

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİVAS VE TOKAT İLLERİNDEKİ SAHİPSİZ KÖPEKLERDE
DIROFILARIA IMMITIS VE
WOLBACHIA'NIN qPCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Dilge Sıla YALÇIN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nermin IŞIK USLU

KONYA-2024

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİVAS VE TOKAT İLLERİNDEKİ SAHİPSİZ KÖPEKLERDE
DIROFILARIA IMMITIS VE
WOLBACHIA'NIN qPCR İLE ARAŞTIRILMASI**

Dilge Sıla YALÇIN

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Nermin IŞIK USLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 21212064 Proje numarası ile
desteklenmiştir.

KONYA-2024

ÖNSÖZ

Başta doktora programına başladığım günden itibaren beni asla geri çevirmeyen, bilgi, deneyim ve önerileriyle yardımını esirgemeyen, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar fikir ve görüşleriyle her zaman bana destek olan çok değerli ve sevgili danışman hocam Prof. Dr. Nermin IŞIK USLU'ya en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Veterinerlik Parazitolojisi AD Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Ferda SEVİNÇ'e, sabırla her sorumu yanıtlayan, tüm bilgisini ve kaynaklarını benimle paylaşan kıymetli hocam Prof. Dr. Bilal DİK'e, akademik düzeni öğrenmemde emeği geçen sayın hocam Prof. Dr. Feyzullah GÜÇLÜ'ye, bilgi ve fikirleriyle desteğini esirgemeyen ve Tez İzleme Komitemde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Özlem DERİNBAY EKİCİ'ye, Tez İzleme Komitemde yer alan sayın hocam Prof. Dr. Enver YAZAR'a, doktora eğitimim süresince tecrübeleriyle bana destek olan Doç. Dr. Onur CEYLAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ceylan CEYLAN'a çok teşekkür ederim.

Materyal toplama sırasında yardımını esirgemeyen Vet. Hek. M. Akif ÇATAK ve Vet. Hek. Mehmet GÜNEŞ'e, bana laboratuvarlarını açan ve tez çalışmam sürecinde destek olan SCÜ Dekanlığına ve SCÜ Hayvan Hastanesi Başhekimliğine teşekkür ederim. Araştırmanın moleküler çalışmalarında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen SCÜ İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki değerli hocalarıma ve ekip arkadaşlarına teşekkür ederim. Ayrıca 21212064 nolu proje ile destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Son olarak doktora programına başlamaya karar verdiğim ilk günden itibaren maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, düştüğüm her an elimden tutan çok değerli ve biricik babam Necmittin DAVULCU, annem Mine DAVULCU ve kardeşim İmge Aslı DAVULCU'ya, tez sürecimde tüm sorunları çözmeme yardımcı olan sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YALÇIN'a ve pamuk kalbiyle hep yanımda olan biricik Nyks'ime çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Dirofilaria</i> Türlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması.....	2
1.2. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in Konakları ve Yerleşim Yerleri.....	3
1.3. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in Morfolojik Yapısı.....	5
1.4. <i>Dirofilaria immitis</i> 'in Biyolojisi.....	5
1.5. Dirofilariasis'in Epidemiyolojisi.....	7
1.6. Dirofilariasis'in Klinik Bulguları ve Patogenezi.....	13
1.7. Endosimbiyont <i>Wolbachia</i> sp.....	14
1.8. Dirofilariasis'in Teşhisi.....	20
1.8.1. Direkt Teşhis Metotları.....	21
1.8.2. Serolojik Teşhis Metotları	23
1.8.3. Moleküler Teşhis Metotları.....	25
1.8.4. Görüntüleme Metotları.....	27
1.9. Dirofilariasis'in Tedavisi.....	27
1.10. Dirofilariasis'te Korunma ve Kontrol.....	30
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
2.1. Çalışmanın Örneklemine İlişkin İstatistiksel Analiz.....	32
2.2. Çalışma Alanı ve İncelenen Hayvan Sayısı.....	32
2.3. Kan alma, Laboratuvar Uygulamaları ve Mikroskopik Muayene.....	34
2.3.1. Natif Muayenenin Yapılışı.....	34
2.3.2. Modifiye Knott Metodunun Yapılışı.....	35
2.4. Moleküler Analizler.....	35
2.4.1. Genomik DNA İzolasyonunun Yapılışı.....	35
2.4.2. <i>Dirofilaria immitis</i> ve <i>Wolbachia</i> Endosimbiyontunun qPCR Analizleri.....	37
3. BULGULAR.....	42
3.1. Mikroskopik Bulgular.....	42
3.2. qPCR Bulguları.....	42

3.3. İstatistiksel Analiz Bulguları.....	44
4. TARTIŞMA.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	56
6. KAYNAKLAR.....	58
7. EKLER.....	76
EK-A: Etik Kurul Onayı.....	76
8. TURNİTİN RAPORU.....	77
9. ÖZGEÇMİŞ.....	79



SİMGELER VE KISALTMALAR

AHS:	American Heartworm Society
cfDNA:	cell-free DNA; Hücre Dışı Mitokondriyal DNA
cox1:	Cytochrome C Oxidase Subunit I
CpG:	Citosin Phospho Guanin; Sitozin Fosfo Guanin
Ct:	Döngü
EKG:	Elektrokardiyografi
EKO:	Ekokardiyografi
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Enzim Bağlı İmmünolojik Yöntem
FRET:	Floresans/Forster Rezonansenerji Transferi Bazlı Analizler
ftsZ:	Filament Temperature-Sensitive Mutant Z; Filament Sıcaklığına Duyarlı Mutant Z
gltA:	Sitrat Sentaz
groEL:	Şaperon Proteini
IFAT:	Indirect Fluorescent Antibody Test; İndirekt Floresan Antikor Testi
IFN- γ :	İnterferon- γ
Ig:	İmmunoglobulin
IGR:	Insect Growth Regulator; Böcek Gelişim Düzenleyici
IL-:	İnterlökin
IM:	İntramuskuler; kas içi
ITS-:	Internal Transcribed Spacer
kg:	Kilogram
LAT:	Latex Agglutination Test; Lateks Aglütinasyon Testi
LPS:	Lipopolisakarit
lt:	Litre
MEGA:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg:	Miligram
MGB:	Minör Groove Binder; Küçük Oluk Bağlayıcı
ML:	Makrosiklik Lakton
ml:	Mililitre
μ g:	Mikrogram
μ m:	Mikrometre
μ l:	Mikrolitre

NK:	Negatif Kontrol
NO:	Nitrik Oksit
PAMP:	Pathogen-Associated Molecular Pattern; Patojenle İlişkili Moleküler Kalıp
PCR:	Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGN:	Progesteron
PK:	Pozitif Kontrol
PO:	Peroral
qPCR:	Quantitative; Real-Time; Gerçek Zamanlı PCR
rpm:	Revolutions per minute; dakikadaki devir sayısı
SC:	Subkutan; deri altı
Th-:	T yardımcı hücre
TLR:	Tool Like Receptor; Toll benzeri reseptör
TNF- α :	Tümör Nekrozis Faktör- α
ULV:	Ultra Low Volume; Düşük hacim
USFDA:	US Food and Drug Administration; ABD Gıda ve İlaç Dairesi
WSP:	<i>Wolbachia</i> Surface Protein; <i>Wolbachia</i> Yüzey Proteini

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sivas ve Tokat İllerindeki Sahipsiz Köpeklerde *Dirofilaria immitis* ve *Wolbachia*'nın qPCR ile Araştırılması

Dilge Sıla YALÇIN

Veterinerlik Parazitolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nermin IŞIK USLU

DOKTORA TEZİ/ KONYA 2024

Dirofilaria immitis, dünya çapında tropikal ve ılıman bölgelerde yaygın olarak görülen zoonoz karakterde bir filarial nematodur. Karnivorlarda “köpek kalp kurdu” olarak da bilinen etken, kardiyopulmoner sistem ve organlarını etkileyerek, “pulmono-arteriyel dirofilariasis” hastalık tablosuna neden olmaktadır. *D.immitis* ve birçok filarianın endosimbiontu olan *Wolbachia* bakterisinin filarial hastalıkların immuno-patogeneğinde önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma, Mayıs–Eylül 2022 tarihleri arasında Sivas ve Tokat illerindeki sahipsiz köpeklerde *D.immitis* ve *Wolbachia* endosimbiontunun yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. *D.immitis*'in yaygınlığını belirlemek amacıyla alınan 200 adet kan örneği, mikroskopik metotlardan natif muayene ve modifiye Knott metodu, moleküler metotlardan qPCR ile incelenmiştir. Aynı örneklerde *Wolbachia*'nın yaygınlığını belirlemek amacıyla qPCR kullanılmıştır. *D.immitis* için *cox1* ve *Wolbachia* için *ftsZ* hedef gen bölgelerini çoğaltan primer ve probalar seçilmiştir. Natif muayene ve modifiye Knott metodu ile hazırlanan preparatlarda mikrofilaremi tespit edilememiştir. qPCR metodu ile Sivas'ta %0,98 ve Tokat'ta %1,02 oranlarında *D.immitis* tespit edilmiştir. En yüksek prevalans oranları 4–6 yaş aralığındaki köpeklerde gözlenmiştir. Ayrıca dişi köpeklerde erkek köpeklere oranla daha yüksek prevalans elde edilmiştir. *D.immitis* yönünden pozitif örneklerin tamamında *Wolbachia* tespit edilmiş, negatif örneklerde ise bakteriye rastlanmamıştır.

Bu çalışma *D.immitis* ve *Wolbachia* endosimbiontunun araştırılmasında Türkiye’de yapılan ilk qPCR çalışmasıdır. Çalışmanın sonucunda, Sivas ilinde *D.immitis*'in çok yaygın olmamasına karşın varlığını sürdürdüğü belirlenmiş, Tokat ilinde *D.immitis* ve her iki ilde de *Wolbachia* endosimbiontu ilk kez tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar qPCR metodunun mikroskopik metotlara göre çok daha hassas ve spesifik olduğunu göstermektedir. *D.immitis*'in zoonoz karakteri ve *Wolbachia* bakterisini taşıdığı göz önüne alınarak risk faktörlerinin değerlendirilmesi, etkili sağaltım, korunma ve kontrol stratejilerinin geliştirilerek etkin bir şekilde uygulanması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Dirofilaria immitis*, dirofilariasis, köpek, qPCR, *Wolbachia*

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia* in Dogs in Sivas and Tokat Province by qPCR

Dilge Sıla YALÇIN

Department of Veterinary Parasitology

PH.D. THESIS/ KONYA 2024

Dirofilaria immitis is a zoonotic filarial nematode that is common in tropical regions around the world. It affects the cardio-pulmonary system and organs in carnivores, causing the disease "pulmonary-arterial dirofilariasis", also known as "dog heartworm". *Wolbachia* bacteria, which are endosymbionts of *D.immitis* and many filariae, are thought to have an important place in the immunopathogenesis of filarial diseases.

A study was conducted between May and September 2022 to determine the prevalence of *D.immitis* and *Wolbachia* endosymbiont in stray dogs in Sivas and Tokat provinces. To determine the prevalence of *D.immitis*, 200 blood samples were taken and examined using native examination and modified Knott method, which are microscopic methods, and qPCR, which is molecular method. In the samples, qPCR was used to determine the prevalence of *Wolbachia*. Primers and probes that amplified the target gene regions of *cox1* for *D.immitis* and *ftsZ* for *Wolbachia* were selected. Microfilaremia wasn't detected by native examination and modified Knott method. However, qPCR method detected *D.immitis* at a rate of 0.98% in Sivas and 1.02% in Tokat. The highest prevalence rates were observed in dogs between 4 and 6 years of age. A higher prevalence was found in female dogs than in male dogs. Furthermore, *Wolbachia* endosymbiont was detected in all samples that tested *D.immitis*- positive, while no bacteria was found in the -negative samples

This is the first qPCR study conducted in Turkey to investigate *D.immitis* and *Wolbachia* endosymbionts. As a result of the study, it was determined that *D.immitis* continued to exist in Sivas, although it was not very common, and *D.immitis* was detected in Tokat and *Wolbachia* endosymbiont was detected for the first time in both provinces. This results show that the qPCR method is much more sensitive and specific than microscopic methods. Considering the zoonotic character of *D.immitis* and the fact that it carries *Wolbachia* bacteria, it was concluded that risk factors should be evaluated, and effective treatment, protection and control strategies should be developed and implemented effectively.

Keywords: *Dirofilaria immitis*, dirofilariasis, dog, qPCR, *Wolbachia*

1. GİRİŞ

Kardiyo-pulmoner sistemi etkileyen dirofilariasis, dünya çapında tropikal ve ılıman bölgelerde yaygın olarak görülen zoonoz karakterde filarial nematod enfeksiyonudur. Hastalığın etkeni olan *Dirofilaria immitis*, vektör sivrisinekler ile insan dahil çok sayıda memeli canlı türünü enfekte edebilmektedir (Atkins 2003, Umur ve ark 2006). Dirofilariasis, köpeklerin parazit için rezervuar görevi görmeleri, parazitlerin konak vücudunda uzun yıllar canlı kalabilmeleri ve bu sürede mikrofilere üretmeye devam etmeleri gibi nedenlerden dolayı önemli bir nematod enfeksiyonudur (Otranto ve ark 2009, Venco ve ark 2011). Son yıllarda dünyada endemik bölgelerin sayısı giderek artmaktadır (Colwell ve ark 2011, Morchón ve ark 2022). Ayrıca hastalık klinik belirti göstermeden ilerleyebilmekte (Nayar ve Connelly 2017) ve ilerleyen patoloji ile tedavi daha da zorlaşmaktadır (American Heartworm Society 2020).

Wolbachia, konağının üremesini manipüle ederek büyük ilgi çekmektedir (Werren 1997). Genellikle filariaların endosimbiyotik ortakları olarak adlandırılmakta fakat nematodlar açısından biyolojik önemi hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu bakterinin, konağın beslenmesi, metabolizması, bağışıklığı ve filarial hastalıkların immunopatogenezinde önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (Taylor ve ark 2001, Simón ve ark 2003, Hise ve ark 2004, Kramer ve ark 2005a, 2005b).

Mikroskobik teşhis metotlarının kolay uygulanabilir ve pratik olmaları, hızlı sonuç vermeleri ve direkt mikrofilere görülebilmesi gibi avantajlarına ek olarak dolaşım kanında mikrofilere aramaya dayalı metotlar oldukları için gizli enfeksiyonlarda veya düşük parazit yüklü enfeksiyonlarda yanlış negatif sonuç vermeleri gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Carlisle 1988). Mikroskobik metotların bu özellikleri göz önüne alındığında, moleküler yöntemlerin hassasiyeti dikkat çekmektedir (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006). PCR (Polymerase Chain Reaction; Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'deki amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak izlenmesine olanak sağlayan, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olan (Laidoudi ve ark 2020), çok düşük oranlardaki parazitemileri bile tespit edebilen (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006) qPCR (Quantitative; Real-time; Gerçek zamanlı PCR) son yıllarda parazitolojide sıklıkla kullanılmaktadır (Von Samson-

Himmelstjerna ve ark 2002, Roeber ve ark 2011). Bu çalışma, qPCR metodu ile Sivas ve Tokat illerindeki sahipsiz köpeklerde *D.immitis* ve *Wolbachia* endosimbiyontunun yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu araştırmanın, zoonoz özellikteki dirofilariasis enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, endosimbiyontu ile ilişkisi, teşhisi, tedavisi ve korunma ile ilgili güncel prosedürlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1.1. *Dirofilaria* Türlerinin Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Rhabditia takımının, Spirurina alt takımının, Filarioidea üst ailesinin, Onchocercidae ailesinde yer alan *Dirofilaria* cinsinde sınıflandırılmış 5 tür bulunmaktadır. Bu türler; *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria lutrae*, *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria striata* ve *Dirofilaria ursi*'dir.

Tablo 1.1. *Dirofilaria* türlerinin sınıflandırmadaki yeri (NCBI Taxonomy Browser 2024).

Üst alem:	Eukaryota	Cins:	<i>Dirofilaria</i> (Raillet & Henry, 1911)
Alem:	Metazoa	Tür:	<i>D.immitis</i> (Leidy, 1856)
Alt alem:	Eumetazoa		<i>D.lutrae</i> (Orihel, 1965)
Soy:	Bilateria		<i>D.repens</i> (Raillet & Henry, 1911)
Üst grup:	Ecdysozoa		<i>D.striata</i> (Molin, 1858)
Grup:	Nematoda		<i>D.ursi</i> (Yamaguti, 1941)
Sınıf:	Chromadorea	Sınıflandırılmamış <i>Dirofilaria</i> türleri:	
Alt sınıf:	Chromadoria		D. sp. 'hongkongensis'
Takım:	Rhabditia		D. sp. 'Thailand'
Alt takım:	Spirurina		D. sp. 'Thailand II'
Üst aile:	Filarioidea		D. sp. 'Thailand III'
Aile:	Onchocercidae		D. sp. 1GM-2017
			D. sp. MK-2010
			D. sp. MT-2019
			D. sp. PT-2018
			D. sp. TKD43A
			D. sp. TKD47A
			D. sp. TKD48A

Evcil ve yabani karnivorlarda kardiyo-pulmoner sistem ve organlarını etkileyerek, halk arasında “köpek kalp kurdu” olarak bilinen, “pulmono-arteriyel dirofilariasis” hastalık tablosuna neden olan en önemli tür *Dirofilaria immitis*’tir (Lok 1988). Bilinen en eski *D.immitis* vakası, 1626 yılında bulunmuş olup (Birago 1626) ilk olarak 1850 yılında Philadelphia’da fizikçi ve doğa bilimci olan Joseph Leidy tarafından ‘köpek kalbi kurtçuğu’ anlamına gelen *Filaria canis cordis* olarak isimlendirilmiş (Leidy 1850) daha sonra 1856 yılında ‘zalim, acımasız kurtçuk’ anlamına gelen *Filaria immitis* olarak yeniden adlandırılmıştır (Leidy 1856). Fransız parazitologlar Raillet ve Henry tarafından (1911) *Dirofilaria* cins adının altına alınarak bugünkü bildiğimiz adıyla *Dirofilaria immitis* olmuştur (Lok 1988). Türkiye’de ilk kez 1951 ve 1959 yıllarında yurt dışından gelen iki köpekte etken teşhis edilmiştir (Güralp 1981).

Ayrıca kaynaklarda geçen farklı türler olup, son yıllarda keşfedilmiş ve henüz sınıflandırılmamış olan türler de mevcuttur. Son yıllarda Hong Kong’da keşfedilen zoonotik karakterde, insanlarda lenfadenopati, karın şişliği ve subkonjunktival kitleye neden olan *Candidatus Dirofilaria hongkongensis* hakkında ‘subkutanöz/oküler dirofilariasis’ vaka bildirimleri olmaktadır (Winkler ve ark 2017, Gowrishankar ve ark 2019). Bu türün *D.repens* ve *D.immitis* ile yakınlığı PCR analizi ile ortaya konmuştur (Gowrishankar ve ark 2019).

1.2. *Dirofilaria immitis*’in Konakları ve Yerleşim Yerleri

Dirofilaria immitis’e çok sayıda memeli canlı konaklık etmektedir. Başta köpekler ve kurtlar (*Canis lupus* alttürleri) olmak üzere dingo (*Canis dingo*), çakal (*Canis latrans*), tilki (*Vulpes* ve *Urocyon* cinsleri), rakun köpek (*Nyctereutes procyonoides*) gibi evcil ve yabani *Canidae*’lerde; kedi (*Felis catus*), jaguar (*Panthera onca*), kaplan (*Panthera tigris*), dumanlı pars (*Neofelis nebulosa*) gibi evcil ve yabani *Felidae*’lerde; Asya küçük peçeli su samuru (*Aonyx cinereus*), bayağı fok (*Phoca vitulina*), boz fok (*Halichoerus grypus*), Güney Afrika (kahverengi) kürklü foku (*Arctocephalus pusilus pusilus*), Kaliforniya deniz aslanı (*Zalophus californianus*) gibi *Pinnipedia*’larda ve Caniformia ailesine bağlı köpeğimsigillerde, hatta insanlarda (*Homo sapiens*) rastlanabilmektedir (Abraham 1988, Umur ve ark 2006, Simón ve ark

2012, Alho ve ark 2017, Potkonjak ve ark 2020, Upton ve ark 2022). Pinnipedler (yüzgeçayaklılar) deniz canlıları olmalarına rağmen hayatlarının büyük bir kısmını karada geçirdikleri için bu canlılarda da *D.immitis* enfeksiyonlarına rastlanabilmektedir (Alho ve ark 2017). Bu parazite en uygun konak olan kanidelerde yüksek sayıda mikrofiler gelişmektedir ki bu durum kanidelerin etken için aynı zamanda rezervuar işlevi olduğunu da göstermektedir (McCall ve ark 2008b). Arakonak vektörleri ise Culicidae familyasından *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia*, *Psorophora* ve *Ochlerotatus* cinslerine bağlı sivrisineklerin dişileridir (Abraham 1988, Umur ve ark 2006, Latrofa ve ark 2012, Foster ve Walker 2019).

Dirofilaria immitis erişkinleri kanidelerde sıklıkla kalbin sağ ventrikülüsü, arteria pulmonalis ve vena cava'ya yerleşmektedir. Nadiren gözde, periton boşluğunda, eklem içinde, deri altında ve merkezi sinir sisteminde de bu nematoda rastlanabilmektedir. Mikrofilerleri ise yine omurgalı konağın dolaşım kanında bulunmaktadır (Umur ve ark 2006, Hodges ve Rishniw 2008, Silva ve ark 2023). İnsanlardaki *D.immitis* kaynaklı dirofilariasis olgularında, bu parazitler subkutanöz dokularda göç geçirmekte ve nadiren organlara lokalize olabilmekte fakat genellikle seksüel olgunluğa ulaşamamaktadırlar (Genchi ve ark 2011, Tomazatos ve ark 2018).

Tablo 1.2. *Dirofilaria* türlerinin insanlarda subkutanöz doku dışında tespit edildiği bölgeler.

BULUNDUĞU ORGAN	KAYNAK
Pankreas, karaciğer	Kim ve ark 2002
Koroner arter	Požgain ve ark 2014
Akciğerler	Tsai ve ark 2023
Ağız ve çevresi	Janardhanan ve ark 2014, Desai ve ark 2015
Dil	Velev ve ark 2019
Göz	Jamshidi ve ark 2008, Winkler ve ark 2017, Sukudom ve ark 2018, Aykur ve ark 2021
Testisler, epididimis, scrotum	Theis ve ark 2001, Fleck ve ark 2009, Bertozzi ve ark 2015, Tumolskaya ve ark 2016
Ovaryumlar	Palicelli ve ark 2014

1.3. *Dirofilaria immitis*'in Morfolojik Yapısı

Dirofilaria türleri ince uzun, beyazımsı renkte, ön uç yuvarlaklaşmış olup rudimenter bir ağız kapsülüne ve türlere göre değişen sayılarda küçük sefalik papillere sahip filarial nematodlardır. *D.immitis*, en uzun *Dirofilaria* türüdür. Ağızları küçük ve yuvarlak olup, stoma (ağız) etrafına yerleşmiş 4 çift küçük papil ve bir çift lateral amfid (duyu organı) bulunmaktadır (Furtado ve ark 2009). Erişkinleri çok katmanlı yapıda ve oldukça kalın kütikula yapısına sahiptirler. Kütikula üzerinde yer alan longitudinal çıkıntıların yeri ve sıralanış şekli ayırıcı teşhiste önem arz etmekte olup *D.immitis*, caudal kısmın ventralinde yer alan longitudinal çıkıntılar haricinde neredeyse pürüzsüz bir kütikula sahiptir (Lok 1988). Dişilerin uzunluğu 250–310 mm ve kalınlığı 1–1.3 mm'dir. Arka uçları küt sonlanmakta ve vulvar açıklık ön ucun 2.7 mm gerisinde yer almaktadır. Erkeklerin uzunluğu 120–200 mm ve kalınlığı 0.7–0.9 mm'dir (Umur ve ark 2006, Manfredi ve ark 2007). Arka uçları incelererek spiral şeklinde kıvrılmış olup 5 çift preanal ve 6 çift postanal papil taşımaktadır. Sol spikülüm 300–375 µm, sağ spikülüm ise 175–299 µm uzunlukta olup gubernakulum bulunmaz (Lok 1988, Umur ve ark 2006, Furtado ve ark 2009).

Dolaşım kanında bulunan mikrofilerler kılıfsız olup uzunlukları 234–324 µm ve kalınlıkları 6.1–7.2 µm arasındadır. Knott metoduyla elde edilen mikrofilerlerin uzunlukları 279–324 µm, filtre metoduyla elde edilen mikrofilerlerin uzunlukları ise 234–486 µm olarak tespit edilmiştir. Mikrofilerlerin ön uçları konik şekilde sivrilmiş olup çengel bulunmamakta, arka uçları düz sonlanmaktadır. Sinir tasması vücudun ön %24'ünde, boşaltım deliği %33'ünde, boşaltım hücresi %39'unda yer almaktadır. Köpeklerin dolaşım kanında sıklıkla bulunan *D.immitis*, *D.repens*, *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum* ve *Brugia* türleri mikroskopik bakıda ayırıcı teşhis açısından önem arz etmektedir (Umur ve ark 2006).

1.4. *Dirofilaria immitis*'in Biyolojisi

Dirofilaria immitis, parazitik nematodlar arasında gelişmesi en uzun süren parazitlerden birisi olup heteroksen gelişim göstermektedir. Bulaşmanın en önemli nedeni vektör sivrisinekler olup plasental yol ve kan transfüzyonu ile de enfeksiyon

mümkündür. Fakat plasental yolla veya mikrofilaremik kan transfüzyonu ile nakledilen mikrofilerler, erişkin (L5) forma ulaşamamaktadırlar. Larvaların (L1) gelişimlerini tamamlayabilmeleri için mutlaka bir sivrisinek tarafından beslenme sırasında alınarak, vektör vücudunda enfektif L3 formuna dönüşmeleri gerekmektedir (Bowman ve Mannella 2011). Pulmono-arteriyel sistem veya sağ ventrikülde bulunan dişi ve erkek parazitlerin çiftleşmesi sonucu dişi parazit vücudunda reseptakulum seminaliste fertilizasyon gerçekleşmektedir. Dişi parazitler ovovivipardırlar (Abraham 1988). Parazitin biyolojisini daha iyi anlayabilmek için vektördeki ve son konaktaki gelişimleri aşağıda sırasıyla incelenmiştir.

Etkenin ara konakta gelişimi, vektör sivrisineğin dişilerinin enfektif son konaktan kan emme sırasında mikrofilerleri almasıyla başlamaktadır. Bu mikrofilerler vektör artropodun orta midesine gelmekte ve sonra malpighi tubul hücrelerine göç etmektedirler. Burada birtakım değişiklikler geçirerek enfeksiyondan sonraki 6–7. günlerde bulundukları hücrelerden çıkarak lümene gelmektedirler. İlk gömlek değiştirme malpighi tubul lümeninde enfeksiyondan sonraki 8–10. günlerde gerçekleşmekte, ikinci gömlek değişimi ise enfeksiyondan sonra yaklaşık 11–13. günlerde olmaktadır. Oluşan L3’ler malpighi tubullerini terk ederek dişi sivrisineğin ağız organlarına (proboscis) gelmekte ve burada beklemektedirler. Bu L3’ler ‘enfektif larva formu’ olarak adlandırılmaktadırlar. (Abraham 1988, Umur ve ark 2006, Nayar ve Connelly 2017).

Sivrisineğin omurgalı konaktan kan emmesi ile son konaktaki gelişim dönemi başlamaktadır. Enfektif larvalar, dişi sivrisinek proboscisini deriden çıkardıktan sonra kalan delinme yarası yoluyla cilde nüfuz etmektedir (Abraham 1988, Nayar ve Connelly 2017). Deri altı dokuya penetre olan larvalar enfeksiyondan sonraki 6–10. günlerde üçüncü kez gömlek değiştirmektedirler (Nayar ve Connelly 2017). Oluşan L4’ler önce abdomenin ön kısımları ve thoraksa, daha sonra büyük kas kitlelerine, baş ve boyun bölgesine ve buralardaki venalara göç etmektedirler (Abraham 1988). Son gömlek değiştirme ise 50–70. günler arası gerçekleşmekte ve oluşan L5’ler ‘genç erişkinler’ olarak adlandırılmaktadır (Dillon ve ark 2017). Genç erişkinler enfeksiyondan sonraki 90–120. günlerde (en erken 67. gün) (American Heartworm Society 2020) venöz dolaşım ile ya da direkt olarak pulmoner arterlere ve sağ ventriküle gelmekte (Nayar ve Connelly 2017), boyları 25–30 cm’ye ulaşmaktadır

(American Heartworm Society 2020). Enfeksiyondan sonraki 100. günde dişilerin ovaryumları oluşmakta, fakat 120. günde gebe dişilere rastlanmaktadır. Parazitlerin üreme organlarının tam olarak gelişip larva üretmeye başlaması (dolaşımda mikrofiler bulunması) en erken enfeksiyondan sonraki 6. ayda görülmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda dolaşımdaki mikrofilerlerin genellikle enfeksiyondan sonraki 7–9. aylardan itibaren görüldüğü bildirilmiştir (Abraham 1988, Simón ve ark 2012, American Heartworm Society 2020).

1.5. Dirofilariasis'in Epidemiyolojisi

Filarial parazitlerin epidemiyolojisinde iklim ve çevre koşulları (sıcaklık, nem), omurgalı konak ve ara konak popülasyonu, hayvan davranışları, yaşam koşulları, duyarlı konağın ortalama yaşı, konak immün sistemi ve parazitin konaktaki yaşam süresi gibi faktörler önemlidir (Anderson 2000, Taylor ve ark 2016, Omar ve ark 2018, Anvari ve ark 2019). Dirofilariasis, dünya çapında tropikal ve ılıman iklime sahip bölgelerde yaygın olarak görülmekte olup son yıllarda etken için sporadik olan bölgeler endemik olma eğilimindedir. Endemik bölgelerin sayısındaki artışın nedenleri arasında vektör varlığı ve dağılımı, değişen iklimler ve yağış, nüfus hareketleri, büyüyen şehirler, seyahat sıklığı ve mülteciler, yaban hayatı kaçakçılığı, ticaret vb. gibi faktörler yer almaktadır (Colwell ve ark 2011).

Vektör artropodların bölgedeki yoğunluğu bulaşmayı önemli derecede artıran bir faktördür (Venco ve ark 2011). Günümüzde dünya genelinde toplam 3570 adet sivrisinek türünün varlığı bildirilmekte (Harbach 2020), Türkiye'de ise 62 adet türün bulunduğu bilinmektedir (Aldemir ve ark 2009, Akıner ve ark 2016, Günay 2015). Sivrisineğin, enfekte olduğu mikrofiler miktarı da bulaşmada önemlidir. Özellikle yaz aylarında konakta sezonsal periodisite artışı olmakta ve fazla miktarda mikrofiler ile enfekte olan sivrisineklerin yaşam süreleri olumsuz olarak etkilenebilmektedir (Beam 1966, Hawking 1967, Sawyer 1975). Bunlar dışında her sivrisinek türü kan emmek için farklı konak türlerini tercih etmekte, bu da *D.immitis*'in o bölgede bulunan her sivrisinek türünde tespit edilememesinin nedeni olarak etkenin yayılışında önemli bir faktör olmaktadır. (Grieve ve ark 1983, Pratt ve Moore 1993). Vektör sivrisinekler tatlı veya tuzlu su, büyük ya da küçük su birikintileri, nemli veya ıslak ağaç kovukları,

bataklıklar gibi farklı akuatik alanlarda gelişebilmekte ve bu alanlar hastalık etkenlerinin yayılmasında önemli bir risk faktörü olmaktadır (Anderson 2000, Dik 2015).

Larvaların sivrisineklerde hayatta kalma, gelişme ve göç etme oranları da çeşitli faktörlere bağlıdır. Vektördeki larval gelişim çevre ısısı 27°C ve %80 bağıl nem varlığında 10–14 günde tamamlanmakta (Slocombe ve ark 1989), ılıman bölgelerde ise bu süre 18 güne uzayabilmektedir (Umur ve ark 2006). Anderson (2000) *D.immitis* ve diğer filarialar üzerine yaptığı çalışmada vektördeki gelişme için ideal sıcaklığın 24–32°C olduğunu, 21°C'nin altındaki sıcaklıklarda gelişimin geciktiğini ve 16°C'nin altındaki sıcaklıkların ise parazitler için ölümcül olabileceğini bildirmektedir. Larvalar bu ortamdan uzaklaştırılıp daha sıcak bir ortama (26,5°C) alındığında gelişmelerine devam edebilmektedirler. Bu olay soğuk iklimlerde larvaların kışı sivrisineklerin vücudunda atlatarak gelişimlerine devam etmeleri için ortam sağlamaktadır (Abraham 1988). Sivrisineğin yaşam süresi de parazitin bulaşmasında kritik bir role sahiptir. Parazitin L1 döneminden L3 dönemine gelişiminin tamamlanabilmesi için, sivrisineğin yeterli süre yaşaması gerekmektedir. Dişiler özellikle hibernasyon durumunda ve bol gıda ile 4–5 ay canlı kalabilmekte, aktivitelerinin en yüksek olduğu dönemlerde ise yaşam süreleri iki haftaya kadar düşebilmektedir (James ve Harwood 1969).

Dirofilaria immitis mikrofilere dolaşım kanında her zaman bulunabilmekle birlikte akciğerlerdeki gündüz ve gece oksijen basıncının değişimine bağlı olarak akşam saatlerinde perifer kandaki yoğunlukları artmaktadır. Oksijen basıncının düşük olduğu saatlerde perifer kanda, yüksek olduğu saatlerde ise akciğerdeki damarlarda daha fazla miktarda mikrofilere bulunmaktadır (Umur ve ark 2006). Yani *D.immitis* mikrofilere dolaşım kanında gece saatlerinde yoğunluk göstermesi ve belli bir yoğunluğa sahipken gün içinde minimum–maksimum değerlere) sahip olduğu belirtilmiştir (Burgu ve ark 2004). Bu nedenle maksimum mikrofilere rastlamak için 16.00–18.00 saatleri arası ideal kan alma saatleri olarak belirtilmiştir. Ayrıca çevre sıcaklığına bağlı olarak ilkbahar ve yaz aylarında kanda mikrofilere rastlama ihtimali daha fazla olmaktadır (Abraham 1988).

Parazitlerin konak vücudunda uzun süre canlı kalıp mikrofilere üretmesi bulaşmayı artıran diğer faktörlerdendir. Köpeklerde erişkin *D.immitis*'ler kalpte 7 yıldan fazla canlı kalabilmekte ve mikrofilere üretmeye devam etmektedirler. Mikrofilere ise dolaşım kanında ortalama 2 yıl canlı kalabilmektedirler (Venco ve ark 2011). Bir sivrisinek, konağa tek seferde sadece 10–12 adet enfektif L3 nakledilebilmekte (Dillon ve ark 2017) ve bunların sadece %30–50'si olgunlaşabilmektedir (Grieve ve ark 1983, Rizzo ve Ware 1989).

Parazitler, konak vücudunda sürekli olarak bağışıklık sistemine maruz kalmaları nedeniyle yaşamlarını sürdürebilmek için immün sistemden kaçış stratejileri geliştirmişlerdir (McCall ve ark 2008b). Kısa süreli immün sistemden kaçma sırasında, enfektif larvalar yüzey antijenlerini serbest bırakarak konak immün yanıtından kaçınırken, uzun süreli immün sistemden kaçma sırasında, erişkin parazitler konağın farklı molekül ve hücrelerini adsorbe ederek yüzeylerini maskeleymektedirler (Bilge ve ark 1989, Kadıpaşaoğlu ve Bilge 1989). Mikrofilaremik köpekler, periferik kan mononükleer hücrelerinin IFN (interferon)- γ salgılaması sonucu parazit antijenlerine immunosupresyon gösterme ya da yanıt vermeme eğiliminde olabilmektedirler (Sartono ve ark 1997, Brattig ve ark 2002).

Konakta erişkin parazitlerin bulunmasına rağmen, kanda mikrofilere tespit edilememesi durumuna 1977 yılında Dr. Ming Yang tarafından önerilen “occult infection” (gizli enfeksiyon) adı verilmiştir (Bowman ve Mannella 2011). Hastalığın gizli seyrettiği vakalarda klinik belirti veya nekropsi sonucu erişkin parazitler görülebilmekte buna rağmen kanın mikroskopik incelemelerinde mikrofilere rastlanamamaktadır. Gizli enfeksiyon durumuna neden olan bazı etkenler; tek cinsiyet parazit enfeksiyonları veya tek parazit enfeksiyonu, prepatent süre (henüz tamamlanmadan yapılan muayeneler), genç erişkin (henüz seksüel olgunluğa erişmemiş L5), geriatric ve/veya ektopik enfeksiyonlar, immün sistem aracılı enfeksiyonlar (mikrofilerelerin immün sistem mekanizmaları tarafından yok edilmesi), mikrofilarisidal ilaç kullanımı, adultisidal ilaçların parazitler üzerine kısırlaştırma etkileri gibi faktörlerdir (Atwell 1988). Bazen de konakta mikrofilere tespit edilmesine rağmen erişkin parazit bulunmayabilmektedir. Bu durum; mikrofilerelerin konak vücudunda uzun süre kalıcılığı fakat yetişkin parazitlerin ölümü, mikrofilaremik kan transfüzyonu, etkenin plasental yolla yavrulara aktarımı ve adultisidal etkili ilaç

kullanımı yer almaktadır (Underwood ve Harwood 1939, Mantovani 1966, Todd ve Howland 1983).

Özellikle prevalansın yüksek olduğu Amerika ve Avrupa ülkelerinde *Dirofilariasis*'le ilgili çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmalar sadece köpeklerle yoğunlaşmamış, evcil ve vahşi karivorlar gibi etkene duyarlı tüm hayvan popülasyonlarında yürütülmüştür (Bowman ve Atkins 2009).

Tablo 1.3. Dünya çapında son yıllarda yapılan bazı *D.immitis* prevalans çalışmaları.

ÜLKE	PREVALANS %	KAYNAK
Kıbrıs	0,5	Kokkinos ve ark 2019
Eje Cafetero, Kolombiya	0,62	Caballero Mendez ve ark 2024
Santa Cruz Adaları, Galapagos	6,9	Jimenez ve ark 2020
Kanarya Adaları, İspanya	15,7	Montoya-Alonso ve ark 2016
Arjantin	74	Simón ve ark 2012
Meksika	42	Labarthe ve Guerrero 2005
Yunanistan	3,7	Diakou ve ark 2016
	9	Angelou ve ark 2019
Bulgaristan	31,25	Stoyanova ve ark 2019
İtalya	0,2	Sgroi ve ark 2022
	12,63	Napoli ve ark 2023
ABD	6,3	Smith ve ark 2022
	9,83	Sobotyk ve ark 2022
Kanada	0,2	Evason ve ark 2019
Çin	12,5	Cai ve ark 2023
İran	10	Naderi ve ark 2021

Tablo 1.4. Yabani karnivorlarda yapılan bazı *D.immitis* prevalans çalışmaları.

HAYVAN	PREVALANS %	KAYNAK
Kızıl Tilki	15,8	Gomes-de-Sá ve ark 2022
Kurt	4,8	
Çakal	5,1	Kotwa ve ark 2019
Tilki	8,5	Potkonjak ve ark 2020
Çakal	6,3	
Pinnipedler	43,8	Alho ve ark 2017

Türkiye’de köpeklerde yapılan çalışmalar sonucu düşük prevalans oranları görülmektedir. Ülke çapında farklı yıllarda ve bölgelerde yapılan çalışmalar Tablo 1.5.de yer almaktadır. Bu çalışmalar ile %0–46,22 aralığında değişen oranlarda *D.immitis*’e rastlanmıştır (Öztürk 1997, Ağaoğlu 2000, Mamak 2002, Öge ve ark 2003, Voyvoda ve ark 2004, Sarali 2009, Köse ve Erdoğan 2012, Taşçı ve Kılıç 2015, Adanır ve ark 2013).

Tablo 1.5. Teşhis metotlarına göre Türkiye’de yapılan *D.immitis* prevalans çalışmaları.

TEŞHİS METODU	ŞEHİR	PREVALANS %	KAYNAK
Sürme Preparat Metodu	Kırklareli	3	Çetinkaya ve ark 2016
Membran Filtrasyon ve Asit Fosfotaz Histokimyasal Boyama Metodu	Kars ve Iğdır	21,7	Taşçı ve Kılıç 2005
	Kayseri	9,6	Yıldırım ve ark 2007
Natif Muayene	Sivas	6	Ataş ve ark 1997
	Sivas	0	Mamak 2002
	Elâzığ	3,3	Balıkçı ve Sevgili 2005
	Bursa Gemlik	0	Civelek ve ark 2006
	Burdur	14,08	Adanır ve ark 2013
	İzmir	0	Ertekin 2017
Modifiye Knott Metodu	Aydın ve İzmir	13,9	Voyvoda ve ark 2004
	Bursa Gemlik	0	Civelek ve ark 2006
	Kırıkkale	5,8	Yıldız ve ark 2008
	Burdur	11,97	Adanır ve ark 2013
	Nevşehir	1,45	Yabaneri 2014
	Avanos		
	Sivas	1,3	Ataş ve ark 2018
ELISA	Kocaeli	18,3	Şimşek ve ark 2008
	Sakarya	12,3	
	Ankara	14,8	
	Mersin	10,5	
	Elâzığ	0	
	Afyon	18	Köse ve Erdoğan 2012
	Eskişehir	15	
	Nevşehir	14	
	Aksaray	12	
	Kars	10	
	Malatya	9	
	Niğde	4	
	Mersin	3	
	Konya	2	

Tablo 1.5 (Devam). Teşhis metotlarına göre Türkiye’de yapılan *D.immitis* prevalans çalışmaları.

TEŞHİS METODU	ŞEHİR	PREVALANS %	KAYNAK
ELISA	Bursa	2	Civelek ve ark 2006
	Hatay	26	Yaman ve ark 2009
	Erzurum	2,1	Şimşek ve ark 2011
	Elâzığ	3,7	Şimşek ve Çiftçi 2016
	Konya	8,18	Öztürk 1997
	Van	46,22	Ağaoğlu 2000
	Ankara	9,3	Öge ve ark 2003
	Samsun	0	Çakıroğlu ve Meral 2007
	Diyarbakır	2,4	İçen ve ark 2011
	Şanlıurfa	2	Altaş ve ark 2013
	Iğdır	40	Sarı ve ark 2013
	Aydın ve İzmir	2,28	Ural ve ark 2014
	İzmir	2	Taşkaya 2014
	İzmir	1	Ertekin 2017
Hızlı tanı kitleri	Burdur	0	Küçüker 2016
	Edirne	14,7	
	Kırklareli	11	Çetinkaya ve ark 2016
	Tekirdağ	1	
	Osmaniye	1	Güven Gökmen ve ark 2019
	Erzurum	4,4	Demir ve Aktaş 2020
	Siirt	0	Aslan Çelik ve ark 2020
	Kocaeli	1	Ceylan 2020
	Balıkesir, Kocaeli ve Aydın	1,2	Ceylan ve ark 2021
	Ardahan	2	Ayvazoğlu ve ark 2022
	Aydın	10	Sarali 2009
	Erzurum	8,1	Şimşek ve ark 2011
	Avanos, Nevşehir	2,17	Yabaneri 2014
	Kars ve Iğdır	25	Taşçı ve Kılıç 2015
PCR	Elazığ	1,8	Şimşek ve Çiftçi 2016
	Edirne	4,9	
	Kırklareli	6	Çetinkaya ve ark 2016
	Tekirdağ	0	
	Sivas	2,9	Ataş ve ark 2018

1.6. Dirofilariasis'in Klinik Bulguları ve Patogenezi

Dirofilariasis duyarlı son konaklarda, enfekte sivrisinek tarafından sokulduktan sonra 1 yıl boyunca herhangi bir klinik belirti görülmeden ilerleyebilmektedir (Nayar ve Connelly 2017). Klinik belirtilerin ortaya çıkması ve şiddeti; konağın yaşı ve immun sistemi, konaktaki parazit miktarı, parazitin yerleşim yeri ve konakta bulunma süresi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Az sayıda parazitte enfekte köpeklerde hastalık herhangi bir klinik belirti göstermeyebilir. Fazla miktarda parazitte enfekte köpeklerde ise bazı tipik klinik bulgulara rastlanabilmektedir. Bunlar letarji, anoreksiya, egzersiz intolerans, öksürük, haemoptysis, epistaksis, böbrek disfonksiyonu, kalp ve akciğerlerde patolojik seslerdir (Umur ve ark 2006, McCall ve ark 2008b, Simón ve ark 2012, American Heartworm Society 2020). Şiddetli olgularda iştahsızlık, karaciğer yetmezliği, asites, sarılık, idrarda safra tuzlarının görülmesi, hemoglobinuri, kollaps, organ yetmezliği ve ölümle seyreden vena cava sendromu ortaya çıkabilmektedir (Umur ve ark 2006). Ayrıca 1 yıldan uzun süreli enfekte köpeklerde böbreklerin glomerulus bazal membranında kalınlaşma ve vakuolizasyon (Paes-de-Almeida ve ark 2003) gibi patolojiler gelişebilmekte ve bunun sonucu olarak glomerulusların semipermeable yapıları bozularak değişen derecelerde proteinüri ile sonuçlanabilmektedir (Sutton 1988).

En fazla hasar akciğerlerin caudal loblarında gözlenirken, kranial loblarda daha az hasar oluşmaktadır (Carlisle 1988). Kendiliğinden veya tedavi sonucu ölen parazitler ya da bunların parçaları arterlerin distalinde birikerek trombozlara neden olabilmekte, bu da daha büyük arterlerde kısmi veya tam tıkanmalara neden olabilmektedir (Umur ve ark 2006). Tromboemboli, şiddetli pulmoner arteriyel tıkanıklığın radyografik bulgularını gösteren, özellikle klinik semptomlarla başvuran enfekte köpeklerde yaygın olarak görülmektedir (Rawlings ve ark 1993). Arteria pulmonalis'deki trombotik bozukluklar, akciğerlerde kanamalara ve granülomatöz yangı alanları oluşumuna neden olmaktadır. Damarlarda ve akciğerlerde meydana gelen değişiklikler ve pulmoner hipertansiyon sonucu, pulmoner arter ve sağ kalpte hipertrofi ve dilatasyonla karakterize 'cor pulmonale' şekillenmektedir. Buna bağlı sekonder pulmoner hipertansiyon gelişebilmekte (Umur ve ark 2006, Kelliham ve Stepień 2010), eğer ciddi pulmoner hipertansiyon vakaları tedavi edilmezse, konjestif

kalp yetmezliği kaçınılmaz olmaktadır (McCall ve ark 2008b). Sağ ventriküldeki ciddi değişikliklerle, sağ atrial boşalma engellenmekte, bu nedenle de sağ atrial genişleme ve kalbin sağ tarafında büyüme şekillenmektedir (Winter ve ark 2017). Bunun sonucunda kronik venöz konjesyon ve karaciğer fibrozisi oluşmaktadır. Bu da asites oluşumuna sebep olmaktadır (Umur ve ark 2006). Parazitlerin ekskresyon ve sekresyonları antijenik özelliğe sahip olup, bunlara karşı oluşan antikorlar ile birleşerek immun kompleksler oluşturmaktadırlar. Bu immun kompleksler böbreklerde glomerulusların bazal membranlarında birikerek glomerulonefritise neden olmaktadır. Mikrofilerlere karşı gelişen antikorların kandaki komponentlerle birleşmesi sonucu oluşan immun kompleksler aşırı duyarlılık reaksiyonlarına da neden olabilmektedir. Bu da deride kaşıntı, ülserasyon ile karakterize dermatitis tablosuna yol açmaktadır (Abramowsky ve ark 1981, Umur ve ark 2006).

Bunlara ek olarak *D.immitis* ile enfekte olmuş köpeklerin sağ ventrikül hipertrofisi ile birlikte sağ ventrikül miyokardında kollajen ve hücre dışı matriks kaybı ile geniş bir miyokard hasarı mevcuttur (Wang ve ark 2005, Carreton ve ark 2012). Plazmada myoglobin ve troponin I seviyelerindeki değişiklikler, nekroz veya iskemi nedeniyle myositlerde oluşan hasar sonucu kana salınmaktadır, ki bu da miyokardial hasarın erken belirteçlerindendir (Collinson 2003, Boswood 2009). Dolaşıma karışan parazitler vena cava caudalis ve vena hepatica'yı tıkayarak pasif venöz konjesyon ve karaciğer yetmezliğine neden olabilmektedirler. Bu durum çok sık görülmemekle birlikte ölümcül olmakta ve “vena cava sendromu” olarak adlandırılmaktadır (Umur ve ark 2006). Akut gelişen vena cava sendromu olgularında acil olarak cerrahi işlemle parazitlerin çıkarılmaması durumunda 2 gün içinde ölüm gerçekleşebilmektedir (American Heartworm Society 2020).

1.7. Endosimbiyont *Wolbachia* sp.

Wolbachia, ilk kez Hertig ve Wolbach (1924) tarafından Boston civarında toplanan *Culex pipiens*'in üreme dokularında Riketsiya benzeri organizmalar olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Hertig (1936) bu organizmaları aynı sivrisinek türünde *Wolbachia pipiens* olarak tanımlamıştır. Aslında, soyoluşları araştırılan iki *Wolbachia* türü bulunmakta olup bunlar farklı bakteri dallarına: *W.pipentis* alfa-2

proteobakterilere; *W.persica* ise gama proteobakterilere atanmıştır (O'Neill ark 1992). Üçüncü bir tür olan *W.melophagi*'nin filogenetik konumu hala incelenmektedir (Bandi ve ark 1998). Bugüne kadar *W.pipientis*, *Wolbachia* cinsinin, Anaplasmataceae familyasının, Rickettsiales takımının, alfa-2 proteobakteri sınıfının tanınan tek türüdür (Riegler ve O'Neill 2006, Lo ve ark 2007). *Wolbachia* bakterileri zorunlu hücre içi, gram negatif, endo-simbiyotik bakterilerdir (Kozek 2005, Taylor ve ark 2005a). Ultrayapısal çalışmalar, *Wolbachia* endobakterilerinin yuvarlak, 0,5 µm çapında ve çift trilaminat zarla çevrelendiğini ve ribozom benzeri granüller içeren bir sitoplazmaya sahip olduğunu göstermektedir (Peixoto ve ark 2001).

Başlıca konakları, tüm türlerin %20–76'sının enfekte olduğu karasal eklembacaklılardır (Werren ve ark 1995a, Jeyaprakash ve Hoy 2000). Ancak *Wolbachia* aynı zamanda çok daha küçük bir taksonomik grup olan filarial nematodlarda da bulunmaktadır (Taylor ve ark 2005a). İlk olarak Werren ve ark (1995b), eklembacaklılarda bulunan *Wolbachia*'dan *ftsZ* genini dizileyerek bunları A ve B olmak üzere iki ana sınıfa ayırmışlardır. Daha sonra filarial nematodların *Wolbachia*'sını içeren filogenetik çalışmalar, C ve D olmak üzere iki üst grubun daha önerilmesine yol açmıştır. Dört üst grubun belirlenmesi, aslında köksüz filogenetik ağaçlardaki dallanma ve kümelenme modellerine dayanmakta ve bu kümeler 'süper grup' statüsü almaktadır (Bandi ve ark 1998). Güncel çalışmalar ile *Wolbachia* 17 süper gruba ayrılmıştır (Lefoulon ve ark 2020). Eklembacaklılarla ilişkili 12 süper grup (A, B, E, H, I, K, M, N, O, P, Q, S) bulunmaktadır. Üst grup C, D ve J filarial nematodlarda bulunmaktadır (Lefoulon ve ark 2020, Manoj ve ark 2021). Üst grup C *D.immitis*, *D.repens*, *Onchocerca volvulus* ve *O.gibsoni* gibi filarial nematodlarda yer almaktadır (Taylor ve ark 2005a). C, D ve J süper gruplarının *Wolbachia*'ları, konakçılarıyla filogenetik uyum göstermekte; bu da *Wolbachia*'nın konakçılarıyla birlikte evrimleştiğini ve yakın zamanda yatay aktarımın gerçekleşmediğini göstermektedir. *Wolbachia* filogenilerinin nereye kök salması gerektiği konusunda henüz bir fikir birliği bulunmamakta; filogenilerin çoğunda dış gruplar olarak *Ehrlichia*, *Anaplasma* veya *Rickettsiya* cinsleri kullanılmaktadır (Lo ve ark 2002, Fenollar ve ark 2003, Fenn ve Blaxter 2006, Lefoulon ve ark 2016). Bazı çalışmalar *Wolbachia*'nın kökenini A+B ve C+D üst grupları arasına (Bandi ve ark 1998, Fenn ve Blaxter 2006, Ferri ve ark 2011, Baldini ve ark 2014, Nikoh ve ark 2014), bazıları ise kökü C ve D süper grupları arasına (Casiraghi ve ark 2004, Czarnetzki ve Tebbe,

2004, Dittmar ve Whiting, 2004), bazıları ise kökü A ve B süper grupları arasına yerleştirmektedir (Bordenstein ve Rosengaus, 2005, Bordenstein ve ark 2009, Koutsovoulos ve ark 2014). Fakat *Wolbachia*'nın ata kökeni hala net olarak bilinmemektedir.

Wolbachia'nın filarial nematodlar arasındaki genetik çeşitliliği; WSP (*Wolbachia* Surface Protein; *Wolbachia* Yüzey Proteini), gltA (Sitrata Sentaz), groEL (Şaperon Proteini), 16S rRNA (16S ribozomal RNA) ve *ftsZ* (Filament Temperature Sensitive Mutant Z; Filament Sıcaklığına Duyarlı Mutant Z) genleri kullanılarak karakterize edilmektedir (O'Neill ve ark 1992, Masui ve ark 1997, Braig ve ark 1998 Zhou ve ark 1998, Casiraghi ve ark 2005, Glowska ve ark 2015). *Wolbachia*'yı süper gruplara ayırmak için 16S rRNA ve *ftsZ* genleri sıklıkla tercih edilmektedir (Werren ve ark 1995b, Bandi ve ark 1998, Casiraghi ve ark 2001, Baldo ve ark 2006). Çalışmalara göre 16S rRNA geni, bakterilerde yüksek oranda korunmuş bölge olduğu için *Wolbachia* filogenisinin inşasında genetik bir işaretleyici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Vandekerckhove ve ark 1999, Ros ve ark 2009). Bunun dışında *ftsZ* geni, bakterilerin hücre döngüsünü düzenlemekte ve hücre bölünmesi sürecinin bir parçası olan sitokinezde önemli bir role sahip olmaktadır. Ayrıca *ftsZ* geni, C ve D süper gruplarının arasında yeterli farklılaşmaya izin vermektedir (Bandi ve ark 1998, Vandekerckhove ve ark 1999).

Wolbachia, Onchocercidae familyasının Onchocercinae, Dirofilarinae ve Splendofilariinae olmak üzere üç alt familyasında bulunmaktadır (Casiraghi ve ark 2004, Bain ve ark 2008, Ferri ve ark 2011, Lefoulon ve ark 2016). Araştırmacılar filaria türlerinde *Wolbachia* varlığını incelemişler; Bordenstein ve ark (2003) %89,5 oranında, Casiraghi ve ark (2004) %63, Ferri ve ark (2011) %37 oranında *Wolbachia* ile enfekte filaria tespit etmişlerdir. Onchocercidae familyasında bazı türlerde *Wolbachia*'nın bulunmaması iki tür evrimsel olayla ilişkilendirilmektedir. Birincisi, *Wolbachia* yokluğu muhtemelen atalardan kalma bir durum olarak düşünülmektedir (Casiraghi ve ark 2004, Bain ve ark 2008, Ferri ve ark 2011). Waltonellinae ve Oswaldofilariinae alt familyaları gibi morfolojik olarak ilkel Onchocercidae'de *Wolbachia* bulunmamaktadır. Bu da bu filariaların Onchocercidae soyundaki ilk *Wolbachia* enfeksiyonundan önce çeşitlendiğini göstermektedir. İkincisi, yakın zamanda Dirofilarinae ve Onchocercinae alt familyalarında beklenmedik derecede

yüksek sayıda ikincil kayıpların meydana geldiği gösterilmiştir. Bu kayıplar, *Onchocerca flexuosa* ve *Acanthocheilonema viteae* gibi *Wolbachia*'yı barındırmayan türlerin filarial konakçı genomlarındaki *Wolbachia* benzeri gen dizilerinin tanımlanmasıyla desteklenmektedir (McNulty ve ark 2010).

Dirofilaria immitis dahil olmak üzere filarialardaki *Wolbachia*'nın tarihi çok yenidir. *D.immitis*'in erginleri ve larva evreleri üzerinde erken dönem elektron mikroskobu çalışmalarını yürüten araştırmacılar, incelenen materyalde olağandışı yapılar gözlemlemişler, ancak bunları hücre içi bakteri olarak tanınamışlardır (Kozek 2005). Kozek (1967), bunları *D.immitis*'in mikrofilerlerinde Innenkorper'in bir parçası (merkezi gövde) olarak tanımlamıştır. Harada ve ark (1970) ve Lee (1975) ise, bunları *D.immitis* oositlerinde sıra dışı, hafif mitokondriler olarak tanımlamışlardır. Vincent ve ark (1975), *Brugia pahangi*'nin vücut duvarında gözlemlenen yapıların bakteriyel varlıklar olabileceğini öne süren ilk kişiler olmuştur. Daha sonra McLaren ve ark (1975) tarafından, *D.immitis* dahil birkaç filaria türünün mikrofilerlerinde, hücre içi mikroorganizmalar olarak doğrulanmıştır. *Wolbachia* bakterileri genellikle filariaların lateral kordlarının hipodermal hücrelerinde lokalize olmaktadır (Hoerauf ve ark 2003, Landmann ve ark 2010). Aynı zamanda dişi parazitlerin yumurtalıklarında, oosit ve uteruslarında embriyonik gelişim boyunca da bulunmaktadır. Ancak hiçbir zaman erkek üreme sisteminde bulunmamaktadır (Kozek 2005, Fischer ve ark 2011). Filarialarda, *Wolbachia* bakterileri tüm gelişim aşamalarında bulunmakta, ancak yoğunlukları her parazitte ve gelişim aşamaları boyunca değişiklik göstermektedir (Fenn ve Blaxter 2004, McGarry ve ark 2004). Bakterinin bulaşması, nematodlarda sadece vertikal yolla olmakta; bir jenerasyondan diğerine, dişi oosit sitoplazması yoluyla taşınmaktadır (Bandi ve ark 1998, Kozek 2005). Bu hücre içi bakterilerin larva evreleri ve yetişkin filariaların vücutlarındaki dağılımı ve transovarial olarak bulaştığının gösterilmesi Kozek ve Figueroa (1977) ve Kozek (1977) tarafından tarif edilmiştir.

Wolbachia, konağının üremesini manipüle ettiği için büyük ilgi çekmektedir (Werren 1997). Bu endobakteriler, eklembacaklılarda yayılmayı sağlayan feminizasyon, partenogenesis, erkek öldürücülük ve sitoplazmik uyumsuzluk gibi mekanizmalar geliştirmişlerdir (Stouthamer ve ark 1999). Filarialarda ise karşılıklı simbiyoz ve üreme paraziti olma durumu mevcuttur (Bandi ve ark 2001). Filarialardaki

Wolbachia enfeksiyonları, eklembacaklılardan farklı olarak tetrasiklin tedavisi sonrasında ortaya çıkan birtakım etkileri içermektedir. Bunlar; dejenere olmuş embriyolar ile karakterize edilen bir embriyogenez bloğu, larvalarda büyüme kusurları, dişi parazitlerin sterilizasyonu ve yetişkin parazitlerin ölümüdür (Hoerauf ve ark 2000, Hoerauf ve ark 2001, Taylor ve ark 2005b). *Wolbachia*, üreme ve döllenmeyi desteklemede önemli bir rol oynamakta, yetişkin parazitlerin uzun süreli hayatta kalması için gerekli olan tüm gelişim aşamalarını ve konak etkileşimindeki patogenezi teşvik etmektedir (Martin ve Gavotte 2010).

Wolbachia, genellikle filariaların endosimbiyotik ortakları olarak adlandırılrsa da nematodlar açısından biyolojik önemi hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu bakterilerin beslenmede, metabolizmada ve konağın bağışıklık tepkilerini bozmada önemli olduğu düşünülmektedir (Bandi ve ark 2001). Simbiyozla dair kanıtlar, insan lenfatik filariyası *Brugia malayi*'den (Foster ve ark 2005) ve sığır doku filariyası *Onchocerca ochengi*'den (Darby ve ark 2012) *Wolbachia* tam genomlarının analizi ile güçlendirilmiştir. Bu çalışmalar ile, *Wolbachia* genomunun haem (hemogloblin ön ürünü) metabolizması ve/veya riboflavin için gerekli genleri taşıdığı, fakat filarial konağının taşımadığı tespit edilmiştir (Foster ve ark 2005, Strubing ve ark 2010, Darby ve ark 2012). Ayrıca *Wolbachia*, filarial nematodlar için riboflavin ve haeme ek olarak flavin adenin dinükleotid ve nükleotidler sağlarken, filarial nematodlar *Wolbachia*'nın büyümesi için gerekli amino asitleri sağlamaktadır (Foster ve ark 2005). Parazitoid bir yaban arısında *Wolbachia* ile konağın demir metabolizması arasındaki ilişki gösterilmiştir (Kremer ve ark 2009). Bu nedenle *Wolbachia*'nın, eklembacaklılarda gözlemlendiği gibi, filarial nematodların demir elde etmesine ve demiri tutmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, filarial parazitlerde haemin taşınması, bozulması ve düzenlenmesinin nasıl gerçekleştiği bilinmemektedir (Wu ve ark 2009).

Filarial nematodlar ile *Wolbachia* arasındaki ilişki hakkında az bilgi bulunmasına rağmen, *Wolbachia*'nın filarial hastalıkların immunopatogenezinde de önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir (Taylor ve ark 2001, Simón ve ark 2003, Hise ve ark 2004, Kramer ve ark 2005a, 2005b). Dirofilariasli hayvanlarda, *Wolbachia* ve ürünleri muhtemelen enfektif yetişkin parazitlerin ve mikrofilerlerin dejenerasyonunun bir sonucu olarak ve/veya bunların konak bağışıklık mekanizmaları

tarafından yok edilmesinin bir sonucu olarak salınmakta ve konağın bağışıklık sistemine maruz kalmaktadır (Bandi ve ark 2001). Konak ve filarial parazit arasındaki ilk bağışıklık etkileşimleri, doğuştan gelen bir immun yanıt kategorisi içinde gerçekleşmektedir. Bu tepkiler, istilacı patojenlere karşı ilk savunma hattı olup adaptif immun yanıt ile ilişkili gen düzenlemeleri veya klonal genişleme gerektirmemektedir. Kronik filarial enfeksiyon, filarial ürünlere karşı B- ve T-hücre yanıtlarının gelişmesine neden olmaktadır (Cooper ve ark 2001, Steel ve Nutman 2003), ancak *Wolbachia*'ya karşı adaptif immun yanıt henüz belirlenmemiştir. TLR (Tool Like Receptor; Toll Benzeri Reseptör)'ler, omurgalılarda ve omurgasızlarda yüksek oranda korunan en az 10 transmembran protein ailesi olup LPS (Lipopolisakarit), PGN (Progesteron) ve CpG (Citosin Phospho Guanin; Sitozin Fosfo Guanin) DNA gibi korunmuş PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern; Patojenle İlişkili Moleküler Kalıp)'ları saptayarak ilk savunma hattını temsil etmektedir (Takeuchi ve Akira 2001). Spesifik antikörlerin üretimini tetiklemenin yanı sıra, *Wolbachia* moleküllerinin muhtemelen konağın doğuştan gelen bağışıklık sistemi ile etkileşime girdiği ve nötrofilleri, makrofajları ve T lenfositleri içeren inflamatuvar reaksiyonları sürdürerek filarial hastalıkların patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Taylor ve ark (2000), *B.malayi* gelişim aşamalarının ekstraktlarının, fare makrofajları tarafından TNF (Tümör Nekrozis Faktör)– α , IL (İnterlökin)–1 ve NO (Nitrik Oksit) üretimini indüklediğini göstermiştir. Bu inflamatuvar sitokinler, karakteristik olarak gram-negatif bakterilerin dış zarının ana bileşeni olan LPS yanıt olarak makrofajlar tarafından üretilmektedir (Ulevitch ve Tobias 1999). *Wolbachia* içermeyen *A.viteae* ekstraktları kullanıldığında inflamatuvar reaksiyonların gelişmemesi, makrofaj yanıtlarının *Wolbachia*'ya bağımlılığını göstermektedir (Bandi ve ark 2001).

D.immitis'ler tarafından salınan herhangi bir *Wolbachia* ürünü dolaşıma girerek vücutta dağılmaktadır. Bu bileşikler, akciğer damar yapısını, karaciğer ve dalaktaki retikülo-endotelial sistemin elementlerini etkileyebilmekte ve sonunda böbrekler tarafından süzölmektedirler. Böylece bu dört organ, wolbachial antijenlerin yerleşimi ve lezyonların oluşumu için tercih edilen bölgeler olmaktadır. (Kozek 2005). Nakagaki ve ark (1993), *D.immitis* ile enfeksiyon sonucu ölen köpeklerin akciğerleri dışında çeşitli dokularında, özellikle böbrek ve karaciğer gibi mikrofilinlerin normalde dolaştığı organlarda, yoğun WSP boyanması gözlemlenmiştir.

WSP'ye karşı Ig (İmmunoglobulin) G antikorları, yalnızca deneysel veya doğal olarak *D.immitis* ile enfekte kedilerden alınan serumlarda Western blot analizi ile gösterilmiştir. Enfekte olmayan kedilerden alınan serumlarda IgG tespit edilememiştir; bu da *Wolbachia* moleküllerine karşı spesifik bir bağışıklık tepkisine işaret etmektedir (Bandi ve ark 2001). Tüm enfekte köpekler, ağırlıklı olarak IgG2 antikorlarının üretimi ile WSP'ye spesifik bir hümmoral tepki göstermekte, bu da Th (T yardımcı hücre) –1 tipi bir bağışıklık tepkisine işaret etmektedir. Antikor seviyeleri, klinik hastalığı olan mikrofiler-pozitif köpeklerde en yüksek, mikrofiler-negatif köpeklerde daha düşük titrelerle sahip olma eğilimindedir. WSP için pozitif boyanan hücreler hem glomerüllerde hem de tübüllerde görülmüştür (Kramer ve ark 2005b). Ayrıca WSP, köpek nötrofil kemotaksisini ve IL–8 üretimini uyarmaktadır (Bazzocchi ve ark 2003).

Morchón ve ark (2012), mikrofiler-pozitif köpeklerin negatif köpeklere göre, idrarda proteinüri ve anti-*Wolbachia* IgG değerlerinin ve böbrek kılcal damarlarında *Wolbachia* barındıran mikrofiler değerlerinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Konakta canlı *D.immitis* bulunurken *Wolbachia*'nın elimine edilmesinin, patoloji üzerinde hiç veya çok az etkisi bulunmaktadır (Kramer ve ark 2008). Fakat adultusit tedavi sonucu ölen parazitlerden salınan wolbachial ürünlerin gelişmiş patolojiye yol açtığı gösterilmiş, bu da *Wolbachia*'nın proinflamatuvar olduğunu düşündürmektedir (Morchón ve ark 2012). Ayrıca *D.immitis* ile deneysel enfekte olan kedilerin ivermektin tedavisi sonucu *Wolbachia*'ya karşı artan antikor titreleri gösterdiği bildirilmiş (Morchón ve ark 2004), bu da bağışıklık sisteminin *Wolbachia* ile temasının parazitin ölümünün ardından meydana geldiğini göstermektedir. Mikrofilariyal tedavi ile ilişkili böbrek değişiklikleri, ivermektin ile tedavi edilen *D.immitis* ile enfekte köpeklerde de gösterilmiş ve bu durum, ölü veya ölmekte olan mikrofilerlerin böbrek dokusu üzerinde sahip olabileceği inflamatuvar rolü doğrulamaktadır (Morchón ve ark 2012).

1.8. Dirofilariasis'in Teşhisi

Dirofilariasis'te teşhis metotları enfeksiyon varlığını, hastalığın prognozunu, tedavi protokolünü ve tedavinin etkinliğini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Hastalığın teşhisi direkt teşhis, serolojik teşhis, moleküler teşhis ve görüntüleme

metotları olmak üzere 4 ana başlık altında toplanabilir. Direkt, serolojik ve moleküler teşhis metotları için hayvanlardan alınan kan, plazma ve serum numuneleri kullanılmaktadır. Serolojik ve moleküler metotlar genellikle mikrofiler varlığı için rutin testler yapıldıktan sonra kullanılmalıdır (Atwell 1988). Mikrofilaremi serolojik sonuçları doğrulamakta, hastayı bir enfeksiyon rezervuarı olarak tanımlamaktadır. Özellikle endemik bölgelerde hayvanlar hem mikrofilerler hem de antijen yönünden test edilmeli ve herhangi bir tedaviye başlanmadan önce sonuçlar doğrulanmalıdır. Negatif test sonuçları hastalığın kesinlikle olmadığını göstermemektedir. Bu durumda testler tekrarlanmalı veya farklı teşhis metotlarıyla desteklenmelidir. Ayrıca şu an pozitif sonuç veren bir test, aslında önceden var olan bir enfeksiyonu belirtmektedir. Bu durumun önüne geçmek için antijen ve mikrofiler testleri yılda 1 kez mutlaka yapılmalıdır. Pozitif sonuçlarda tedavinin etkinliğini belirleyebilmek amacıyla 6 ay sonra testler tekrarlanmalıdır (American Heartworm Society 2020).

1.8.1. Direkt Teşhis Metotları

Direkt teşhis metotlarının prensibi konaktaki parazitlerin erişkin formları ya da gelişim formlarından bir veya birkaçının görülmesi esasına dayanmaktadır. *D.immitis*'in erişkinleri direkt teşhis metotlarından nekropsi ile kalbin sağ tarafında görülürken, mikrofilerleri dolaşım kanında bulunmakta ve parazitolojik teşhisin temelini oluşturmaktadır. Dirofilariasis'in direkt teşhisinde mikrofiler aranırken natif kan muayenesi, sürme preparat metodu, modifiye Knott metodu, membran filtrasyon metodu ve asit fosfotaz histokimyasal boyama metodu gibi metotlar kullanılmaktadır (Atwell 1988, Yıldırım 2004, Güçlü 2006, Umur ve ark 2006). Mikrofiler teşhisi enfeksiyondan sonra en erken 5–6. aylarda mümkün olup çeşitli sebeplerle bu süre uzayabilmektedir (American Heartworm Society 2020). Tek cinsiyet ile enfeksiyon, düşük parazit yükü, bağışıklık reaksiyonları, geçmişte mikrofilariyal aktiviteye sahip ilaç uygulamaları gibi nedenler *D.immitis* ile enfekte köpeklerin %20–30'unda dolaşımda mikrofiler eksikliğine neden olabilmektedir (McCall ve ark 2008a). Bu metotlar, gizli enfeksiyonlarda veya düşük parazit yüklü enfeksiyonlarda yanlış negatif sonuç vermeleri gibi dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca mikrofilerlerin kandaki yoğunluğu kanın alındığı saate ve sezona göre de değişebildiği göz önünde bulundurulmalıdır (Carlisle 1988).

Natif kan muayenesi ile mikrofilerler canlı ve hareketli olarak görülebilmektedir. Natif kan muayenesinde *D.immitis* mikrofilerleri sapık ve gelişigüzel hareket ederken *A.reconditum* mikrofilerleri hızlı ve ileri doğru hareket etmektedirler. Kan almadan önce 12–19 mg/kg dozda asetil kolin SC (subkutan; derialtı) yolla verilerek mikrofilerlerin kanda yoğunlaşmasını sağlanmakta ve kan alma işlemi özellikle 16.00–18.00 saatleri arasında tercih edildiğinde mikrofilerlere rastlama ihtimali artmaktadır. Enfeksiyonun gizli seyrettiği vakalarda yanlış negatif sonuç vermesi nedeniyle tanı amaçlı tek başına kullanımı yeterli olmamakta ve etkenin natif muayene ile teşhisi her zaman objektif yanıt vermemektedir (Atwell 1988, Umur ve ark 2006, American Heartworm Society 2020). Sürme preparat metodu ise, mikrofilerleri tespit edip boyamayı sağlamaktadır. Bu amaçla giemsa, metilen blue, eosin gibi çeşitli boyalar kullanılmaktadır. Bu sayede mikrofilerlerin morfolojik özellikleri rahatlıkla incelenebilmektedir. (Güçlü 2006).

Modifiye Knott metodu bir yoğunlaştırma metodu olup mikrofilerler fikse edilerek boyanmaktadır. Mikrofilerler fikse edildiğinde doğru ölçümler yapılabilmekte, baş şekli ve kuyruk özellikleri daha yakından incelenebilmektedir. *D.immitis* mikrofilerlerinde baş hafifçe sivrilirken, *D.repens* ve *A.reconditum* mikrofilerlerinde kütür. Bu testte fiksasyon için %2 formolin kullanımı *D.repens* ve *A.reconditum* mikrofilerlerinin kuyruk kısmında kavisli ('şemsiye', 'düşme kancası' kuyruğu) ve belirgin bir artefaka neden olurken *D.immitis* mikrofilerlerinin kuyruğu düz şekilde gözlenmektedir (Sloss ve ark 2012, Taylor ve ark 2016).

Membran filtrasyon metodu uygulaması kolay ve pratik olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Yabaneri (2014) membran filtrasyon metodunun, modifiye Knott ve natif metoda kıyasla daha kolay ve zaman kazandırıcı olduğunu belirtmiştir. Fakat filtrasyon testlerindeki mikrofiler ölçümleri esnasında, filtre üzerindeki porların mikrofilerlerin teşhis için önemli vücut bölümlerini gizlediğini, dolayısıyla mikrofilerlerin ölçülerini ve morfolojik yapılarını (baş, gövde bölümleri, kuyruk) tespit edebilmek için modifiye Knott metoduna göre daha fazla dezavantaja sahip olduğunu gözlemlemiştir (Yabaneri 2014).

Asit fostotaz histokimyasal boyama metodu, kanda bulunan mikrofilerlerin ayırıcı teşhisinde histokimyasal farklılıklarını ortaya çıkararak yardımcı olmaktadır.

Bu metodun prensibi, mikrofilierlerin dış yüzeyindeki enzim bulunan bölgelerin, kırmızı-kahverengi azo boyası ile türlere göre farklı bant veya nokta şeklinde boyanması esasına dayanmaktadır. (Peribanez ve ark 2001). *D.immitis*'te kırmızı renk oluşumu hem anal delikte hem de boşaltım deliğinde gözlemlenirken, *D.repens*'te sadece anal delikte, *A.reconditum*'da ise vücudun yaygın bölümlerinde renk değişimi görülmektedir. (Umur ve ark 2006).

1.8.2. Serolojik Teşhis Metotları

Serolojik teşhis metotları ile vücutta parazitin antijenik özelliğe sahip ekskresyon ve sekresyonları veya bunlara karşı oluşan antikorlar tespit edilebilmektedir. *D.immitis*'in serolojik teşhisinde LAT (Latex Agglutination Test; Lateks Aglütinasyon Testi), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test; İndirekt Floresan Antikor Testi), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Enzim Bağlı İmmünolojik Yöntem) ve hızlı tanı testleri kullanılmaktadır (Collins ve ark 1987, Atwell 1988, Snyder ve ark 2000, McCall ve ark 2008b, Traversa ve ark 2010, Özcel ve ark 2011, Zeyrek ve Erdoğan 2011).

LAT, serumda *D.immitis* antijenlerinin tespiti için diğer serolojik metotlarla kıyaslandığında daha verimli olmakta fakat düşük parazit yüküne sahip vakalarda başarısız olmaktadır (Collins ve ark 1987). Wong ve Suter (1979), ölmüş mikrofilierleri antijen olarak kullanan IFAT ile *D.immitis*'e karşı oluşan spesifik antikorların saptanması için güvenilir testler geliştirmeye çalışmışlardır. İmmün sistem aracılı gizli dirofilariasis vakalarında %80–95 oranında IgG antikorlarını tespit edebildiği için etkili bir metot olarak kabul edilmektedir. Fakat gizli enfeksiyon olup olmadığı ya da gizli enfeksiyonun nedeni önceden bilinemediği için yaygın bir kullanım alanı bulunmamaktadır (Atwell 1988, Özcel ve ark 2011).

ELISA, şüpheli materyalden antijen ya da antikor tespit etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Antijen testlerinin antikor testlerine oranla daha yüksek spesifiteye sahip olduğu, fakat *D.repens* ile çapraz reaksiyon riski olduğu belirtilmektedir. Song ve ark (2002) tarafından *D.immitis* ile *Trichuris vulpis* ve *Ancylostoma caninum* arasında çapraz–reaksiyon tespit edilememiş, fakat *D.immitis* ile *Toxocara canis*

arasında güçlü bir çapraz–reaksiyon belirlenmiş olup bu durumun parazitin somatik yapılarındaki antijenik epitoplara bağlı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Song ve ark 2002). Günümüzde ELISA antijen testleri sıklıkla tercih edilmektedir. Erişkin dişi parazit varlığında %100 spesifiteye ulaşan bu testler, düşük parazit yükü veya antijen düzeylerinde değişken sensitivite göstermektedir (Atkins 2003, Courtney ve Zeng 2001, Lee ve ark 2011). ELISA ile antikor tespiti, özellikle kedilerin az sayıda parazit ile enfekte olmaları nedeniyle ya da hayvanların sadece erkek parazitlerle enfekte olmaları durumunda tercih edilebilmektedir. Fakat antikor tespiti, hayvanın test yapıldığı anda enfekte olduğunu göstermemekte, hayvanın daha önce enfekte olmuş ve etkeni elimine edebilmiş olduğu anlamına da gelebilmektedir (Snyder ve ark 2000). Yapılan bir çalışmada antijen-pozitif kedilerin %20’den fazlası antikor-negatif sonuç vermiştir (Kalkstein ve ark 2000). Tespit edilen antikorlar, L3 veya L4’lerin erken göçüne yanıt olarak konak tarafından üretildiği için, kedilerin yaklaşık %50’sinde başarılı bir deneysel enfeksiyondan 2 ila 3 ay sonra pozitif titreler tespit edilebilmekte ve 5 ay boyunca pozitif titre gözlenebilmektedir. Ayrıca çalışmalar konak antikorumun 4–6 ayda negatif titreye dönüştüğünü göstermektedir (McCall ve ark 1995, McTier ve ark 1995, Ryan ve ark 1995).

Hızlı tanı testleri genellikle dişi parazitlerin sekresyonlarını saptamayı amaçlamaktadır (Courtney ve Cornell 1990, McCall ve ark 2008b, Traversa ve ark 2010, Traversa ve ark 2011). Bu testlerin sensitivitesi dişi parazit varlığı, sayısı ve yaşı ile ilişkili olmaktadır. *D.immitis* için mikrotitre plate ELISA, membran bound ELISA ve lateral flow immünokromatografik hızlı tanı testleri mevcuttur (Little ve ark 2014). Mikrotitre plakalı ELISA en hassası olarak kabul edilmektedir. Tek yetişkin dişi parazit ile enfekte olan köpeklerin %85,7’sinde ve en az 3 yetişkin dişi parazit ile enfekte köpeklerin %100’ünde antijeni tespit edilebilmektedir. Lateral flow immünokromatografik ve membran bound ELISA’ların birçoğu da iyi bir hassasiyet göstermektedir. Tek yetişkin dişi parazit ile enfekte olan köpeklerin %46–76,2’sinde ve en az 3 yetişkin dişi parazit ile enfekte köpeklerin %84–100’ünde antijeni tespit edilebilmektedir (McCall ve ark 2001a). Farklı sensitivitelere sahip hızlı tanı testleri ile *D.immitis* ile *Spirocerca lupi* arasında çapraz-reaksiyon belirlenememiş (Aroch ve ark 2015) fakat *D.immitis* ile *Angiostrongylus vasorum* arasında %25 oranında çapraz-reaksiyon riski bulunmuştur (Schnyder ve Deplazes 2012).

Ayrıca antijen testleri, adultusidal aktiviteye sahip tedavinin etkinliğini doğrulamanın en güvenilir yollarından biri olarak kabul edilmektedir. Antijen testlerinin tek başına kullanılması tedavinin başarılı olduğunu kesin kanıtlamamakla birlikte, tedaviden 6 ay sonra tekrarlanan testler ile antijenemi ve mikrofilaremi tespit edilememesi tedavinin başarılı olduğu anlamına gelmektedir (Maxwell ve ark 2014, American Heartworm Society 2020). Mikrofiler pozitif vakalarda, erişkin parazitlerin de bulunması ve dolayısıyla paraziter antijenin tespit edilebilir olması gerektiği düşünülmektedir. Fakat bazen mikrofiler pozitif numunelerde antijen testleri negatif sonuç verebilmektedir. Bu durumun nedenleri arasında; mikrofilerlerin kalıcılığı fakat yetişkin parazitlerin ölümü, mikrofilaremik kanın transfüzyonu veya plasental yolla yavrulara aktarım yer almaktadır (Underwood ve Harwood 1939, Todd ve Howland 1983). Bunlara ek olarak, antijenler dolaşım kanında immün kompleksler içinde bulunabilirler. Bu immün kompleksleri bozmak için serum veya plazma numunelerini ısıl ön işleme tabi tutmak ve testi tekrarlamak, yanlış negatif sonucu doğru pozitif çevirmeyi sağlayabilmektedir (Little ve ark 2014, Velasquez ve ark 2014). Ayrıca son çalışmalar, enfekte bir köpeğe koruyucu ilaç ve doksisisiklin uygulanmasının antijen tespitine müdahale ettiğini göstermekte, ancak bu yanlış negatif sonuçlar, numunelerin ısıl ön işleme tabi tutulmasıyla tersine çevrilebilmektedir (Drake ve ark 2015). Fakat sadece erkek parazitlerden kaynaklı enfeksiyonlarda ısıl ön işlem uygulanmasının, antijenin saptanması üzerindeki etkisi bildirilmemiştir, bu tür enfeksiyonlar nadir ve klinik olarak önemsiz olarak kabul edilmektedir (Little ve ark 2018). Bunlara ek olarak rutin tarama testlerinde ısıl ön işlem önerilmemektedir (American Heartworm Society 2020). Duyarlılığı %85–90 olan bir antijen testinin, uygulamada enfeksiyonların yaklaşık %10–15'ini kaçırması beklenmektedir; fakat güven aralıkları dahil edildiğinde, kaçırılan potansiyel enfeksiyonların aralığı daha geniş olmaktadır (Little ve ark 2018).

1.8.3. Moleküler Teşhis Metotları

Son konak ve vektör sivrisineklerde filarial gen materyallerini saptamak için PCR bazlı moleküler metotlar geliştirilmiştir. Mikrofilaremi görülen hayvanlarda PCR, Nested PCR ve qPCR gibi moleküler teşhis metotları ile filarial enfeksiyonların kesin teşhisi sağlanmakta ve mikroskopik teşhis metotları ile ortaya çıkabilecek hatalı

identifikasyonların önüne geçilebilmektedir (Casiraghi ve ark 2006, Thanchomnang ve ark 2010). Moleküler tanıda *D.immitis*'in identifikasyonu için sıklıkla cox1 (Cytochrome C Oxidase Subunit I), 12S rDNA, 16S rDNA, ITS-1 ve ITS-2 (Internal Transcribed Spacer 1 ve 2) hedef gen bölgeleri kullanılmaktadır (Rishniw ve ark 2006, Rojas ve ark 2015). Ferreira ve ark (2017), ITS-1 geni ile %9,3 ve ITS-2 geni ile %13,7 oranında *D.immitis* tespit etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda *D.immitis* ve *A.reconditum* ile miks enfeksiyonlarda, ITS-2 gen bölgesinin ITS-1'e göre daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Ferreira ve ark 2017).

Nested PCR, test reaksiyonunun duyarlılığını ve özgüllüğünü artırmak için tasarlanmış bir PCR modifikasyonudur. (Bişkin ve ark 2011). Oi ve ark (2015) doğal enfekte köpeklerden alınan numunelere nested PCR uygulamış ve cfDNA (cell-free DNA; Hücre Dışı Mitokondriyal DNA)'nın yetişkin dişi parazitler tarafından üretildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışma konak serumundan mitokondriyal DNA saptanmasına dair bilinen ilk rapordur (Oi ve ark 2015). Hem PCR hem de fragman analizini birleştiren hassas ve floresan bazlı qPCR tekniği geliştirilmiştir. Bu teknik floresan işaretli boya ve proplar kullanılarak hedef gen bölgesinin çoğaltılmasını görünür hale getirmekte ve monitörize etmekte, ayrıca birden fazla sayıda etkeni kantitatif bir şekilde eş zamanlı olarak tespit edebilmesiyle parazitolojide kullanım alanı bulmaktadır (Von Samson-Himmelstjerna ve ark 2002, Roeber ve ark 2011). Dirofilariasis olgularında qPCR metodu %0,000083 oranındaki parazitemiyi teşhis edebilmektedir (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006). Bu PCR tekniği hem parazitleri hem de paraziter hastalıkları tanımlamak ve parazit seviyelerini belirlemek için kullanılmaktadır (Zarlenga ve Higgins 2001). Potkonjak ve ark (2020), qPCR'ın düşük mikrofilaremlerde bile yüksek sensitiviteye sahip olduğunu fakat gizli enfeksiyonları kaçırılabilceğini bildirmiştir. Birden fazla etkeni qPCR analizi ile teşhis etmek de mümkün olup bu amaçla multipleks qPCR kullanan Laidoudi ve ark (2020), bu metodun %99,3 ile %100 arasında spesifiteye sahip olduğu, sensitivite oranını ise koenfeksiyon varlığına göre %62,5 ile %94,1 aralığında değişebileceğini bildirmişlerdir.

1.8.4. Görüntüleme Metotları

Dirofilariasis teşhisinde tanı veya tanıya yardımcı olması amacıyla görüntüleme metotları da kullanılabilir. Bu amaçla radyografi, EKG (Elektrokardiyografi) ve EKO (Ekokardiyografi) tercih edilmektedir (Atwell 1988, Carlisle 1988).

Radyografi, Dirofilariasis'in varlığını ve şiddetini belirlemek için önemli bir teknolojidir. Klinik vakalarda en sık görülen bulgular, kalbin sağ tarafında ters D şeklinde genişleme (135 köpeğin %72'si), pulmoner arter segmentinin genişlemesi (%71) ve pulmoner arter dalların genişlemesi şeklindedir (%54). Hem klinik hem de deneysel vakalarda yetişkin parazitlerin varlığını ve yerini, kalp ve pulmoner lobar arterlerin şekli/boyutunu göstermek için anjiyokardiyografi veya arteriyografi kullanılması daha uygundur (Carlisle 1988). EKG'nin Dirofilariasis'in tanısı için zorunlu olmadığı, ancak köpekte hastalık varsa ve sağ ventriküler hipertrofiyi düşündüren EKG modelinde değişiklikler de mevcutsa, o zaman teşhisi desteklediği ve prognostik olduğu vurgulanmaktadır (Atwell 1988). EKO, özellikle hafif enfekte köpeklerde kesin teşhis için etkili ve yeterli bir metot değildir, çünkü parazitler genellikle ekokardiyografik görüş alanının dışında pulmoner arterlerin periferik dalları ile sınırlıdır. Çok sayıda parazit bulunduğunda, ana pulmoner arterde, sağ ve proksimal sol interlobar dallarda veya kalbin sağ tarafında kolayca görüntülenebilmektedir (American Heartworm Society 2020).

1.9. Dirofilariasis'in Tedavisi

Dirofilariasis tedavisinde mikrofilariisit (mikrofilerleri öldüren) ve adultusit (yetişkin parazitleri öldüren) etkili olmak üzere 2 aşamalı tedavi uygulanmalıdır. Sadece adultusit aktiviteye sahip ilaç kullanımı gelişmekte olan larvalar üzerine etkisiz olacağı için tedavide tam anlamıyla başarı sağlanamamaktadır. Gelişmekte olan bu larvalar gelişimlerini tamamlayıp mikrofiler üretmeye başlamaktadır. Bu nedenle hem erişkinleri hem de mikrofilerleri öldürmek, sürekli tekrarlayan enfeksiyonları engellemeyi sağlamaktadır (American Heartworm Society 2020). Bu amaçla USFDA (US Food and Drug Administration; ABD Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından adultusit

etkili melarsomin ve mikrofilarisit etkili ML (Makrosiklik Lakton)'ların kullanılması önerilmektedir. Şiddetli klinik bulgulara sahip köpekler adultusit tedaviye başlamadan önce stabilize edilmelidir ki bu da glukokortikosteroidler, diüretikler, vazodilatörler, pozitif inotropik ajanlar ve sıvı tedavisi uygulamalarını gerektirebilmektedir (American Heartworm Society 2020). Ayrıca azalan anti-inflamatuar dozlarda glukokortikosteroidlerin kullanımı, pulmoner tromboembolinin klinik belirtilerinin kontrolüne yardımcı olmaktadır (Atwell ve Tarish 1995).

Günümüzde levamizol gibi mikrofilarisidal etkinliği zayıf (Dik ve ark 1992) ilaçlar yerine ML sınıfı ilaçlar (ivermektin, milbemisin oksim, moksidektin, selamektin) duyarlı larvaları öldürmek için köpeklerin immün sistemi ile uyumlu çalışmaktadır (Moreno ve ark 2010, Vatta ve ark 2014). Prekardiyak (göç eden) larvalar üzerindeki filarisidal etkileri, çok düşük dozlarda ve kısa aralıklarla ya da uzun süreler boyunca ve küçük miktarların sürekli salınmasıyla elde edilebildiğinden, mükemmel terapötik/toksik oranlara sahiptirler (Wolstenholme ve ark 2015, Prichard ve Geary 2019). ML'ların etkinliği, 4 hafta boyunca eşzamanlı doksisisiklin kullanımı ile de güçlendirilebilmektedir. Bu uygulama, tedavinin ilk 60 günü boyunca gelişen tüm larvaları ortadan kaldırmaktadır (American Heartworm Society 2020).

Melarsomin dihidroklorid ile adultusit tedavisinde kullanılan 2 protokol mevcuttur. İlkinde melarsomin (2,5 mg/kg) 24 saat arayla 2 enjeksiyon uygulanmakta ve erişkin parazitlerin %90'ını öldürmede başarılı olmaktadır. İkinci protokolde ise melarsomin (2,5 mg/kg) 0 (ilk melarsomin enjeksiyonu), 30, 31. günlerde olmak üzere 3 doz şeklinde uygulanmakta ve erişkin parazitleri öldürmedeki başarı oranı %98 olmaktadır (Keister ve ark 1992, Vezzoni ve ark 1992). Köpeğin tedavi sırasında ve son melarsomin uygulamasından sonra 6–8 hafta boyunca yüksek aktivite göstermesi, adultusit tedavi sonrası komplikasyonlara neden olabileceği için köpeğin hareket alanını kısıtlamak gereklidir (Dillon ve ark 1995, Fukami ve ark 1998). Bir adultusit tedavisi sırasında öldürülen parazitlerin sayısı ne kadar fazla olursa, obstrüktif ve inflamatuvar patoloji potansiyeli o kadar önemli olmaktadır (Venco ve ark 2004). AHS (American Heartworm Society), acil klinik müdahale gerekmediği sürece, adultusit tedaviye başlamadan önce 3 aya kadar ML uygulamalarını önermektedir. Bu uygulamanın mantığı, duyarlı larvaları öldürmek ve böylece re-enfeksiyonları önlemek, genç parazitlerin duyarlı hale gelmesi için zaman sağlamaktır. Bu sayede

mikrofilerleri ortadan kaldıramasa bile, dişilerin genital sistemine zarar vermesi nedeniyle parazit yeni mikrofiler oluşturmamaktadır (American Heartworm Society 2020). Ayrıca çalışmalar, melarsomin enjeksiyonlarından önce ivermectin ve doksisisiklin ile tedavi edilen deneysel enfekte köpeklerin, parazitlerin ölümü ile ilişkili daha az pulmoner patolojiye sahip olduğunu göstermektedir (McCall ve ark 2008a, Kramer ve ark 2011).

ML'ların adultisidal aktivitesini araştıran çalışmalar; aylık profilaktik ivermectin dozlarının (minimum 6 µg/kg), deneysel enfekte köpeklerde 36 ayda etkeni elimine edebileceğini (McCall ve ark 2001b) ve doğal enfekte köpeklerde iki yılda antijenemide %71 oranında düşüş olabileceğini belirtmişlerdir (Venco ve ark 2004). ML'lar ile sinerjik çalışan tetrasiklin grubu antibiyotiklerin adultisidal aktivitesini inceleyen çalışmalar; haftalık profilaktik ivermectin dozları (6 µg/kg) ile uzun süreli doksisisiklin (10 mg/kg) kullanımının parazitemide %78 oranında düşüş (Bazzocchi ve ark 2008), ivermectin (6 µg/kg) ile doksisisiklinin (10 mg/kg) parazitemide %72,7 oranında düşüş (Grandi ve ark 2010), moksidektin (1 mg/kg) ile doksisisiklinin (10 mg/kg) 10 ayda yetişkin parazitleri elimine edebildiğini belirtmişlerdir (Chandrashekar ve ark 2014). Doksisisiklin (10 mg/kg), imidakloprid %10 + moksidektin %2,5 kombinasyonu ile kullanıldığında 9 ayda antijenemiyi sıfırladığı belirtilmiştir (Genchi ve ark 2019). Ayrıca, doksisisiklin + ivermectin kombinasyonu sadece ivermectin uygulamasından daha hızlı adultisit aktivite sağlamakta (Bazzocchi ve ark 2008), doksisisiklin + moksidektin kombinasyonunun tedavi etkinliği, melarsomine eşdeğer olup tedavi daha az komplikasyon ile sonuçlanmaktadır (Chandrashekar ve ark 2014, Genchi ve ark 2019).

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerden doksisisiklin, parazitin tüm yaşam evrelerinde *Wolbachia* sayısının azalmasını sağlamaktadır (American Heartworm Society 2020). *D.immitis* ile deneysel enfeksiyonu takip eden birinci veya ikinci ay boyunca doksisisiklin uygulaması L3 ve L4'ler üzerinde ölümcül etkiye sahip olmaktadır (McCall ve ark 2011). Ek olarak, erişkin parazitlerle enfekte köpeklerde, doksisisiklin uygulamaları kademeli olarak mikrofilaremiyi bastırmaktadır (Bazzocchi ve ark 2008, McCall ve ark 2008a). Doksisisiklin (10 mg/kg) 4 hafta boyunca günde 2 uygulanmalıdır (Bandi ve ark 1999, Kramer ve ark 2011). Doksisisiklin ile melarsomin uygulamaları arasında bir aylık bekleme süresi önerilmektedir. Bu sayede adultisit

tedavi öncesinde WSP ve diğer metabolitlerin azalması, ayrıca *Wolbachia* elimine edildikten sonra parazitlerin kendiliğinden ölmeleri için zaman tanınmış olmaktadır (American Heartworm Society 2020). *D.immitis* enfeksiyonlarında, doksisisiklin uygulamasını takiben en az 12 ay boyunca *Wolbachia* sayısının düşük kaldığı görülmektedir (Rossi ve ark 2010). Doksisisiklin, ivermektin ile kombine kullanıldığında *Wolbachia* titrelerini tek başına doksisisiklin uygulamasına göre daha etkili bir şekilde düşürmektedir (Bazzocchi ve ark 2008).

1.10. Dirofilariasis'te Korunma ve Kontrol

Hastalıktan korunma, son konak olan köpeklerin korunması ve vektör sivrisinek kontrolü olarak 2 kısımda uygulanabilmektedir.

Köpeklerin korunmasında en etkili ve güvenli ilaç grubu olarak ML'lar önerilmektedir. İlk antiparaziter uygulama yapılan yavru köpeklere 6 ay sonra bir test yapıldıktan sonra tekrar uygulama yapılmalı, daha sonra yılda 1 kez test ve sonrasında koruyucu uygulama tekrarlanmalıdır. 7 ay ve daha büyük yaştaki köpeklerde ise koruyucu uygulamalara başlamadan önce antijen ve mikrofiler testleri yapılmalıdır (American Heartworm Society 2020). ML kullanımında oral, topikal ve parenteral olmak üzere 3 yol izlenebilmektedir. PO (Oral) kullanımda ivermektin ve milbemisim oksim 30 gün süreli koruma sağlamaktadır. Endeminin yüksek olduğu bölgelerde yıl boyu kullanım önerilmektedir. Topikal kullanım için moksidektin ve selamektinin sıvı formları bulunmakta ve 30 gün süreyle koruyuculuk sağlamaktadır. Parenteral (SC) uygulamada yavaş salınım formülasyonuna sahip moksidektin preparatlarının 6 ay koruyuculuğu bulunmaktadır. Maksimum koruma için 6 ayda bir uygulamanın tekrarlanması önerilmektedir (American Heartworm Society 2020). Repellent (kovucu) kullanımı da enfeksiyonun yayılımını azaltan uygulamalardan biri olup köpeklerde %95 oranında yüksek etki sağladığı gözlemlenmiştir (McCall ve ark 2017a). Topikal bir sivrisinek kovucu veya ektoparaziter uygulama ile eşzamanlı olarak ML önleyici kullanımı, dirençli ve duyarlı parazitlere karşı daha etkili koruma sağlayabilmektedir (McCall ve ark 2017b, American Heartworm Society 2020).

Sivrisinek mücadelesi, sivrisineklerin gelişim formlarına karşı fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlarla yapılmaktadır. Fiziksel mücadelede, sivrisineklerin üreme ortamları olan su birikintileri kurutulmaya ve/veya ıslah edilmeye çalışılmaktadır. Kimyasal mücadelede, sivrisineklerin üreme yerleri periyodik olarak insektisitlerle ilaçlanmaktadır. Larva ve pupalarının gelişimlerini engellemek amacıyla IGR (Insect Growth Regulator; Böcek Gelişim Düzenleyici)'ler kullanılmaktadır. Bu insektisitler kitin sentezi inhibitörü olarak larva mücadelesinde kullanılmaktadır. Türkiye'de bu amaçla kullanılmak üzere piyasada bulunan Triflumuron ve Diflubenzuron etken maddelerine sahip insektisitler mevcuttur. Ayrıca larva ve ergin sivrisineklere karşı sentetik pretroidli insektisitler, üreme ve saklanma yerlerine uygulanabilmektedir. Bu amaçla sıklıkla deltamethrine, cyflutrin ve cypermethrin etken maddelerine sahip insektisitler, sıcak sisleme veya ULV (Ultra Low Volume; Düşük Hacim) yöntemleriyle kullanılmaktadır. Biyolojik mücadelede, larvalarla beslenen *Gambusia* ve *Poecilia* cinslerindeki balıklar durgun su ve göletlerde yetiştirilerek, oluşacak sivrisinek sayısı azaltılmaya çalışılmalıdır. Larvalarla biyolojik mücadele amacıyla *Bacillus thuringiensis* (Bt-14 suşu) ve *Bacillus sphaericus* gibi bazı bakteri türleri, *Culicinomyces* ve *Coelomomyces* cinslerindeki bazı mantarlar ve entomopatojenik nematodlar (mermithid nematodlar) kullanılabilmektedir (Dik 2015).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 06.10.2022 tarihli ve 65202830-050.04.04-684 sayılı izin (Bkz. EK-A) ile yapılmıştır.

2.1. Çalışmanın Örneklemine İlişkin İstatistiksel Analiz

Hayvan sayısının belirlenmesinde yapılan güç analizi sonucu araştırma için güven düzeyi %95 olduğunda kabul edilebilir örneklem sayısı yaklaşık 96 olarak hesaplanmıştır. Buna göre Sivas'tan 102, Tokat'tan 98 köpeğin çalışmada kullanılacak materyal sayısını karşıladığı belirlenmiştir. Hesaplama elde edilen örneklem büyüklüğü minimum örneklem büyüklüğü olup kullanılan formüller aşağıda verilmiştir.

[Güven düzeyine karşılık gelen tablo değeri ($z=1,96$); evrende gözlenme oranı ($p=0,5$) (Bu oran bilinmediği durumlarda en yüksek değeri veren 0,5 olarak alınmıştır), Kabul edilebilir sapma toleransı ($d=0,1$), n : örneklem büyüklüğü.]

$$n_0 = \frac{z^2 \times p \times (1 - p)}{d^2} = \frac{(1,96)^2 \times 0,5 \times 0,5}{(0,1)^2} \approx 96$$

2.2. Çalışma Alanı ve İncelenen Hayvan Sayısı

Tez çalışmasının materyal temini için seçilen Sivas ve Tokat illeri farklı coğrafik bölgelerde yer almalarına rağmen şehir merkezlerinde akarsu bulunmaktadır. Bu da vektör sivrisinek gelişimi ve dirofilariasisin yayılımı için ortam hazırlamaktadır. Materyal temini, mikrofilerlerin sezonsal olarak dolaşım kanındaki yoğunluğunun değişimi ve çevre sıcaklığına bağlı olarak ilkbahar ve yaz aylarında kanda mikrofilerlere rastlama ihtimalinin daha fazla olması nedeniyle Mayıs–Eylül 2022 tarihleri arasında yapılmıştır. Ayrıca parazitin nokturnal-subperiodik periodisiteye sahip olması nedeni ile kan alma işlemi 16.00–18.00 saat aralığı dikkate alınarak

yapılmıştır. Bu amaçla, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Klinikleri'ne Sivas ve Tokat illerinden gelen farklı ırk, yaş ve cinsiyetlerde rastgele seçilen sahipsiz 200 (Sivas'tan 102, Tokat'tan 98) adet köpekten alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Çalışmada kan örnekleri alınan köpeklerin ırklarının cinsiyetlere göre dağılımı Tablo 2.1.de, yaşlarının cinsiyetlere göre dağılımı Tablo 2.2.de verilmiştir.

Tablo 2.1. Sivas ve Tokat illerindeki köpek ırklarının cinsiyetlere göre dağılımı.

KÖPEK CİNSİ	SİVAS		TOKAT	
	DİŞİ	ERKEK	DİŞİ	ERKEK
Kangal	8	17	2	3
Kafkas Kangalı	-	1	-	-
Akbaş	1	-	-	-
Aksaray Malaklısı	-	1	-	-
Alman Çoban Kurdu	2	2	2	3
Huski	-	1	-	-
Golden Retriever	-	1	2	1
Labrador Retriever	-	-	-	1
Cocker Spaniel	-	-	1	-
Terrier	-	-	1	-
Border Collie	1	-	-	-
Dachshund	1	-	-	-
İngiliz Pointer	-	-	1	1
Dogo Argentino	1	-	-	2
Pitbull	-	-	7	1
Tiger Pitbull	-	-	-	3
Boxer	-	-	1	-
Melez	37	28	26	40
TOPLAM	51	51	43	55

Tablo 2.2. Sivas ve Tokat illerindeki köpeklerin yaşlarının cinsiyetlere göre dağılımı.

YAŞ	SİVAS			TOKAT		
	DİŞİ	ERKEK	TOPLAM	DİŞİ	ERKEK	TOPLAM
1-3	15	15	30	16	25	41
4-6	28	26	54	19	26	45
7+	8	10	18	6	6	12

2.3. Kan alma, Laboratuvar Uygulamaları ve Mikroskopik Muayene

Çalışma için köpeklerin sefalik ven (vena cephalica antebrachii)'inden, bölge alkol ile temizlendikten sonra, kan alma holderi ve iğnesi ile antikoagulant madde (EDTA) içeren tüplere kan alınmıştır. Bütün köpeklerin ırkı, yaşı, cinsiyeti ve klinik bulguları (varsa) not edilmiştir. Laboratuvar uygulamaları ve mikroskopik muayene, SCÜ Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Alınan kanlar, kan karıştırıcıda bir süre karıştırıldıktan sonra natif muayene ve Modifiye Knott metotları ile mikroskopik olarak incelenmiştir. Daha sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek plazma ve şekilli elemanlar birbirinden ayrılmış, plazma ve tam kanlar ependorf (1,5 ml) tüplere alınarak genomik DNA izolasyonuna kadar -20°C'de saklanmıştır.

Mikroskopik muayenede kullanılan ekipmanlar

- Santrifüj (Hettich)
- Işık mikroskobu (Zeiss)
- Derin dondurucu -20°C (Arçelik)

Mikroskopik muayenede kullanılan kimyasallar

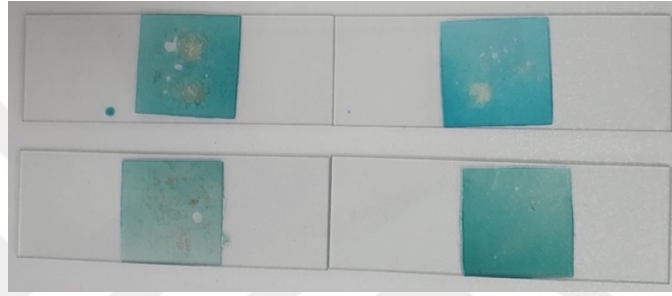
- Formaldehit %37 (Stabilizasyon min. %10 Methanol) 1 lt (Tekkim)
- Metilen Blue (Alkoldeki Doymuş Çöz.) 500 ml (Norateks)

2.3.1. Natif Muayenenin Yapılışı

Natif muayene için lam üzerine EDTA'lı tüpten alınan birkaç damla kan üzerine fizyolojik su damlatıp karıştırıldıktan sonra üzerine lamel kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar Zeiss marka ışık mikroskobu altında, canlı ve hareketli mikrofillerler yönünden incelenmiştir.

2.3.2.Modifiye Knott Metodunun Yapılışı

EDTA'lı tüpten, başka bir tüpe 1 ml kan alınarak üzerine 9 ml %2'lik formol ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Bu karışım 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Dipte 1–2,5 ml sediment kalacak şekilde üstteki sıvı kısım dökülmüş ve sedimentin üzerine birkaç damla %0,1'lik metilen blue damlatılarak iyice karıştırılmıştır. Bu karışımdan lam üzerine birkaç damla alınarak üzerine lamel kapatılmış (Şekil 2.1.) ve Zeiss marka ışık mikroskobunda mikrofilerler yönünden incelenmiştir. Bu sayede mikrofilerler fikse edilip ve boyanmaktadır.



Şekil 2.1. Modifiye Knott metodu ile hazırlanan preparat görüntüsü.

2.4. Moleküler Analizler

2.4.1. Genomik DNA İzolasyonunun Yapılışı

Genomik DNA izolasyonunda kullanılan ekipman ve kimyasallar

- Roche High Pure PCR Template Preparation Kit
- Otomatik pipet
- Filtreli pipet ucu 10 µl
- Filtreli pipet ucu 100 µl
- Filtreli pipet ucu 1000 µl
- Steril ependorf tüpleri
- İsoopropanol (Merck)
- Santrifüj (Hettich)
- İnkübatör

Roche High Pure PCR Template Preparation Kit ile DNA izolasyonu aşamaları;

- 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine; 200 µl tam kan numunesi, 200 µl binding buffer ve 40 µl çözdürülmüş Proteinaz K solüsyonu eklendi ve hemen karıştırılarak +70°C'de 10 dk inkübe edildi.
- Ardından 100 µl isopropanol eklenerek iyice karıştırıldı.
- High Pure Filtre tüpleri ile toplama tüpleri birleştirildi.
- Sıvı numune, filtre tüpünün üst haznesine pipetlendi. Tüm High Pure tüp düzeneği 8.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra; filtre tüpleri toplama tüplerinden çıkarılarak toplama tüpü ve içerisinde bulunan sıvı atıldı.
- Filtre tüpleri yeni toplama tüpleri ile birleştirildi. Filtre tüpünün üst haznesine 500 µl Inhibitor Removal Buffer eklenerek 8.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtre tüpleri toplama tüplerinden çıkarılarak toplama tüpü ve içerisinde bulunan sıvı atıldı.
- Filtre tüpleri yeni toplama tüpleri ile birleştirildi. Filtre tüpünün üst haznesine 500 µl Wash Buffer eklenerek 8.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek altta kalan kısım atıldı.
- Filtre tüpleri yeni toplama tüpleri ile birleştirildi. Filtre tüpünün üst haznesine 500 µl Wash Buffer eklenerek 8.000xg'de 1 dk santrifüj edilerek altta kalan kısım atıldı.
- Daha sonra tüm High Pure düzeneği 10 saniye boyunca tam hızda santrifüj edilerek toplama tüpü atıldı. Bu ek santrifüjleme adımı, kalan Yıkama Tamponunu gidermektedir.
- DNA'yı ayırtmak için; filtre tüpü temiz, steril 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- Filtre tüpünün üst haznesine 50 µl Elution Buffer (+70°C) ekleyerek 8.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Tekrar filtre tüpünün üst haznesine 50 µl Elution Buffer (+70°C) ekleyerek 8.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
- Mikrosantrifüj tüpü izole edilen DNA'yı içerir.

DNA'yı filtreden mikrosantrifüj tüpüne toplama aşamasında protokolde belirtilen tek seferde 200 µl yerine, 2 seferde 50 µl (toplam 100 µl) Elution Buffer solüsyonu kullanılarak daha yoğun oranda DNA elde edilmiştir. Bu nedenle ihtiyaç olabileceği düşünülerek filtre tüpleri parafin bant ile sarılarak -20°C'de saklanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine ayrıştırılan DNA, qPCR uygulamasına kadar -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.4.2. *D.immitis* ve *Wolbachia* Endosimbiyontunun qPCR Analizleri

qPCR uygulamalarında kullanılan ekipmanlar

- CFX Connect Real-time Systems qPCR cihazı (Şekil 2.4. (A))
- Roche LightCycler 96 qPCR cihazı (Şekil 2.4. (B))
- Otomatik pipet
- Filtreli pipet ucu 10 µl
- Filtreli pipet ucu 100 µl
- Filtreli pipet ucu 1000 µl
- Steril ependorf tüpleri

qPCR uygulamalarında kullanılan kimyasallar

- *Dirofilaria immitis* primer prob kit
- *Wolbachia* primer prob kit
- Roche LightCycler 480 Probes Master
- SYBR Green I
- Otoklavlanmış bidistile su

qPCR'in yapılışı

qPCR, 1990'lı yılların başında geliştirilerek PCR'deki amplifikasyonun gerçek zamanlı olarak izlenmesine olanak sağlayan bir metottur. Bu metodun prensibi, standart PCR'ye bir dijital kamera ve reaksiyon tüpüne bağlı bir florometre kullanarak her döngüden sonra floresanstaki değişikliği ölçmek için spesifik, ara katman

oluşturan bir boyayı (etidyum bromür gibi) dahil etmektir (Higuchi ve ark 1993). Günümüzde qPCR platformu; bir termal cycler, hem floresan uyarımı hem de emisyon toplamaya yönelik optikler, ayrıca veri toplama ve analiz için bir bilgisayar ve yazılımdan oluşmaktadır (Logan ve Edwards 2009). qPCR’de kullanım alanı bulan diğer tespit kimyasalları arasında Taqman problemleri (Heid ark 1996), MGB (Minör Groove Binder; küçük oluk bağlayıcı), Eclipse problemleri (Afonina ve ark 2002), moleküler işaretçiler (Piatek ve ark 1998) ve FRET (Floresans/Forster rezonans enerji transferi bazlı analizler) (Chen ve Kwok, 1999) bulunmaktadır. qPCR tekniği, SYBR Green I (Becker ve ark 1996) gibi diğer güvenli boyaları reaksiyona ve analize dahil edecek şekilde modifiye edilebilmektedir. qPCR, amplikonların agaroz jel elektroforezi ihtiyacını ortadan kaldırmakta ve amplifikasyonun başladığı döngünün (Ct) tanımlanmasına izin vererek bağıl veya mutlak miktar belirlemeye olanak sağlamaktadır. DNA standartları (tanımlanmış bir konsantrasyona sahip) ve test numuneleri aynı anda döngüye dahil edilerek Ct değerleri belirlenip karşılaştırılabilmektedir. Elde edilen verilerden standart bir eğri oluşturularak test numunelerindeki miktarlar, bu standart eğriye göre hesaplanmaktadır (Gasser 2006). SYBR Green I, etidyum bromürden yaklaşık 10 kat daha fazla hassasiyete sahip olmakla birlikte 0,5 ng kadar az DNA’nın tespitine olanak sağlamaktadır (Becker ve ark 1996). Araya giren SYBR Green I boyasının avantajı, herhangi bir çift sarmallı DNA’ya bağlanabilmesi ve herhangi bir etkenin teşhisinde kullanılabilmeleridir. Bununla birlikte dezavantajı, boyanın bir numunedeki primer dimerler ve spesifik olmayan ürünleri içeren çift sarmallı DNA’nın tümüne bağlanmasıdır. Bu sınırlama, spesifik olmayan ürünleri denatüre eden ve belirli ürünleri sağlam bırakan bir sıcaklıkta floresans verilerinin elde edilmesiyle aşılabilmektedir (Becker ve ark 2004).

Çalışmada *D.immitis*’in *cox1* hedef gen bölgesini çoğaltan 1,25 µl COI-DIM-F primeri; 1,25 µl COI-DIM-R primeri; 10 µl SYBR Green (SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, BioRad); 5,5 µl otoklavlanmış ddH₂O (double distilled water; duble distile su); 2 µl Template DNA (kan örneklerinden izole edilen DNA’lar) kullanılarak, son hacim (pleyitin her kuyucuğunda) 20 µl olacak şekilde BioRad CFX Connect Real-time Systems PCR cihazına yükleme yapıldı. *D.immitis* tespiti için qPCR’da kullanılan primer ve problemlerin dizilimi Tablo 2.3.de; qPCR koşulları Tablo 2.4.de verilmiştir.

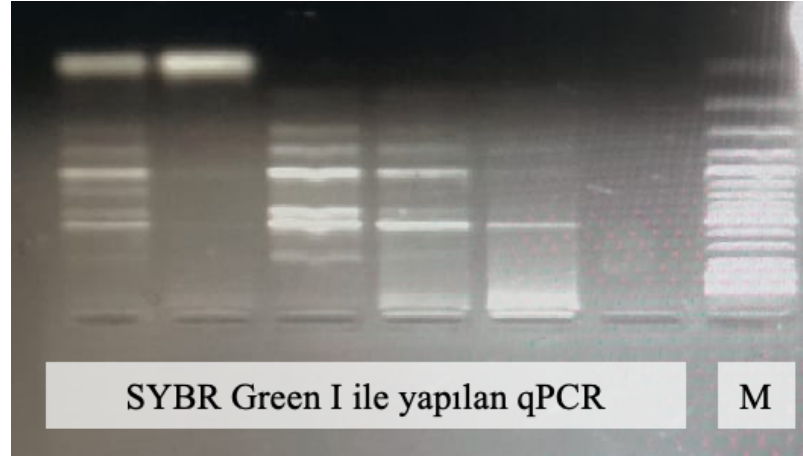
Tablo 2.3. *D.immitis* tespiti için qPCR analizinde kullanılan primerlerin (Tahir ve ark 2017) dizilimleri.

PRİMER/PROB	SEQUENCE (5'-3')	AMPLİKON UZUNLUĞU
COI-DIM-F	TGCTGGTTTGCAAGGTATGC	89 bp
COI-DIM-R	TCACCGAACCCAACGAAGAA	

Tablo 2.4. *D.immitis* tespiti için qPCR analizinde uygulanan PCR koşulları.

AŞAMA	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
İlk Denatürasyon	94°C	300 sn	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Annealing	53°C	30 sn	
Elongation	72°C	30 sn	
Final Elongation	72°C	300 sn	1
Melting	95°C	15 sn	1
	63°C	15 sn	
	95°C	15 sn	
Cooling	37°C	30 sn	1

Dirofilaria immitis'in PK (pozitif kontrol) örnekleri için için Ataş ve ark (2018)'nın çalışmasında pozitif bulunan bir örneğin DNA ve tam kanı kullanıldı. Öncelikle DNA izolasyonuna bu pozitif tam kan numunesi de dahil edilerek DNA izolasyonunun başarılı olduğu görüldü. *D.immitis* için tüm qPCR analizlerinde çift PK ile çalışıldı. NK (Negatif kontrol) örnekleri için otoklavlanmış ddH₂O kullanıldı. Daha sonra rastgele seçilen 10 örnek ile, aynı koşullarda, SYBR Green I kullanılarak deneme qPCR'ı yapıldı. qPCR sonuçlarına %2'lik Agaroz Jel Elektroforezi ile bakıldığında, SYBR Green'de normal ışım ve bant oluşumu gözlemlendi (Şekil 2.5.). Ayrıca MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) yazılımı ile *D.immitis* primer dizilimleri Şekil 2.6.de verilmiştir.

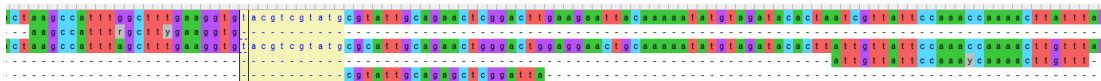


Şekil 2.5. SYBR Green I yapılan qPCR sonuçlarının %2'lik Agaroz Jel Elektroforezi görüntüsü. (M) Marker 100 bp.



Şekil 2.6. *D.immitis* primerlerinin MEGA 11 programı ile dizilimleri. 1 ve 2. Sıra; *D.immitis*'in gen dizilimi, 3. Sıra; COI-DIM-F primeri dizilimi, 5. Sıra; COI-DIM-R primeri dizilimi.

Çalışmada *Wolbachia*'nın *ftsZ* hedef gen bölgesini çoğaltan 0,5 µl WDi.ftsZ.490-F primeri; 0,5 µl WDi.ftsZ.600-R primeri; 1,8 µl WDimm.ftsZ.523-P prob; 10 µl prob master mix (LightCycler 480 Probes Master, Roche); 5,5 µl otoklavlanmış ddH₂O; 2 µl Template DNA kullanılarak, son hacim 20 µl olacak şekilde Roche LightCycler 96 PCR cihazına yükleme yapıldı. *Wolbachia*'nın PK örnekleri için çalışmamızda pozitifliği kesin olarak belirlenmiş olan pozitif DNA örneği, NK örnekleri için otoklavlanmış ddH₂O kullanıldı. MEGA 11 yazılımı ile *Wolbachia* primer ve prob dizilimleri Şekil 2.7.de verilmiştir. *Wolbachia* tespiti için qPCR'da kullanılan primerler ve probın dizilimi Tablo 2.5.de; qPCR koşulları Tablo 2.6.de verilmiştir.



Şekil 2.7. *Wolbachia* primerleri ve probunun MEGA 11 programı ile dizilimleri. 1 ve 3. Sıra; *Wolbachia*'nın gen dizilimi, 2. Sıra; WDi.ftsZ.490-F primer dizilimi, 5. Sıra; WDimm.ftsZ.523-P prob dizilimi, 4. Sıra; WDi.ftsZ.600-R primer dizilimi.

Tablo 2.5. *Wolbachia* tespiti için qPCR analizlerinde kullanılan primer ve prob (Laidoudi ve ark 2020) dizilimleri.

PRİMER/PROB	SEQUENCE (5' - 3')	AMPLİKON UZUNLUĞU
WDiro.ftsZ.490-F	AAGCCATTTRGCTTYGAAGGTG	111 bp
WDiro.ftsZ.600-R	AAACAAGTTTTGRTTTGGAATAACAAT	
WDimm.ftsZ.523-P	6FAM-CGTATTGCAGAGCTCGGATTA-TAMRA	

Tablo 2.6. *Wolbachia* tespiti için qPCR analizinde uygulanan PCR koşulları.

AŞAMA	SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
İlk Denatürasyon	94°C	300 sn	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Annealing	53°C	30 sn	
Elongation	72°C	30 sn	
Final Elongation	72°C	300 sn	1
Cooling	37°C	30 sn	1

3. BULGULAR

Bu çalışmada, Sivas ve Tokat illerindeki sahihsiz köpeklerden, 102 adet Sivas'tan ve 98 adet Tokat'tan olmak üzere; 30 adet Kangal, 1 adet Kafkas Kangalı, 1 adet Akbaş, 1 adet Aksaray Malaklısı, 9 adet Alman Çoban Kurdu, 1 adet Huski, 4 adet Golden Retriever, 1 adet Labrador Retriever, 1 adet Cocker Spaniel, 1 adet Terrier, 1 adet Border Collie, 1 adet Dachshund, 2 adet İngiliz Pointer, 3 adet Dogo Argentino, 8 adet Pitbull, 3 adet Tiger Pitbull, 1 adet Boxer ve 131 adet melez köpekten; toplamda 200 adet kan örneği toplandı. Bu kan örnekleri mikroskopik muayene ile *D.immitis* mikrofilerleri yönünden, qPCR ile *D.immitis* ve *Wolbachia* endosimbiyontu yönünden incelendi.

3.1. Mikroskopik Bulgular

Sivas ve Tokat ilinden toplanan kan örnekleri öncelikle natif muayene metodu ile mikrofilerler yönünden incelendi. Fakat 200 adet kan örneğinin hiçbirinde *D.immitis* veya diğer filariaların mikrofilerlerine rastlanmadı.

Bu kan örnekleri daha sonra modifiye Knott metodu ile mikrofilerler yönünden incelendi. Fakat 200 adet kan örneğinin hiçbirinde *D.immitis* veya diğer filariaların mikrofilerlerine rastlanmadı.

3.2. qPCR Bulguları

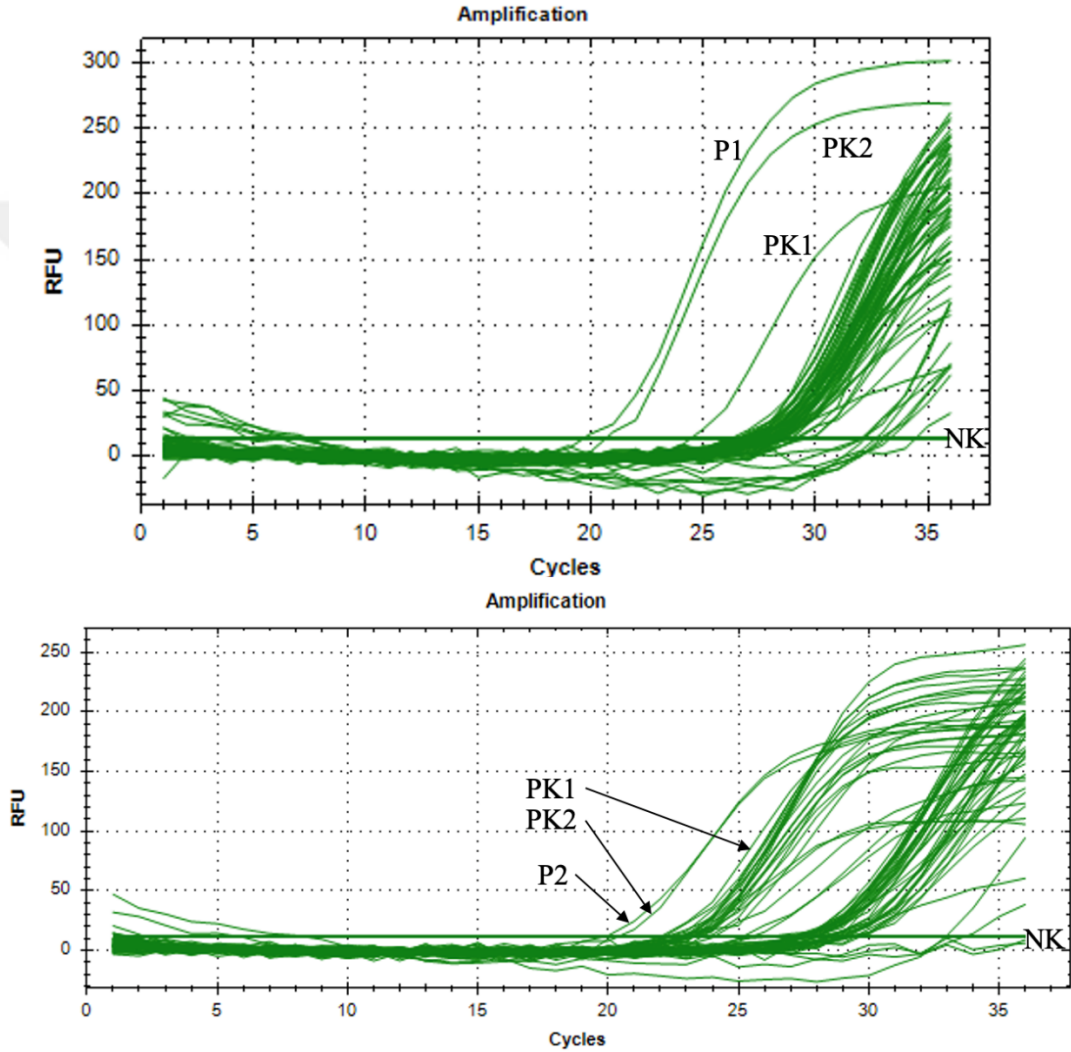
Toplanan kan örnekleri, mikroskopik değerlendirme sonrasında DNA izolasyonu yapılarak, qPCR analizi ile *D.immitis* tür spesifik ve *Wolbachia* soy spesifik primerler kullanılarak incelendi.

Dirofilaria immitis tür spesifik primerleri ve SYBR Green I kullanılarak yapılan qPCR analizi sonucunda, incelenen 200 adet kan örneğinden 2'si *D.immitis* yönünden pozitif sonuç verdi. Pozitif örneklerin 1'i Sivas, 1'i Tokat'tan getirilen sahihsiz köpeklerden alınan kan örnekleri olup bunlara ait ırk, cinsiyet ve yaş tabloları

Tablo 3.1.de verilmiştir. *D.immitis* qPCR analizi sonuçlarının CT değerleri Şekil 3.1.de verilmiştir.

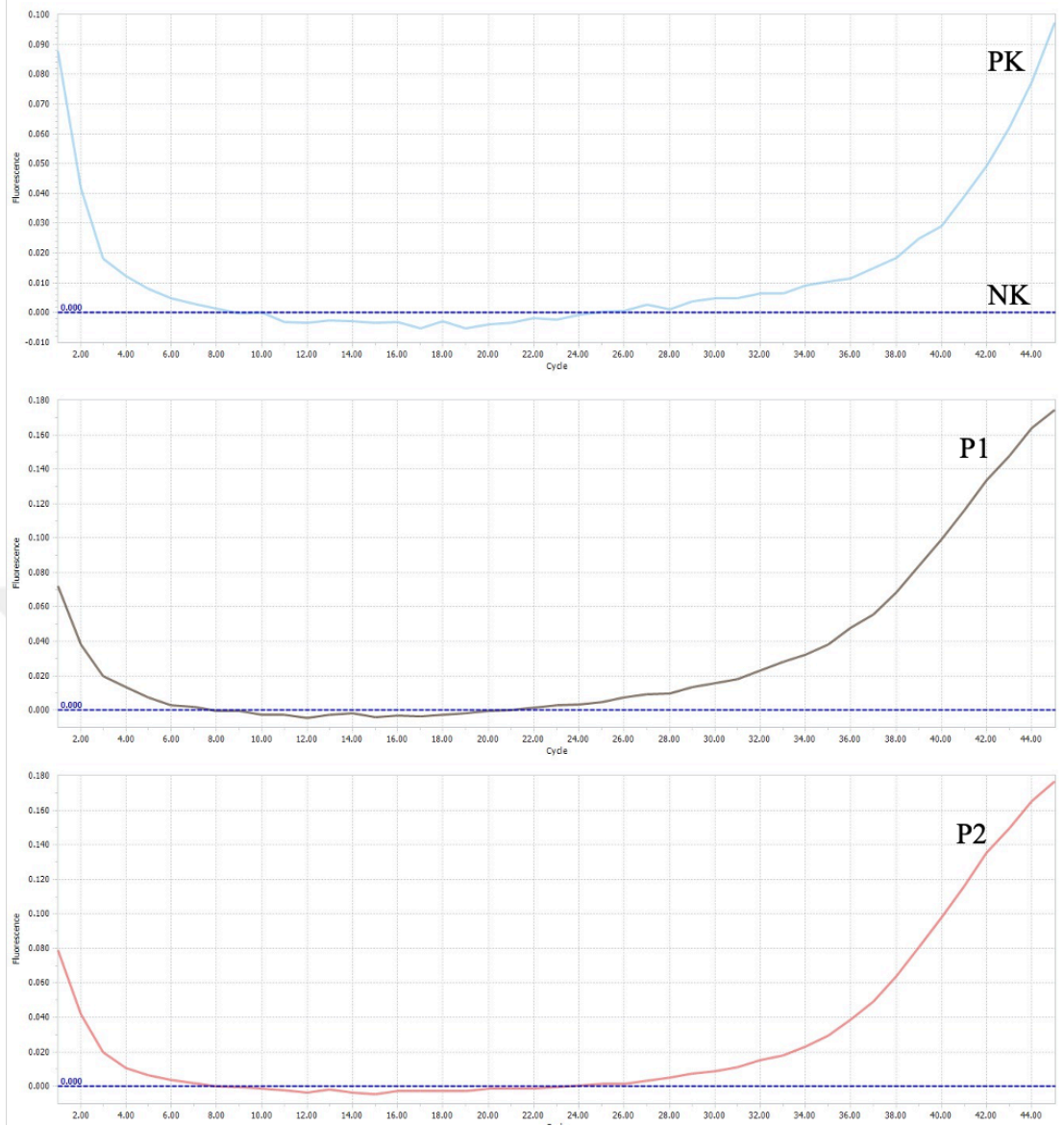
Tablo 3.1. Pozitif sonuç veren örneklerin ırk, cinsiyet ve yaş dağılımları.

ŞEHİR	IRK	CİNSİYET	YAŞ
Sivas	Alman Çoban Kurdu	Erkek	4
Tokat	Melez	Dişi	5



Şekil 3.1. *D.immitis* qPCR sonuçlarının CT değerleri. PK1 ve PK2; pozitif kontroller, NK; negatif kontrol, P1; *D.immitis* pozitif örnek-1, P2; *D.immitis* pozitif örnek-2.

Wolbachia soy spesifik primerleri ve probu kullanılarak yapılan qPCR analizi sonucunda, *D.immitis* pozitif olan 2 örnek *Wolbachia* yönünden pozitif sonuç verdi. *D.immitis* negatif olan 198 örnekte ise *Wolbachia* DNA'sına rastlanmadı. *Wolbachia* endosimbiontunun qPCR analizi sonuçlarının CT değerleri Şekil 3.2.de verilmiştir.



Şekil 3.2. *Wolbachia* endosimbiyontunun qPCR sonuçlarının CT değerleri. PK; pozitif kontrol, NK; negatif kontrol, P1; *Wolbachia* pozitif örnek-1, P2; *Wolbachia* pozitif örnek-2.

3.3. İstatistiksel Analiz Bulguları

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 29.0 (IBM Corp. Released 2023. IBM SPSS Statistics for Mac OS, Version 29.0.2.0 (20) Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılarak değerlendirildi. Kategorik veriler Pearson'ın Ki-kare (X^2) testi ile analiz edildi. Testlerin anlamlılık düzeyi için $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ değeri kabul edildi.

Dirofilaria immitis enfeksiyonunun ırk ile ilişkisine bakıldığında; Kangal, Kafkas Kangalı, Akbaş, Aksaray Malaklısı, Alman Çoban Kurdu, Huski, Golden Retriever, Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Terrier, Border Collie, Dachshund, İngiliz Pointer, Dogo Argentino, Pitbull, Tiger Pitbull, Boxer ve melez köpekler de dahil olmak üzere toplam 18 farklı köpek ırkı incelendi (Tablo 2.1.). Örneklemdeki Alman çoban kurtlarında %11.1 (1/9), melez köpeklerde %0.8 (1/131) oranlarında enfeksiyon tespit edildi. *D.immitis* enfeksiyonunda ırklara göre anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($X^2 (17) = 41.336, p=0.375$).

Tablo 3.2. *D.immitis* enfeksiyonunun cinsiyet açısından değerlendirilmesi.

			<i>D.immitis</i>	
			Pozitif	Negatif
CİNSİYET	Dişi	n	1	93
		%	1.1	98.9
	Erkek	n	1	105
		%	0.9	99.1

Dirofilaria immitis enfeksiyonunun cinsiyet ile ilişkisine bakıldığında; örneklemdeki dişi köpeklerde %1.1 (1/94), erkek köpeklerde %0.9 (1/106) oranında enfeksiyon tespit edildi (Tablo 3.2.). *D.immitis* enfeksiyonunda cinsiyetlere göre anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($X^2 (1) = 0, p=1.000$).

Tablo 3.3. *D.immitis* enfeksiyonunun farklı yaş grupları açısından değerlendirilmesi.

			<i>D.immitis</i>	
			Pozitif	Negatif
YAŞ	1-3 yaş arası	n	0	72
		%	0	100
	4-6 yaş arası	n	2	97
		%	2	98
	7 yaş ve üzeri	n	0	29
		%	0	100

Dirofilaria immitis enfeksiyonunun yaş ile ilişkisine bakıldığında; örneklemdaki 1-3 yaş aralığında %0, 4-6 yaş aralığında %2 (2/99), 7 yaş ve üzerinde %0 oranlarında enfeksiyon tespit edildi (Tablo 3.3.). Pozitif bulunan köpeklerden biri 4, diğeri ise 5 yaşında olup her iki pozitif örnek de 4-6 yaş grubuna yerleşmektedir. *D.immitis* enfeksiyonunda farklı yaş gruplarına göre anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($X^2 (2) = 1.437$, $p=0.642$).

Tablo 3.4. *D.immitis* enfeksiyonun teşhis metotları açısından değerlendirilmesi.

			<i>D.immitis</i>	
			Pozitif	Negatif
TEŞHİS METOTLARI	Mikroskopik Metotlar	n	0	200
		%	0	100
	qPCR	n	2	198
		%	1	99

Dirofilaria immitis enfeksiyonları teşhis metotları açısından değerlendirildiğinde; mikroskopik metotlardan natif muayene ve modifiye Knott metotları ile mikrofilaremi belirlenememiş olup qPCR metodu ile %1 (2/200) oranında parazitemi tespit edilmiştir (Tablo 3.4.). *D.immitis* enfeksiyonlarında teşhis metotlarına göre anlamlı farklılık olmadığı belirlendi ($X^2 (1) = 2.010$, $p=0.156$).

4. TARTIŞMA

Filarial nematodların, hem hayvanlarda neden oldukları hastalıklar hem de zoonoz karakterleri nedeniyle son yıllarda dünyada sahip oldukları önem artmaktadır. İnsan ve hayvanlara bu enfeksiyonların bulaşması için vektörlük görevi gören çeşitli artropod türlerinin dünya çapında geniş bir yayılışa sahip olması da filarial nematodların öneminin artmasına katkı sağlamaktadır (Barriga 1982, Anderson 2000, Simón ve ark 2012). Bu filarial nematodların yayılışı ve epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmaların önemli bir kısmı köpeklerde kardiyo-pulmoner sistemde ciddi bozukluklara ve ölüme neden olan *D.immitis* üzerine yoğunlaşmıştır (Barriga 1982, Anderson 2000, Simón ve ark 2012).

Son 20 yılda köpeklerde kalp kurdu enfeksiyonunun coğrafi dağılımı önemli ölçüde artış göstermektedir (Hou ve ark 2017). Türkiye’de, tüm teşhis metotlarına göre, prevalans oranı %0–46,22 aralığında değişmektedir (Ağaoğlu ve ark 2000, Öge ve ark 2003, Sarı ve ark 2013, Çetinkaya ve ark 2016, Aslan Çelik ve ark 2020). Son yapılan meta-analiz raporu sonuçları, teşhis metodu fark etmeksizin, dünya çapında köpeklerde *D.immitis* prevalansının %10,91 (%95 CI=10.18-11.65) olduğunu ortaya koymaktadır. Meta-analiz raporuna göre, *D.immitis* prevalansının kıtalara göre sıralanması; Avustralya %22,68 (%95 GA: 6,30-45,37), Asya %12,07 (%95 CI: 9,12-15,37), Amerika %11,60 (%95 CI: 10,47-12,77), Avrupa %10,45 (%95 CI: 7,51-13,82) ve Afrika %7,57 (%95 GA: 3,09-13,80) şeklindedir. Ükelere göre en yüksek ve en düşük değerlere bakıldığında; İspanya %19,25 (%95 GA: 8.27-33.45) oranı ile en yüksek ve Kanada %0,16 (%95 GA: 0.11-0.21) oranı ile en düşük prevalans değerlerine sahip ülkeler olarak belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek prevalans oranı 2011–2015 yılları arasında %14,05 ve en düşük prevalans oranı ise 2016 yılı sonrasında (2016–2019 yılları) %7,60 olarak kaydedilmiştir (Anvari ve ark 2020). Bu çalışmada köpeklerde %1 (2/200) oranında *D.immitis* enfeksiyonu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular Türkiye’nin de bulunduğu Asya kıtası ve diğer kıtalarda belirlenen prevalans oranlarından daha düşük bulunmuştur. Ayrıca bu sonuç, 2016 yılı sonrasında belirtilen düşük prevalans oranı ile uyumludur. Bu farklılıkların; köpeklerin kapalı alanlarda beslenme oranının artması, köpek sahiplerinin bilinçlenmesi, antiparaziter ilaç kullanımının artması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dirofilariasis'in coğrafik dağılımı, *D.immitis*'in biyolojik döngüsü için büyük bir öneme sahip olup hava durumu ve iklim hastalığın prevalansını etkileyen önemli bir faktördür. Larvaların gelişimi için yaklaşık 1 ay boyunca 18°C'den daha yüksek sıcaklık gerekmekte, bu nedenle sivrisineklerin L3'lerin gelişimini destekleyebilmeleri için uygun sıcaklıklara ihtiyacı olmaktadır (Montoya ve ark 1998). Hayvanlarda ve insanlarda dirofilariasis Akdeniz ülkelerinde endemik olup (Simón ve ark 2005) Avrupa kıtasının orta ve doğu bölgelerinde daha sık tespit edilmektedir (Simón ve ark 2012). Coğrafi faktörlere ek olarak; vektörlerin bulunduğu bölgelerdeki köpek yoğunluğu, hem parazitin hem de vektörün gelişim ve hayatta kalma oranlarındaki mevsimsel değişiklikler, mikrofilareminin günlük periyodikliği, sivrisinek faunasının dağılımı ve köpeklerin yaşı hastalığın yayılışında ve epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu faktörler, farklı duyarlılık ve özgüllüğe sahip tanı metotları, incelenen örnek sayısı, sivrisinek varlığını etkileyen iklim türü ve köpeklerin beslenme türü gibi nedenlerle birlikte, dünya çapında köpeklerde *D.immitis*'in oldukça değişken (yüksek heterojenlik) bir prevalansa sahip olmasına yol açmaktadır (Brooks ve Hoberg 2007, Montoya-Alonso ve ark 2016, Morchón ve ark 2012, Taylor ve ark 2016). Bu çalışmada örnek toplanan Sivas ve Tokat il merkezlerinde sivrisinek gelişimine olanak sağlayan akarsular bulunmasına rağmen %1 oranında enfeksiyon tespit edilmiştir. Bu sonuçların; iklim değişikliği, düşük yağış miktarı, kuraklık, akarsuların su miktarlarının nispeten azalması, akarsulara yapılan ıslah çalışmaları, sivrisinek mücadeleleri, köpeklerde tedavi ve korunma amaçlı bilinçli veya bilinçsiz antiparaziter uygulamaları gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Dirofilariasis'de dolaşımdaki mikrofilerlerin tanısı genellikle mikroskopik kan muayenesi ile yapılmaktadır. *D.immitis* mikrofilerleri, natif muayene ile Türkiye'de %0–14,08 aralığında değişen prevalans oranlarında belirlenmiştir (Mamak 2002, Adanır ve ark 2013, Ertekin 2017). Ataş ve ark (1997) Sivas'ta %6 oranında, Balıkcı ve Sevgili (2005) Elazığ'da %3,3 oranında, Adanır ve ark (2013) Burdur'da %14,08 oranında mikrofilaremi tespit etmişler; Mamak (2002) Sivas'ta kangal köpeklerinde, Civelek ve ark (2006) Bursa Gemlik'te ve Ertekin (2017) İzmir'de mikrofilaremi tespit edememişlerdir. Bu çalışmada natif muayene ile incelenen kan örneklerinin hiçbirinde mikrofilaremi tespit edilemedi. Bu sonuç; Mamak (2002), Civelek ve ark (2006) ve Ertekin (2017)'in sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Natif muayene ile etken tespit

edilememesinin, metodun sensitivitesinin düşük olması, düşük mikrofilaremi (ml'ye düşen mikrofiler sayısı) ve olası gizli enfeksiyonlar gibi nedenlerle tanıda tek başına yeterli olmayacağından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Dirofilaria immitis mikrofilerleri, modifiye Knott metodu ile dünyada %11,99 oranında (Anvari ve ark 2020) ve Türkiye'de %0–13,9 aralığında değişen prevalans oranlarında belirlenmiştir (Voyvoda ve ark 2004, Civelek ve ark 2006). Modifiye Knott metodu ile dünya çapında; Yabsley ve ark (2004) Amerika'da %11,1 oranında, Bolio-Gonzalez ve ark (2007) Meksika'da %8,3 oranında, Furtado ve ark (2009) Brezilya'da %32,4 oranında, Venco ve ark (2011) İtalya'da %29,8 oranında, Diakou ve ark (2016) Yunanistan'da %4,1 oranında, Anvari ve ark (2019) İran'da %30,3 oranında mikrofilaremi tespit etmişlerdir. Modifiye Knott metodu ile Türkiye'de; Voyvoda ve ark (2004) Aydın ve İzmir' de %13,9 oranında, Yıldız ve ark (2008) Kırıkkale'de %5,8 oranında, Adanır ve ark (2013) Burdur'da %11,97 oranında, Yabaneri (2014) Nevşehir Avanos'ta %1,45 oranında, Ataş ve ark (2018) Sivas'ta %1,3 oranında mikrofilaremi teşhis etmişler; Civelek ve ark (2006) Bursa Gemlik'te mikrofilaremi tespit edememiştir. Bu çalışmada modifiye Knott metodu ile incelenen kan örneklerinde mikrofilaremiye rastlanmadı. Bu sonuç, Civelek ve ark (2006)'nın sonuçları ile benzerlik göstermekte fakat dünya çapında ve Türkiye'de aynı metodu kullanan diğer çalışmaların değerlerinden düşüktür. Bu farklılığın; modifiye Knott metodu bir yoğunlaştırma metodu olmasına rağmen gizli enfeksiyonlar gibi kanda mikrofiler tespit edilemediği durumlarda yanlış negatif sonuçlar verebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu durum; tek cinsiyet ile enfeksiyon, tek parazit ile enfeksiyon, genç erişkin veya geriatric (yaşlı) parazitler ile enfeksiyon, ektopik enfeksiyonlar, adultisidal ilaçların parazitlere sterilizasyon (kısırlaştırma) etkileri gibi nedenlerle dolaşım kanında mikrofiler bulunmayışı ya da immun sistem aracılı enfeksiyonlar ve mikrofilarisidal ilaç kullanımına bağlı olarak mikrofilerlerin ölümü sonucu dolaşım kanında tespit edilememesi gibi nedenlere bağlı olabilmektedir.

Mikroskopik teşhis metotlarının kolay uygulanabilir ve pratik olmaları, hızlı sonuç vermeleri ve direkt mikrofilerleri görebilmek gibi avantajlarına ek olarak dolaşım kanında mikrofiler aramaya dayalı metotlar oldukları için gizli enfeksiyonlarda veya düşük parazit yüklü enfeksiyonlarda yanlış negatif sonuç vermeleri gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Carlisle 1988). Ayrıca gizli enfeksiyon

nedenlerine ek olarak, bağışıklık reaksiyonları, geçmişte mikrofilarisidal aktiviteye sahip ilaç kullanımı gibi nedenler *D.immitis* ile enfekte köpeklerin %20–30’unda dolaşımında mikrofiler eksikliğine neden olabilmektedir (McCall ve ark 2008a). Serolojik metotlar ile antijen tespiti ise enfeksiyondan sonraki 5–6. aylarda mümkün olup ve koruyucu ilaç kullanılan köpeklerde 9. aya kadar ertelenebilmektedir (McCall ve ark 2001a). Ayrıca antijen tespitine dayalı metotlarda *Toxocara canis* ile *D.immitis* arasında çapraz-reaksiyon riski bulunmaktadır (Song ve ark 2002). Hızlı tanı testleri ise, dişi parazit varlığı ve sayısına göre değişen sensitiviteye sahip olmakla birlikte *Angiostrongylus vasorum* ile *D.immitis* arasında çapraz-reaksiyon riski bulunmaktadır (McCall ve ark 2001a, Schnyder ve Deplazes 2012). Antikor testleri ile enfeksiyondan 2–3 ay sonra pozitif titreler tespit edilebilmekte, bunlar 4–6 ayda negatif titreye dönüşmektedir (McCall ve ark 1995, Ryan ve ark 1995). Serolojik ve mikroskopik metotların bu özellikleri göz önüne alındığında, moleküler yöntemlerin hassasiyeti dikkat çekmektedir (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006). qPCR metodu, amplikonların agaroz jel elektroforezine gerek duyulmadan amplifikasyonun başladığı döngünün (Ct) tanımlanmasına izin vererek bağıl veya mutlak miktar belirlemeye ve numuneleri karşılaştırmaya olanak sağlamaktadır (Gasser 2006). Bu sayede, qPCR ile mikroskopik teşhis metotlarıyla ortaya çıkabilecek yanlış-negatif veya yanlış-pozitif değerlendirmelerin de önüne geçilebilmektedir (Casiraghi ve ark 2006, Thanchomnang ve ark 2010).

Son yıllarda parazitolojide sıklıkla kullanılan PCR ile dünyada %11,44 oranında (Anvari ve ark 2020) ve Türkiye’de %0–25 aralığında değişen *D.immitis* prevalansı belirlenmiştir (Civelek ve ark 2006, Taşçı ve Kılıç 2015). Dünya çapında PCR ile yapılan çalışmalarda Pantchev ve ark (2009) Almanya’da % 6,8 oranında, Ionica ve ark (2015) Romanya’da %6,2 oranında, Feng ve ark (2015) Tayvan’da %7,08 oranında, Maia ve ark (2016) Portekiz’de %10,4 oranında, Silva ve ark (2019) Brezilya’da %6 oranında *D.immitis* tespit etmişlerdir. Dirofilariasis olgularında qPCR, %0,000083 oranındaki parazitemiyi teşhis edilebilecek hassasiyete sahiptir (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006). qPCR ile köpeklerde; Aroch ve ark (2015) %25 oranında, Tahir ve ark (2017) %21,27 oranında, Laidoudi ve ark (2020) %7,14 oranında *D.immitis* tespit etmişlerdir. Potkonjak ve ark (2020) köpeklerde % 27,1 oranında, tilkilerde %8,5 oranında ve çakallarda %6,3 oranında *D.immitis* tespit etmişlerdir. Türkiye’de PCR ile köpeklerde; Sarali (2009) Aydın’da %10 oranında,

Şimşek ve ark (2011a) Erzurum'da %8,1 oranında, Yabaneri (2014) Nevşehir Avanos'ta %2,17 oranında, Taşçı ve Kılıç (2015) Kars ve Iğdır'da %25 oranında, Şimşek ve Çiftçi (2016) Elazığ'da %1,8 oranında, Çetinkaya ve ark (2016) Tekirdağ'da %1, Edirne'de %4,9, Kırklareli'de %11 oranında ve Ataş ve ark (2018) Sivas'ta %2,9 oranında *D.immitis* tespit etmişlerdir. Bu çalışmada köpeklerde *D.immitis* tespiti için Türkiye'de ilk defa qPCR metodu kullanılmış olup, Sivas'ta %0,98 (1/102) ve Tokat'ta %1,02 (1/98) oranında *D.immitis* tespit edilmiştir (Şekil 3.1.). Çalışmanın sonucunda, etkenin Sivas'ta düşük oranlarda varlığını sürdürdüğü belirlenmiş olup Tokat'ta ilk defa *D.immitis* tespit edilmiştir. Bu çalışmada qPCR sonucu elde edilen enfeksiyon oranı ile dünyanın çeşitli bölgelerinde ve Türkiye'de moleküler metotlarla yapılan diğer çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıkların; vektör sivrisineklerin bölgedeki dağılımı, iklim değişiklikleri ve yağışın az olması nedeniyle sivrisineklerin üreme ortamlarının etkilenmesi, sivrisineklerin en yüksek aktivite gösterdikleri saatlerde belediyelerin yaptığı ilaçlama çalışmaları, belediyeler tarafından sahipsiz hayvanlara özellikle yaz aylarından önce antiparaziter uygulamalar yapılması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu çalışmada mikroskopik muayene sonucu negatif çıkan örneklerden iki tanesi qPCR ile pozitif sonuç vermiştir. Bu durumun, dirofilariasis olgularında qPCR metodunun çok düşük parazitemiyi dahi tespit edebilecek hassasiyete sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Casiraghi ve ark 2006, Rishniw ve ark 2006).

Köpeklerde *D.immitis*'in ırk predispozisyonu incelendiğinde; bazı çalışmalar ırk predispozisyonunun istatistiki açıdan anlamsız olduğunu belirtirken (Razi ve ark 2010, Liu ve ark 2013, Taşçı ve Kılıç 2015, Demir ve Aktaş 2020, Seven ve Akkan 2023), bazı çalışmalar ise ırk predispozisyonunun istatistiki açıdan anlamlı farklılık gösterdiğini ve büyük ırk köpeklerde küçük ırk köpeklere göre parazitemi ihtimalinin daha yüksek olduğunu belirtmektedir (Montoya ve ark 1998, Voyvoda 2004, Yıldırım ve ark 2007, Yaman ve ark 2009). Çalışmada elde edilen veriler ırklara göre değerlendirildiğinde; Alman çoban kurtlarında %11,1 ve melez köpeklerde %0,8 oranında parazitemi gözlenmiştir. Parazitemi görülen 2 köpeğin de büyük ırk köpekler olduğu gözlenmiş; bu sonuç Montoya ve ark (1998), Voyvoda (2004), Yıldırım ve ark (2007), Yaman (2009)'ın bulguları ile benzerlik göstermiş fakat aradaki fark istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($X^2 (17) = 41.336, p=0.375$).

Köpeklerde *D.immitis* cinsiyetlere göre incelendiğinde; bazı çalışmalar dişi ve erkek köpekler arasında istatistiki açıdan anlamlı fark olmadığını belirtirken (Theis ve ark 1999, Fan ve ark 2001, Liu ve ark 2013, Güven ve ark 2017, Ataş ve ark 2018), bazı çalışmalar erkek köpeklerde dişi köpeklere göre parazitemi ihtimalinin daha yüksek olduğunu ve bunun istatistiki açıdan anlamsız olduğunu belirtmekte (Öge ve ark 2003, Şahin ve ark 2004, Yıldırım ve ark 2004, Duran-Struuck ve ark 2005, Razi 2010, Adanır ve ark 2013, Taşçı ve Kılıç 2015, Şimşek ve Çiftçi 2016, Seven ve Akkan 2023), bazı çalışmalar erkek köpeklerde parazitemi ihtimalinin daha yüksek olduğunu ve bunun istatistiki açıdan anlamlı farklılık gösterdiğini belirtmektedir (Yıldırım ve ark 2007, Şimşek ve ark 2011, Taşkaya 2014, Demir ve Aktaş 2020). Bu farklılığın, erkek köpeklerin koruma, av, spor gibi amaçlarla daha çok tercih edilmesinden ve bu nedenle dış ortamda sivrisinelere maruz kalma risklerinin dişilere kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Montoya ve ark 1998). Bazı çalışmalar ise dişi köpeklerde parazitemi ihtimalinin daha yüksek olduğunu ve bunun istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık göstermediğini belirtmektedir (Ağaoğlu ve ark 2000, Şimşek ve ark 2008, Yaman ve ark 2009, Sarı ve ark 2013, Yabaneri 2014, Ayvazoğlu ve ark 2022, Başer ve ark 2023). Çalışmada elde edilen veriler cinsiyetlere göre değerlendirildiğinde; dişi köpeklerde %1,1 ve erkek köpeklerde %0,9 oranında parazitemi tespit edilmiştir. Bir dişi ve bir erkek köpekte olmak üzere; dişi köpeklerde erkek köpeklere göre daha yüksek oranda parazitemi gözlenmiş (Tablo 3.2.), fakat aradaki fark istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($X^2 (1) = 0, p = 1.000$). Ayrıca bu sonuçlar; Ağaoğlu ve ark (2000), Şimşek ve ark (2008), Yaman ve ark (2009), Sarı ve ark (2013), Yabaneri (2014), Ayvazoğlu ve ark (2022) ve Başer ve ark (2023)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Köpeklerde *D.immitis* yaş gruplarına göre incelendiğinde; bazı çalışmalar prevalansın yaşa göre değişmediğini (Toparlak ve Tüzer 1999, Fan ve ark 2001, Razi ve ark 2010, Güven ve ark 2017), bazı çalışmalar yaşın artmasıyla prevalansın da arttığı fakat bu durumun istatistiki açıdan anlamlı farklılık göstermediğini (Öge ve ark 2003, Şahin ve ark 2004, Civelek ve ark 2006, Taşçı ve kılıç 2015, Ataş ve ark 2018), veya yaşın artmasıyla prevalansın da arttığı ve bu durumun istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık gösterdiğini belirtmektedir (Yaman ve ark 2009, Adanır ve ark 2013, Liu ve ark 2013, Sarı ve ark 2013, Khedri ve ark 2014, Kamyngkird ve ark 2017). Ayrıca

bazı çalışmalar da 3–4 yaşından büyük köpeklerde prevalansın yüksek olduğunu fakat bunun istatistiki açıdan anlamlı farklılık göstermediğini (Şimşek ve ark 2008, Sarali 2009, Şimşek ve Çiftçi 2016, Demir ve Aktaş 2020, Ayvazoğlu ve ark 2022, Başer ve ark 2023) veya bu durumun istatistiki açıdan anlamlı bir farklılık gösterdiğini belirtmektedir (Yıldırım ve ark 2004, Yıldırım ve ark 2007, Taşkaya 2014). Bu çalışmalara ek olarak; Şimşek ve ark (2011) en yüksek prevalans oranını 6 ay–1 yaş grubunda tespit ederken, Yabaneri (2014) 6 ay, 1 ve 4 yaşında olmak üzere toplam 3 köpekte, Seven ve Akkan (2023) ise 1–5 yaş aralığında 1 köpekte parazitemi tespit etmiştir. Şimşek ve Çiftçi (2016) köpeklerde en yüksek *D.immitis* prevalansını 2–4 yaş grubunda tespit ederken 5 yaşından büyük köpeklerde parazitemi tespit edememiştir. Bunun nedeninin yaşla birlikte gelişen immünite ya da parazitlerin sterilizasyonu olduğunu belirtmiştir (Sarali 2009). Çalışmada elde edilen veriler yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde; %2’lik parazitemi ile en yüksek prevalans değeri 4–6 yaş grubunda gözlenmiş (Tablo 3.3.), fakat gruplar arasındaki fark istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($X^2(2) = 1.437, p = 0.642$). Çalışmanın sonuçları; Şimşek ve ark (2008), Sarali (2009), Şimşek ve Çiftçi (2016), Demir ve Aktaş (2020), Ayvazoğlu ve ark (2022) ve Başer ve ark (2023)’nın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada 7 yaş ve üzeri köpeklerde parazitemi tespit edilememesinin ve bu yaş grubuna ait az sayıda örnek toplanmasının; sahihsiz hayvanların yaşam sürelerinin daha kısa olması, yaş ile immünitenin gelişebileceği, yaşlı köpeklerde antiparaziter uygulamalarının daha dikkatli şekilde yapılması gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Wolbachia’yı ilk kez Hertig ve Wolbach (1924), *Culex pipiens*’in üreme dokularında riketsiya benzeri organizmalar olarak tanımlamış, daha sonra Hertig (1936) bu organizmaları aynı sivrisinek türünde *Wolbachia pipiens* olarak tanımlamıştır (Merçot ve Poinot 2009). *D.immitis*’te varlığı ise ilk kez 1995 yılında tespit edilmiştir (Sironi ve ark 1995). *D.immitis* ile enfekte köpeklerin tetrasiklin grubu antibiyotiklerle tedavisini takiben ortaya çıkan; dejenere olmuş embriyolar ile karakterize bir embriyogenezis bloğu, larvalarda büyüme kusurları, dişi parazitlerin sterilizasyonu ve yetişkin parazitlerin ölümü (Hoerauf ve ark 2000, Hoerauf ve ark 2001, Taylor ve ark 2005b) gibi etkileri nedeniyle parazit ile bakteri arasında karşılıklı simbiyoz olduğu ve bakterinin aslında üreme paraziti olarak etki gösterdiği düşünülmektedir. *Wolbachia*, genellikle filarial nematodların endosimbiyotik ortakları

olarak adlandırılrsa da nematodlar açısından biyolojik önemi hala tam olarak bilinmemektedir (Bandi ve ark 2001).

Dünyada yapılan çalışmalar genellikle *D.immitis* ile *Wolbachia* endosimbiontu arasındaki ilişkiyi anlamaya yoğunlaşmaktadır. Aralarındaki mutlak simbiyoz nedeniyle *D.immitis* pozitif her örneğin *Wolbachia* pozitif sonuç vereceği düşünülmektedir (Bandi ve ark 2001). Fakat *D.immitis*'teki varlığı henüz çok yeni bilinen *Wolbachia* endosimbiontu, *D.immitis* pozitif örneklerin; Tabar ve ark (2013) tarafından %30,6'sında, Landum ve ark (2014) tarafından %52,6'sında, Maia ve ark (2016) tarafından %64'ünde, Laidoudi ve ark (2020) tarafından %75'inde, Bawm ve ark (2023) tarafından %64,3'ünde tespit edilebilmiştir. Türkiye'de *D.immitis* ile *Wolbachia* endosimbiontu arasındaki ilişkiyi araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde; ilk kez Sarali (2009) *D.immitis* pozitif kan örneklerinin tamamında *Wolbachia* endosimbiontu tespit etmiştir. Bu amaçla *Wolbachia ftsZ* genini kullanarak yaptığı PCR analizleri ile tespit ettiği *Wolbachia* oranı %12,3'tür (Sarali 2009). Şimşek ve Çiftçi (2016) ise multipleks PCR ile; 4 örnekte tek başına, 2 örnekte *D.immitis* ile, 1 örnekte *D.repens* ile ve 3 örnekte miks enfeksiyon olmak üzere toplam 10 örnekte *Wolbachia* endosimbiontu tespit etmişlerdir. *Wolbachia* endosimbiontunun tek başına tespit edildiği 4 örneğin *Wolbachia* bulunduran başka bir filaria taşıyor olabileceğini belirtmişlerdir. Bu amaçla WSP genini kullanarak yaptıkları multiplex PCR ile tespit ettiği *Wolbachia* oranı %6,2'dir (Şimşek ve Çiftçi 2016). Bu çalışmada, *Wolbachia* endosimbiontu tespiti için Türkiye'de ilk defa qPCR metodu kullanılarak *D.immitis* pozitif 2 örnekte de *Wolbachia*'ya rastlanmış olup (Şekil 3.2.), negatif örneklerde *Wolbachia* tespit edilememiştir. Bu amaçla *Wolbachia ftsZ* geni kullanılarak tespit edilen *Wolbachia* oranı %1 olup Sivas ve Tokat illerinde *Wolbachia* varlığı ilk kez tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, Sarali (2009) ve Şimşek ve Çiftçi (2016)'nin sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada, qPCR metodu ile *Wolbachia*'da hedeflenen gen bölgesi (*ftsZ*) tamamen mutasyona kapalı olduğundan (Bandi ve ark 1998, Casiraghi ve ark 2001) bu metodun diğer filaria türlerine de uyarlanabileceği düşünülmektedir. Türkiye'de bugüne kadar yapılan tüm çalışmalarda *D.immitis* pozitif örneklerin tamamında *Wolbachia* bakterisi tespit edilmiştir (Sarali 2009, Şimşek ve Çiftçi 2016). Bu sonuçlar, *D.immitis* ile *Wolbachia* endosimbiontu arasındaki simbiyozu doğrulamakta fakat aralarındaki ilişki hakkında kesin bir bilgi

vermemektedir. Filarial enfeksiyonlar ve *Wolbachia* arasındaki ilişkiyi anlayabilmek için daha ayrıntılı çalışmalar yürütülmelidir. Bu sayede, *D.immitis* ve diğer filarialardaki *Wolbachia* varlığı ve/veya yokluğu ile ilgili daha net bilgiler elde edilebilir. *Wolbachia*'nın filarialarda üreme, beslenme, metabolizma üzerine etkileri ve filarial enfeksiyonların immuno-patogenezindeki rolü belirlenebilir. Elde edilecek bu bilgiler sayesinde *D.immitis* tedavisi öncesinde anti-Wolbachial ilaç kullanımı ile ortaya çıkan embriyogenez bloğu (dejenere embriyolar), larvalarda büyüme kusurları, parazitlerin kendiliğinden ölümü ve/veya sterilizasyonu beklenebilir. Ayrıca hayvanlarda belirli aralıklarla yapılan rutin taramalar sayesinde enfeksiyon ilerlemeden etken teşhis edilerek, tedavi ve kontrol stratejileri belirlenebilir ve bu sayede de tedavi sonrası oluşabilecek komplikasyonlar azaltılabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dirofilaria immitis'in neden olduğu pulmono-arteriyal dirofilariasis, köpeklerde ciddi hastalık tablosuna neden olan ve vektör sivrisinekler ile dünyanın her yerine yayılabilen, en önemli zoonoz hastalıklardan biri olarak görülmektedir. *D.immitis* ile enfekte köpeklerin tetrasiklin grubu antibiyotiklerle tedavisini takiben ortaya çıkan birtakım etkiler nedeniyle parazit ile *Wolbachia* bakterisi arasında karşılıklı simbiyoz olduğu ve bakterinin aslında üreme paraziti olarak etki gösterdiği düşünülmektedir. *Wolbachia*, genellikle filarial nematodların endosimbiyotik ortakları olarak adlandırılrsa da nematodlar açısından biyolojik önemi hala tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışma *D.immitis* ve *Wolbachia* endosimbiyontunun araştırılmasında Türkiye'de yapılan ilk qPCR çalışmasıdır. Çalışmada elde edilen sonuçlar ile, Sivas ilinde *D.immitis*'in çok yaygın olmamasına karşın varlığını sürdürdüğü belirlenmiş, Tokat ilinde *D.immitis* ve her iki ilde de *Wolbachia* endosimbiyontu ilk kez tespit edilmiştir. Ayrıca bu sonuçlar, *D.immitis*'in tespitinde qPCR metodunun mikroskopik metotlara göre çok daha hassas ve spesifik olduğunu göstermekte, mikroskopinin subjektif sonuçlarına karşı objektif ve kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Çalışma sonucunda köpeklerde *D. immitis*'in tespitinde qPCR metodunun çok düşük parazitemiyi dahi tespit edebilecek hassasiyete sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma sonucunda düşük prevalans oranları gözlenmesinin nedenlerinin; değişen iklim koşulları, yağış miktarının azalması, kuraklık, akarsulara yapılan ıslah çalışmaları, sivrisinek mücadeleleri, vektör sivrisineklerin bölgedeki dağılımı, sahipsiz köpeklere düzensiz antiparaziter uygulamalar ve diğer ilaç uygulamalarının yapılması gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Değişen iklim koşulları karşısında vektör kaynaklı enfeksiyonların epidemiyolojilerinin ve bunun öneminin daha iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, *D.immitis* ile *Wolbachia* endosimbiyontu arasındaki simbiyozu doğrulamakta fakat aralarındaki ilişki hakkında kesin bir bilgi vermemektedir. Bu ilişkiyi anlayabilmek için *D.immitis* ve diğer filarialar hakkında daha ayrıntılı çalışmalar yürütülmelidir. Bu amaçla *Wolbachia*'da tamamen mutasyona kapalı *ftsZ* hedef gen bölgesi kullanılarak diğer filaria türlerinin de qPCR metodu ile araştırılabileceği düşünülmektedir. Bu

sayede *Wolbachia*'nın, *D.immitis*'te varlığı/yokluğu, üreme, beslenme ve metabolizma üzerine etkileri ve *D.immitis* dahil filarial hastalıkların immuno-patogenezindeki rolü belirlenebilir. Elde edilecek bu bilgiler sayesinde, enfeksiyon ilerlemeden etken teşhis edilebilir, en az komplikasyona sahip tedavi protokolleri belirlenerek hayvanlar genel sağlık durumları bozulmadan tedavi edilebilir. Sonuçta sağlıklı köpekler artık rezervuar görevi görmeyeceği için *D.immitis* kaynaklı dirofilariasis enfeksiyonlarının zoonoz öneminin de azalacağı düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abraham D, 1988. Biology of *Dirofilaria immitis*. In: *Dirofilariasis*, Eds: Boreham PFL, Atwell RB. USA: CRC Press, p. 30-46.
- Abramowsky CR, Powers KG, Aikawa M, Swinehart G, 1981. *Dirofilaria immitis*. 5th Immunopathology of filarial nephropathy in dogs. Am J Pathol, 104, 1-12.
- Adanır R, Sezer K, Köse O, 2013. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs with different breed, ages and sex. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 60, 241-4.
- Afonina IA, Reed MW, Lusby E, Shishkina IG, Belousov YS, 2002. Minor Groove Binder-Conjugated DNA Probes for Quantitative DNA Detection by Hybridization-Triggered Fluorescence. BioTechniques, 32, 940-9.
- Ağaoğlu Z, Akgül Y, Ceylan E, Akkan H, 2000. Van yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in yaygınlığı. YYÜ Vet Fak Derg, 11 (2), 41-3.
- Akner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F, 2016. Spread of the Invasive Mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the Black Sea Region Increases Risk of Chikungunya, Dengue, and Zika Outbreaks in Europe. PLoS Negl Trop Dis, 10, e0004664. doi: 10.1371/journal.pntd.0004664.
- Aldemir A, Erdem F, Demirci B, Bedir H, Koç E. Species composition and seasonal dynamics of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in Kars Plateau and six new records for Turkey. Proceedings of the 5th International Congress of Vector Ecology, s. 138, 2009, Türkiye.
- Alho AM, Marcelino I, Colella V, Flanagan C, Silva N, Correia JJ, Latrofa MS, Otranto D, Madeira de Carvalho L, 2017. *Dirofilaria immitis* in pinnipeds and a new host record. Parasites Vectors, 10, 142-8. doi:10.1186/s13071-017-2073-0.
- Altas MG, Ipek DN, Sevgili M, ve ark, 2013. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* infection in stray dogs from Sanliurfa in Turkey. Vet Res, 6, 48-53.
- American Heartworm Society, 2020. Prevention, diagnosis and management of Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. American Heartworm Society Canine Guidelines. Erişim tarihi 2020. Erişim adresi, https://d3ft8sckhnqim2.cloudfront.net/images/pdf/2020_AHS_Canine_Guidelines.pdf?1580934824
- Anderson RC, 2000. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. İkinci baskı, NY: CABI Publishing. p. 467-509.
- Angelou A, Gelasakis AI, Verde N ve ark, 2019. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. Parasit Vectors, 12, 283. doi: 10.1186/s13071-019-3543-3.
- Anvari D, Narouei E, Daryani A, Sarvi S, Moosazadeh M, Hezarjaribi HZ, Narouei MR, Gholami S, 2020. The global status of *Dirofilaria immitis* in dogs: a systematic review and meta-analysis based on published articles, Res Vet Sci, 131, 104-16. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.04.002.
- Anvari D, Saadati D, Siyadatpanah A, Gholami S, 2019. Prevalence of dirofilariasis in shepherd and stray dogs in iranshahr, southeast of Iran. J Parasit Dis, 43, 319-23. doi: 10.1007/s12639-019-01096-5.
- Aroch I, Rojas A, Slon P, Lavy E, Segev G, Baneth G, 2015. Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. Vet Parasitol, 211(3-4), 303-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.06.010.
- Aslan Çelik B, Çelik OY, Şahin T ve ark, 2020. A serological survey of dirofilariosis, leishmaniasis, ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs in Siirt province. FU Vet J Health Sci, 34, 103-8.
- Ataş AD, Altay K, Alim A, Özkan E, 2018. Survey of *Dirofilaria immitis* in dogs from Sivas Province in the Central Anatolia Region of Turkey. Turk J Vet Anim Sci, 42, 130-4. doi: 10.3906/vet-1707-93.

- Ataş AD, Özçelik S, Saygı G, 1997. Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri. Bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. Türkiye Parazitoloji dergisi, 21 (3), 305-9.
- Atkins CE, 2003. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. J Am Vet Med Assoc, 222 (9), 1221-3. doi: 10.2460/javma.2003.222.1221.
- Atwell RB, 1988. Clinical signs and diagnosis of canine *Dirofilariasis*. In: *Dirofilariasis*, Eds: Boreham PFL & Atwell RB. USA: CRC Press, p. 62-81.
- Atwell RB, Tarish JH. The effect of oral, low-dose prednisolone on the extent of pulmonary pathology associated with dead *Dirofilaria immitis* in a canine lung model. Proceedings of the Heartworm Symposium '95, p.103-11, 1995, Auburn, AL, USA.
- Aykur M, Yağcı A, Simşek S ve ark, 2021. First time identification of subconjunctival *Dirofilaria immitis* in Turkey: giant episcleral granuloma mimicking scleritis. Parasitol Res, 120, 3909–14. doi: 10.1007/s00436-021-07317-2.
- Ayvazoglu C, Akyüz E, Ogun M, Demir Ayvazoglu P, Kızıltepe S, 2022. Investigation of the Prevalence of *Dirofilaria immitis* in Dogs in Ardahan Region. International Journal of Veterinary and Animal Research, 5 (2), 50-3.
- Bain O, Casiraghi M, Martin C, Uni S, 2008. The Nematoda Filarioidea: critical analysis linking molecular and traditional approaches. Parasite, 15, 342–8. doi: 10.1051/parasite/2008153342.
- Baldini F, Segata N, Pompon J, Marcenac P, Shaw WR, Dabiré RK, Diabaté A, Levashina EA, Catteruccia F, 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. Nat Commun, 5, 1–7.
- Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH, 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Appl Environ Microbiol, 72, 7098–110. doi: 10.1128/AEM.00731-06.
- Balıkçı E, Sevgili M, 2005. Elazığ ve çevresindeki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in Seroprevalansı. FÜ Sağlık Bil Dergisi, 19 (2), 103-6.
- Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML, 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. Proc Biol Sci, 265, 2407–13. doi: 10.1098/rspb.1998.0591.
- Bandi C, McCall JW, Genchi C, Corona S, Venco L, Sacchi L, 1999. Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. Int J Parasitol, 29, 357-64. doi:10.1016/S0020-7519(98)00200-8.
- Bandi C, Trees A, Brattig NW, 2001. *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. Vet Parasitol, 98, 215-38. doi:10.1016/S0304-4017(01)00432-0.
- Barriga OO, 1982. *Dirofilariasis*, In: Handbook series in zoonoses. Eds: Steele JH, Schultz MG. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, p. 93–110.
- Başer DF, Civelek T, Tunç AC, Acar A, 2023. Prevalence of *Dirofilariasis*, Lyme, Anaplasmosis, and Ehrlichiosis in Dogs in Afyonkarahisar Province. Kocatepe Vet J, 16 (3), 393-400.
- Bawm S, Khaing Y, Chel HM, Hmoon MM, Win SY, Bo M, Naing T, Htun LL, 2023. Molecular detection of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbionts in dogs from Myanmar, Curr Res Parasitol Vector Borne Dis, Vol 4, 100148. doi: 10.1016/j.crvbd.2023.100148.
- Bazzocchi C, Genchi C, Paltrinieri S, Lecchi C, Mortarino M, Bandi C, 2003. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria immitis*: the *Wolbachia* surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. Vet Parasitol, 117, 73–83.
- Bazzocchi C, Mortarino M, Grandi G, Kramer LH, Genchi C, Bandi C, Genchi M, Sacchi L, McCall JW, 2008. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria immitis* in experimentally infected dogs. Int J Parasitol, 38, 1401-10. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.002.

- Beam FD, 1966. Mortality of *Aedes sollicitans* Walker due to a high microfilaremia of dog heartworm, *Dirofilaria immitis* Leidy. Proc NJ Mosq Exterm Assoc, 117-26.
- Becker A, Reith A, Napiwotzki J, Kadenbach B, 1996. A quantitative method of determining initial amounts of DNA by polymerase chain reaction cycle titration using digital imaging and a novel DNA stain. Anal Biochem, 237, 204–7.
- Becker S, Franco JR, Simarro PP, Stich A, Abel PM, Steverding D, 2004. Real-time PCR for detection of *Trypanosoma brucei* in human blood samples. Diagn Microbiol Infect Dis, 50, 193–9.
- Bertozzi M, Rinaldi VE, Prestipino M, Giovenali P, Appignani A, 2015. *Dirofilaria immitis* mimicking an acute scrotum. Pediatr Emerg Care, 31, 715–6. doi: 10.1097/pec.0000000000000346.
- Bilge FH, Kadipaşaoğlu KA, McCormick CM, Baier RE, 1989. Surface characterization of the cuticle of *Dirofilaria immitis*. J Biomed Mater Res, 23, 1027–47. doi: 10.1002/jbm.820230905
- Birago F, 1626. Trattato Cinegetico overo della Caccia. Milan, V Sfondreato, 77.
- Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, 2011. Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. Erciyes Üniv Vet Fak Derg, 8 (1), 43-51.
- Bolio-Gonzalez ME, Rodriguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH, Gutierrez-Blanco E, Ortega-Pacheco A, Colin-Flores RF, 2007. Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan. Mexico. Vet Parasitol, 148, 166–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.05.019.
- Bordenstein S, Rosengaus RB, 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. Curr Microbiol, 51, 393–8.
- Bordenstein SR, Fitch DH, Werren JH, 2003. Absence of *Wolbachia* in nonfilariid nematodes. J Nematol, 35, 266–70.
- Bordenstein SR, Paraskevopoulos C, Dunning Hotopp JC, Sapountzis P, Lo N, Bandi C, Tettelin H, Werren JH, Bourtzis K, 2009. Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. Mol Biol Evol, 26, 231-41.
- Boswood A, 2009. Biomarkers in cardiovascular disease: Beyond natriuretic peptides. J Vet Cardiol, 11, 23–32. doi: 10.1016/j.jvc.2009.01.003.
- Bowman DD, Atkins CE, 2009. Heartworm biology, treatment, and control. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 39 (6), 1127–58.
- Bowman DD, Mannella C, 2011. Macrocyclic lactones and *Dirofilaria immitis* microfilariae. Top Companion Anim Med, 26 (4), 160-72. doi: 10.1053/j.tcam.2011.07.001.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL, 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. J Bacteriol, 180, 2373–8. doi: 10.1128/JB.180.9.2373-2378.1998.
- Brattig NW, Lepping B, Timmann C, Büttner DW, Marfo Y, Hamelmann C, Horstmann RD, 2002. *Onchocerca volvulus*–exposed persons fail to produce Interferon- γ in response to *O. volvulus* antigen but mount proliferative responses with Interleukin-5 and IL-13 production that decrease with increasing microfilarial density. J Infect Dis, 185, 1148-54. doi: 10.1086/339820.
- Brooks DR, Hoberg EP, 2007. How will global climate change affect parasite-host assemblages? Trends Parasitol, 23 (12), 571-4. doi: 10.1016/j.pt.2007.08.016.
- Burgu A, Şahal M, Yıldırım A, Gazyağcı S, Adanır R, Gürcan S, 2004. *Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerde mikrofiller periodisitesinin kantitatif analizi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 51, 117-25.
- Caballero Méndez LC, Gómez Domínguez M, Franco García AD, Mazo MM, Santisteban Arenas RR, Franco-Montoya LN, 2024. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in canines from animal shelters in the Colombian coffee region (Eje Cafetero). Vet stanica, 55 (3), 279-88. doi: 10.46419/vs.55.3.4.
- Cai D, Tian B, Liu Y, Rehman MU, Ranucci D, Veronesi F, Varcasia A, Jia W, Liu J, 2023. The seroprevalence of canine dirofilariasis in dogs in the eastern coastal areas of China. Heliyon, 9, e17009. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17009.

- Carlisle CH, 1988. Radiology of Heartworm Disease. In: *Dirofilariasis*, Eds: Boreham PFL, Atwell RB. Birinci Baskı, USA, CRC Press, p.84-97.
- Carreton E, Grandi G, Morchon R, Simón F, Passeri B, Cantoni AM, Kramer L, Montoya-Alonso JA, 2012. Myocardial damage in dogs affected by heartworm disease (*Dirofilaria immitis*): immunohistochemical study of cardiac myoglobin and troponin I in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 189 (2-4), 390–3. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.013
- Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C, 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology*, 122, 93–103. doi: 10.1017/S0031182000007149.
- Casiraghi M, Bain O, Guerrero R, Martin C, Pocacqua V, Gardner SL, Franceschi A, Bandi C, 2004. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *Int J Parasitol*, 34, 191–203. doi: 10.1016/j.ijpara.2003.10.004.
- Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M, Ottina E, Genchi C, 2006. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet Parasitol*, 141 (3-4), 368–72. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.06.006.
- Casiraghi M, Bordenstein S, Baldo L, Lo N, Beninati T, Wernegreen J, Werren J, Bandi C, 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151, 4015–22. doi: 10.1099/mic.0.28313-0.
- Ceylan O, Uslu A, Öztürk Ö, Sevinç F, 2021. Serological investigation of some vector-borne parasitic and rickettsial agents in dogs in the western part of Turkey. *Pak Vet J*, 41 (3), 386-92. doi: 10.29261/pakvetj/2021.052.
- Ceylan O. Seroprevalence of vector-borne rickettsial and parasitic agents in dogs in Kocaeli province of Turkey. *Proc 'IV. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress'*, p. 80, 30–1 October 2020, Konya, Turkey.
- Chandrashekar R, Beall MJ, Saucier J, O'Connor T, McCall JW, McCall SD, 2014. Experimental *Dirofilaria immitis* infection in dogs: effects of doxycycline and Advantage Multi(R) administration on immature adult parasites. *Vet Parasitol*, 206, 93–8.
- Chen X, Kwok PY, 1999. Homogeneous genotyping assays for single nucleotide polymorphisms with fluorescence resonance energy transfer detection, *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 14, 157-63. doi: 10.1016/S1050-3862(98)00016-3.
- Civelek T, Yıldırım A, İça A, 2006. Bursa ili Gemlik yöresi köpeklerde kalp kurdu hastalığının prevalansı. *Vet Bil Derg*, 22, 65-8.
- Collins GH, Griffin DL, Pope SE, 1987. Evaluation of a latex agglutination test for the diagnosis of infection with *Dirofilaria immitis* in dogs. *Aust Vet J*, 64 (10), 317–8. doi: 10.1111/j.1751-0813.1987.tb07341.x.
- Collinson PO, 2003. Multicentre evaluation of the diagnostic value of cardiac troponin T, CK-MB mass, and myoglobin for assessing patients with suspected acute coronary syndromes in routine clinical practice. *Heart*, 89, 280-6. doi:10.1136/heart.89.3.280.
- Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D, 2011. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol*, 182, 14–21. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.012.
- Cooper PJ, Mancero T, Espinel M, Sandoval C, Lovato R, Guderian RH, Nutman TB, 2001. Early human infection with *Onchocerca volvulus* is associated with an enhanced parasite-specific cellular immune response. *J Infect Dis*, 183, 1662–8.
- Courtney CH, Cornell JA, 1990. Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests. *J Am Vet Med Assoc*, 197, 724-9.
- Courtney CH, Zeng QY, 2001. Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Vet Parasitol*, 96 (4), 317–22. doi:10.1016/s0304-4017(01)00374-0.
- Czarnetzki AB, Tebbe CC, 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environ Microbiol*, 6, 35–44.

- Çakıroğlu D, Meral Y, 2007. Samsun bölgesinde, köpeklerde *Dirofilaria immitis* enfestasyonu insidansı incelenmesi. JIVS, 2, 1-12.
- Çetinkaya H, Akyazı İ, Özkurt M, Matur E, 2016. The serologic and molecular prevalence of heartworm disease in shelter dogs in the thrace region of Turkey. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 22, 751-5.
- Darby AC, Armstrong SD, Bah GS ve ark 2012. Analysis of gene expression from the *Wolbachia* genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. Genome Res, 22 (12), 2467–77. doi: 10.1242/bio.2012737.
- Demir A, Aktaş MS, 2020. Investigation of seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma* spp in dogs in Erzurum province. FU Sag Bilim Vet Derg, 34, 91-6.
- Desai RS, Pai N, Nehete AP, Singh JS, 2015. Oral Dirofilariasis. Indian J Med Microbiol, 33, 593-4. doi: 10.4103/0255-0857.167342.
- Diakou A, Kapantaidakis E, Tamvakis A, Giannakis V, Strus N, 2016. Dirofilaria infections in dogs in different areas of Greece. Parasites Vectors, 9, 508-14. doi: 10.1186/s13071-016-1797-6.
- Dik B, 2015. Veteriner Entomoloji. İkinci baskı, Konya, s. 101-11.
- Dik B, Başoğlu A, Kaya M, 1992. Köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in sağtımında levamisol ve ivermektin'in etkileri. SÜ Vet Fak Derg, 8 (2), 48–50.
- Dillon AR, Blagburn BL, Tillson M, Brawner W, Welles B, Johnson C, Cattlet R, Rynders P, Barney S, 2017. Heartworm-associated respiratory disease (HARD) induced by immature adult *Dirofilaria immitis* in cats. Parasit Vectors, 10 (2), 514-29. doi: 10.1186/s13071-017-2452-6.
- Dillon AR, Brawner WR, Hanrahan L. Influence of number of parasites and exercise on the severity of heartworm disease in dogs. Proceedings of the Heartworm Symposium'95. p. 113, 1995, Auburn, AL, USA.
- Dittmar K, Whiting MF, 2004. New *Wolbachia* endosymbionts from nearctic and neotropical fleas (Siphonaptera). J Parasitol, 90, 953–7.
- Drake J, Gruntmeir J, Merritt H, Allen L, Little SE, 2015. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. Parasites Vectors, 8, 68-72. doi: 10.1186/s13071-015-0698-4.
- Duran-Struuck R, Jost C, Hernandez AH, 2005. *Dirofilaria immitis* prevalence in a canine population in the Samana Peninsula (Dominican Republic)-June 2001. Vet Parasitol, 133, 323-7.
- Ertekin B, 2017. İzmir hayvan barınaklarındaki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in prevalansı. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Evason M, Stull JW, Pearl DL ve ark, 2019. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Dirofilaria immitis* in Canadian dogs, 2008 to 2015: a repeat cross-sectional study. Parasit Vectors, 12, 64. doi: 10.1186/s13071-019-3299-9.
- 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, 113-20.
- Feng TH, Chou CC, Yeh TM, Su YC, Lu YP, Shih WL, Chiang CH, Chang CD, Liu SS, Wu HY, Huang HH, Liao MH, 2015. Molecular prevalence of zoonotic pathogens in pet and stray dogs in southern Taiwan. Wetchasan Sattawaphaet. 45, 509–21.
- Fenn K, Blaxter M, 2004. Quantification of *Wolbachia* bacteria in *Brugia malayi* through the nematode lifecycle. Mol Biochem Parasitol, 137, 361–4.
- Fenn K, Blaxter M, 2006. *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. Trends Parasitol, 22, 60-5.
- Fenollar F, La Scola B, Inokuma H, Dumler JS, Taylor MJ, Raoult D, 2003. Culture and phenotypic characterization of a *Wolbachia pipientis* isolate. J Clin Microbiol, 41, 5434–41.

- Ferreira C, Afonso A, Calado M, Maurício I, Alho AM, Meireles J, Madeira de Carvalho L, Belo S, 2017. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasites Vectors*, 10 (1), 250-7. doi:10.1186/s13071-017-2180-y.
- Ferri E, Bain O, Barbuto M, Martin C, Lo N, Uni S, Landmann F, Baccei SG, Guerrero R, de Souza Lima S, 2011. New insights into the evolution of *Wolbachia* infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS ONE*, 6, e20843. doi: 10.1371/journal.pone.0020843.
- Fischer K, Beatty WL, Jiang D, Weil GJ, Fischer PU, 2011. Tissue and stagespecific distribution of *Wolbachia* in *Brugia malayi*. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1174.
- Fleck R, Kurz W, Quade B, Geginat G, Hof H, 2009. Human *Dirofilariasis* due to *Dirofilaria repens* mimicking a scrotal tumor. *Urology*, 73, 209.e1–e3. doi: 10.1016/j.urology.2008.02.015.
- Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol*, 3, e121. doi: 10.1371/journal.pbio.0030121.
- Foster WA, Walker ED, 2019. Mosquitoes (Culicidae). In: *Medical and Veterinary Entomology*, Eds: Mullen GR, Durden LA. Üçüncü baskı, UK, Academic Press. p. 261–325. doi: 10.1016/b978-0-12-814043-7.00015-7.
- Fukami N, Hagio M, Okano S, Watanabe S. Influence of exercise on recovery of dogs following heartworm adulticide treatment with melarsomine. *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'98*. p. 225-7, 1998, Tampa, FL, USA.
- Furtado AP, Do Carmo ES, Giese EG, Vallinoto ACR, Lanfredi RM, Santos JN, 2009. Detection of dog filariasis in Marajo Island, Brazil by classical and molecular methods. *Parasitol Res*, 105, 1509–15. doi: 10.1007/s00436-009-1584-9.
- Gasser RB, 2006. Molecular tools-advances, opportunities, and prospects. *Vet Parasitol*, 136, 2, 69-89.
- Genchi C, Kramer LH, Rivasi F, 2011. *Dirofilarial* Infections in Europe. *Vector-Borne Zoonot*, 11, 1307–17. doi:10.1089/vbz.2010.0247.
- Genchi M, Vismarra A, Lucchetti C, Viglietti A, Crosara S, Gnudi G, Quintavalla C, Schaper R, Kramer L, 2019. Efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% spot on (Advocate®, Advantage Multi®) and doxycycline for the treatment of natural *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *Vet Parasitol*, 273, 11–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.07.011.
- Głowska E, Dragun-Damian A, Dabert M, Gerth M, 2015. New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Syringophilidae). *Infect Genet Evol*, 30, 140–6. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.019.
- Gomes-de-Sá S, Santos-Silva S, Moreira A ve ark, 2022. *Dirofilaria immitis* antigenemia and microfilaremia in Iberian wolves and red foxes from Portugal. *Parasit Vectors*, 15, 119. doi: 10.1186/s13071-022-05170-5.
- Gowrishankar S, Aravind M, Sastya S, Latha BR, Azhahianambi P, Vairamuthu S, Jayanthi C, 2019. *Dirofilaria hongkongensis* – A first report of potential zoonotic dirofilariasis infection in dogs from Tamil Nadu. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100326. doi:10.1016/j.vprsr.2019.100326.
- Grandi G, Quintavalla C, Mavropoulou A, Genchi M, Gnudi G, Bertoni G, Kramer L, 2010. A combination of doxycycline and ivermectin is adulticidal in dogs with naturally acquired heartworm disease (*Dirofilaria immitis*). *Vet Parasitol*, 169, 347-51. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.025.
- Grieve RB, Lok JB, Glickman LT, 1983. Epidemiology of canine heartworm infection. *Epidemiol Rev*, 5, 220-46.
- Güçlü F, 2006. Parazitolojik Teşhis Metotları. Birinci baskı, Konya, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, s. 30-2.
- Günay F, 2015. Türkiye sivrisinek faunası üzerine DNA Barkodlama yöntemiyle moleküler analizler. *Hacettepe Üniversitesi*, s. 144.

- Güralp N, 1981. Helminloloji. İkinci baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
- Güven E, Avcioğlu H, Cengiz S, Hayırlı A, 2017. Vector-Borne pathogens in stray dogs in Northeastern Turkey. Vector Borne Zoonotic Dis, 17, 610-7. doi: 10.1089/vbz.2017.2128.
- Güven Gökmen T, Günaydın E, Turut N, Akın B, Koç O, Ütük AE, 2019. A Serosurvey on Some Canine Vector-borne Zoonoses (*Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis* and *Leishmania* spp.) in Osmaniye. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 14 (2), 151-8. doi: 10.17094/ataunivbd.580250.
- Harada R, Maeda T, Nakashima A, Sadakata M, Anso M, Yonomine K, Otsuji Y, Sato H, 1970. Electron microscopical studies on the mechanism of oogenesis and fertilization in *Dirofilaria immitis*. In: Recent Advances in Researches on Filariasis and Schistosomiasis in Japan. Ed: Sasa M. Baltimore, MD: University Park Press, p. 99–121.
- Harbach R, 2020. Mosquito Taxonomic Inventory. Erişim tarihi 3 Şubat 2020. Erişim adresi, <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/valid-species-list>
- Hawking F, 1967. The 24-hour periodicity of microfilariae: biological mechanisms responsible for its production and control. Proc Roy Soc B, 169, 59-76.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM, 1996. Real time quantitative PCR. Genome Res, 6 (10), 986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986.
- Hertig M, 1936. The Rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions of the mosquito, *Culex pipiens*. Parasitology 28, 453–86.
- Hertig M, Wolbach SB, 1924. Studies on Rickettsia-like microorganisms in insect. J Med Res, 44, 329-74.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R, 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (NY), 11, 1026–30.
- Hise AG, Ferguson IG, Pearlman E, 2004. The role endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. Cel Microbiol, 6 (2), 97-104. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00350.x.
- Hodges S, Rishniw M, 2008. Intraarticular *Dirofilaria immitis* microfilariae in two dogs. Vet Parasitol, 152, 167-70. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.11.018.
- Hoerauf A, Mand S, Adjei O, Fleischer B, Büttner DW, 2001. Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. Lancet, 357, 1415–6.
- Hoerauf A, Mand S, Volkmann L ve ark, 2003. Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of *Wolbachia* endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. Microbes Infect, 5, 261–73.
- 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. Lancet, 355, 1242–3.
- Hou H, Cao L, Ren W, Wang D, Ding H, You J, Yao X, Dong H, Guo Y, Yuan S, Zhang X, Gong P, 2017. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in Cats from Liaoning Province, Northeastern China. Korean J Parasitol, 55, 673-7. doi: 10.3347/kjp.2017.55.6.673.
- Ionica AM, Matei IA, Mircean V, Dumitrache MO, D'Amico G, Gyorke A, Pantchev N, Annoscia G, Albrechtova K, Otranto D, Modry D, Mihalca AD, 2015. Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. and *Acanthocheilonema reconditum* infections in dogs in Romania. Parasitol Res, 114, 975–82. doi: 10.1007/s00436-014-4263-4.
- İçen H, Sekin S, Şimşek A, Koçhan A, Çelik OY, Altaş MG, 2011. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* infection in dogs from Diyarbakır in Turkey. Asian J Anim Vet Advances, 6, 371-8. doi: 10.3923/ajava.2011.371.378.
- James MT, Harwood RF, 1969. Herms's Medical Entomology. 6th edition. New York: Macmillan Publishing Co Inc.

- Jamshidi A, Jamshidi M, Mobedi I, Khosroara M, 2008. Periocular Dirofilariasis in a young woman: a case report. *Korean J Parasitol*, 46, 265-7. doi: 10.3347/kjp.2008.46.4.265
- Janardhanan M, Rakesh S, Savithri V, 2014. Oral dirofilariasis. *Indian J Dent Res*, 25 (2), 236-9. doi: 10.4103/0970-9290.135932.
- Jeyaprakash A, Hoy MA, 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 9, 393–405.
- Jimenez IA, Mariño PAV, Stapleton GS, Prieto JB, Bowman DD, 2020. Canine vector-borne disease in domestic dogs on Isla Santa Cruz, Galápagos. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100373. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100373.
- Kadıpaşaoğlu AK, Bilge FH, 1989. Partial characterization of the adsorbed protein layer on *Dirofilaria immitis* (Nematoda) cuticle. *Parasitol Res*, 75, 554–8.
- Kalkstein TS, Kaiser L, Kaneene JB, 2000. Prevalence of heartworm infection in healthy cats in the lower peninsula of Michigan. *J Am Vet Med Assoc* 217 (6), 857-61. doi: 10.2460/javma.2000.217.857.
- Kamyngkird K, Junsiri W, Chimnoi W, Kengradomkij C, Saengow S, Sangchuto K, Kajeerum W, Pangjai D, Nimsuphan B, Inpankeaw T, Jittapalaponga S, 2017. Prevalence and risk factors associated with *Dirofilaria immitis* infection in dogs and cats in Songkhla and Satun provinces, Thailand. *Agric Natural Res*, 51, 299-302.
- Keister DM, Dzimianski MT, McTier TL ve ark. Dose selection and confirmation of RM 340, a new filaricid for the treatment of dogs with immature and mature *Dirofilaria immitis*. *Proceedings of the Heartworm Symposium'92*. p. 225-9, 1992, Austin, TX, USA.
- Kellihan HB, Stepien RL, 2010. Pulmonary hypertension in dogs: diagnosis and therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40 (4), 623–41. doi: 10.1016 / j.cvsm.2010.03.011.
- Khedri J, Radfar MH, Borji H, Azizzadeh M, Akhtardanesh B, 2014. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with review of disease distribution. *Iranian J Parasitol*, 9, 560-7.
- Kim MK, Kim CH, Yeom BW, Park SH, Choi SY, Choi JS, 2002. The first human case of hepatic Dirofilariasis. *J Korean Med Sci*, 17, 686-90. doi: 10.3346/jkms.2002.17.5.686.
- Kokkinos P, Dimzas D, Pantchev N, Tamvakis A, Balzer J, Diakou A, 2019. Filarial infections in dogs in Cyprus, an apparently heartworm free island. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100330. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100330.
- Kotwa JD, Jardine CM, Berke O, Pearl DL, Mercer NJ, Peregrine AS, 2019. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* infection in wild canids in southern Ontario. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100349.
- Koutsovoulos G, Makepeace B, Tanya VN, Blaxter M, 2014. Palaeosymbiosis revealed by genomic fossils of *Wolbachia* in a strongyloidean nematode. *PLoS Genet*, 10, e1004397.
- Kozek WJ, 1967. The ultrastructure of the microfilaria of *Dirofilaria immitis*. M.S. thesis, Tulane University.
- Kozek WJ, 1977. Transovarially-transmitted intracellular microorganisms in adult and larval stages of *Brugia malayi*. *J Parasitol*, 63, 992–1000.
- Kozek WJ, 2005. What is new in the *Wolbachia*/*Dirofilaria* interaction? *Vet Parasitol*, 133, 127–32. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.02.005.
- Kozek WJ, Figueroa MH, 1977. Intracytoplasmic bacteria in *Onchocerca volvulus*. *Am J Trop Med Hyg*, 26, 663–78.
- Köse M, Erdoğan M, 2012. Serological screening of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infections in Turkey. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 125 (11-12), 503-8. doi: 10.2376/0005-9366-125-503.
- Kramer L, Grandi G, Leoni M, Passeri B, McCall J, Genchi C, Mortarino M, Bazzocchi C, 2008. *Wolbachia* and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet Parasitol*, 10, 158 (3), 191-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.014.

- Kramer L, Grandi G, Passeri B, Gianelli P, Genchi M, Dzimirski MT, Supakorndej P, Mansour AM, SD, McCall JW, 2011. Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Vet Parasitol*, 176, 357–60. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.021.
- Kramer L, Simón F, Tamarozzi F, Gechi M, Bazzocchi C, 2005a. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet Parasitol*, 133, 133–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.011.
- Kramer LH, Tamarozzi F, Morchón R, López-Belmonte J, Marcos-Atxutegi C, Martín-Pacho R, Simón F, 2005b. Immune response to and tissue localization of the *Wolbachia* surface protein (WSP) in dogs with natural heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 106, 303–8. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.03.011.
- Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F, 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog*, 5, e1000630.
- Küçüker S, 2016. Antalya ilinde bulunan köpeklerde Dirofilariasis, Borreliosis, Ehrlichiosis ve Anaplazmozis'in hızlı test kitleri ile teşhisi ve insidansı üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Labarthe N, Guerrero J, 2005. Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico? *Vet Parasitol*, 133, 149–56. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.04.006.
- Laidoudi Y, Davoust B, Varloud M, Niang EHA, Fenollar F, Mediannikov O, 2020. Development of a multiplex qPCR-based approach for the diagnosis of *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *Acanthocheilonema reconditum*. *Parasites Vectors*, 13 (1), 319–33. doi: 10.1186/s13071-020-04185-0.
- Landmann F, Foster JM, Slatko B, Sullivan W, 2010. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. *PLoS Negl Trop Dis*, 4, e758.
- Landum M, Ferreira CC, Calado M, Alho AM, Maurício IL, Meireles JS ve ark 2014. Detection of *Wolbachia* in *Dirofilaria* infected dogs in Portugal. *Vet Parasitol*, 204, 407–10.
- Latrofa M, Montarsi F, Ciocchetta S, Annoscia G, Dantas-Torres F, Ravagnan S, Capelli G, Otranto D, 2012. Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis. *Parasites Vectors*, 5 (1), 76–83. doi: 10.1186/1756-3305-5-76.
- Lee ACY, Bowman DD, Lucio-Forster A, Beall MJ, Liotta JL, Dillon R, 2011. Evaluation of a new in-clinic method for the detection of canine heartworm antigen. *Vet Parasitol*, 177(3–4), 387–91. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.050.
- Lee CC, 1975. *Dirofilaria immitis*: ultrastructural aspects of oocyte development and zygote formation. *Exp Parasitol*, 37, 449–68.
- Lefoulon E, Bain O, Makepeace BL, D'haese C, Uni S, Martin C, Gavotte, L, 2016. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. *PeerJ*, 4, e1840.
- Lefoulon E, Clark T, Guerrero R, Cañizales, I, Cardenas-Callirgos JM, Junker K, Vallarino-Lhermitte N, Makepeace BL, Darby AC, Foster JM, Martin C, Slatko BE, 2020. Diminutive, degraded but dissimilar: *Wolbachia* genomes from filarial nematodes do not conform to a single paradigm. *Microb Genom*, 6 (12), mgen000487. doi: 10.1099/mgen.0.000487.
- Leidy J, 1850. Descriptions of three filaria. *Proc Acad Nat Sci*, 5, 117–8.
- Leidy J, 1856. Worms in heart of a dog. *Proc Acad Nat Sci*, 8, 2.
- Little S, Saleh M, Wohltjen M, Nagamori Y, 2018. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasites Vectors*, 11, 186–95. doi: 10.1186/s13071-018-2736-5.

- Little SE, Munzing C, Heise SR, Allen KE, Starkey LA, Johnson EM, Meinkoth J, Reichard MV, 2014. Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Vet Parasitol*, 203 (1-2), 250–2. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.007.
- Liu C, Yang N, He J, Yang M, Sun M, 2013. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Shenyang, Northeastern China. *Korean J Parasitol*, 51, 375-7.
- Lo N, Casiraghi M, Salati E, Bazzocchi C, Bandi C, 2002. How many *Wolbachia* supergroups exist? *Mol Biol Evol*, 19, 341–6.
- Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, O'Neill SL, Werren JH, Bordenstein SR, Bandi C, 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57, 654–7.
- Logan J, Edwards K, 2009. An overview of PCR platforms. In: *Real Time PCR: Current technology and applications*. Eds: Logan J, Edwards K, Saunders N. Caister Academic Pres, p. 8.
- Lok JB, 1988. *Dirofilaria* sp.: Taxonomy and Distribution. In: *Dirofilariasis*, Eds: Boreham PFL, Atwell RB. Birinci Baskı, USA, CRC Press, p. 2-28.
- Maia C, Altet L, Serrano L, Cristovao JM, Dolores Tabar M, Francino O, Cardoso L, Campino L, Roura X, 2016. Molecular detection of *Leishmania infantum*, Filariae and *Wolbachia* spp. in dogs from southern Portugal. *Parasit Vectors*, 9. doi: 10.1186/s13071-016-1452-2.
- Mamak N, 2002. Sivas yöresindeki kangal köpeği üretim çiftliklerinde bulunan köpeklerde bazı enfeksiyöz ve paraziter hastalıkların (Leptospirozis, Listeriozis, Dirofilariasis, Barsak parazitleri) araştırılması ve sağaltımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Manfredi MT, Di Cerbo A, Genchi M, 2007. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In: *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Eds: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G. vol 8, Naples, Italy, Mapped parasitologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, p. 39-47.
- Manoj RRS, Latrofa MS, Epis S, Otranto D, 2021. *Wolbachia*: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasites Vectors*, 14, 245. doi: 10.1186/s13071-021-04742-1.
- Mantovani A, 1966. Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J Parasitol*, 52, 116. doi: 10.2307/3276400.
- Martin C, Gavotte L, 2010. The bacteria *Wolbachia* in filariae, a biological Russian dolls' system: new trends in antifilarial treatments. *Parasite*, 17, 79–89. doi: 10.1051/parasite/2010172079.
- Masui S, Sasaki T, Ishikawa H, 1997. groE-homologous operon of *Wolbachia*, an Intracellular symbiont of arthropods: a new approach for their phylogeny. *Zool Sc*, 14, 701–6. doi: 10.2108/zsj.14.701.
- Maxwell E, Ryan K, Reynolds C, Pariaut R, 2014. Outcome of a heartworm treatment protocol in dogs presenting to Louisiana State University from 2008 to 2011: 50 cases. *Vet Parasitol*, 206, 71–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.05.033.
- McCall JW, Genchi C, Kramer L, Guerrero J, Dzimianski MT, Supakorndej P, Mansour AM, McCall SD, Supakorndej N, Grandi G, Carson B, 2008a. Heartworm and *Wolbachia*: Therapeutic implications. *Vet Parasitol*, 158, 204–14. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.09.008.
- McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L, 2008b. Heartworm disease in animals and humans. In: *Advances in Parasitology*. Eds: Rollinson D, Hay SI. Birinci baskı, vol 66, New York, Academic Press, p.193-285.
- McCall JW, Guerrero J, Roberts RE, Supakorndej N, Mansour AE, Dzimianski MT, McCall SD. Further evidence of clinical prophylactic, retro-active (reach-back) and adulticidal activity of monthly administrations of ivermectin (Heartgard Plus™) in dogs experimentally infected with heartworms. *Recent Advances in Heartworm Disease: Symposium'01*. p. 189–200, 2001b. IL, USA.
- McCall JW, Hodgkins E, Varlout M, Mansour A, DiCosty U, 2017b. Blocking the transmission of heartworm (*Dirofilaria immitis*) to mosquitoes (*Aedes aegypti*) by weekly exposure for one month to microfilaremic dogs treated once topically with dinotefuran-permethrin-pyriproxyfen. *Parasites Vectors*, 10, 511-9. doi: 10.1186/s13071-017-2439-3.

- McCall JW, Kramer L, Genchi C, Guerrero J, Dzimirski MT, Supakorndej P, Mansour A, McCall SD, Supakorndej N, Grandi G, Carson B, 2011. Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Vet Parasitol*, 176, 361–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.01.022.
- McCall JW, Nonglak S, Ryan W, Soil MD. Utility of an ELISA-based antibody test for detection of heartworm infection in cats. *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*. p. 127-133, 1995, March 31-April 2. Batavia, IL, USA.
- McCall JW, Supakorndej BS, Donoghue AR, Turnbull RK. Evaluation of the performance of canine heartworm antigen test kits licensed for use by veterinarians and canine heartworm antigen tests conducted by diagnostic laboratories. *Recent Advances in Heartworm Disease Symposium '01*, p. 135–40, 2001a, Batavia, IL, USA.
- McCall JW, Varlout M, Hodgkins E, Mansour A, DiCosty U, McCall S, Carmichael J, Carson B, Carter J, 2017a. Shifting the paradigm in *Dirofilaria immitis* prevention: blocking transmission from mosquitoes to dogs using repellents/insecticides and macrocyclic lactone prevention as part of a multimodal approach. *Parasites Vectors*, 10, 525-35. doi: 10.1186/s13071-017-2438-4.
- McGarry H, Egerton G, Taylor M, 2004. Population dynamics of *Wolbachia* bacterial endosymbionts in *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol*, 135, 57–67.
- McLaren DJ, Worms MJ, Laurence BR, Simpson MG, 1975. Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 69, 509-14.
- McNulty S, Foster J, Mitreva M et al 2010. Endosymbiont DNA in endobacteria-free filarial nematodes indicates ancient horizontal genetic transfer. *PLoS ONE*, 5, e11029.
- McTier TL, Supakorndej N, McCall JW, Dzimirski MT. Evaluation of ELISA-based adult heartworm antigen test kits. *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*. 1995 March 31-April 2, Batavia, IL, USA.
- Merçot H, Poinot D, 2009. Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *C R Biol*, 332, 284-97. doi: 10.1016/j.crv.2008.09.010.
- Montoya JA, Morales M, Ferrer O, Molina JM, Corbera JA, 1998. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994- 1996). *Vet Parasitol*, 75, 221-6.
- Montoya-Alonso JA, Carretón E, Morchón R, Silveira-Viera L, Falcón Y, Simón F, 2016. The impact of the climate on the epidemiology of *Dirofilaria immitis* in the pet population of the Canary Islands, *Vet Parasitol*, 216, 66-71. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.12.005.
- Morchón R, Carretón E, Grandi G, González-Miguel J, Montoya-Alonso JA, Simón F, et al, 2012. Anti-*Wolbachia* surface protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12 (1), 17-20.
- Morchón R, Ferreira AC, Martín-Pacho JR, Montoya A, Mortarino M, Genchi C, Simón F, 2004. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Vet Parasitol*, 125 (3–4), 313–21. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.08.003.
- Morchón R, Montoya-Alonso JA, Rodríguez-Escobar I, Carretón E, 2022. What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years? *Pathogens*, 11, 1042. doi: 10.3390/pathogens11091042
- Moreno Y, Nabhan JF, Solomon J, Mackenzie CD, Geary TG, 2010. Ivermectin disrupts the function of the excretory-secretory apparatus in microfilariae of *Brugia malayi*. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 20120–5. doi: 10.1073/pnas.1011983107
- Naderi A, Sharifi I, Aflatoonian MR, Mostafavi M, Parizi MH, Mashayekhi J, Mashayekhi M, Nikpour S, Bamorovat M, 2021. Dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* in the south of Kerman province, Iran. *Microb Pathog*, 154, 104863. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104863.
- Nakagaki K, Nogami S, Hayashi Y, Hammerberg B, Tanaka H, Ohishi I, 1993. *Dirofilaria immitis*: detection of parasitespecific antigen by monoclonal antibodies in glomerulonephritis in infected dogs. *Parasitol Res*, 79 (1), 49–54.

- Napoli E, De Benedetto G, Ciuca L, Bosco A, Lia RP, Veneziano V, Bezerra Santos MA, Otranto D, Rinaldi L, Brianti E, 2023. New distribution patterns of *Dirofilaria immitis* in Italy. Front Vet Sci, 10, 1162403. doi: 10.3389/fvets.2023.1162403.
- Nayar JK, Connelly CR, 2017. Mosquito-borne dog heartworm disease. In: Pests in and around the southern home. University of Florida, UF/IFAS Extension. Erişim adresi, <http://ifasbooks.ifas.ufl.edu/p-1222-pests-in-and-around-the-southern-home.aspx>.
- NCBI Taxonomy Browser, 2024. *Dirofilaria* sp. Taxonomy. Erişim tarihi 24 Mart 2024. Erişim adresi, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=6286&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T, 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. Proc Natl Acad Sci, 111, 10257–62.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert A, Karr TL, Robertson HM, 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. Proc Natl Acad Sci, 89, 2699–702. doi: 10.1073/pnas.89.7.2699.
- Oi M, Sato Y, Nakagaki K, Nogami S, 2015. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. Parasitol Res, 114(10), 3645-8. doi: 10.1007/s00436-015-4591-z.
- Omar OI, Elamin EA, Omer SA, Alagaili AN, Mohammed OB, 2018. Serorevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs and cats in Riyadh city, Saudi Arabia. Trop Biomed, 35, 531–40.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Breitschwerdt EB, 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends Parasitol, 25(4), 157–63. doi:10.1016/j.pt.2009.01.003
- Öge H, Doğanay A, Öge S, Yıldırım A, 2003. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 110 (2), 69-72.
- Özcel MA, Üner A, Ertuğ S, 2011. Parazitolojide immunofluoresans. In: Parazitolojide Laboratuvar. Edr: Korkmaz M, Ok ÜZ. Birinci baskı, İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, yayın no:23, s.209-18.
- Öztürk A, 1997. Konya yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in prevalansının serolojik olarak tespiti. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Paes-de-Almeida EC, Ferreira AMR, Labarthe NV, Caldas MLR, McCall JW, 2003. Kidney ultrastructural lesions in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Vet Parasitol, 113, 157-68. doi:10.1016/s0304-4017(03)00020-7.
- Palicelli A, Deambrogio C, Arnulfo A, Rivasi F, Paganotti A, Boldorini R, 2014. *Dirofilaria repens* mimicking an ovarian mass: histologic and molecular diagnosis. Acta Path Micro Im, 122, 1045–6. doi: 10.1111/apm.12259.
- Pantchev N, Norden N, Lorentzen L, Rossi M, Rossi U, Brand B, Dyachenko V, 2009. Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. Parasitol Res, 105, 63–74. doi: 10.1007/s00436-009-1497-7.
- Peixoto CA, Silva LF, Teixeira KM, Rocha A, 2001. Ultrastructural characterization of intracellular bacteria of *Wuchereria bancrofti*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 95, 566–8.
- Peribanez MA, Lucientes J, Arce S, Morales M, Castillo JA, Gracia MJ, 2001. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acantocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®, Vet Parasitol 102, 173-5.
- Piatek A, Tyagi S, Pol A ve ark, 1998. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Biotechnol, 16, 359–63. doi: 10.1038/nbt0498-359
- Potkonjak A, Rojas A, Gutiérrez Y, Nachum-Biala Y, Kleinerman G, Savić S, Polaček V, Pušić I, Harrus S, Baneth G, 2020. Molecular survey of *Dirofilaria* species in stray dogs, red foxes and golden jackals from Vojvodina, Serbia. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 101409. doi: 10.1016/j.cimid.2019.101409.
- Požgain Z, Dulić G, Šego K, Blažeković R, 2014. Live *Dirofilaria immitis* found during coronary artery bypass grafting procedure. Eur J Cardio-Thorac, 46, 134–6. doi: 10.1093/ejcts/ezt496.

- Pratt HD, Moore CG, 1993. Mosquitoes of public health importance and their control. U.S. Department of Health & Human Services: Centers for Disease Control and Prevention Publication; Atlanta, Georgia.
- Prichard RK, Geary TG, 2019. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 10, 69–83. doi: 10.1016/j.ijpddr.2019.06.002.
- Raillet A, Henry A, 1911. Remarques sur sujet de dex notes de MM. Bouche et Bernard *Bull Soc Path Exot*, 4, 485-8.
- Rawlings CA, Tonelli Q, Lewis RE, Duncan JR, 1993. Semiquantitative test for *Dirofilaria immitis* as a predictor of thromboembolic complications associated with heartworm treatment in dogs. *Am J Vet Res*, 54, 914-9.
- Razi Jalali MH, Alborzi AR, Avizeh R, Mosallanejad BA, 2010. Study on *Dirofilaria immitis* in healthy urban dogs from Ahvaz, Iran. *Iranian J Vet Res Shiraz Univ*, 2010, 11, 33.
- Riegler M, O'Neill SL, 2006. The genus *Wolbachia*. In: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*. Eds: Dworkin MM, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. Vol 5, 3rd ed. New York: Springer, p. 547–61.
- Rishniw M, Barr SC, Simpson KW, Frongillo MF, Franz M, Dominguez Alpizar JL, 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol*, 135, 303–14. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.
- Rizzo DM, Ware WA, 1989. Canine heartworm disease. *Iowa State Univ Vet*, 51, 78-83.
- Roeber F, Jex AR, Campbell AJD, Campbell BE, Anderson GA, Gasser RB, 2011. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. *Infect Genet Evol*, 11, 849-54. doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.013.
- Rojas A, Rojas D, Montenegro VM, Baneth G, 2015. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasites Vectors*, 8, 170-9. doi: 10.1186/s13071-015-0783-8.
- Ros VI, Fleming VM, Feil EJ, Breeuwer JA, 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl Environ Microbiol*, 75, 1036–43. doi: 10.1128/AEM.01109-08.
- Rossi MID, Paiva J, Bendas A, Mendes-de-Almeida F, Knackfuss F, Miranda M, Guerrero J, Fernandes O, Labarthe N, 2010. Effects of doxycycline on the endosymbiont *Wolbachia* in *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)-Naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 174 (1-2), 119-23. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.07.019.
- Ryan WG, Gross SJ, Soll MD. Diagnosis of feline heartworm infection. *Proceedings of the Heartworm Symposium '95*. p. 121-6, 1995. March 31-April 2, Batavia, IL, USA.
- Sarali H, 2009. Köpeklerdeki *Dirofilaria* türlerinde *Wolbachia*'nın belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Sarı B, Taşcı GT, Kılıç Y, 2013. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* in dogs in Iğdır province, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 735-9.
- Sartono E, Kruize YCM, Kurniawan A, Maizels RM, Yazdanbakhsh M, 1997. Depression of antigen-specific Interleukin-5 and Interferon- γ responses in human lymphatic filariasis as a function of clinical status and age. *J Infect Dis*, 175, 1276–80. doi: 10.1086/593701.
- Sawyer TK. hawking Seasonal fluctuations of microfilariae in two dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Proceedings of the heartworm Symposium*, 1975, p. 23-25,
- Schnyder M, Deplazes P, 2012. Cross-reactions of sera from dogs infected with *Angiostrongylus vasorum* in commercially available *Dirofilaria immitis* test kits. *Parasites Vectors*, 5 (1), 258-62. doi: 10.1186/1756-3305-5-258.

- Seven Ö, Akkan HA, 2023. Seroprevalence of *Dirofilariasis* in Dogs in Antalya Province. Turkish Veterinary Journal, 5 (2), 39-43.
- Sgroi G, Buono F, Iatta R, Beall M, Chandrashekar R, Buch J, Piantedosi D, Veneziano V, Otranto D, 2022. Vector-borne pathogens of zoonotic concern in hunting dogs of southern Italy. Acta Tropica, 232, 106502. doi: 10.1016/j.actatropica.2022.106502.
- Silva MSG, Leles D, Sudré AP, Millar PR, Uchôa F, Brener B, 2019. Prevalence and Molecular Characterization of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Dogs from Endemic Areas of Rio De Janeiro State. Brazil J Parasitol, 105, 387–90.
- Silva WI, Gomes ARD, Francisco MC, Silva JM, Oliveira Filho HS, Feitosa TF ve ark, 2023. Subcutaneous dirofilariasis due to *Dirofilaria immitis* in a dog in Brazil: first report. Braz J Vet Parasitol, 32 (2), e001423. doi: 10.1590/S1984-29612023032.
- Simón F, López-Belmonte J, Marcos-Atxutegi C, Morchón R, Martín-Pacho JR, 2005. What is happening outside North America regarding human dirofilariasis? Vet Parasitol, 133 (2-3), 181-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.033
- Simón F, Prieto G, Morchón R, Bazzocchi C, Bandi C, Genchi C, 2003. Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts of filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariasis. Clin Diagn Lab Immunol, 10, 180-1. doi: 10.1128/CDLI.10.1.180-181.2003.
- Simón F, Siles-Lucas M, Morchon R, Gonzalez-Miguel J, Mellado I, Carreton E, Montoya-Alonso JA, 2012. Human and animal Dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. Clin Microbiol Rev, 25, 507–44. doi: 10.1128/cmr.00012-12.
- Sironi M, Bandi C, Sacchi L, Di Sacco B, Damiani G, Genchi C, 1995. A close relative of the arthropod endo-symbiont *Wolbachia* in a filarial worm. Molec Biochem Parasitol, 74, 223-7.
- Slocombe JOD, Surgeoner GA, Srivastava B. Determination of the heartworm transmission period and its used in diagnosis and control. Proceedings of the Heartworm Symposium, 1989. p. 19-26, Charleston, SC, USA.
- Sloss MW, Kemp RL, Zajac AM, 2012. Veterinary Clinical Parasitology. Altıncı Baskı, Iowa, USA, Blackwell Publishing.
- Smith R, Murillo DFB, Chenoweth K ve ark, 2022. Nationwide molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in companion dogs and cats, United States of America. Parasit Vectors, 15, 367. doi: 10.1186/s13071-022-05459-5.
- Snyder PS, Levy JK, Salute ME, Gorman SP, Kubilis PS, Smail PW, George LL, 2000. Performance of serologic tests used to detect heartworm infection in cats. J Am Vet Med Assoc, 216 (5), 693-700. doi: 10.2460/javma.2000.216.693.
- Sobotyk C, Nguyen N, Negrón V, Varner A, Saleh MN, Hilton C, Tomeček JM, Esteve -Gasent MD, Verocai GG, 2022. Detection of *Dirofilaria immitis* via integrated serological and molecular analyses in coyotes from Texas, United States. Int J Parasitol Parasites Wildl, 18, 20-4. doi: 10.1016/j.ijppaw.2022.03.012.
- 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*. Korean J Parasitol, 40 (4), 195-8. doi: 10.3347/kjp.2002.40.4.195.
- Steel C, Nutman TB, 2003. CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity. J Immunol, 170, 1930–8.
- Stouthamer R, Breeuwer JA, Hurst GD, 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. Annu Rev Microbiol, 53, 71–102.
- Stoyanova H, Carreton E, Montoya-Alonso JA, 2019. Stray dogs of Sofia (Bulgaria) could be an important reservoir of heartworm (*Dirofilaria immitis*). Helminthologia, 56, 4, 329–33. doi: 10.2478/helm-2019-0033.
- Strubing U, Lucius R, Hoerauf A, Pfarr KM, 2010. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of *Wolbachia* from filarial nematodes. Int J Parasitol, 40, 1193–202.

- Sukudom P, Phumee A, Siriwasatien P, 2018. First report on subconjunctival dirofilariasis in Thailand caused by a *Dirofilaria* sp. closely related to *D.hongkongensis*. Acad J Sci Res, 6, 114-6. doi: 10.15413/ajsr.2017.0179.
- Sutton RH, 1988. Pathology and pathogenesis of dirofilariasis. In: *Dirofilariasis*, Eds: Boreham PFL, Atwell RB. Birinci Baskı, USA, CRC Press, p. 99-132.
- Şahin T, Sevgili M, Çamkerten İ, 2004. Şanlıurfa yöresi köpeklerinde *Dirofilaria* sp.'nin yayılışı. Türkiye Parazitoloj Derg, 28 (3), 140-2.
- Şimşek S, Çiftçi A, 2016. Serological and molecular detection of *Dirofilaria* species in stray dogs and investigation of *Wolbachia* DNA by PCR in Turkey. J Arthropod Borne Dis. 10, 445-53.
- Şimşek S, Özkanlar Y, Balkaya İ, Aktaş MS, 2011. Microscopic, serologic and molecular surveys on *Dirofilaria immitis* in stray dogs, Turkey. Vet Parasitol, 183 (1-2), 109-13. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.06.012.
- Şimşek S, Utuk AE, Köroğlu E, Rishniw M, 2008. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. J Helminthol, 82, 181-6.
- Tabar MD, Altet L, Martínez V, Roura X, 2013. *Wolbachia*, filariae and *Leishmania* coinfection in dogs from a Mediterranean area. J Small Anim Pract, 54, 174-8.
- Tahir D, Bittar F, Barré-Cardi H, Sow D, Dahmani M, Mediannikov O, Raoult D, Davoust B, Parola P, 2017. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by new real-time TaqMan® PCR assay in dogs and mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Corsica (France). Vet Parasitol, 235, 1-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.01.002.
- Takeuchi O, Akira S, 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int Immunopharmacol, 1, 625-35.
- Taşçı GT, Kılıç Y, 2015. Kars ve Iğdır civarındaki köpeklerde *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)'nin prevalansı ve potansiyel vektör sivrisinek türleri üzerine araştırmalar. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18 (A), 29-34.
- Taşkaya S, 2014. İzmir/Çiğli ilçesindeki köpeklerde Ehrlichiosis, Anaplasmosis, Borreliosis ve *Dirofilaria immitis*'in prevalansı. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL, 2016. Veterinary Parasitology, 4th edition, Oxford, Blackwell Publishing. doi: 10.1002/9781119073680.
- Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A, 2005a. *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. Adv Parasitol, 60, 245-84. doi: 10.1016/s0065-308x(05)60004-8
- Taylor MJ, Cross HF, Bilo K, 2000. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. J Exp Med, 191, 1429-36.
- Taylor MJ, Cross HF, Ford L, Makunde WH, Prasad GBKS, Bilo K, 2001. *Wolbachia* bacteria in filaria immunity and disease. Parasite Immunol, 23, 401-9. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00400.x.
- Taylor MJ, Makunde, WH, McGarry HF, Turner, JD, Mand S, Hoerauf A, 2005b. Macrolaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. Lancet, 9477, 2116-21. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66591-9.
- Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V, Sangmaneeet S, Chungpivat S, Taweethavonswat P, Choochote W, Maleewong W, 2010. Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. Vet Parasitol, 168, 255-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.002.
- Theis JH, Gilson A, Simón GE, Bradshaw B, Clark D, 2001. Case report: Unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-year-old man necessitates orchiectomy. Am J Trop Med Hyg, 64, 317-22. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.317.
- Theis JH, Stevens F, Theodoropoulos G, Ziedins AC, 1999. Studies on the prevalence and distribution of filariasis in dogs from Los Angeles County. Canine Pract, 24, 8-16.

- Todd KS, Howland TP, 1983. Transplacental transmission of *Dirofilaria immitis* microfilariae in the dog. *J Parasitol*, 69, 371. doi: 10.2307/3281237.
- Tomazatos A, Cadar D, Török E, Maranda I, Horváth C, Keresztes L, Spinu M, Jansen S, Jöst H, Schmidt-Chanasit J, Tannich E, Lühken R, 2018. Circulation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in the Danube Delta Biosphere Reserve, Romania. *Parasites Vectors*, 11, 392-9. doi: 10.1186/s13071-018-2980-8.
- Toparlak M, Tüzer E, 1999. Veteriner Helmintoloji. İstanbul Üniv Vet Fak Yayını Ders Notu No: 102. İstanbul, İstanbul Üniv Vet Fak Masatüstü Yayıncılık Ünitesi.
- Traversa D, Aste G, Di Cesare A, Paoletti B, Di Tommaso M, Di Giulio E, Pampurini F, Cristiano T, Boari A, 2011. Efficacy of a single administration of a spot-on solution containing imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% in eliminating *Dirofilaria repens* microfilariae in naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 179, 107–12. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.02.018.
- Traversa D, Aste G, Milillo P, Capelli G, Pampurini F, Tunesi C, Santori D, Paoletti B, Boari A, 2010. Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. *Vet Parasitol*, 169, 128–32. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.12.034.
- Tsai CC, Chang YC, Chang IW, 2023. Human pulmonary dirofilariasis mimicking a metastatic disease in a cancer patient. *Asian Journal of Surgery*, 47 (1), 538-9. doi: 10.1016/j.asjsur.2023.09.096.
- Tumolskaya NI, Pozio E, Rakova VM, Supriaga VG, Sergiev VP, Morozov EN, Morozova LF, Rezza G, Litvinov SK, 2016. *Dirofilaria immitis* in a child from the Russian Federation. *Parasite*, 23, 37-40. doi: 10.1051/parasite/2016037.
- Ulevitch RJ, Tobias PS, 1999. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol*, 11, 19–22.
- Umur Ş, Köroğlu E, Güçlü F, Tınar R, 2006. Nematoda. In: *Helmintoloji*. Ed: Tınar R. Birinci Baskı, Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, s. 213-441.
- Underwood PC, Harwood PD, 1939. Survival and location of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J Parasitol*, 25, 23-33.
- Upton KE, Sobotyck C, Edwards EE, Verocai GG, 2022. *Dirofilaria immitis* in an Asian small-clawed otter (*Aonyx cinereus*) from southeastern Louisiana, United States. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 29, 100703. doi: 10.1016/j.vprsr.2022.100703.
- Ural K, Gultekin M, Atasoy A, Ulutas B, 2014. Spatial distribution of vector borne disease agents in dogs in Aegean region, Turkey. *Rev MVZ Córdoba* 19 (2), 4086–98.
- Vandekerckhove TT, Watteyne S, Willems A, Swings JG, Mertens J, Gillis M, 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS Microbiol Lett*, 180, 279–86. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08807.x.
- Vatta AF, Dzimiński M, Storey BE, Camus MS, Moorhead AR, Kaplan RM, Wolstenholme AJ, 2014. Ivermectin-dependent attachment of neutrophils and peripheral blood mononuclear cells to *Dirofilaria immitis* microfilariae in vitro. *Vet Parasitol*, 206, 38–42. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.004.
- Velasquez L, Blagburn BL, Duncan-Decoq R, Johnson EM, Allen KE, Meinkoth J, Jeff Gruntmeir, Little SE, 2014. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Vet Parasitol*, 206, 67–70. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.021.
- Velev V, Popov M, Pavlova M, Karageorgiev M, Mangarov A, 2019. Tongue infection caused by *Dirofilaria repens*. *Qjm-Int J Med*, 112, 619-20. doi: 10.1093/qjmed/hcz135.
- Venco L, Genchi C, Simón F, 2011. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. In: *La filariosis en las especies domésticas y en el hombre*. Eds: Simón F, Genchi C, Venco L, Montoya MN. Barcelona, Spain, Merial Laboratorios SA, p. 19-60.
- Venco L, McCall JW, Guerrero J, Genchi C, 2004. Efficacy of long-term monthly administration of ivermectin on the progress of naturally acquired heartworm infections in dogs. *Vet Parasitol*, 124, 259–68. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.024.

- Vezzoni A, Genchi C, Raynaud JP. Adulticide efficacy of RM 340 in dogs with mild and severe natural infections. Proceedings of the Heartworm Symposium'92. p. 231-40, 1992, Austin, TX, USA.
- Vincent AL, Portaro JK, Ash LR, 1975. A comparison of body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *Brugia malayi*. J Parasitol, 61, 570-6.
- Von Samson-Himmelstjerna G, Harder A, Schnieder T, 2002. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. Int J Parasitol 32, 1529-35.
- Voyvoda H, Paşa S, Özensoy Töz S, Özbel Y, Ertabaklar H, 2004. Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde Leishmaniosis ve Dirofilariasis'in prevalansı. Turk J Vet Anim Sci, 28, 1105-11.
- Wang JS, Tung KC, Huang CC, Lai CH, 2005. Alteration of extracellular collagen matrix in the myocardium of canines infected with *Dirofilaria immitis*. Vet Parasitol, 131(3-4), 261-5. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.041
- Werren JH, 1997. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol, 42, 587-609.
- Werren JH, Windsor D, Gao L, 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. Proc R Soc Lond B, 262, 197-204.
- Werren JH, Zhang W, Guo LR, 1995b. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. Proc Biol Sci, 261, 55-63. doi: 10.1098/rspb.1995.0117.
- Winkler S, Pollreis A, Georgopoulos M, Bagò-Horvath Z, Auer H, To KK-W, Krücken J, Poppert S, Walochnik J, 2017. Candidatus *Dirofilaria hongkongensis* as causative agent of human ocular filariasis after travel to India. Emerg Infect Dis, 23, 1428-31. doi: 10.3201/eid2308.170423.
- Winter RL, Dillon AR, Cattlet RC, Blagburn BL, Tillson DM, Johnson CM, Brawner WR, Wellws EG, Barney S, 2017. Effect of heartworm disease and heartworm-associated respiratory disease (HARD) on the right ventricle of cats. Parasites Vectors, 10 (2), 492-8. doi: 10.1186/s13071-017-2451-7.
- Wolstenholme AJ, Evans CC, Jimenez PD, Moorhead AR, 2015. The emergence of macrocyclic lactone resistance in the canine heartworm, *Dirofilaria immitis*. Parasitology 142, 1249-1259. doi:10.1017/S003118201500061X
- Wong MM, Suter PF, 1979. Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariasis. Am J Vet Res, 40(3), 414-20.
- Wu B, Novelli J, Foster J ve ark, 2009. The heme biosynthetic pathway of the obligate *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* as a potential antifilarial drug target. PLoS Negl Trop Dis, 3, e475.
- Yabaneri F, 2014. Avanos yöresi sokak köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in PCR ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Yabsley MJ, Dresden-Osborne C, Pirkle EA, Kirven JM, Noblet GP, 2004. Filarial worm infections in shelter dogs and cats from northwestern South Carolina, USA. Comp Parasitol, 71, 154-7. doi: 10.1654/4125.
- Yaman M, Güzel M, Koltas IS, Demirkazık M, Aktaş H, 2009. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province, Turkey. Cambridge University Press, 83 (3), 255-60. doi: 10.1017/S0022149X08198832.
- Yıldırım A, 2004. Ankara ve çevresindeki köpeklerde filarial etkenlerin prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 51, 35-40.
- Yıldırım A, İça A, Atalay O, Düzlü Ö, İnci A, 2007. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. Res Vet Sci, 82, 358-63. doi: 10.1016/j.rvsc.2006.08.006.
- Yıldız K, Yasa Duru S, Yağcı BB, Öcal N, Gazıyağcı AN, 2008. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Kırıkkale. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 32 (3), 225-8.
- Zarlenga DS, Higgins J, 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. Vet Parasitol, 101, 215-30. doi: 10.1016/s0304-4017(01)00568-4.

- Zeyrek FY, Erdoğan DD, 2011. ELISA. In: Parazitolojide Laboratuvar. Edr: Korkmaz M, Ok ÜZ. Birinci baskı, İzmir, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, yayın no:23, s. 219-34.
- Zhou W, Rousset F, O'Neill S, 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. Proc R Soc B Biol Sci, 265, 509–15. doi: 10.1098/rspb.1998.0324.



7. EKLER

EK – A: Etik Kurul Onayı



8. TURNİTİN RAPORU

SİVAS VE TOKAT İLLERİNDEKİ SAHİPSİZ KÖPEKLERDE DİROFİLARIA İMMİTİS VE WOLBACHİA'NIN qPCR İLE ARAŞTIRILMASI

by Dilge Sıla Yalçın

Submission date: 30-Apr-2024 12:34AM (UTC+0300)

Submission ID: 2366021514

File name: DİLGE-

Sivas_ve_Tokat_İllerindeki_Sahipsiz_Köpeklerde_Dirofilaria_immitis_ve_Wolbachia_nın_qPCR_ile_Araştırılması_1_.docx
(6.27M)

Word count: 26214

Character count: 170676

SİVAS VE TOKAT İLLERİNDEKİ SAHİPSİZ KÖPEKLERDE DİROFİLARIA İMMİTİS VE WOLBACHİA'NIN qPCR İLE ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

8%	8%	1%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	dergipark.org.tr Internet Source	7%
2	adudspace.adu.edu.tr:8080 Internet Source	1%

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches < 1%

9. ÖZGEÇMİŞ

