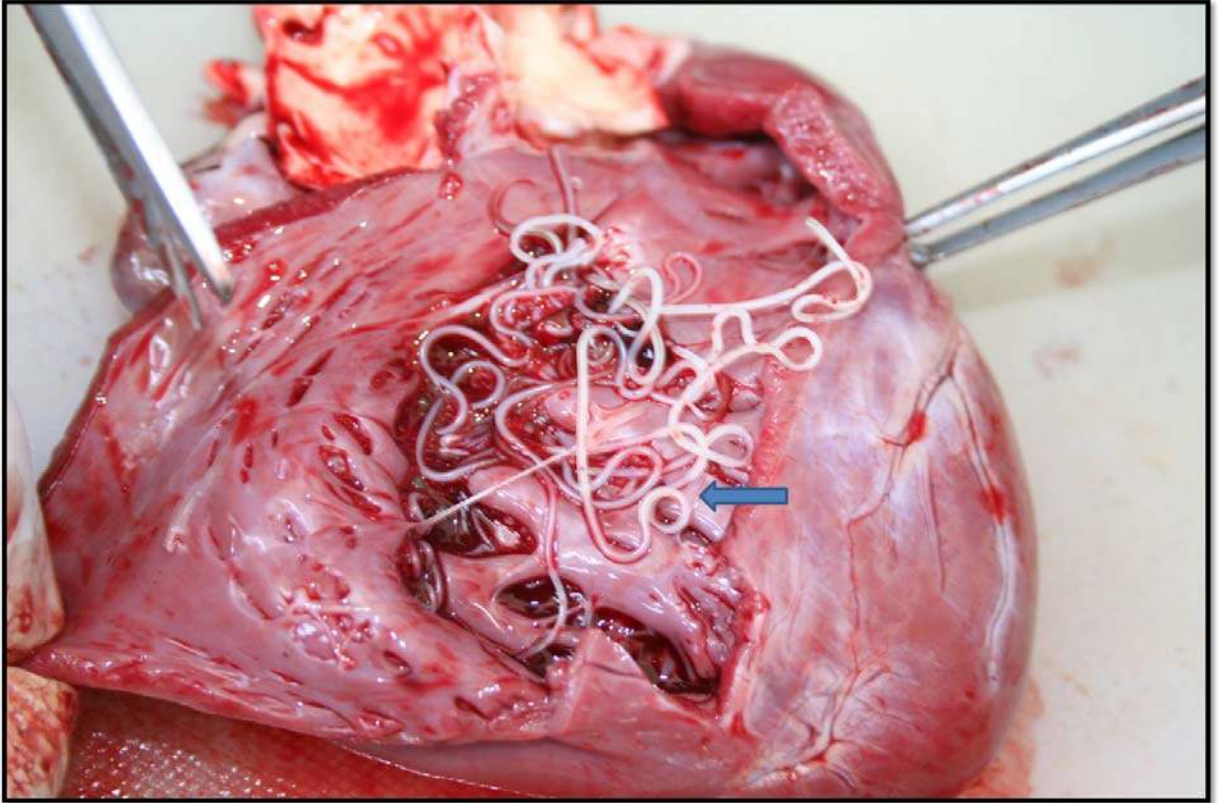
**Şekil 3.4.** Asit fosfataz yöntemi ile boyanmış *Dirofilaria immitis* EP ve AP bölgelerindeki reaksiyon bölgeleri oklar ile gösterilmiştir (Orijinal).

Asit fosfataz tekniği ile boyanan sürme preparatlar mikroskop altında (Olympus BX61) incelenmiş ve Analysis ölçüm programı kullanılarak mikrofilerlerin ortalama uzunlukları 254,1  $\mu\text{m}$ , ön nihayeti-EP uzunluğu 79,2  $\mu\text{m}$ , EP-AP uzunluğu 119,8  $\mu\text{m}$  ve AP-arka nihayeti 55,1  $\mu\text{m}$ , kalınlıkları 4,1  $\mu\text{m}$  ölçülmüştür.

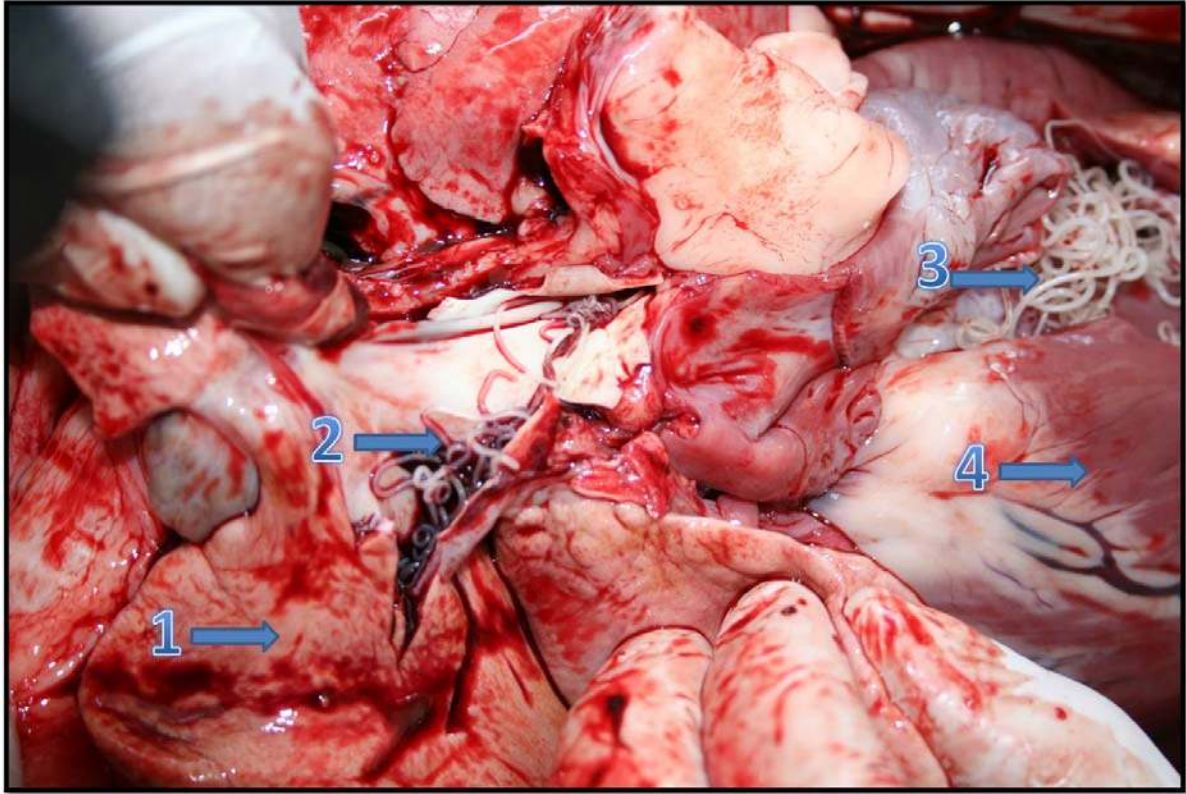
### 3.4. Nekropsi

Toplanan kan örnekleri yukarıda anlatılan mikroskobik teşhis yöntemleri ve / veya PCR ile pozitif olduğu belirlenen köpeklerle Canine Heartworm serolojik kiti (Heska™ Solo Step™ CH Batch Test Kit) kullanılarak kalplerinde erişkin etkenlerin olup olmadığı açısından incelenmiştir. Kalplerinde erişkin *Dirofilaria immitis* olduğu belirlenen köpeklerden 51, 61 ve 62 numaralı köpeklerle sahiplerinin rızası alınarak Lystenon (Fako Actavis İlaçları A.Ş. Doz: 10 ml/hayvan) ile etik kurulda belirtilen şekilde ötenazi ve takiben Adnan Menderes

Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda nekropsileri yapılmıştır. 51 numaralı köpeğin nekropsisinde kalp ağırlığının 335 gram, sağ kalbinde hipertrofi olduğu belirlenmiş ve sağ kalbinde 21 (7 erkek, 8 dişi ve 6 parçalanmış) adet *Dirofilaria immitis* erişkinine rastlanılmıştır. 61 numaralı köpeğin nekropsisinde kalp ağırlığı 410 gram, sağ kalbinde hipertrofi olduğu belirlenmiştir ve sağ kalbinden 38 (18 erkek, 2 dişi ve 18 adet parçalanmış) adet *Dirofilaria immitis* erişkinleri alınmıştır (Şekil 3.4). 62 numaralı köpeğin nekropsisinde ön ve arka bacaklarda deri lezyonlarına rastlanılmış, yapılan ölçümde kalp ağırlığının 250 gram olduğu görülmüş, sağ kalp de hipertrofi ve az sayıda *Dirofilaria immitis* erişkininin *Arteria pulmonalis*'den akciğere lobuna kadar ilerlemiş olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.5). 62 numaralı köpeğin sağ kalp ve *Arteria pulmonalis* 'inden 13 (5 erkek, 2 dişi ve 6 parçalanmış) adet *Dirofilaria immitis* erişkini toplanmıştır.



**Şekil 3.5.** 61 nolu köpeğin sağ kalbindeki *Dirofilaria immitis* erişkinleri ok ile gösterilmiştir (Orijinal)



**Şekil 3.6.** 62 nolu köpeğin kalp ve *Arteria pulmonalis* yolu ile akciğer lobuna kadar gelmiş olan *Dirofilaria immitis* erişkinleri. 1. Sağ akciğer lobu, 2. Akciğer lobundaki erişkin etkenler, 3. Sağ kalpteki erişkin etkenler, 4. Sağ kalp (Orijinal)

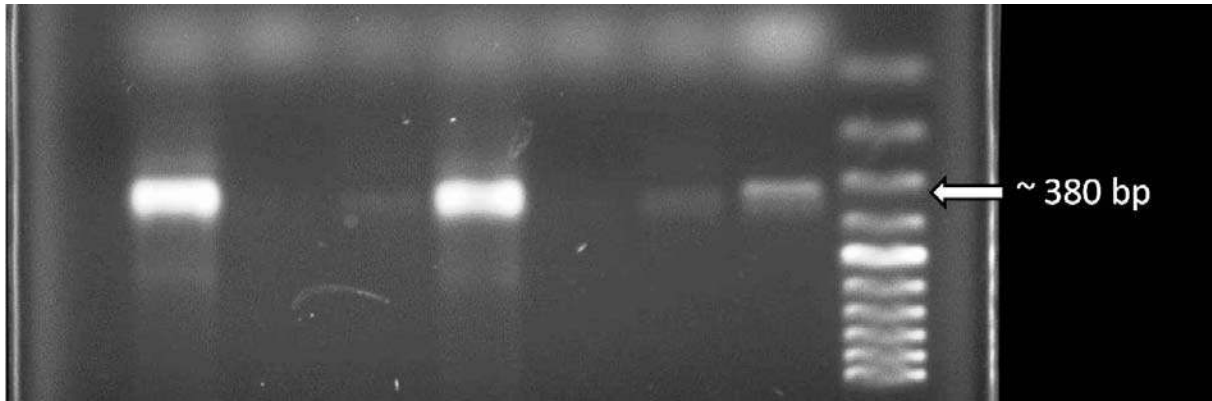
Nekropsi sonrası kalpten alınan 12 dişinin yapılan uzunluk (en ve boy olarak) ölçümlerinde ortalama uzunlukları 284 mm, kalınlıkları 1,21 mm, 30 erkeğin ortalama uzunlukları 178 mm ve kalınlıkları 0,78 mm olarak belirlenmiştir.

### 3.5. PCR (Polimerase Chain Reaction)

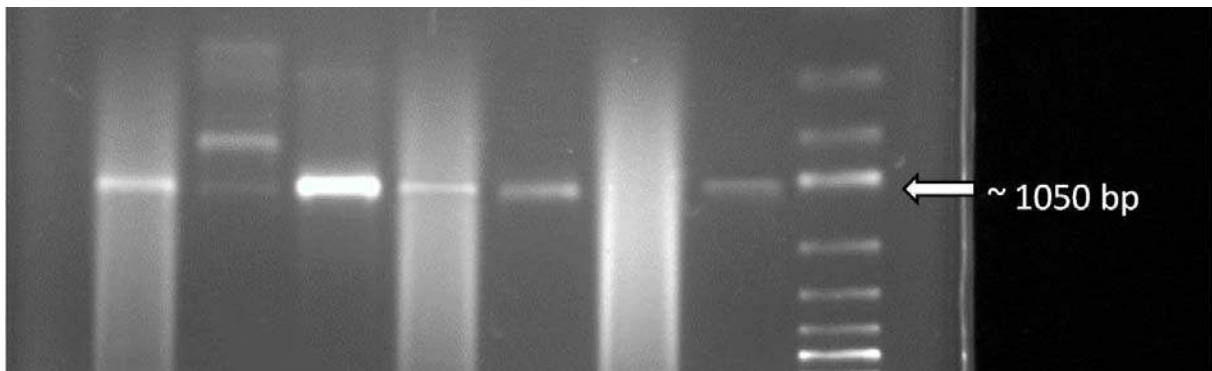
Toplanan tüm kan örnekleri membran filtrasyon tekniği ile incelendikten sonra DNA ekstraksiyonları yapılmış ve PCR yöntemi ile *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* türlerine özgü primerler ve *Wolbachia* soy primerleri kullanılarak moleküler yönden incelenmiştir. PCR ile toplanan 150 kan örneğinin 15 tanesi *Dirofilaria immitis* yönünden pozitif sonuç vermiştir. Pozitif 15 örneğin, 12'si Aydın'ın Germencik ilçesinden, diğer 3'ü ise Aydın'ın Merkez, Didim ve Köşk ilçelerinden alınmıştır (Çizelge 3.1).

PCR ile *D.immitis* yönünden pozitif olan örnekler *Wolbachia* soy primerleri kullanılarak yapılan PCR ile de *Wolbachia* pozitif bulunmuştur.

Ayrıca nekropsi yöntemi ile toplanan *Dirofilaria immitis* erişkinlerinin *Wolbachia* soy PCR'ı yapılmıştır. Bu amaç ile erişkin parazitler 5 eşit parçaya bölünmüş ve her parçanın ayrı ayrı DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Ayrıca nekropsi ile elde edilen parçalanmış erişkinlerin içerisinde bulunduğu 1XPBS santrifüj edilmiş ve santrifüj sonucunda dipteki çökeltide bulunan mikrofilerlerin DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra *Wolbachia* soy PCR'ları yapılmıştır ve bütün örneklerde *Wolbachia* pozitif sonuç alınmıştır.



**Şekil 3.7.** *Dirofilaria immitis* PCR jel elektroforez görüntüsü, 1. Marker 100, 2. HS161, 3. HS162, 4.HS154, 5.HS168, 6.HS170, 7.HS105, 8.HS156, 9.Negatif kontrol (Orijinal)



**Şekil 3.8.** *Wolbachia* soy PCR jel elektroforez görüntüsü. 1. Marker, 2.HS161 numaralı köpek kanı, 3. HS156 numaralı köpek kanı, 4. HS154 nolu köpekten nekropsi sonrası elde edilen mikrofilerler (HS154-M), 5. HS154 numaralı köpekten nekropsi sonrası elde edilen erişkin dişi (HS154-D3), 6. HS161 numaralı köpekten nekropsi sonrası elde edilen erişkin dişi (HS161-D2) 7. HS161 numaralı köpekten nekropsi sonrası elde edilen erişkin erkek (HS161-E3), 8 HS154 numaralı köpekten nekropsi sonrası elde edilen erişkin erkek (HS154-E3), 9.Negatif kontrol (Orijinal)

### 3.6. Serolojik Teşhis

Toplanan kan örneklerinden PCR ile *Dirofilaria immitis* mikrofilerleri olduğu teşhis edilen 15 adet kan örneği *Dirofilaria* spesifik test kitleri (Heska™ Solo Step™ CH Batch Test Kit) ile erişkin parazitler yönünden incelenmiştir. PCR ile pozitif sonuç veren 15 köpeğin serumları bu serolojik test ile de pozitif sonuç vermiştir (Şekil 3.6) (Çizelge 3.1).



**Şekil 3.9.** Heska™ Solo Step™ CH Batch Test Kit ile *Dirofilaria* pozitif bulunan bir örnek (Orijinal)

**Çizelge 3.2.** Pozitif bulunan örneklerin yerleşim yeri, yaş cinsiyete göre dağılımı

| Yerleşim yeri      | Yaş Grupları |     |    | Cinsiyet |      | Toplam |
|--------------------|--------------|-----|----|----------|------|--------|
|                    | 0,5-3        | 4-6 | ≥7 | Erkek    | Dişi |        |
| Aydın / Merkez     | -            | -   | 1  | 1        | -    | 1      |
| Aydın / Bozdoğan   | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Çine       | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Didim      | -            | 1   | -  | 1        | -    | 1      |
| Aydın / Germencik  | 7            | 4   | 1  | 10       | 2    | 12     |
| Aydın / Incirliova | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Karpuzlu   | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Köşk       | 1            | -   | -  | 1        | -    | 1      |
| Aydın / Umurlu     | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Yenipazar  | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Aydın / Kuşadası   | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| İzmir / Merkez     | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| İzmir / Selçuk     | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| İzmir / Belevi     | -            | -   | -  | -        | -    | -      |
| Toplam             | 8            | 5   | 2  | 13       | 2    | 15     |

### 3.7. Sekans Analizi Sonuçları

PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılan *Wolbachia* ile ilgili hedef DNA bölgelerinin dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla eppendorf tüp içerisine konulan PCR ürünleri Macrogen (Macrogen Inc., Güney Kore) firmasına dizilim analizleri için gönderilmiştir. Daha sonra dizilim sonuçları PCR ile çoğaltılan Germencik (H3; HS161 – M, H1; HS156 – M) ve menşei bilinmeyen (H2; köpek 27) üç *Wolbachia* izolatının dizilim analiz sonuçlarının NCBI veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kayıtlı olan dizilimlerin karşılaştırılması sonucunda H1, H2 ve H3 izolatları veri tabanında kayıtlı olan *Dirofilaria immitis*'deki *Wolbachia*'nın *ftsZ* geni ([AJ010272.2](#)) sırası ile % 96, 93 ve 91 oranında benzerlik göstermiştir.

Ayrıca *Wolbachia ftsZ* genini çoğaltmada kullanılan primer çiftleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda üç *Wolbachia* pozitif sonuç veren Germencik (H3; HS1161 – M, H1; HS156 – M) ve menşei bilinmeyen (H2; köpek 27) üç *Wolbachia* izolatının sekans analizleri yapılmıştır. Analiz sonucunda; H1'in %96 (Çizelge 3.3), H2'nin %93 (Çizelge 3.4) ve H3'ün %91 (Çizelge 3.5) *Wolbachia* ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. H2 ve H1 *Wolbachia* izolatının analiz sonuçları Clustal 2.0 bilgisayar programı kullanılarak nükleotid seviyesinde birbirleri arasında karşılaştırmaları sonucunda genin özellikle N terminal bölgesinde (ilk 200 bp'lık kısım) iki izolat arasında iyi oranda korunmuş bölgeler mevcut iken merkezi ve C terminal kesiminde polimorfik alanlar göze çarpmaktadır (Şekil 3.10).

**Cizelge 3.3.** H1-HR (HS156 – M) *Wolbachia*’nın ftsZ geni (AJ010272.2) ile karşılaştırılması

| Erişim     | Tanım                                                                  | Maksimum skor | Toplam skor | Benzerlik yüzdesi | E değeri | Maksimum benzerlik |
|------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|-------------------|----------|--------------------|
| AJ010272.2 | <i>Dirofilaria immitis</i> ’deki <i>Wolbachia</i> ’nın kısmi ftsZ geni | 1517          | 1517        | 95%               | 0.0      | 96%                |
| AJ495000.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> ’deki <i>Wolbachia</i> ’nın ftsZ geni       | 1517          | 1517        | 95%               | 0.0      | 96%                |
| AJ131709.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> ’deki <i>Wolbachia</i> ’nın kısmi ftsZ geni | 1480          | 1480        | 93%               | 0.0      | 96%                |
| AY523519.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> ’deki <i>Wolbachia</i> ’nın ftsZ geni       | 1424          | 1424        | 95%               | 0.0      | 95%                |

> emb | AJ010272.2 | *Dirofilaria immitis*’deki *Wolbachia*’nın kısmi ftsZ geni. Benzerlik = 887/917 (96%), Ayrılık = 17/917 (1%)

|       |     |                                                                                                                           |     |
|-------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Query | 12  | TCTTACCTTTTC-CTTACTTGCTCAGTCGTCTTCGTCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAACTTTTCTTCCTTTAAAGCCCTAGTTTGACTAACAGAGGAAGTTTCCAC   | 130 |
| Sbjct | 990 | TCTTACCTTTTCCTTACTTGCTCAGTCGTCTTCGTCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAACTTTTCTTCCTTTAAAGCCCTAGTTTGACTAACAGAGGAAGTTTCCAC    | 871 |
| Query | 131 | TCTATCATCACGGATAGCACTACTATCAATACCAGTTGCAAGAATAGAACTCTAACTTTACCTTCCATCGCTTGATCGAAAGTAGCACCAAATATTATATTGCAATTTTCATCCACTTC   | 250 |
| Sbjct | 870 | TCTATCATCACGGATAGCACTACTATCAATACCAGTTGCAAGAATAGAACTCTAACTTTACCTTCCATCGCTTGATCGAAAGTAGCACCAAATATTATATTGCAATTTTCATCCACTTC   | 751 |
| Query | 251 | TTCACGCACTCTATTTGCTGCAGCATCAACTTCAAATAGAGTCATGTCCCACTACCCGTAATGTTAATCAATATCCCCTGCGCGCCTTTTCATCGATACATTATCAAGCAATGGATTAGA  | 370 |
| Sbjct | 750 | TTCACGCACTCTATTTGCTGCAGCATCAACTTCAAATAGAGTCATGTCCCACTACCCGTAATGTTAATCAATATCCCCTGCGCGCCTTTTCATCGATACATTATCAAGCAATGGATTAGA  | 631 |
| Query | 371 | CATTGCAGCCTCTGCAGCATTAAATTGCCCTATTTCCCTCCTGCCTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTGCCATTTTCGCTCATCACTGTTCTTATATCAGCAAAGTCAAGGTTAATGAG   | 490 |
| Sbjct | 630 | CATTGCAGCCTCTGCAGCATTAAATTGCCCTATTTCCCTCCTGCCTCTCCAGTACCAATCATTGCTTTGCCATTTTCGCTCATCACTGTTCTTATATCAGCAAAGTCAAGGTTAATGAG   | 511 |
| Query | 491 | CCCTGGCATAATCATTAAAGTCAGTTACTCCTCTAATACCAATGGGGCAGAACATTATCAGCAAGTTTAAATGCATCAGCAAACGTGGTTTTTTCATTAGCAATTCTAAACAAATTTTGA  | 610 |
| Sbjct | 510 | CCCTGGCATAATCATTAAAGTCAGTTACTCCTCTAATACCAATGTG-CAGAACATTATCAGCAAGTTTAAATGCATCAGCAAACGTGGTTTTTTCATTAGCAATTCTAAACAAGTTTT-GA | 393 |
| Query | 611 | TTTGGAATAACAATAAGTGTATCTACATATTTTTTGCAATTCCTCTAATCCGAGCTCTGCA-TACGCATACGACGTACACCTTCGAAGCCAAATGGCTTAGTTACAACCTCCACAGATA   | 729 |
| Sbjct | 392 | TTTGGAATAACAATAAGTGTATCTACATATTTTT-GCAATTCCTCTAATCCGAGCTCTGCAATACGCATACGACGTACACCTTC-GAAGCCAAATGGCTTAGTTACAACCTCCAACAGTTA | 275 |
| Query | 730 | AAAtttttttttCTCTTAACATTTTATCTTTCACTGCAGTTCTTGCTTCCTCTTGCCGCTTTTGCAATTACTGGGGCTGCACCTGTACCAG-ACCACCACCCATTTCTGCTGTTTTTA    | 848 |
| Sbjct | 274 | ATATNTTTTTTCTCTTAACATTTTATCTTTCACTGCAGTTCTTGCTTC-TCTTGCCGCTTTTGCAATTACTGGCG-CTGCACCTGTACCAGTACCACCACCCATT-CCTGCTGTTAT-A   | 159 |
| Query | 849 | AAGAGAA-ATGAC-ATCCTTTATATGT-CCNNAATTTCTTTAATCGATTCTTTCTGCTGCCGCTTTTCCA-TATCA                                              | 921 |
| Sbjct | 158 | AAGAGCATATGACTATCCTTTATATGTTCCATAATTTCTTTAATCGATTCTT-CTGCTGCA-CCTTTACCAATATCA                                             | 84  |

**Çizelge 3.4.** H2-HR (Köpek-27) *Wolbachia*'nın ftsZ geni (AJ010272.2) ile karşılaştırılması

| Erişim     | Tanım                                                                  | Maksimum skor | Toplam skor | Benzerlik yüzdesi | B. Değer | Maksimum benzerlik |
|------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|-------------------|----------|--------------------|
| AJ010272.2 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın kısmi ftsZ geni | 479           | 479         | 34%               | 1e-131   | 93%                |
| AJ495000.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın ftsZ geni       | 479           | 479         | 34%               | 1e-131   | 93%                |
| AJ131709.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın kısmi ftsZ geni | 446           | 446         | 31%               | 1e-121   | 92%                |

> emb | AJ010272.2 | *Dirofilaria immitis*'deki *Wolbachia*'nın kısmi ftsZ geni. Benzerlik = 308/331 (93%), Ayrılık= 10/331 (%3)

```

Query 13 TCTTACCTTTTC-CTTACTTGCTCAGTCGTCCTTCGTCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAACTTTTCTTCCTTTAAAGCCCTAGTTTGACTAACAGAGGAAGTTTCCAC 131
      |||
Sbjct 990 TCTTACCTTTTCACCTACTTGCTCAGTCGTCCTTCGTCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAACTTTTCTTCCTTTAAAGCCCTAGTTTGACTAACAGAGGAAGTTTCCAC 871

Query 132 TCTATCATCACGGATAGCACTACTATCAATACCAGTTGCAAGAATAGAACTCTAACTTTACCTTCCATCGCTTGATCGAAAGTAGCACAAAAATAATATTTCATTTTCN-CCAACCTT 250
      |||
Sbjct 870 TCTATCATCACGGATAGCACTACTATCAATACCAGTTGCAAGAATAGAACTCTAACTTTACCTTCCATCGCTTGATCGAAAGTAGCACCAAATATTATATTTCATTTTCATCCA-CTT 752

Query 251 CTTAACGCATTCTATTTGCTGCA-CATCAACTTCAAATAAATTT-TGTCCCC-CNACCC-TAAT-TAAAT-ATTTATCCCCTGGGCGCCTT 335
      |||
Sbjct 751 CTTACGCACTCTATTTGCTGCAGCATCAACTTCAAATAGAGTCATGTCCCCACTACCCGTAATGTTAATCAAT-ATCCCCTGCGCGCCTT 662

```

**Çizelge 3.5.** H3-HR (HS161 – M) *Wolbachia*'nın *ftsZ* geni (AJ010272.2) ile karşılaştırılması

| Erişim     | Tanım                                                                  | Maksimum skor | Toplam skor | Benzerlik yüzdesi | B. Değer | Maksimum benzerlik |
|------------|------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|-------------------|----------|--------------------|
| AJ010272.2 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın kısmi ftsZ geni | 250           | 250         | 37%               | 5e-63    | 91%                |
| AJ495000.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın ftsZ geni       | 250           | 250         | 37%               | 5e-63    | 91%                |
| AJ131709.1 | <i>Dirofilaria immitis</i> 'deki <i>Wolbachia</i> 'nın kısmi ftsZ geni | 220           | 220         | 33%               | 4e-54    | 90%                |

> emb | AJ010272.2 | *Dirofilaria immitis*'deki *Wolbachia*'nın kısmi ftsZ geni. Benzerlik=169/185 (91%), Ayrılık = 6/185 (3%)

|       |     |                                                                                                                         |     |
|-------|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Query | 17  | TTACCTTTTTACTTACTTGCTCAGTCGTCTTCGCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAAATTTTCTTCCTTTAAAGCCCTATTTTGATTAACAGAGGNAGTTTCCACTC  | 136 |
| Sbjct | 988 | TTACCTTTTCACTTACTTGCTCAGTCGTCTTCGCTCCGGCACTGAAGTTTGGCTGTAAGGCCACTTAAACTTTTCTTCCTTTAAAGCCCTAGTTTGACTAACAGAGGAAGTTTCCACTC | 869 |
| Query | 137 | TATCATCAGGGAGAGCACT-CTATCAAG-CC-GTTGCAAGaaaa-aaaCTCTATCTT--CCTTCC                                                       | 195 |
| Sbjct | 868 | TATCATCACGGATAGCACTACTATCAATACCAGTTGCAAGAATAGAACTCTAACTTTACCTTCC                                                        | 804 |



#### 4. TARTIŞMA

Köpeklerle yerleşen filarial nematodlar, hem hayvanlarda meydana getirdikleri hastalık hem de zoonoz özellik göstermesi nedeniyle dünyada artan bir öneme sahiptir. İnsan ve hayvanların enfeksiyona maruz kalmasında ara konak görevi üstlenen çeşitli cinslere bağlı artropod türlerinin dünyada geniş bir yayılışa sahip olması konunun önemini daha da artırmaktadır (Montoya ve ark 1998, Fan ve ark 2001). Çeşitli ülkelerde bu parazitlerin yayılışı ve epidemiolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar, daha çok köpeklerde ciddi kardiyopulmoner bozukluklara ve bazen de ölüme yol açan *D.immitis* üzerinde yoğunlaşmıştır (Barriga 1982, Anderson 2000).

Filarial nematodların dünyadaki yayılışı bölge, duyarlı vektör, ekolojik faktör, uygulanan teknikler ile daha birçok faktöre bağlı değişmekle birlikte *D.immitis*'in Amerika'da % 0,3-39,7 (Graham 1974, Kocan ve Laubach, 1976, Todaro ve ark 1977, Mackenzia ve Waldie, 1991, Theis ve ark 1999, Theis ve ark 2001), İspanya'da % 1,6-58,89 (Perez-Sanchez ve ark 1989, Ortega-Mora ve ark 1991, Aranda ve ark 1998, Montoya ve ark 1998), Hollanda'da % 9 (Saleh ve ark. 1988), İtalya'da % 0,6 (Cringoli ve ark, 2001), Avusturya'da % 3,6-6,4 (Martin ve Collins 1985, Marks ve Bloomfield 1998), Avustralya'da % 1,1-15 (Copland ve ark 1992, Bidgood ve Collins 1996), Tayvan'da % 12,1-13,4 (Fan ve ark. 2001) ve Japonya'da (Tada ve ark 1991, Nogami ve Sato 1997) % 46,8-62,8 oranında yayılışa sahip olduğu bildirilmektedir. Türkiye, gerek iklimsel gerekse ekolojik faktörler yönünden filaria türlerinin yayılışı için uygun bir ülke olarak gözükmesine rağmen filariaların yayılışı konusunda sınırlı bilgi bulunmaktadır. Türkiye'de şimdiye kadar filaria türlerinden yalnızca *D.immitis*, *D.reconditum* ve *D.repens*'in varlığı bildirilmiştir (Taşan 1977, Güralp 1981, Ataş ve ark 1997). Bu konuda yapılan çalışmalarda genellikle nekropsi bakısı yapılmış daha seyrek olarak natif,

Modifiye Knott kan bakı yöntemleri nekropsi ile desteklenmiştir. *Dirofilaria immitis*'e Ankara'da % 0,6-9,3 (Pamukçu ve Ertürk 1961, Yıldırım 1998, Zeybek 1989, Zeybek ve ark 1992), Afyon'da %3,6 (Kozan ve ark 2007), Aydın'da %13,9 (Voyvoda ve ark. 2004), Bursa'da % 0,2-2,98 (Tınar ve ark 1989, Coşkun ve ark 1992, Yalçın ve ark 2007), Elazığ'da % 5-9,1 (Balıkçı ve Sevgili 2005, Taşan 1984), İstanbul'da %1,52 (Öncel ve Vural 2003), Hatay'da %26 (Yaman ve ark 2009), Kayseri'de % 12 (Şahin ve ark 1993), Kırklareli'nde %27,46 (Yıldız ve ark 2008), Sivas'ta % 6 (Ataş ve ark 1997), Şanlıurfa'da %5,5-10,5 (Şahin ve 2004), Eskişehir'de %1,4-30 (Kozan ve ark 2007, Sarnıç ve Aklan 1986), Van'da %17,8 (Göz ve ark 2007) oranında rastlanmıştır (Çizelge 1.1.3).

*Dirofilaria repens*'in aynı cinse ait *D.immitis*'den daha az ve sınırlı bir yayılışa sahip olduğu ve İspanya'da % 0,3-86 (Perez-Sanchez ve ark 1989, Cancrini ve ark 2000), İtalya'da % 0,8 (Cringoli ve ark 2001) kaydedilirken oran verilmeksizin Fransa, Almanya, Seylan, Hindistan, İsrail, Mısır, Kanada, Brezilya, Arjantin ve Nijerya'dan da bildirilmiştir (Barriga 1982, Soulsby 1982, Anderson 2000). Benzer biçimde Türkiye'de şimdiye kadar sadece Ankara (Doğanay 1983) ve Elazığ'da (Taşan 1983, Taşan, 1984) *D.repens* bildirilirken çalışmamızda *D.repens*'e rastlanmamıştır. Daha önce *D.repens* varlığı bildirilen bölgelerde daha sonra rastlanılmamasına potansiyel vektör dağılımının sınırlı olmasının neden olabileceği bildirilmiştir (Aranda ve ark 1998).

Bu çalışmada *D.immitis*'in Aydın bölgesindeki yayılışı %12,3 olarak saptanmış ve daha önce aynı bölgede yapılan çalışma ile benzerlik göstermiştir. Yerleşim yerleri arasında en yüksek yaygınlık %80 oranla Aydın'ın Germencik ilçesinde belirlenmiştir, bunu % 6,66'lık oranlarla Aydın Merkez, Köşk ve Didim ilçeleri takip etmiştir. Germencik ilçesinde etken oranının fazla olması bölgede bataklık arazinin ve herhangi bir çalışma yapılmamakla birlikte bölgede etkene arakonaklık yapabilecek sivrisinek oranının yüksek olması olarak düşünülmüştür. İzmir bölgesinden alınan örnek sayısının az olması nedeni ile bölgedeki *Dirofilaria* türleri yaygınlığı değerlendirilememiştir.

Filaria tipi nematodların teşhisinde kanda mikrofiler saptanmasında kullanılan yöntemlerden membran filtrasyon yönteminin, natif, sürme preparat ve modifiye knott yöntemlerine oranla daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Acevedo ve ark. 1981, Seward 2001). Bununla birlikte bazı araştırmacılar (Williams ve ark 1977, Calvert 1987, Witeley 1988) membran filtrasyon ve modifiye knott yöntemlerinin eşit duyarlılıkta olduğunu ve

natif yönteme oranla konsantrasyon yöntemlerinin %50-90 daha duyarlı olduğunu kaydetmektedirler. Williams ve ark. (1977), membran filtrasyon ve modifiye knott yöntemlerinin, 1 mikrofiler/ml yoğunluğunda bile oldukça başarılı olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca membran filtrasyon yönteminin daha hızlı ve güvenli olmasıyla modifiye knott yönteminden daha avantajlı olduğu ve bu testin rutinde tavsiye edilebilir olduğu bildirilmektedir (Acevedo ve ark 1981). Modifiye knott yönteminde, özellikle mikrofilerlerin ayırımında baş ve kuyruk kısımlarının net g r ld ğu ve morfolojik ölçümlerin daha sık olarak bu teste göre yapıldığı, maliyetinin düşük olduğu ancak, santrifüje gereksinim duyulması ve yetersiz santrifüj sonucunda mikrofiler kaybının olabileceği kaydedilmektedir (Calvert 1987, Whiteley 1988, Courtney 1989). Membran filtrasyon yönteminde ise daha hızlı sonuçlar alındığı ve belirli bir sahada fazla sayıda mikrofilerin incelenemediği, buna karşın, saptanan mikrofilerlerin bazen baş veya kuyruk kısımlarının membran üzerindeki porlara girmesiyle bu bölgelerin incelenmesinin zor olduğu ve filtrasyon tertibatındaki temizlik yetersizliğinin pozitif örneklerde bulunan mikrofilerlerin bir diğer kan örneğine bulaşmasına yol açabildiği belirtilmektedir (Williams ve ark., 1977; Whiteley, 1988; Courtney, 1989b). Williams ve ark. (1977), 8  m por genişliği olan filtrelerde %3,5'a kadar mikrofiler kaybının şekillenebildiğini, 5  m por genişliğindeki filtrelerde ise %1'den fazla kayıp görülmediğini bildirmişler ancak, bu kayıpların elde edilen sonuçları %3'den fazla değiştirmeyeceği Wylie (1970) tarafından belirtilmiştir. Adriano ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada kandaki mikrofilerlerin belirlenmesi için PCR yönteminin, Ranjbar-Bahadori ve ark. (2007) ve Masahiko ve ark. (1999) yaptıkları çalışmalarda kit kullanılarak uygulanan serolojik yöntemin modifiye knott yönteminden daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada membran filtrasyon ve modifiye knott yöntemleri, natif yönteme göre daha duyarlı bulunmuştur. Ayrıca PCR ve kit kullanılarak uygulanan serolojik yöntemin kandaki mikrofilerlerin belirlenmesi açısından modifiye knott ve membran filtrasyon tekniklerinden daha duyarlı olduğu gözlenmiştir.

Perifer kanda saptanan mikrofilerlerin teşhisi amacıyla hareket özellikleri, uzunluk ve genişlik ölçüleri, baş, gövde ve kuyruk şekilleri gibi çeşitli morfolojik özellikleri ile bazı somatik yapıların  n uca uzaklıklarının vücut uzunluğuna oranı gibi çeşitli kriterlerden yararlanılmaktadır (Lindsey 1965, Kelly 1973, Anon 1974, Euzeby 1981, Courtney 1989b, Corwin ve Nahm 1998, Rommel ve ark 2000). Mikrofilerlerin teşhisinde

olabilecek hataları önlemek için somatik yapıların incelenmesinde, arzu edilen bölgelere göre farklı boyama yöntemleri (Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, Brilliant cresol blue, Hematoxyline ferrique, Hemalun-eosine) kullanılmakta ve bu durum zaman, emek ve para açısından ayrıca bir yük getirmektedir. Ancak, asit fosfataz boyama yönteminin daha kısa sürede kesin teşhiste başarılı olduğu pek çok araştırmacı (Omar, 1977, Whitlock ve ark 1978, Euzeby 1981, Courtney 1989b, Ortega-Mora ve ark 1989, Leuterer ve Gothe 1993, Peribanez ve ark 2001) tarafından kaydedilmekte ve mikrofiler identifikasyonunda tercih edilmektedir. Asit fosfataz histokimyasal boyama yönteminin, sürme preparatların yanısıra membran filtre üzerinde de uygulandığı kaydedilmekte, bu şekilde daha fazla kan örneğinin incelenmesinin mümkün olduğu ve mevcut miks enfeksiyonların teşhis edilme şansını arttırdığı bildirilmektedir (Whitlock ve ark.1978, Acevedo ve ark 1981, Theis ve ark 1999). Acevedo ve ark. (1981), filtrasyon ve histokimyasal boyama metodunun birlikte kullanılmasının mikrofiler saptanması ve identifikasyonunda en uygun yöntem olduğunu belirtmektedir. Çalışmada elde edilen asit fosfataz boyama verilerine göre *D.immitis*, *D.repens* ve *D.reconditum*'dan kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Asit fosfataz boyamada mikrofilerlerin EP ve AP bölgelerinde kırmızı-kahverenginde nokta tarzında boya alması ile *D.immitis* mikrofilerleri olduğu saptanmıştır. *Dirofilaria repens* mikrofilerlerinde asit fosfataz aktivitesi AP'de yüzük tarzında görülürken *D.reconditum* mikrofilerlerinde tüm yüzeyde boya aktivitesi gözlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar araştırmacıların (Chalifoux ve Hunt 1971, Whitlock ve ark 1978, Acevedo ve ark 1981, Leuterer ve Gothe 1993, Theis ve ark 1999, Peribanez ve ark 2001) bulguları ile uyum göstermiş, perifer kanda mikrofiler saptanması ve identifikasyonunda membran filtrasyon ve asit fosfataz yöntemlerinin birarada kullanılmasının daha kısa sürede kesin sonuca ulaşılmasına imkan sağladığı gözlenmiştir. Peribanez ve ark. (2001)'nın, belirttiği gibi mikrofilerlerde asit fosfataz reaksiyonunu saptamak amacıyla LEUCOGNOST-SP® test kitinin kullanımının oldukça başarılı ve kolay olduğu, aynı zamanda +4° C'de uzun süre muhafaza edilebildiği gözlenmiştir. Bunun yanısıra çalışmada -20 °C'de 6 ay muhafaza edilen sürme preparat ve membran filtrelerindeki mikrofilerlerde herhangi bir bozulma olmadan asit fosfataz reaksiyonunun şekillendiği belirlenmiştir. Ayrıca, EP ve AP'nin toplam vücut uzunluğuna oranı sırasıyla % 31,1 ve % 78,3 saptanmış, bu yönüyle de araştırmacıların (Euzeby 1981, Barriga 1982, Soulsby 1982, Mehlitz 1988, Yıldırım 1998) sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir.

*Dirofilaria immitis* enfeksiyon riskinin yaş faktörü ile ilgili olarak değişkenlik gösterdiği kaydedilmekle birlikte (Graham, 1974, Selby ve ark 1980, Perez-Sanches ve ark 1989, Montoya ve ark 1998, Fan ve ark 2001), bazı yazarlar (Thrasher ve ark 1968, Rowley 1981, Martin and Collins 1985) *D.immitis* enfeksiyonunda köpeğin yaşının etkili olmadığını, tüm yaş gruplarında enfeksiyonun görülebileceğini kaydetmektedir. Bazı yazarlar (Selby ve ark 1980, Pappas ve Lunzman 1985, Perez-Sanchez ve ark 1988, Ortega-Mora ve ark 1991, Montoya ve ark 1998) ise yaşın artması ile orantılı olarak enfeksiyon oranının artış gösterdiğine, özellikle 3-7 yaş arasında daha yaygın (% 6,1-53,8) olduğuna dikkat çekmektedirler. Aranda ve ark. (1998), 5 yaş üstü köpeklerde *D.immitis*'in % 73 yayılım gösterdiğini, Sears ve ark. (1980), 1-3, 4-6, 7-9 ve 10-12 yaş gruplarındaki köpeklerde enfeksiyon prevalansını sırasıyla % 6, % 11, % 15, % 19 bildirerek yaş ile birlikte enfeksiyon oranlarının arttığını kaydetmişlerdir. Benzer şekilde Fan ve ark. (2000), *D.immitis* enfeksiyonunu 6 yaş üstü köpeklerde (% 23,7), 1-3 (% 6,3) ve 3-6 (% 14,1) yaş arası köpeklerle oranla daha yaygın bulmuşlardır. Bu çalışmada köpeklerin yaş gruplarına göre *D.immitis* enfeksiyonunda prevalans 0,5-3 ve 4-6 yaş arası köpeklerde %42,85, 7 yaş üzeri köpeklerde %14,3 olarak belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda belirtilenin aksine bu çalışmada 0,5-3 ve 4-6 yaş köpeklerde enfeksiyon oranının daha fazla çıkmasının sebebi; örneklerin toplandığı bölgelerde köpeklerin bekçilik ve av amacı ile kullanılması nedeni ile ileri yaştaki köpek sayısının az olmasına olarak düşünülmüştür. Bu sebepten dolayı her yaş grubundan yeterli sayıda örnek olmaması nedeniyle bu durum yorumlanamamıştır (Çizelge 3.2).

Köpeklerde *D.immitis* enfeksiyonunda, cinsiyetin etkisinin olmadığı kaydedilmekte (Graham 1974, Martin ve Collins 1985, Aranda ve ark 1998, Masahiko ve ark 1999, Theis ve ark 1999, Fan ve ark 2001, Byeon ve ark 2007, Adriano ve ark 2009) veya genel olarak bu parazite erkek köpeklerde dişilerden daha çok rastlandığı bildirilmektedir (Selby ve ark 1980, Montoya ve ark 1998). Bu farklılığın dişi köpeklerin durağan yapısına karşın erkek köpeklerin koruyucu, av veya spor amacıyla daha çok tercih edilmesi, erkek köpeklerin dolaşma eğilimlerinin fazlalığı sebebiyle, sivrisineklere maruz kalma risklerinin dişilere göre daha yüksek olmasından ileri gelebileceği kaydedilmektedir (Selby ve ark 1980; Montoya ve ark 1998). Bu çalışmada pozitif olduğu belirlenen köpeklerin %86,66'sını erkek köpekler, %13,33'ünü dişi köpekler oluşturmaktadır. Bu bakımdan yukarıda belirtilen veriler ile benzerlik göstermektedir. Bunun sebebi örnek

alınan bölgelerde erkek köpeklerin koruma ve av amaçlı kullanılması olarak düşünülmüştür. Bu sebepten dolayı iki cinsiyette yeterli sayıda örnek olmaması nedeniyle bu durum yorumlanamamıştır (Çizelge 3.2).

Dışarıda barınan ve profilaksi uygulanmayan köpeklerde *D.immitis* enfeksiyon riskinin yüksek olduğu, bunun da sivrisineklere maruz kalma riski ile orantılı olduğu kaydedilmiştir (Montoya ve ark 1998, Theis ve ark 1999). Bu çalışmada enfeksiyon saptanan köpeklerin tümünün dışarıda barınan, dolayısıyla sivrisinekler tarafından ısırılma olasılığı yüksek olan ve profilaksi uygulanmayan köpekler olması, sonuçlarımızın ilgili literatürlerle (Montoya ve ark 1998, Theis ve ark 1999) uygunluk gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca pozitiflik saptanan Aydın Merkez, Germencik, Köşk ve Didim ilçelerinin sivrisineklerin doğal yaşam alanı olan Büyük Menderes Nehri'ne yakın olması bu pozitifliği destekler niteliktedir.

*Wolbachia* türleri birçok artropod türünün üreme sistemlerinde yerleşik halde bulunan sitoplazmik bakterilerdir. Bu bakteriler konak üreme sisteminde partenogenez, üreme bozuklukları ve feminasyon gibi etkiler oluşturmaktadır (Genchi ve ark 2007, Werren ve ark 1995). *Dirofilaria immitis*'ler de *Wolbachia*'nın varlığı ilk olarak 1995 yılında ortaya koyulmuştur (Sironi ve ark 1995). Bütün *Dirofilaria*'larda *Wolbachia*'nın belirlenmesi nedeni ile aralarında simbiyotik bir ilişki olduğu düşünülmüştür (Bandi ve ark 2001). 2000 yılında tetrasiklin türevi ilaçların kullanılması sonucunda *Dirofilaria immitis* enfeksiyonların azalması, *Wolbachia*'nın hastalığın patogenezisinde önemli yeri olduğunu düşündürmüştür (Hoerauf ve ark 2000). Yapılan çalışmalarda değişik moleküler ve serolojik metodlar kullanılarak *Dirofilaria immitis*'lerde *Wolbachia*'nın varlığı ortaya konulmuştur (Bandi ve ark 1998, Casiraghi ve ark 2002, Kramer ve ark 2005, Marcos-Atxutegi ve ark 2002, Zhou ve ark 1997, Werren ve ark 1995). Bu çalışmada, toplanan örneklerden elde edilen *Dirofilaria immitis* erişkin ve mikrofilerilerinin tamamında PCR tekniği kullanılarak *Wolbachia*'nın varlığını tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda insektalarda görülen 38 *Wolbachia* türünün birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda filogenetik olarak iki grup (A ve B) oluşmuş ve bu gruplar arasında amino asit düzeyine *ftz* geninin 5' yönünde (ilk 170 amino asit) altı amino asit farklılaşması gözlenirken 3' yönde 25 farklı amino asite rastlanmış ve proteine ait N terminal kısmın daha korunmuş

olduğu belirtilmiştir (Werren e ark 1995). Bu çalışmada, Germencik'ten ve farklı bir bölgeye ait somatik *D.immitis*'ten izole edilen *Wolbachia* türleri arasında yapılan karşılaştırmada nükleotid düzeyinde genin 5' kısmının korunmuş, 3' kesiminde ise insesiyonların olduğu gözlemiştir. Her ne kadar nükleotid düzeyinde farklılaşmanın görülmüş olması ve meydana gelen değişimlerdeki sinonim ve nonsinonim yer değiştirmelerinin belirlenmemiş olmasına rağmen, yapılan analizler bize *Dirofilaria immitis*'lerde varlığı gösterilen *Wolbachia* türleri arasında bölgesel farklılığın oluştuğunu göstermektedir. Bu farklılıkların ileriki çalışmalarda yapılacak olan filogenetik analizler ile belirlenerek bölgede yer alan bakteri popülasyonlarının belirlenmesi için bir ön çalışma olmuştur. Aynı zamanda *Wolbachia* türlerinin *D.immitis* erişkinlerinde üreme üzerine oluşturabileceği düşünülen muhtemel değişimlerin ve iki tür arasındaki simbiyotik ilişkinin belirlenmesi köpeklerde görülen Diroflariosis'e karşı yeni kontrol stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

## 5. SONUÇ

Bu çalışma ile *D.immitis*'in prevalansı Aydın ve çevresindeki köpeklerde % 12.3 olarak saptanmış, İzmir bölgesinde etkene rastlanmamıştır. Ayrıca araştırma yapılan bölgelerde *D.repens* belirlenmemiştir. Kanda mikrofiler saptanması ve identifikasyonu amacıyla natif, modifiye knott, membran filtrasyon ve PCR yöntemleri ile asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemi kullanılmış, her yöntem için elde edilen bulgular değerlendirilmiştir. Perifer kanda mikrofilerlerin belirlenmesinde en etkili yöntemin PCR olduğu belirlenmiş. Mikroskopik inceleme yöntemleri karşılaştırıldığında modifiye knott ve membran filtrasyon tekniklerinin aynı duyarlılıkta olduğu saptanmıştır. Türkiye’de parazitoloji laboratuvarlarında henüz kullanılmayan bu tekniklerin, filarial enfeksiyonların durumunun tespit edilmesi ve gerekli profilaktik önlemlerin ortaya konulması amacıyla rutin olarak kullanılmasında yarar görülmektedir. Bununla birlikte özellikle *D.immitis*’den kaynaklanan gizli enfeksiyonların da teşhisinde, sözü edilen parazitolojik tekniklerin yanı sıra immunoserolojik teşhis yöntemlerin de beraberinde kullanılmasının elde edilecek sonuçların daha sağlıklı ve gerçekçi olmasını sağlayacağı kanatine varılmıştır.

Bu çalışma ile, Türkiye’de köpeklerdeki *D.immitis* etkenlerinin kandaki mikrofiler ve erişkinlerinde *Wolbachia*’nın varlığı ilk olarak tespit edilmiştir.

## ÖZET

Bu çalışma, Haziran 2007-Ağustos 2009 tarihleri arasında Aydın ve İzmir yöresinde 150 köpekte filarial enfeksiyonların yayılışını belirlemek ve *Dirofilaria* türlerinde *Wolbachia*'nın varlığını ortaya koymak amacı ile yapılmıştır. Bu amaçla alınan kan örnekleri natif, modifiye knott, membran filtrasyon ve PCR yöntemleri ile *Dirofilaria* türleri açısından incelenmiş; ayrıca asit fosfataz boyama yapılmıştır. Pozitif olduğu belirlenen örneklerde ticari kit kullanılarak kalplerinde erişkin parazitin varlığı araştırılmış ve kalbinde erişkin *Dirofilaria immitis* belirlenen 3 köpekte nekropsi yapılarak erişkin parazitleri alınmıştır. Kan örneği alınan köpeklerin bulunduğu bölge, kan alma tarihi ve zamanı, yaşı, cinsiyeti, sahipli/sahipsiz, içeride/dışarıda barınma, varsa klinik belirtileri protokol numarası verilerek kayıt edilmiştir.

Aydın bölgesinde köpekleri *Dirofilaria*'nın prevalansı %12.3 olarak belirlenmiş, İzmir'den alınan örneklerde *Dirofilaria* tespit edilememiştir. En yüksek enfeksiyon oranının %80 ile Aydın'ın Germencik ilçesinde olduğu, Merkez, Köşk ve Umurlu'da enfeksiyon oranının %6,66 olduğu belirlenmiştir. Perifer kanda mikrofil varlığının belirlenmesinde en etkili yöntemin moleküler tekniklerden PCR olduğu, mikroskopik incelemeler arasında ise modifiye knott ve membran filtrasyon tekniklerinin natif yöntemle oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

*Dirofilaria immitis* mikrofil varlığının natif yöntemde yavaş ve yılanvari hareket edip mikroskop sahası dışına çıkmadığı, modifiye knott ve membran filtrasyon yöntemlerinde kılıfsız, ön kısmının konik biçimde sivrilerek sonlanıp kuyruklarının düz olduğu saptanmıştır. Asit fosfataz boyamada mikrofil varlığının EP ve AP bölgelerinde nokta tarzında boya aldığı ve ortalama uzunluklarının 254,1 µm, ön nihayeti-EP uzunluğu 79,2 µm, EP-AP uzunluğu 119,8 µm ve AP-arka nihayeti 55,1 µm, kalınlıkları 4,1 µm ölçülmüştür. Bu bölgelerin vücut uzunluğuna oranının sırasıyla % 30,7 ve % 79,2 olduğu belirlenmiş ve nekropsi sonrası kalpten alınan 12 erişkin dişinin yapılan uzunluk (en ve boy olarak) ölçümlerinde ortalama uzunlukları 284 mm, kalınlıkları 1,21 mm ve 30 erişkin erkeğin ortalama uzunlukları 178 mm ve kalınlıkları 0,78 mm olarak belirlenmiştir.

Nekropsi sonucunda elde edilen erişkin *Dirofilaria immitis*'ler *Wolbachia* açısından PCR ile incelenmiş ve bütün örneklerde *Wolbachia* varlığı tespit edilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Dirofilaria*, Köpek, Mikrofil, *Wolbachia*, PCR

## SUMMARY

This study was carried out between June 2007/August 2009 to determine the prevalence of filarial infections and to research *Wolbachia* in *Dirofilaria spp.* in 150 dogs at Aydın and İzmir region. Blood samples were examined by native, modified knott, membrane filtration techniques and PCR assay in order to detect the *Dirofilaria spp.* and acid phosphatase histochemical staining was performed for this aim. Three positive dogs were examined with necropsy. The origin of dogs, date and time (10<sup>30</sup>-18<sup>00</sup>) of blood collection, age, sex, being owned/stray, being outdoor/indoor, and the clinical signs (if there is) and the number of dogs were recorded. The prevalence of *Dirofilaria immitis* was determined as 12.3% in Aydın region. There were no positive dogs in İzmir region. Among the controlled regions, the maximum infection rate was found in Germencik-Aydın district (80%) and infection rate in Merkez, Köşk and Umurlu was 6,66% in each region. PCR was found to be most effective method for determining microfilarial parasites in peripheral blood, within the microscopic examination techniques modified knott and membrane filtration methods were found to be more effective than naïve microscopic examination.

The microfilaries of *Dirofilaria immitis* observed to exhibit sluggish and undulating movements and not to move across the objective field in the native technique. In the modified knott and membrane filtration techniques, microfilaries determined to be unsheathed, tapered conically from the anterior extremity and straight tailed. In the acid phosphatase histochemical staining, the enzyme activity was restricted to EP and AP zones. Dot like staining was observed in these zones. The average length was 254,1 µm, distance between anterior end-EP, EP-AP, AP-posterior end and thickness was 79,2; 119,8; 55,1 and 4,1 µm, respectively. The ratios of these zones to the body length were 30.7% and 79.2% respectively and the average length and thickness of 72 adult female collected from hearth after necropsy was found to be 284 and 1,21 mm respectively. the average length and thickness of adult male collected from hearth after necropsy was found to be 178 and 0,78 mm respectively.

The PCR assay was highly efficient molecular test, besides this within microscopic methods modified knott and membrane filtration were considered to be more suitable than native examination for the detection and identification of microfilaria in peripheral blood.

All of the collected adult *Dirofilaria immitis* were examined for presence *Wolbachia spp.* With PCR test and all samples were found positive.

**Keywords:** *Dirofilaria*, Dog, Microfilarie, *Wolbachia*, PCR

## KAYNAKLAR

- Acevedo RA, Ciencias L, 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.* Am.J.Vet.Res., 42 p.:537-540.
- Adriano PF, Eder SDO, Elane GG, Antonio CRV, Reinalda ML, Jeannie NS (2009)** *Detection of dog dilariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods,* Parasitol Res. 10.1007/ s00436-009-1584-9
- Anderson RC, (2000).** Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2<sup>nd</sup> Ed. NewYork: CABI Publishing, p.:467-509
- Anon (1974).** *A practitioner's guide for the differentiation of canine microfilariae.* Southwest Vet.,27p.: 178-182
- Anon (1999)** Heartworm. Erişim: [<http://www.marvistavet.net/html/heartworm.html>]
- Aranda C, Panyella O, Eritja R., Castella J (1998).** *Canine filariasis importance and transmission in the Baix Llobregat area, Barcelona (Spain).* Vet.Parasitol., 77 p.:267-275.
- Ataş AD, Özçelik S, Saygı G (1997)** *Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağılığı yönünden önemi,* Türkiye Parazitoloji Dergisi, 21(3) p:305-309
- Bacigalup J (1950)** *Finding of Dirofilaria acutiuscula (Molin 1858) in dog from Tigre (Provide of Buenos Aires)* Rev. Soc. Argent Biol.,26(7-8):332-4
- Balıkçı E, Sevgili M (2005),** *Elazığ ve çevresindeki köpeklerde Dirofilaria immitis'in seroprevalansı,* F.Ü. Sağılık Bilimleri Dergisi, 19(2) p:103-106

- Bandi C, Anderson TJC, Genchi C, Blaxter ML** (1998) *Phylogeny of Wolbachia in filarial nematodes*, Proc. R. Soc. Lond. B., 265 p:2407-2413
- Bandi C, Trees A, Brattig NW** (2001) *Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases*, Veterinary Parasitology, 98 p:215-238
- Barriga OO** (1982). *Dirofilariasis In: Handbook Series in Zoonoses, Section C; Parasitic zoonoses*, Vol.2 Ed, p.: 93-110
- Barriga OO**, (1982). *Dirofilariasis In: Handbook series in zoonoses, section C; Parasitic zoonoses*, Vol.II; Ed.: STEELE, J.H., Section Ed.: SCHULTZ, M.G. Florida: CRC Press, p.: 93-110
- Berkin S, Alçığır G** (1986) *1973-1984 periyodunda incelen 523 köpeğin postmortem bulguları üzerine survey çalışma*. A.Ü. Vet. Fak. Derg., 331: 153-164
- Bidgood A, Collins GH** (1996). *The prevalence of Dirofilaria immitis in dogs in Sydney*. Aust.Vet.J., 73 p.:103-104.
- Bowman DD** (1999) *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 8<sup>nd</sup> Ed. W.B. Saunders Company, p: 206-210, Philadelphia
- Breitschwerdt EB** (2007) *Canine and Feline Anaplasmosis: emerging infection diseases*, 2<sup>nd</sup> CVBD Symposium, p.:6-14
- Byeon KH, Kim BJ, Kim SM, Yu HS, Jeong HJ, Ock MS** (2007) *A serological survey of Dirofilaria immitis infection in pet dog of Busan, Korea, and effect of chemoprophylaxis*. Korean Journal of Parasitology 45 p.:27-32
- Calvert A** (1987). *Confirming a diagnosis of heartworm infection in dogs*. Vet. Med., 82p.:232-237.

- Casiraghi M , McCall JW, Simoncini L, Kramer LH, Sacchi L, Genchi C, Werren JH, Bandi C** (2002) *Tetracycline treatment and sex-ratio distortion: a role for Wolbachia in the moulting of filarial nematodes?*, International Journal for Parasitology 32, p.:1457–1468
- Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, Martin C, Pocacqua V, Gardner SL, Franceschi A, Bandi C** (2004) *Mapping the present of Wolbachia pipientis on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution*, International Journal for Parasitology, 34 p:191-203
- Chalifoux L, Hunt RD** (1971). *Histochemical differentiation of Dirofilaria immitis and Dipetalonema reconditum*. J.A.V.M.A., 158p.: 601-605.
- Charlat S, Hurst GDD, Merçot H** (2003) *Evolutionary consequences of Wolbachia infection*, Trends in Genetics, 19 p: 217-223
- Copland MD, O’Callaghan MG, Hajduk P, O’Donoghue PJ** (1992). *The occurrence of Dirofilaria immitis in dogs in South Australia*. Aust.Vet.J., 69 p.:31-32.
- Cordaux R** (2008) *ISWpil from Wolbachia pipientis defines a novel group of insertion sequences within the IS5 family*, Gene, 409 p:20-27
- Corwin RM, Nahm J** (1998). *Heartworm*. Erişim: [www.missouri.edu/~vmicroc/Nematoda/Spirurids/Dimmitis.htm]
- Coşkun şZ, Tınar R, Akyol çV, Aydın L, Demir C** (1992). *Doğal enfekte köpeklerde Dirofilaria immitis mikrofilerlerine ivermektinin etkisi*. Uludağ Univ. Vet. Fak. Derg., 11 p.:121-128.
- Courtney CH** (1989). *Detection and differentiation of microfilariae*. Calif.Vet., Special Edition, p.: 9-11.
- Courtney CH, Zeng QY** (2001) *Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens*, Veterinary Parasitology, 96 p:317-322

- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G (2001).** *A prevalence survey and risk analysis of filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy.* Vet.Parasitol., 102 p.:243-252
- Çakıroğlu D, Meral Y (2007)** *Investigation of Dirofilaria immitis infestation in dog in Samsun region, JIVS 2:1-12*
- Dobson S L, Bourtris K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill S, (1999)** *Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues.* Insect
- Doğanay A (1983).** *Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi.* Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg., 30 p.:550-561
- Doran T, Moore R (2001)** *Application of the reproductive parasite Wolbachia to the biological control of flystrike.* Proceedings of the FLICS Conference, Launceston.
- Euzeby J (1981).** *Diagnostic Expérimental des Helminthoses animales Livre 1.* Paris : Boulevard de Grenelle, p.: 277-312.
- Fan CK, Su KE, Lin YH, Liao CW, Du WY, Chiou HY (2001).** *Seroepidemiologic survey of Dirofilaria immitis infection among domestic dogs in Taipei City and mountain aboriginal districts.* Vet.Parasitol., 102 p.:113-120
- Fenn K, Blaxter M (2006)** *Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism,* Trends in Parasitology, 22:60-65
- Fırat, İ., Gülçubuk, A., Çetinkaya, H (2005)** *İstanbul' da üç köpekte D. immitis olgusu:* İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 31; 187-193
- Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G (2007)** *Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens in dog and cat and human infections* *Mappe Parassitologiche 8* , Veterinary Parasitology and Parasitic and Animal Health Faculty of Veterinary Medicine, Italy

- Gotoh T, Noda H, Hong XY**, (2003) *Wolbachia distribution and sitoplasmic incompatibility based on a survey of 42 spider mite species (Acari: Tetranychidae) in Japan*. Heredity 91: 208-216
- Göz Y, Koltas İS, Altuğ N, Demirkazık M, Ağaoğlu Z** (2007). *Van yöresi köpeklerinde Dirofilaria immitis 'in seroprevalansı*, YYÜ Vet Fak Dergisi,18(2) p.:5-8
- Graham JM** (1974). *Canine filariasis in northeastern Kansas*. J. Parasitol. 60 p.:322-326
- Grieve RB, Lok JB, Glickman LT**, (1983). *Epidemiology of canine heartworm infection*. Epidemiol. Rev., 5: 220-246.
- Grovw D.I.** (1982). *Filariasis In: Handbook Series in Zoonoses, Section C; Parasitic zoonoses, Vol.II*; Ed.: STEELE, J.H., Section Ed.: SCHULTZ, M.G. Florida: CRC Press, p.: 123-146
- Güralp N** (1981). *Helmintoloji. 2. Baskı*. Ankara: Ankara Üniv. Basımevi, p.: 505-515
- Hertig M, Wolbach SB** (1924) *Studies on Rickettsia-like microorganisms in insect*. J.Med.Res. 44, p:329-374
- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH** (2008) *How many species are infected with Wolbachia?- a statistical analysis of current data*, FEMS Microbial Lett, 281 p:215-220
- Hise AG, Ferguson IG, Pearlman E** (2004) *The role endosymbiotic Wolbachia bacteria in filarial disease*, Cellular Microbiology, 6(2) 97-104
- Hoerauf A, Volkmann L, Hamelmann C, Adjei O, Autenrieth IB, Fleischer B, Büttner DW** (2000) *Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis*, The Lancet, 355 p:1242-1243

- Hong XY, Gotoh T, Noda H**, (2002) *Sensitivity comparison of PCR for detecting Wolbachia in spider mites*. App. Entomol. Zool. 37(3): 379-383.
- Huignes ME, Luck RF, Klaasen RHG, Maas MFPM, Timmermans MJTN, Stouthamer R** (2000) *Infections parthenogenesis*, Nature, 405 p:178-179
- Jackson RF**, (1989). History of heartworm disease. *Calif.Vet.*, Special Edition, p.: 6-7.
- Johnstone C**, (2000) *Parasites and parasitic diseases of domestic animals: Heartworm*.  
Erişim: [[http://cal.nbc.upenn.edu/merial/hrtworm/hw\\_top.htm](http://cal.nbc.upenn.edu/merial/hrtworm/hw_top.htm)]
- Kelly JD** (1973). *Detection and differentiation of microfilariae in canine blood*. Aust.Vet.J., 49p.: 23-27.
- Kelly JD**, (1973) *Detection and differentiation of microfilariae in canine blood*. Aust.Vet.J., 49: 23-27.
- Kocan AA, Laubach HE** (1976). *Dirofilaria immitis and Dipetalonema reconditum infections in Oklahoma dogs*. J.A.V.M.A., 168 p.:419-420.
- Kozan E, Sevimli FK, Birdane FM** (2007) *Afyonkarahisar ve Eskişehir illerindeki sokak köpeklerinde Dirofilaria sp. 'nin yayılışı*, Ankara Üniversitesi Vet. Fak. Dergisi, 54: 117-119
- Kozek WJ** (2005) *What is in the Wolbachia/Dirofilaria interaction?*, Veterinary Parasitology, 133 p:127-132
- Kramer L, Grandi G, Leoni M, Passeri B, McCall J, Genchi C, Bazzocchi C** (2008) *Wolbachia and ints influence on the patology and immunology of Dirofilaria immitis infection*, Veterinary Parasitology, 158:191-195

- Kramer L, Simon F, Tamarozzi F, Gnechi M, Bazzocchi C** (2005) *Is Wolbachia complicating the pathological effects of Dirofilaria immitis Infections?*, Veterinary Parasitology, 133 p:133-136
- Kramer LH, Passeri B, Corona S, Simoncini L, Casiragi M** (2003) *Immunohistochemical/immunogold detection and distribution of the endosymbiont Wolbachia of Dirofilaria immitis and Brugia pahagi using a polyclonal antiserum raised against WSP (Wolbachia Surface Protein)*, Parasitol Res. 89:381-386
- Kramer LH, Tamarozzi F, Morchon R, Belmonte JL, Atxutegi CM, Panco RM, Simon F** (2005) *Immune response to and tissue localization of the Wolbachia surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (Dirofilaria immitis) infection*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 106 p:303-308
- Lee SE, Kim HC, Chong ST, Klein TA, Lee WJ** (2007) *Molecular survey of Dirofilaria immitis and Dirofilaria repens by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea*, Veterinary Parasitology, 148 p:149-155
- Leuterer G, Gothe R** (1993). *Die Herzwurmkrankheit des Hundes: Erregerbiologie und –ökologie, Pathogenese, Klinik, Diagnose, Therapie und Prophylaxe*. Kleintier Prax., 38p.: 633-646.
- Lindsey JR** (1965). *Identification of canine microfilariae*. J.A.V.M.A., 146p.: 1106-1114
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C** (2007) *Taxonomic status of the intracellular bacterium Wolbachia pipientis*, International Journal of Systematic and Evolution Microbiology, 57 p: 654-657
- Mackenzie GW, Waldie JM** (1991). *Heartworms in dogs in British Columbia*. Can.Vet.J, 32 p.:501.

- Marcos-Atxutegi , Kramer LH, Fernandez I, Simoncini L, Genchi M, Prieto G, Simón F** (2002). *Th1 response in BALB/c mice immunized with Dirofilaria immitis soluble antigens: a possible role for Wolbachia?*, Veterinary Parasitology, 112, p.:117-130
- Marks CA, Blommfield TE** (1998). *Canine heartworm (Dirofilaria immitis) detected in red foxes (Vulpes vulpes) in urban Melbourne*. Vet.Parasitol., 78 p.:147-154.
- Martin TE, Collins GH** (1985). *Prevalence of Dirofilaria immitis and Dipetalonema reconditum in greyhounds*. Aust.Vet.J., 62 p.:159-163.
- Masahiko K, Hidenobu H, Hiroshi I, Hiroshi Y** (1999) *Detection of Dirofilaria immitis infection in dogs in the laboratory animal research center of Toyoma Medical and Pharmaceunetical University*. Journal of Experimental Animal Technology. 34 p.:27-32
- Mehlitz D** (1988). *Flarien Bei Hunden in Liberia: Vorkommen, Bestimmung, Experimentelle Infektion Des Zwischenwirtes Und Darstellung Der Larvenstadien. Dissertation, Veterinarmedizin an der Freien Universitat Berlin*
- Merçot H, Poinso D** (2009) *Infection by Wolbachia: from passengers to residents*, C.R. Biologies 332: 284-297
- Merdivenci A** (1970b) *Bir köpekte Dirofilaria repens (Railliet et Henry, 1911) olgusu ve insan dirofilariazuna toplu bir bakış*. Pendik Vet. Aras. Ens. Derg. 3:121-129.
- Merdivenci A, İçli N** (1970) *İnsanda Dirofilaria repens (Railliet et Henry,1911) enfeksiyonu vakası*. İstanbul Üniv. Tıp Fak. Mec., 33: 463-470.
- Merdivenci A.** (1970a). *Türkiye Parazitleri ve Parazitolojik Yayınları*. İstanbul Üniv. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, İstanbul: Kurtulmuş Matbaası, p.: 120-174

- Montoya JA, Morales M, Ferrer O, Molina JM, Corbera JA** (1998). *The prevalence of Dirofilaria immitis in Gran Canaria, Vet.Parasitol.*, 75 p.:221-226.
- Nogami S, Sato T** (1997). *Prevalence of Dirofilaria immitis infection in cats in Saitama, Japan. J.Vet.Med.Sci.*, 59 p.:869-871.
- Nolan T**, (2002), *Appendix lab 5, Laboratory methods for parasitological diagnosis of canine heartworm infection*. Erişim: [<http://cal.vet.upenn.edu/paraav/labs/append5.htm>]
- Omar MS** (1977). *Distribution of asit fosfataz activity in the larval stages of Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, B.pahangi and Dirofilaria immtis in the mosquito. Tropenmed. Parasit.*, 28p.: 100-108.
- Orihel TC, Beaver PC** (1965) *Morphology and relationship of Dirofilaria tenuis and Dirofilaria conjunvtivae, Am. J. Trop. Med.Hyg.*, 14 p:1030-1043
- Ortega-Mora LM, Gomez-Bautista M, Rojo-Vazquez FA, Rodenas A, Guerrero J** (1991). *A survey of the prevalence of canine filariasis in Spain. Prev. Vet. Med.*, 11 p.:63-68.
- Öncel T, Vural G** (2005) *Seroprevalance of Dirofilaria immitis in Stay dogs in İstanbul and İzmir, Turk J Vet. Anim. Sci*, 29:785-789
- Özcel MA, Altıntaş N** (1997) *Parazit Hastalıklarında Tanı, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:15, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir*
- Özcel MA, Daldal N** (1997). *Parazitolojide Artropod Hastalıkları, Vektörler. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi*, p.: 1-46
- Pamukçu AM, Ertürk E** (1961). *1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Üniv.Vet.Fak.Derg.*, 8 p.: 323-346.

- Pappas LG, Lunzman AT** (1985). *Canine heartworm in the domestic and wild canids of Southeastern Nebraska*. J.Parasitol., 71p.: 828-830.
- Perez-Sanchez R, Gomez-Bautista M, Encinas GA** (1989). *Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain)*. Ann. Trop. Med.Parasitol., 83 p.:143-150.
- Peribanez MA, Lucientes J, Arce S, Morales M, Castillo JA, Gracia MJ** (2001) *Histochemical differentiation of Dirofilaria immitis, Dirofilaria repens and Acanthocheilonema dracunculoides microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®, Veterinary Parasitology*, 102 p:173-175
- Pfarr KM, Hoerauf A** (2006) *A niche for Wolbachia*, Trends in Parasitology, 23 p:5-7
- Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Alpizar JLD** (2006) *Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction*, Veterinary Parasitology, 135 p:303-314
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnider T**, (2000). *Veterinarmedizinische Parasitologie*. 5. Auflage. Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag, p.: 609-622
- Ronjbar-Bahadori H, Eslami A, Bokaic S** (2007) *Evaluation of different methods for diagnosis of Dirofilaria immitis*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 p.:1938-1940
- Rowley J** (1981). *The prevalence of heartworm infection in three countries in North Carolina*. Canine Pract.,8p.: 46-48.
- Saleh FC, Kirkpatrick C., Haseeth OD, Lok JB** (1988). *Occurrence of some blood and intestinal parasites in dogs in Curaçao*, Trop.Georg.Med., 40 p.:318-321.
- Sarıncı H, Alkan M** (1986) *Köpeklerde dirofilariosis olguları ve insan sağlığı yönünden önemi*. T. Parazitol. Derg., 1-2: 169-174.

- Sears BW, McCallister GL, Heidman JC** (1980). *Dirofilaria immitis in West Colorado*. J.Parasitol., 66p.: 1070.
- Selby LA, Corwin RM, Hayes HM** (1980). *Risk factors associated with canine heartworm infection*. J.A.V.M.A., 176p.: 33-36.
- Seward RL** (2001). *Canine heartworm disease*. Erişim: [<http://heartwormsociety.org/>]
- Simon F, Kramer LH, Roman A, Blasini W, Morchon R, Atxutegi CM, Grandi G, Genchi C** (2007) *Immunpahtology of Dirofilaria immitis infection*, Veterinary Research Communication, 31 p:261-271
- Simon F, Prieto G, Morchon R, Bazzocchi C, Bandi C, Genchi C** (2003) *Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (Wolbachia) in patients with pulmonary dirofilariasis*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 10 p: 180-181
- Sinkins SP, O'Neill S**, (2000) *Wolbachia as a vehicle to modify insect populations*. In: *insect transgenesis – methods and applications* (Eds: Handler, A. M., James, A. A.). Boca Raton, CRC Press.: 271-284.
- Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C** (1995) *A close relative of the arthropod endosymbiont Wolbachia in a filarial worm*. Molec. Biochem. Parasitol. 74:223-227
- Song KH, Hayasaki M, Cho KW, Lee SE, Kim DH** (2002) *Cross-reactivity between sera from dogs experimentally infected with Dirofilaria immitis and crude extract of Toxocara canis*, The Korean Journal of Parasitology, 40:195-198
- Soto JMR** (2000) *First record of Dirofilaria spectans Freitas and Lent, 1949 (Nematoda, Filariidae) in Lutra longicaudis Olfers, 1818 (Mamalia, Mustelidae)*, Rev. Bras. Parsitol. Vet., 9 2:157-158

- Soulsby E JL**, (1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7<sup>th</sup> Ed. London: Baillere Tindall, p.: 306-320
- Spratt DM** (1972) *Histological morphology of adult* *Dirofilaria Roemeri* *and anatomy of microfilaria*, *İnternational Journal for Parasitology*, 2 p:193-194
- Stevens L, Giordano R, Fialho RF** (2001) *Male-Killing, nematode infection, bacteriophage infection, and virulence od cytoplasmic bacteria in the genus Wolbachia*, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32 p:519-545
- Şahin İ, Gödekmerdan A, Ekinci N, Özcan M, Şen İ** (1993). *Kayseri yöresi köpeklerinde Echinococcus granulosus (Batsch, 1786) ve diğer parazitlerin yayılışı*. *T.Parazitol.Derg.*, 17 p.:77-82.
- Şahin T, Sevgili M, Çamkerten İ** (2004) *Şanlıurfa yöresi köpeklerinde Dirofilaria sp. 'nin yayılışı*, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 28 p:140-142
- Tada Y, Ohta T, Soohara S, Suzuki Y** (1991). *Helminth infections of dogs in Shiga, Japan with reference to occult infection of Dirofilaria immitis*. *J. Ve.t Med. Sci.*, 53 p.:359-360.
- Taşan E** (1977). *Elazığ ve yöresindeki köpeklerde filaria'ların yayılışı*. Doktora tezi, Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Taşan E** (1984). *Elazığ kırsal yöre köpeklerinde helmintlerin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi*. *Doğa Bilim Derg.*, 8: 160-167.
- Taşan E**, (1983). *Elazığ ve yöresindeki köpeklerde filaria'ların yayılışı*. *Doğa Bilim Derg.*, 7: 63-70.
- Taylor MJ, Cross HF, Ford L, Makunde WH, Prasad GBKS, Bilo K** (2001) *Wolbachia bacteria in filaria immunity and disease*, *Parasite İmmunology*, 23 p:401-409

- Theis JH, Stevens F, Law M** (2001). *Distribution, prevalence, and relative risk of filariasis in dogs from the state of Washington (1997-1999)*. J.Am.Anim.Hosp. Assoc., 37 p.:339-347.
- Theis JH, Stevens F, Theodoropoulos G, Ziedins AC** (1999). *Studies on the prevalence and distribution of filariasis in dogs from Los Angeles Country*. Canine Pract., 24 p.:8-16.
- Tınar R** (2006). *Helmintoloji*, Nobel Yayın, Ankara, 1.Baskı, p.:418-422
- Thrasher JP, Gould KG, Lynch MJ, Harris CC** (1968). *Filarial infections of dogs in Atlanta, Georgia*. J.A.V.M.A., 153p.: 1059-1062.
- Tınar R, Coşkun ŞZ, Doğan H, Demir S, Akyol ÇV, Aydın L** (1989). *Bursa yöresi köpeklerinde görülen helmint türleri ve bunların yayılışı*. T.Parazitol.Derg., 13 p.:113-120.
- Todaro WS, Morris CD, Heacock NA** (1977). *Dirofilaria immitis and its potential mosquito vectors in Central New York State*. Am.J.Vet.Res., 38 p.:1197-1200.
- Topakçı N, Göçmen H** (2003) *Wolbachia bakterileri ve entomolojideki yeri*, Bahçe, 32 p:63-68
- Toparlak M, Tüzer E** (2004) *Veteriner Helmintoloji*, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul
- Tsuji H, Ynani T, Uni S, Sakai H, Masegi T, Agatsuma T** (2006) *Pathological and molecular biological studies on Dirofilaria ursi in wild Japanese black bears*, Chulalongkorn Uni. Fac. Of Vet. Sc. Bangkok, Thailand
- Voyvoda H, Paşa S** (2004) *Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde Leishmaniosis ve Dirofilaria immitis'in prevalansı*. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 28 p.:1105-1111

- 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*, Molecular and Cellular Probes 14: 425-430
- Werren JH**, (1997) *Biology of Wolbachia*. Annual Review of Entomology 42: 587-609
- Werren JH, Bartos JD** (2001) *Recombination in Wolbachia*, Current Biology, 11 p:431-35
- Werren JH, Zhang W, Guo LR**, (1995). *Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods*. Proc. R. Soc. London B 261:55–63.
- Whiteley HE** (1988). *Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs*. Vet.Med., 83p.:328-345.
- Whitlock HV, Porter CJ, Kelly JD** (1978), *The PKW aspartate phosphatase modification for the recovery and histochemical identification of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in blood*. Aust. Vet. Pract., 8: 201-207.
- Williams JF, Williams CSF, Signs M, Hokama L** (1977). *Evaluation of a polycarbonate filter for the detection of microfilaremia in dogs in central Michigan*. J.A.V.M.A., 170p.:714-716.
- Wright JC, Hendrix CM, Brown RG** (1989). *Zoonosis update*. J.A.V.M.A., 5p.:644-648.
- Yalçın E, Şenlik B, Yılmaz Z, Alasonyalılar A, Akyol V** (2007) *Bursa'daki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in prevalansı*, Veteriner Cerrahi Dergisi, 13: 23-27
- Yaman M, Güzel M, Koltas İS, Demirkazık M, Aktaş H** (2009) *Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province, Turkey*. Journal of Helminthology. 83 p.:255-260

- Yıldırım A** (1998) *Ankara ve çevresindeki köpeklerde flarial etkenlerin prevalansı*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Yıldız K, Duru SY, Yağcı BB, Öcal N, Gazyağcı AN** (2008) *The prevalence of Dirofilaria immitis in dog in Kırıkkale*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 p:225-228
- Zeybek H** (1989). *Ankara yöresi köpeklerinde Dirofilaria immitis olguları*. Etlik Vet.Mikrob.Derg., 6 p.:1-9.
- Zeybek H, Tatar N, Tokay A** (1992). *Ankara yöresi kırsal alan köpeklerinde görülen parazitler ve bunların yayılışı*. Etlik Vet.Mikrob.Derg., 7 p.:17-26.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S** (1998) *Phylogeny and PCR-based classification of Wolbachia strains using wsp gene sequences*, Proc. R. Soc. Lond. B., 265 p: 509-515
- Zimmer C**, (2001) *Wolbachia: A tale of sSex and survival*. Science 292: 1092-1095

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Trabzon'un Akçaabat ilçesinde doğdum. İlkokulu Akçaabat Merkez İlkokulu'nda , Ortaokulu Mevlüt Selami Yardım Ortaokulu'nda ve Liseyi Akçaabat Lisesi'nde okudum. 1999 yılında Adnan Menderes Üniversite Veteriner Fakültesi'ne kayıt oldum ve 2005 yılında mezun olduktan sonra, 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. Evli olup, yabancı dilim ingilizcedir.