

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

**KAYSERİ YÖRESİNDEKİ HAYVAN BARINAKLARINDAN
TOPLANMIŞ PİRELERİN MORFOLOJİK VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

**Hazırlayan
Nursafa ATIŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

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

**KAYSERİ YÖRESİNDEKİ HAYVAN
BARINAKLARINDAN TOPLANMIŞ PİRELERİN
MORFOLOJİK VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

**Hazırlayan
Nursafa ATIŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2016-6819 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Nursafa ATİŞ

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kayseri Yöresindeki Hayvan Barınaklarından Toplanmış Pirelerin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonları”, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Nursafa ATİŞ



Danışman

Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Abdullah İNCİ



Prof. Dr. Abdullah İNCİ danışmanlığında **Nursafa ATİŞ** tarafından hazırlanan “**Kayseri Yöresindeki Hayvan Barınaklarından Toplanmış Pirelerin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonları**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Parazitoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

24/08/2017

JÜRİ :**İmza**

Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ (ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

Üye: Doç. Dr. G. Zafer PEKMEZCİ (OMÜ Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı, Samsun)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Zuhale ÖNDER (ERÜ Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ**Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

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

Parazitoloji Anabilim Dalı'nda master eğitimime başladığım günden bu yana desteğini gördüğüm değerli hocalarım Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim elemanları Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM, Doç. Dr. Önder DÜZLÜ ve Yrd. Doç. Dr. Zuhâl ÖNDER ile Araş. Gör. Dr. Arif ÇİLOĞLU'na ve çalışma süresince malzeme bazında TYL-2016-6819 kodlu proje ile destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın her aşamasında birçok fedakârlıklar gösterip beni destekleyerek her an yanımda olan aileme teşekkürü borç bilirim.

**KAYSERİ YÖRESİNDEKİ HAYVAN BARINAKLARINDAN TOPLANMIŞ
PİRELERİN MORFOLOJİK VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

Nursafa ATIŞ

**T.C. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Parazitoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2017
Danışman: Prof. Dr. Abdullah İNCİ**

ÖZET

Bu çalışma, Kayseri yöresinde pire enfestasyonuna uğramış hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanan pirelerin morfolojik identifikasyonunu takiben moleküler karakterizasyonlarını yaparak DNA barkodlamalarını sağlamak ve filogenetik yapılanmalarını ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, 2015-2016 yılları arasında Kayseri yöresinde pire enfestasyonuna maruz kalmış hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınaklarından toplam 100 adet pire örneği toplanmıştır. Morfolojik teşhisler sonucunda, toplanan pirelerin 45'i *Ctenocephalides canis*, 20'si *Ctenocephalides felis* ve 35'i *Pulex irritans* olarak identifiye edilmiştir. Örneklenen türlerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve sonrasında genomik DNA izolatlarının mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgesini amplifiye eden primer çiftleriyle PCR analizleri yapılmıştır. *C. canis* için 5, *C. felis* için 2 ve *P. irritans* için 4 olmak üzere toplam 11 izolata ait ampikonlar sekans ve filogenetik analizler için klonlanmış ve plazmid pürifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmidler vektör spesifik primerlerle sekans analizine tabii tutulmuş ve hedef gen bölgesi dizilimleri elde edilmiştir. Nükleotit dizileri saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları belirlendikten sonra GenBank'a kaydedilmiş (KY865409-19) ve Dünya'daki diğer pire izolatları ile çoklu ve ikili hizalamaları yapılarak filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Mt-COI sekans analizlerine göre *C. canis* izolatları arasında % 0,1, *C. felis* izolatları arasında % 1,3 ve *P. irritans* izolatları arasında ise % 2,6 genetik farklılık olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez pirelerin morfolojik ve moleküler teşhisleri birarada kullanılarak moleküler karakterizasyonları yapılmış ve filogenileri ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Pire, Morfolojik Teşhis, Kayseri, Moleküler karakterizasyon

MORPOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FLEAS COLLECTED FROM BARNS IN KAYSERI PROVINCE

Nursafa ATIS
Erciyes University, Graduate School of Health Science
Department of Veterinery Parasitology
M.Sc. Thesis, August 2017
Supervisor: Prof. Dr. Abdullah İNCİ

ABSTRACT

This study was carried out to provide DNA barcoding by molecular characterization and establish phylogenetic constructions following the morphological identification of fleas collected from basement and shelter of building and animal barns exposed to flea infestation in Kayseri region. For this aim, a total of 100 flea samples were collected from animal barns and basement and shelter of building exposed to flea infestation between 2015-2016 in Kayseri region. The collected fleas were morphologically identified as *Ctenocephalides canis* in 45, as *Ctenocephalides felis* in 20 and as *Pulex irritans* in 35. Genomic DNA isolation from specimens was performed and PCR analyzes of the obtained isolates were done with the primer pairs that amplify the mt-COI gene region. The amplicons of 11 isolates belong to 5 for *C. canis*, 2 for *C. felis* and 4 for *P. irritans*, were cloned for sequence and phylogenetic analysis and plasmid purification was performed. The obtained plasmids were sequenced with the vector specific primer pairs and the sequences of the target gene regions were obtained. The molecular characterization of obtained isolate were determined, then they were deposited to GenBank (KY865409-19) and the phylogenetic analyses of the isolates recorded in GenBank (KY865409-19) were carried out by multiple alignments of the isolates with the similar flea ones available in GenBank in the world. According to mt-COI sequence analyses, genetic difference were determined as 0.1%, between *C. canis* isolates, 1.3% *C. felis* isolates and 2.6% *P. irritans* isolates. In conclusion, the molecular characterizations and phylogenetic analyses of the fleas using together morphological and molecular analyses were firstly performed in Turkey with this study.

Key words: Flea, Morphological identification, Kayseri, Molecular characterization

İÇİNDEKİLER

KAYSERİ YÖRESİNDEKİ HAYVAN BARINAKLARINDAN TOPLANMIŞ PİRELERİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI

Sayfa

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 PİRELERİN TAKSONOMİSİ.....	2
2.2 PİRELERİN MORFOLOJİSİ.....	4
2.3 PİRELERİN BİYOLOJİSİ	5
2.4 EPİDEMİYOLOJİ	9
2.5 ÖNEMLİ PİRE TÜRLERİ.....	10
2.6 PİRE ENFESTASYONLARINDA PATOGENEZ VE KLİNİK BELİRTİLER.....	12
2.7 PİRELERİN TANISI	14
2.8 TEDAVİ.....	14
2.9 KORUNMA VE KONTROL	17
2.10 PİRELERİN ARA KONAK ve VEKTÖR OLARAK ÖNEMLERİ	18
2.11 PİRELER ÜZERİNE YAPILMIŞ MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1 Pire Örneklerinin Toplanması.....	29
3.2 Laboratuvar Çalışmaları.....	29

3.2.1 Pire Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu	29
3.2.2 Genomik DNA İzolasyonu.....	29
3.2.3 Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi	31
3.2.4 Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu	32
3.2.5 Sekans ve Filogenetik Analizler	36
4. BULGULAR.....	38
4.1 MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI	38
4.2 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI.....	44
4.2.1 Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	44
4.2.2 Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması	45
4.2.3 Mt-COI Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizleri.....	47
4.2.4 Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
6. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR LİSTESİSayfa

Tablo 2.1	Pirelerin sistematikteki yeri.....	3
Tablo 2.2.	Siphoneptera dizisindeki aileler.....	3
Tablo 2.3.	Köpek ve kedilerde pire mücadelesinde kullanılan ilaçlar ve uygulama şekilleri.....	15
Tablo 2.4	Pire türleri, konakları ve naklettiği hastalık etkenleri	19
Tablo 4.1	Örneklenen pire türleri, cinsiyetleri ve toplanma yerlerine göre dağılımları	44
Tablo 4.2	Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler.....	47
Tablo 4.3	Mt-COI sekansları sağlanan pire izolatlarının nükleotid kompozisyonları.....	48
Tablo 4.4	Mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların türler arası ikili hizalama farklılıkları.....	49
Tablo 4.5	Mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların tür içi ikili hizalama farklılıkları.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Pirelerin morfolojisi.....	5
Şekil 2.2	Pirelerin biyolojik döngüsü	6
Şekil 2.3	Pire yumurtası.....	6
Şekil 2.4	Pire larvası.....	7
Şekil 2.5	Pire pupası.....	8
Şekil 2.6	Ergin <i>Ctenocephalis felis</i> piresi.	9
Şekil 3.1	pJET1.2/blunt Cloning Vector Haritası.....	33
Şekil 3.2	Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları.....	36
Şekil 4.1	<i>C. canis</i> bazı morfolojik özellikleri	39
Şekil 4.2	<i>C. canis</i> A:Dişi B: Erkek.....	40
Şekil 4.3	<i>C. felis</i> bazı morfolojik özellikleri	41
Şekil 4.4	<i>C. felis</i> Erkek.....	41
Şekil 4.5	<i>P. irritans</i> bazı morfolojik özellikleri	42
Şekil 4.6	<i>P. irritans</i> A: Erkek B: Dişi.....	43
Şekil 4.7	<i>P. irritans</i> taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	43
Şekil 4.8	Pire türlerinin parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü	45
Şekil 4.9	Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler	46
Şekil 4.10	Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler	46
Şekil 4.11	Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu ampikonların jel agarozda görünümü.	47
Şekil 4.12	Sekans analizi yapılan pire izolatları ile Dünyadaki diğer bazı pire izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin çoklu hizalamaları.....	53
Şekil 4.13	Pire izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri.	55

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pireler, sıçrayarak hareket eden ve larval dönemlerinde özgür yaşayıp erişkin formlarında gerek konaklarından zorunlu fakat geçici olarak kan emerek gerekse birçok hastalık etkeninin vektörü olarak, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden önemli ekto parazitlerdendir. Dünyada %96'sı memelilerde %4'ü ise kuşlarda olmak üzere yaklaşık 2575 farklı pire türü tanımlanmıştır (1). Bu türlerden *Ctenocephalides*, *Pulex* ve *Xenopsylla* cinslerine ait bazı türler çeşitli hastalık etkenlerinin vektörleri olmalarından dolayı insanlar ve hayvanlar için önem taşımaktadır.

Kutuplar dahil dünyanın birçok yerinde bulunabilen pireler, vektör-borne hastalıkların naklinde büyük önem arz etmektedirler. Bununla birlikte insan ve hayvanlarda irritasyon ve huzursuzluğun, anemi ve pire alerjisinin bir kaynağı olduğu bildirilmektedir (2).

Türkiye'de pireler üzerine yapılmış çalışmalar oldukça sınırlı olup mevcut çalışmalar da yalnızca morfolojik teşhise dayalıdır (3). Son yıllarda ekto parazitlerin klasifikasyonunda yaygın olarak kullanılan moleküler tabanlı tekniklerin kullanımı artmıştır. Günümüze kadar Türkiye'de pirelerin moleküler karakterizasyonları üzerine yapılmış moleküler bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez projesinde, Kayseri yöresinde pire enfestasyonuna maruz kalmış hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınaklarından toplanmış ergin pire örneklerinin morfolojik teşhislerini takiben, genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen izolatların mitokondrial cytochrome c oxidase subunit I gen bölgesi amplifiye edildikten sonra sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nükleotid dizilerinin ilgili gen bölgesi yönünden filogenetik analizleri incelenerek Dünyadaki mevcut genotiplerle ilişkileri ortaya konmuştur. Moleküler karakterleri belirlenen ve klasifiye edilen pire türlerine ait izolatlar Türkiye'nin biyolojik varlıkları olarak Genbank'a kayıtları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Pireler konaklarının bütün vücut bölgelerinden 3-4 günde bir 2-15 dakika süreyle kan emebilmektedirler. Direkt kapiller damarlardan kan emdiklerinden dolayı, öncelikle bu damarlara zarar vermekte, kan emmeleri esnasında çeşitli alerjenler salgılayarak kaşıntıya neden olmaktadır. Şiddetli kaşıntıyı takiben deri lezyonları ve sekonder enfeksiyonlar gelişebilmektedir. Birçok hayvan, tekrarlanan pire enfestasyonlarından sonra kısmi bağışıklık kazansa da, bazı hayvanlarda ve özellikle insanlarda duyarlılık devam etmekte ve alerji gelişebilmektedir. Pireler aynı zamanda tıbbi ve veteriner önemi olan hastalık etkenlerini de nakletmektedirler. Pireler çok fazla konak seçiciliği göstermemektedirler. Örneğin *Ctenocephalides felis*'e 50 farklı konak üzerinde rastlanılmaktadır. Bu özellikleri ile vektörlükleri çok gelişmiş olup, çok çeşitli virüs ve bakterinin naklinde rol almaktadırlar. Yoğun şekilde pire ile enfeste olan hayvanlarda ölüm görülebilmektedir (4-7).

2.1 PİRELERİN TAKSONOMİSİ

Siphanoptera (pireler) holometabol insekt takımlarından biridir. Bu takım içerisinde 16 familya içinde 246 cinse ait yaklaşık 2575 tür bulunmaktadır (5, 8). Güncel olarak National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy veri tabanına göre pirelerin sistematikteki yeri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Pirelerin sistematikteki yeri

Sınıflandırma
Alem: Animalia Linnaeus, 1758
Şube: Arthropoda von Siebold, 1848
Alt Şube: Hexapoda Latreille, 1825
Sınıf: Insecta Linnaeus, 1758
Alt Sınıf: Pterygota
Order: Siphoneptera Latreille, 1825
Üst Aile: Hystrichopsylloidea
Ceratophylloidea
Malacopsylloidea
Vermipsylloidea
Pulicoidea

Siphoneptera dizisine ait aileler, dağılımları, yaygın konakları, içerdikleri soy ve tür sayıları Tablo 2.2 de verilmiştir (5)

Tablo 2.2. Siphoneptera dizisindeki aileler

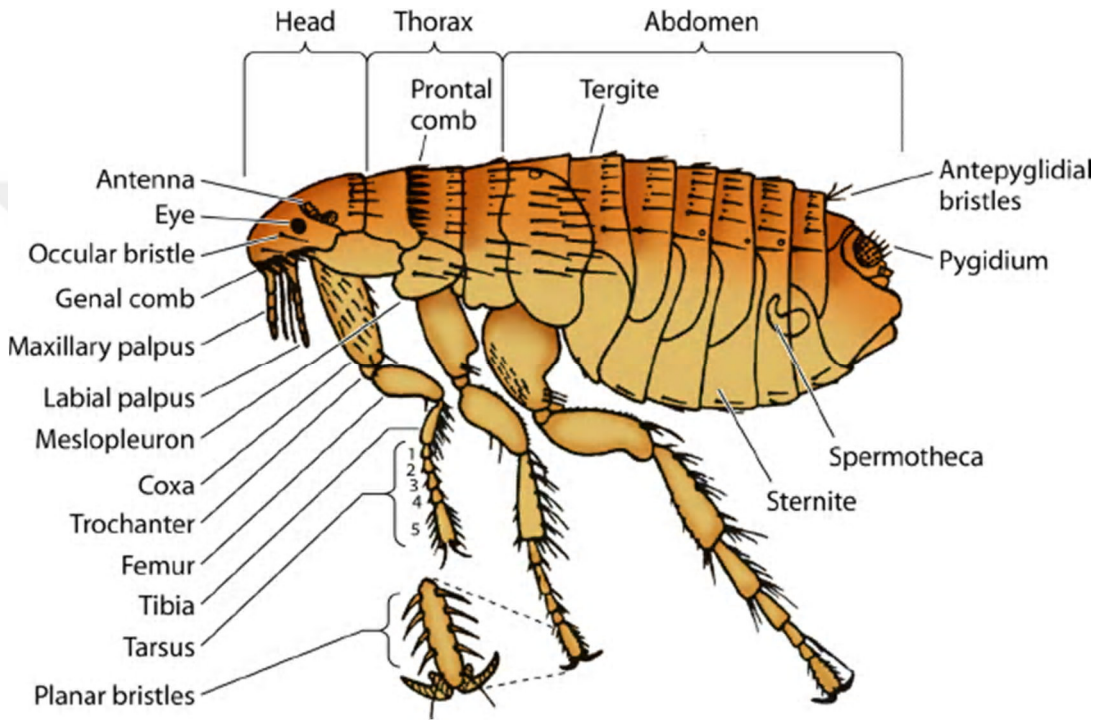
Aile	Dağılım (bölge)	Soy	Tür	Yaygın konakları
Ancistropsyllidae	Doğu	1	3	Toynaklılar
Ceratophyllidae	Kozmopolittir fakat ağırlıklı olarak holarktık bölgelerde	44	403	Öncelikle kemirgenler, bazen viverridae, mustelidae, kuşlar
Chimaeropsyllidae	Etiyopya	8	26	Kemirgenler, böcek yiyen canlılar, fil sivri fareleri
Coptopsyllidae	Paleartik bölgelerde	1	19	Kemirgenler
Ctenophthalmidae	Öncelikle holarktık bölgelerde, bazıları Güney yarımkürede	42	548	Kemirgenler, occasionally, pikas, insektivorlar, keseliler, mustelidae
Hystrichopsyllidae	Nearktik, Paleartik ve Neotropik bölgelerde, Avustralya	6	36	Kemirgenler, insektivorlar
Ischnopsyllidae	Kozmopolit	20	122	Yarasalar
Leptopsyllidae	Paleartik ve Nearktik bölgelerde, Doğuda, Avustralya veya Etiyopya'da birkaç	29	230	Kemirgenler, tavşanımsılar, insektivorlar, tilkiler

	tür			
Malacopsyllidae	Neotropik bölgelerde	2	2	Armadillo
Pulicidae (incilides tungid flea)	Kozmopolit	27	182	Karnivorlar,toynaklılar,yarasalar, armadillolar ve bazen kuşlar
Pygiopsyllidae	Etiyopya, Doğu, Avustralya ve Neotropik bölgelerde	37	166	Kemirgenler, keseliler, insektivorlar, bazende kuşlar ve sivri sincapçık giller
Rhopalopsyllidae	Neotropik, Güney Neartik bölgelerde ve Okyanus bölgesinde	10	122	Öncelikle kemirgenler, bazıları okyanus deniz kuşlarında
Stephanocircidae	Öncelikle Neotropik bölgelerde ve Avustralya'da	9	51	Kemirgenler, çok azı marsupials
Vermipsyllidae	Holartik bölgelerde	3	39	Karnivorlar ve toynaklılar
Xiphiopsyllidae	Etiyopya'da	1	8	Kemirgenler

2.2 PİRELERİN MORFOLOJİSİ

Pireler kırmızımsı kahverengiden siyaha varan renkte, bazıları ise sarımsı görünümde, yaklaşık 2-10 mm uzunluğunda, kanatları olmayan ve sıçrayarak hareket eden, erişkin formları zorunlu kanla beslenen geçici parazitler olup, konağın derisini ağız organelleri ile delerek kapillar kan ile beslenmektedir. Ergin dişi bir pire günde ortalama 14 mikrolitre kan tüketebilmektedir. Pirelerin birçok morfolojik karakteri diğer arthropodlara benzememektedir. Vücut yandan basık, erkekler dişilerden daha kısa, baş, göğüs ve karın belirgin olarak ayrılmış, baş sınırlı olarak hareket edebilmektedir (Şekil 2.1). Ağız delici, emici özelliktedir. Başın her iki yanında küçük anten içeren oluklar bulunmaktadır. Anten erkeklerde erektil özellikte olup, çiftleşme esnasında erkeğe destek sağlamaktadır. Bileşik olmayan gözler bazı türlerde antenin önüne yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Bazı türlerde genal (oral) ve pronotal ctenidium denen tarak

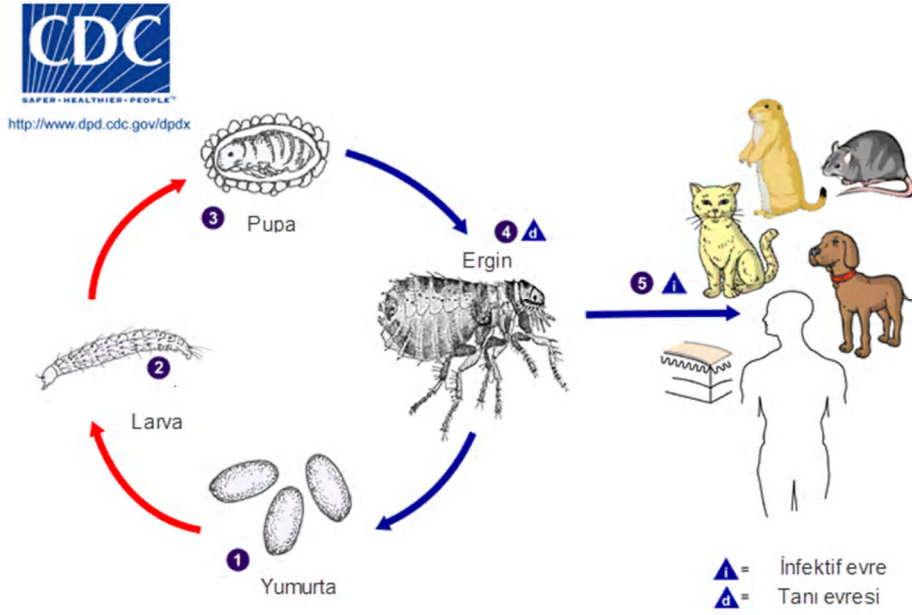
benzeri yapılar görülmektedir. Karnın son segmenti duyu kılları ile kaplanmış olup, pygidium denen duyu organını oluşturmaktadırlar. Dişi pirelerde spermateka, erkeklerde ise bir çift clasper ve penis bulunmaktadır. Kanatları bulunmamakta, ayakları sıçramaya elverişli yapıda olup, vücut uzunluklarınının 150 katı mesafeye (70 cm-1 metre) sıçrayabildikleri bildirilmektedir. Pire yumurtaları inci beyazı renginde ve yaklaşık 0.5 mm uzunluğunda oval şekillidir (6, 7, 9, 10,11)



Şekil 2.1 Pirelerin morfolojisi (12)

2.3 PİRELERİN BİYOLOJİSİ

Pireler tam başkalaşımli gelişme (holometabol) göstermektedirler. Yaşamlarında yumurta, larva, pupa ve erişkin dönemleri bulunmaktadır (Şekil 2.2). Yaşam evresindeki tek parazitik safha erişkin dönemi olup, yumurta, larva ve pupa doğada bulunmaktadır (5).



Şekil 2.2 Pirelerin biyolojik döngüsü (https://www.pesticideresearch.com/site/?page_id=2933)

Yumurta: . Erişkin dişiler genellikle konak üzerindeyken bir defada 15-20 olmak üzere yaşamları boyunca yaklaşık 500 adet yumurta üretmektedirler. Yumurtalar yapışkan olmadıkları için konak vücudundan toprağa, konağın yuvası içine, tozlu yerlere ve kovuklara düşmekte, bazen de konak hayvanın tüyleri arasında 5-8 tanesi bir arada paketler hâlinde bırakılmaktadır. Yumurtalar oval, inci beyazı renğinde ve erişkin pirelere kıyasla geniş yapıda (0.3-0,5 mm) görülmektedir (Şekil 2.3). Isı ve nemin uygun olduğu koşullarda 2-16 gün içerisinde yumurtadan larvalar çıkmaktadır (5).



Şekil 2.3 Pire yumurtası (<http://cutecats.candra.info/flea-eggs-on-cats.htm>)

Larva: Larva beyaz renkte, bacaksız, gözsüz ve 0,5 mm boyundadır (Şekil 2.4). Baş ve 13 halkadan oluşmuş vücudun tamamı kalın tüylerle kaplıdır. Larvaların ağızları çiğneyici özellikte olup proteinden zengin organik döküntülerle (erişkin pire

dışkıdaki sindirilmiş kan, konak deri parçaları ve konak dışkısı) beslenmektedirler. Larvalar ışıktan kaçma ve toprağa saklanma özelliğindedirler. Bu nedenle ortamdaki karanlık ve nemli yerlere gizlenirler. Larvalar, halı ve mobilyaların en alt kısımlarında, yerdeki yarık ve çatlaklarda, hayvan barınaklarının en kuytu yerlerinde bulunurlar. Larvalar solunum deliklerini kapatamadıklarından dolayı ortamda nem azalmasına karşı duyarlı olmaktadır. Larva genellikle iki gömlek değiştirip üç larva dönemi geçirir ve 8-150 günde gelişimini tamamlamaktadır. Daha sonra larva tükürük salgılarından oluşan ipek kozasına bürünerek yaklaşık 4x2 mm boyutlarındaki pupa şeklini almaktadır (5,7).



Şekil 2.4 Pire larvası (<http://fleabitesblog.com/flea-larvae/>)

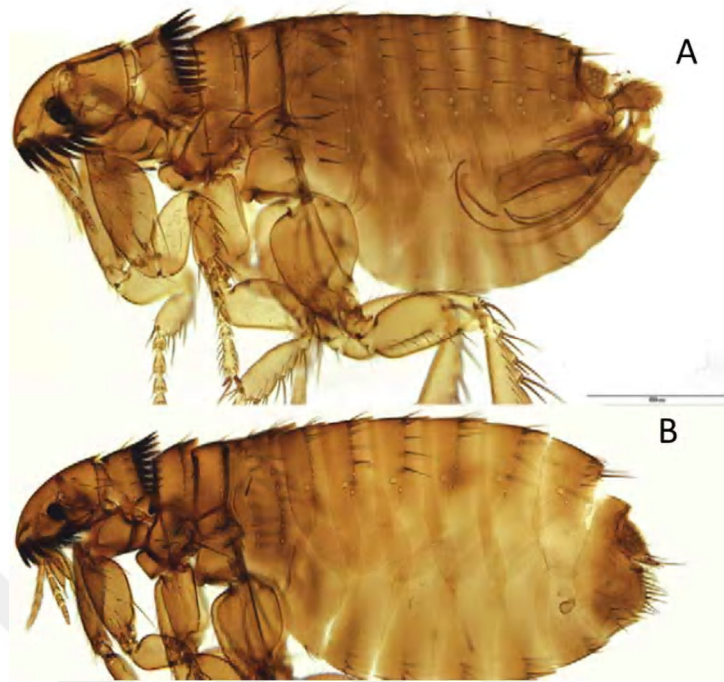
Pupa: Ovalimsi beyaz olan pupa kokonu yapışkandır, etrafı toz, toprak ve çöp gibi maddelerle kaplıdır (Şekil 2.5). Pupa dönemi kokon içinde geçmekte, hareketsiz ve beslenmenin söz konusu olmadığı bu dönem uygun koşullarda 1-2 hafta içinde tamamlanmakta ve erişkin pireler oluşmaktadır. İdeal çevre koşullarında birçok türün yaşam evresi 20 ila 75 günde tamamlanmaktadır. Fakat düşük sıcaklık larval dönemi 200 güne, pupa evresini ise bir yıla kadar uzatabilmektedir (5).



Şekil 2.5 Pire pupası (<http://fayyyadh95.blogspot.com.tr/2015/04/fleas.html>)

Ergin: Erginler 2-10 mm büyüklüğünde, vücutları iki yandan basık ve kahverengi-siyah renkte canlılardır. Vücut örtüsü iyi kitinize olmuş ve kıllarla kaplıdır. Vücut baş, toraks ve abdomen olmak üzere 3 bölümden oluşmuştur. Bacaklar erişkin pirelerde 3 çifttir ve iyi gelişmiştir (Şekil 2.6). Üçüncü çift bacak diğerlerinden belirgin bir şekilde uzun olup sıçrayarak konağa tutunmayı sağlamaktadır. Erişkin dişiler konak üzerindeyken bir defada 15-20 olmak üzere yaşamları boyunca yaklaşık 500 adet yumurta üretmektedirler. Yumurtalar yapışkan olmadıkları için konak vücudundan toprağa, konağın yuvası içine, tozlu yerlere ve kovuklara düşmekte, bazen de konak hayvanın tüyleri arasına 5-8 tanesi bir arada paketler hâlinde bırakılmaktadır

Ergin pirelerin kanatları bulunmamakta, sıçramaya elverişli yapıda olup, vücut uzunluklarınının 150 katı mesafeye (70 cm-1 metre) sıçrayabildikleri bildirilmektedir. Erkekler dişilerden daha kısa baş, göğüs ve karın belirgin olarak ayrılmıştır. Başın her iki yanında küçük anten içeren oluklar bulunmakta, anten erkeklerde erektil özellikte olup, çiftleşme esnasında erkeğe destek sağlamaktadır. Bileşik olmayan gözler bazı türlerde antenin önüne yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Bazı türlerde genal (oral) ve pronotal ctenidium denen tarak benzeri yapılar görülmektedir. Karnın son segmenti duyu kılları ile kaplanmış olup, pygidium denen duyu organını oluşturmaktadırlar. Dişi pirelerde spermateka, erkeklerde ise bir çift clasper ve penis bulunmaktadır (5, 7, 9, 10,11, 10).



Şekil 2.6 Ergin *Ctenocephalis felis* piresi. A:Erkek, B: Dişi (5)

2.4 EPİDEMİYOLOJİ

Pirelerin epidemiyolojisini etkileyen 3 önemli faktör bulunmaktadır:

Hava veya ortam sıcaklığı: Pirelerin epidemiyolojisinde çok önemli olup soğukta gelişme yavaşlamakta, sıcakta ise hızlanmaktadır. Dolayısıyla sıcak iklimli coğrafik bölgelerde, her mevsim gelişme görülürken; ılıman iklim bölgelerinde yaz ve bahar aylarında gelişme hızlı, kışın yavaş olmaktadır. Pire popülasyonu kurak geçen yaz aylarında azalırken, yağışlı yazlarda artmaktadır. Buna rağmen mikroklimatik ortamlar da önemli olmakta örneğin dışarıda kar yağarken kapalı yerlerdeki (barınaklar, ev ortamı vs.) sıcaklık pirelerin gelişmesi için uygun olabilmekte, böyle ortamlarda gelişmede bir gecikme olmamaktadır (5,13).

Nem ve gün ışığı: Konakların barındığı mağara, kömürlük veya depo gibi yerlerin gölgelik ve nemli olması pirelerin hayatta kalma şanslarını arttırmaktadır. Hatta beslenecek bir konak bulamaları bile nemli yerlerde 5-6 ay kadar canlı kalabilmektedirler. Larvaların gelişmesi için ortamdaki nisbi nemin %50 nin altına

düşmemesi gerekmektedir. Güneş ışığı ve kuraklık ise larvaların ölümüne sebep olmaktadır (5,13).

Gıda: Pirelerde konak spesifikliğı çok fazla gelişmemiştir, dolayısıyla ortamda kan emebilecekleri herhangi bir canlının bulunması yeterli olmaktadır. Kronik hastalıklara maruz kalarak zayıflamış veya düşük kondisyonlu hayvanlarda pire enfestasyonlarına daha fazla rastlanmaktadır (13).

Belirtilen bu epidemiyolojik faktörlere bağılı olarak pirelerin yaşam süresi bir aydan 2 yıla kadar uzayabilmektedir. Dolayısıyla bu durum pirenin konağına enfekte etme yeteneğini arttırmaktadır. Uzun süre boş kalmış enfeste barınak, kümes, mağara gibi yerlerde bulunan aç pireler, ortama giren yeni konaklara aniden saldırarak ağır enfestasyonlara neden olmaktadır (5).

Pireler zıplama özellikleriyle konaklarına tutunmakta ve konaktan 3-4 saat kadar kan emebilmektedirler. Konaklarını bulmada koku alma, sıcaklığı hissetme ve titreşimleri algılama yetenekleri önem taşımaktadır. Bu esnada tutundukları konakla birlikte uzak mesafelere taşınabilmektedirler (5, 13).

Konağın yaşadığı alanlar pirelerin başlıca bulaşma yerleri olmaktadır. Buralardaki pire popülasyonunun % 1'i erişkin, %34'ü yumurta, %57'si larva ve %8'i pupalardan oluşmaktadır. Yumurtadan çıkan larvalar beslenmek için uygun organik maddeleri kolaylıkla buradan temin edebilmektedirler. Pupa dönemini geçirecek kuytu, sıcak ve nemli ortam şartları burada sağlanmış olmaktadır. Kokondan çıkan genç pire, kan emmek için konağı hazır olarak ortamda bulmaktadır. Pireler sıcakkanlı canlılardan kan emdikleri için ölen canlının vücut ısısı düştüğünde konağı terk ederek yakınında bulunan farklı bir konağına geçmektedirler (5, 13).

2.5. ÖNEMLİ PIRE TÜRLERİ

Pireler konak spesifik özellik göstermemektedirler. İnsana spesifik pire türü bulunmazken yalnızca bir kısmı insanlardan kan emmektedir. Buna karşın pek çok pire türü ise evcil hayvanlardan kan emmektedir (5).

***Pulex irritans* (insan piresi):** İnsan piresi olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte dünyanın birçok kesiminde domuz, evcil kedi ve köpeklerde, ratlarda yaygın olarak görülmektedir. *P. irritans* kozmopolit bir yayılış göstermekte ve genellikle yerleşim

yerlerine uzak alanlarda bulunmaktadır. Baş kısmı ovaldır ve göz bulunmaktadır. Gözün altında oküler kıl bulunmakta, genal ve pronotal tarakların bulunmadığı bildirilmektedir (4, 14). Erkekleri 2-2.5 mm, dişileri ise 3-4 mm uzunluğundadır. Medikal önemi olan bazı patojenlerin naklinde rol oynamaktadır (6).

***Ctenocephalides felis* (kedi piresi):** Kedi piresi ılıman ve tropikal bölgelerde kedi ve köpeklerin en yaygın ektoparazitidir. Bu tür aynı zamanda rakun ve ratlarda da parazitlenmektedir. Dişileri 2-3, erkekleri 1-2 mm boyunda, kırmızımsı kahverenkli. Baş öne doğru uzamış olup boyu eninin iki katıdır. Genal taraktaki dikenler aynı boydadır (5, 6).

***Ctenocephalides canis* (köpek piresi):** Köpek, tilki ve kurt gibi karnivorlardan kan emen bu pirelere hayvanlarda ve insanlarda da rastlanmaktadır. Morfolojik olarak *C. felis*'e benzer ancak baş yuvarlak olup eni ve boyu hemen hemen eşittir. Genal tarağın ilk dikeni ikinciden belirgin olarak kısadır. Ergin pireler 3-4 mm boyunda ve kırmızı kahverenkli (4, 10).

***Xenopsylla cheopis* (oriental rat piresi):** Bu pire tropikal ve subtropikal bölgelerde veba hastalığı ve fare tifüsünün başlıca vektörü olup, evcil fareler üzerinde çok yaygın bulunmasına rağmen, farelerin az olması durumunda insan, köpek, kedi, tavuk ve diğer konaklar üzerinde de beslenebilmektedirler. Pronotal ve genal taraklarının bulunmadığı bildirilmiştir (4). Vücut açık sarı renklidir. Baş ön uçta yuvarlak yapıdadır. Göz kılı gözün önünden çıkmaktadır. Bu pire veba etkeni *Yersinia pestis*'in vektörü olması yönünden oldukça önemlidir. Aynı zamanda fare tifüsünü insanlara nakletmekte ve çeşitli parazitik helmintlerin ara konaklığını yapmaktadır (5).

***Nosopsyllus fasciatus* (kuzey rat piresi):** Genellikle Avrupa'da yaygındır. Türkiye'de de varlığı bildirilmiştir. Pronotal taraklar bulunur, ancak genal taraklar yoktur. Gözleri bulunmakta ve altında üç adet kıl vardır. Vücut 3-4 mm uzunluğundadır (5).

***Echidnophaga gallinacea*:** Kanatlı hayvanlarda çok sık görülen bu tür, tavukların dağılımı ile paralel olarak tüm dünyada görülmektedir. Bununla beraber evcil fare, kedi, köpek, at ve insandan da kan emebilmektedir. Küçük pireler olup dişileri 2 mm, erkekleri ise 1 mm'den daha kısadır. Başın ön tarafı keskin biçimde köşelidir. Genal ve pronotal tarakları yoktur (11, 15).

2.6 PİRE ENFESTASYONLARINDA PATOGENEZ VE KLİNİK BELİRTİLER

Pire ısırığına bağlı olarak özellikle kedi, köpek ve insanlarda alerjik reaksiyonlar görülebilmektedir. Pire ısırığına bağlı olarak meydana gelen patogeneze ve klinik belirtiler aşağıda verilmiştir (5, 7, 13):

İrkiltici etkileri: Kan emmek için konağa gelen pire uygun bir kapillar damar bulana kadar birkaç deneme ısırığı gerçekleştirmektedir. Bu ısırıklar deride irritasyona, kaşıntıya ve o bölgeye geçici bir lenfosit infiltrasyonuna sebep olmaktadır. Alerjik reaksiyonlarla ilgili olarak hayvan türlerinde farklılıklar olsa da bu lokal reaksiyonlar bütün konaklarda prensip olarak aynıdır. Bu nedenle pirelerle enfeste hayvanların huzursuz oldukları (stres faktörü), kondüsyon kaybı gösterdikleri, zayıfladıkları, kendilerini ısırma ve kaşıntı sebebiyle vücut yüzeyinde deri bütünlüğü ve kıl yapısının bozulduğu görülmektedir.

Sömürücü Etkileri: Çok fazla kan emmelerde (bir pire günde aşağı yukarı 0.3 mm³ kan emmektedir) ağır enfestasyonlarda özellikle kedi, köpek yavrularında ve kanatlılarda demir eksikliği anemisine sebep olmaktadır. Böyle hayvanların öldükleri gözlenmiştir. Bir pire konağına tutunduğunda 3.5 saat kan emebilmektedir. Bu esnada konakta yaptığı rahatsızlık sonucu orada uzun süre kalamamakta konağın hareketi ve kaşınma refleksiyle uzaklaşıp başka bir yerden tekrar ısırılmaktadır. Dolayısıyla konak üzerinde çok sayıda delik açmaktadır. Bu bölgelerde sızıntılar oluşmakta ve sindirebileceğinden fazla kan emmektedir, sindirilmemiş fazla kanı ise dışkıyla çıkarmaktadır.

Travmatik etkileri: Pireler beslenmek amacıyla deriyi delerek travmalara neden olmaktadır. Ayrıca deride tünel açan *Tunga penetrans* ve *Echidnophaga gallinacea* türleri doku kaybına, deformasyona ve ağır travmalara neden olmaktadır.

Allerjik reaksiyonlara yol açmaları: Küçük hayvanların dermatolojik problemlerinde diğer sebeplerin yanı sıra pireyle ilgili dermatitis olaylarına daha sık rastlanmaktadır.

Pire ısırığı dermatitisi: Pire ısırıldıktan sonra o bölgeye antikoagulant özellikli tükürüğünü vermektedir. Bu tükürük antijenik özellikte olup ısırık yerinde ağır irritasyon, yangı ve kızarıklığa neden olmaktadır. Pirenin ısırıldığı bölgede kırmızı nokta şeklinde bir delik ve onu çevreleyen kırmızı halka şeklinde bir kabartı görülmektedir. Bu papul (kabarcık) püstüllü veya kabuklu olabilmektedir. Konağın kendini ısırma ve sürekli kaşıma içgüdüğü sonucu deride nemli, purulent dermatits gelişmektedir. Kronik

durumda ise deride kalınlaşma ve hiperpigmentasyon gözlenmektedir. Yoğun enfestasyonlarda anemi gelişebilmektedir. Pirelerle sık sık enfestasyon durumlarında deride ciddi irritasyonlar ve buna bağlı olarak sekonder bakteriyel etkenlerin karıştığı dermatozlar görülmektedir.

Pire ısırığı dermatitisinde ana bulgu kaşıntıdır. Her yaş ve ırktaki kedi ve köpeklerde görülebilir. Pirenin varlığı ve kan emme olayı konakta bir stres durumu yaratmakta ve hayvanda klinik olarak kaşıntı, tüylerde dökülme, deride kabuklanma görülmektedir. Konakta erişkin pirenin ısırması sonucu iğne batması şeklinde kanama odakları şekillenmektedir. Bu lezyonlara yaygın olarak kuyruk kaidesi ve bel omurları boyunca rastlanmaktadır.

Köpek ve kedilerde pire alerjik dermatiti (FAD-flea allergy dermatitis): Pire ısırığının sebep olduğu, aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucunda oluşan bir deri hastalığıdır. Köpek ve kedilerde çok sık görülmektedir. Pire kan ile beslenirken konaklarına tükürük salgısı ile histamin benzeri bileşikler, enzimler, polipeptidler ve amino asitleri vermektedirler. Bu maddeler konakta aşırı duyarlılıklara neden olmaktadır. Köpeklerde pire ısırıkları dolaşımında IgE ve IgG antikorlarının artmasına ve 15 dakika ya da 24-48 saat içerisinde alerjik reaksiyonların gelişmesine neden olmaktadır. Sürekli olarak pire ısırıklarına maruz kalan köpeklerde bu antikorlar düşük düzeylerde kalmakta ve bunun sonucu olarak da erken veya gecikmiş deri reaksiyonları görülmektedir. Kedilerde de aynı patofizyolojik mekanizma ile pire alerjisi geliştiği düşünülmektedir (13, 16).

Klinik olarak kedilerde boyun, kulak çevresi, karın bölgesi, kuyruk ve arka bacakların iç bölgesinde küçük kabarcıklar ile kıl dökülmesi, kepeklenme ve tüm vucutta kaşıntı; köpeklerde ise vücudun birçok yerinde kabuklu papüller, deride yoğun kaşıntı ve kızarıklık ve bunlara bağlı gelişen sekonder enfeksiyon, sinirlilik ve kilo kaybı gibi komplikasyonlar görülebilmektedir (7).

Düşük düzeydeki pire enfestasyonu orta şiddette kaşıntıya sebep olabilmektedir. Çok sayıda pire enfestasyonuna maruz kalan kedi ve köpeklerde şiddetli kaşıntı, huzursuzluk, alopesi, dermatit ve anemi gelişebilmekte, kronik vakalarda deride sekonder bakteriyel ve mantar hastalıklarının gelişebildiği bildirilmektedir (17, 18).

2.7 PİRELERİN TANISI

Pirelerin tanısı genelde makroskobik olarak yapılmakta olup hayvanların üzerinde erişkin pirelerin görülmesiyle konmaktadır. Hızlı hareket ettikleri için yakalamak amacıyla konak vücuduna sprey şeklinde insektisid püskürtülmektedir. Hayvanın kılları sık dişli bir tarakla taranarak ölen veya bayılan pireler toplanmaktadır. Ayrıca bu amaçla yapışkanlı selofan bantlar da kullanılabilir. Bir başka teknik ise elektrik süpürgesi kullanımıdır (5, 13). Süpürgenin bağlantı boruları arasına pirelerin geçmemesi için sargı bezi gibi bir filtre geçirilmekte ve makine çalıştırılmaktadır. Süpürge pire bulunma ihtimali olan hayvanın tüyleri üzerinde veya çevrede gezdirilmekte; böylece pireler süzgeci geçemedikleri için yakalanmaktadır (5, 19).

Ortamda ise pirenin yumurta, larva ve pupaları aranmaktadır. Ayrıca konak üzerinde veya çevrede pire dışkılarına rastlanması önemli bir bulgudur. Bu dışkıları koyu kahverengi-siyah, kangal biçiminde döküntülerdir. İçeriğinde kan bulunduğu için nemli bir bez veya kâğıt mendil içinde ovalanırsa kırmızı renk çıkardığı görülmektedir (5, 20).

Köpek ve kedilerde pire alerjik dermatitis'inin teşhisinde, hastanın geçmişi, lezyonların yayılımı, diğer deri enfeksiyonlarının bulunmaması, tedaviye cevap vermemesi gibi durumlar göz önüne alınmaktadır. Hayvan üzerinde pirenin görülmesi ve aynı zamanda konak dışkısında *Dipylidium caninum* görülmesi pire varlığını gösteren önemli bulgulardır. Fakat bunların görülmediği durumlarda, intradermal deri testi ve kanda pire antijenine spesifik Ig E seviyesinin yükselmesi teşhise yardımcı olmaktadır (21).

2.8 TEDAVİ

Pireler ile mücadelede konak ve çevre ilaçlamasının kombine bir şekilde yapılması gerekmektedir (20).

Ergin pire mücadelesi: Öncelikle konak üzerinde bulunan ergin pireler yok edilmelidir. Bunun için insektisitler tablet, enjeksiyon, toz, sprey, şampuan, spot-on ve banyo şeklinde uygulanabilmektedir (7, 20).

Ruminant ve köpeklerde amitraz; organik fosforlu ilaçlardan malathion, koumafos, krotoksifos, triklorfon, foksim, etken maddeli ilaçlar; piretroit grubundan, permetrin,

siflutrin, sipermetrin, fenvalerat, flumetrin, deltametrin ve yeni geliştirilen imidakloprid, fipronil ve selamectin etken maddeli ilaçlar kullanılabilir (7, 20, 22).

Köpek ve kedilerde ilaç emdirilmiş pire tasmaları kullanılmaktadır. Pire enfestasyonu en çok kedi ve köpeklerde problem oluşturduğu için bu hayvanlarda kullanılan insektisidlerin etken madde, uygulama şekli ve etkilediği pirenin gelişme dönemleri Tablo 2.3'de verilmiştir (23).

Tablo 2.3. Köpek ve kedilerde pire mücadelesinde kullanılan ilaçlar ve uygulama şekilleri (23)

Etken Madde	Uygulama Şekli/periyo	Konak		Etkilediği dönem	
		Kedi İlk Uygulama Yaşı /Kilo	Köpek İlk Uygulama Yaşı /Kilo	Erişkin	Yumurta/Larva
İmidacloprid	Topikal/Ay	8 hafta	7 hafta	+	
imidacloprid/moxidectin	Topikal/Ay	9 hafta/ 0.9	7 hafta/ 1.3	+	
İmidacloprid/permethrin	Topikal/Ay		7 hafta	+	
Nitenpyram	Tablet/Gün	4 hafta/ 0.9	4 hafta/ 0.9	+	+
Spinosad	Çiğneme tableti/Ay		14 hafta	+	
Fipronil/(s)-methoprene	Topikal/Ay	8 hafta	8 hafta	+	+
Fipronil	Spot-on/ Sprey/Ay	8 hafta	8 hafta	+	+
Lufenuron	Tablet/Ay	4 hafta	4 hafta		+
	Süpansiyon/Ay	6 hafta			+
	Enjektabl Subcutan/ 6Ay	6 hafta			+
Lufenuron/ Milbemycin oxime	Tablet/Ay		4 Hafta/ 0.9	+	+
Metaflumizone	Spot- on/Ay	8 hafta		+	+
Metaflumizone/Amitraz	Spot- on/Ay		8 hafta	+	+
Permethrin	Topikal/Ay		4 hafta	+	
Dinotefuran/ Permethrin/ Pyriproxyfen	Topikal/Ay		7 hafta	+	+
Dinotefuran/Pyriproxyfen	Topikal/Ay	8 hafta		+	+
Permethrin/Pyriproxyfen	S prey/Ay		6 Ay	+	+
Selamectin	Topikal/Ay	8 hafta	6 hafta	+	+
Pyrethrins/Piperonyl butoxide/n-octyl Bicycloheptene dicarboximide/di-n-propyl isocinchomerionate	Banyo	12 hafta	12 hafta	+	

Kanatlılarda, az sayıda organik fosforlu (malation), karbamatlı (karbaril) ve piretrin grubu ilaçlar kullanılabilir. İlaçların *Ceratophylluslara* karşı toz, *Echidnophagalara* karşı ise solüsyon formunda kullanılması tercih edilmektedir (20).

Domuzlarda, propoksür (toz) ve flumetrin (pour-on) etken maddeli ilaçlar kullanılmaktadır (20).

Tavşanlarda, organik fosforlu, karbamatlı ve pretroid grubu insektisidler toz, banyo ve püskürtme şeklinde uygulanabilmektedir. Kireç-sülfür solüsyonları ve piyasada satılan

pire spreyleri (içerdikleri maddelerden dolayı) toksik olduğu için bu hayvanlarda kullanılmamalıdır (20)

Fare ve rat gibi laboratuvar hayvanlarında, temas yoluyla etkili propoksur ve flumetrin etken maddeli ilaçlar kullanılabilir (20).

Pirenin diğer gelişme dönemlerine karşı mücadele: Hayvanın yaşadığı, beslendiği yerde (hayvan türüne göre bu kümes, ağıl, ahır, ev veya kulübe mağara gibi her türlü barınak ve dış çevre vs) bulunabilecek yumurta/larva/pupa evrelerinin yok edilmesidir. Çünkü buralarda erişkin pireden çok yumurta, larva ve pupalar (%34'ü yumurta, %57'si larva ve %8'i pupa) bulunmaktadır (22).

IGR (Insect Growth Regulator) adı verilen böcek büyüme düzenleyicileri ve İDİ (Insect Development Inhibitors) adı verilen böcek gelişim düzenleyicileri son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar pirelerin gelişme dönemlerine (larva çıkışını ve gömlek değişimini engelleyerek) etkilemektedirler. Örneğin, lufenuron 30mg/kg dozda, köpek ve kedilerde ayda bir kullanıldığında yumurtadan larva çıkışını engeller. Dolayısıyla ortamda yeni nesil gelişemediği için zamanla erişkin pireler azalır ve hatta biter. Bu amaçla metopren ve fipronil etken maddeli ilaçlar da kullanılmaktadır (22).

Kapalı mekânlarda mekanik ve fiziksel önlem olarak elektrik süpürgesiyle sık aralıklarla ortam temizlenmeli, muhtemel pire formları toplanarak uzaklaştırılmalı ve iş bittikten sonra da süpürge torbası imha edilmelidir (19, 20).

Pet hayvanlarının üzerinde yattığı halı, şilte, örtü, paspas, kilim, yolluk, koltuk ve mobilya gibi eşyalar temizlenmeli (sıcak buhar veya sıcak suyla) ve dezenfekte edilmelidir. Bu amaçla borik asit gibi kimyasal maddelerden faydalanılabilmektedir. Ayrıca taşınabilir eşyalar gün ışığına çıkarılıp, larvaların ölmesi sağlanabilir; eğer böyle eşyalar temizlenemeyecek kadar enfekteyse imha edilmelidir (19, 20).

Kapalı mekânlarda (ev, depo) pireleri yakalamak için ışık tuzakları kullanılabilir. Bu tuzaklar 510-550 nm dalga boyunda yeşil ışık yayarak pireleri (özellikle kedi piresi) kendine çekmektedir. Düzenek kurulup ortamda 20 saat çalıştırıldığında pirelerin %86'sı toplanabilmektedir (19, 20).

Dış ortamda pire mücadelesinde biyolojik mücadele yöntemlerinden de faydalanılmaktadır. Bu amaçla pirelerin doğal düşmanları olan böcekler kullanılmaktadır. Örneğin pirenin pupa dışında diğer gelişme dönemlerini yok eden karıncaların; pire avcısı olarak bilinen Histerid, Staphylinid, Tenebrionid koleopteraların ortamda bulunması sağlanmaktadır. Böcek seven nematodlardan *Steinernema carpocapsae*, pirelerin larva ve pupalarına saldırılmaktadır. Bu canlılar torfla beraber karıştırılarak arazi toprağına dağıtılmaktadır. Böylece hem ilaç tasarrufu sağlanmakta hem de doğal denge bozulmamış olmaktadır (19).

2.9 KORUNMA VE KONTROL

Evcil hayvanları enfeste edecek pirelerin serbest yaşayan canlılardan gelme ihtimali göz önüne alınarak mümkünse çevredeki diğer hayvanlar özellikle sahipsiz sokak köpek ve kedileri ilaçlanmalıdır. Ortama yabancı hayvan giriş çıkışı engellenmeli, kemirgen ve fare mücadelesi yapılmalıdır. Evcil hayvanlara verilen gıda maddeleri tüketilmemişse çevrede bırakılmamalı (özellikle geceleri) veya etrafa atılmamalı; böylece bunları yemek için gelecek kontrol dışı hayvanların taşıdıkları pirelerin bulaştırılmasının önüne geçilmelidir (19, 20).

Ağır enfestasyona maruz kalmış kümeslerin, bütün altlığı gerekirse tamamen atılmalı, hatta radikal bir önlem olarak kümes tamamen boşaltılıp ilaçlanmalıdır. Ayrıca ortam alev makinesiyle yakılmalı veya uygun bir dezenfektan ile dezenfekte edilmelidir (19). Bu aşamada mümkünse yukarıda bahsedilen mücadele yöntemleri aynı gün içerisinde veya aynı anda yapılmalıdır. Çünkü hayvanlar ilaçlanıp ortam ilaçlanmaz ise erişkin pireler hayvan üzerinden kaçarak gizlenecek bir yer bulmakta ve daha sonra yeniden ortama çıkmaktadırlar (19).

Kontrol çalışmalarında en büyük problemi pirenin pupa dönemi oluşturmaktadır. Çünkü bunlar bir kokon içinde olup halıların altında veya zemindeki yarık ve çatlaklarda yada toz toprak içerisinde bilhassa hayvan gübrelere saklanmaktadırlar. Böylece ortama uygulanan insektisidlerle temas etmedikleri için etkilenmemekte ve enfestasyonun devamını sağlamaktadırlar. Ayrıca pupadan erişkinin çıkması 2-4 haftayı bulmakta, çoğu ilacın reziduel etkisi iki haftayı geçmediğinden, genç pire bu esnada bir konak bulup yaşam siklusunu devam ettirebilmektedir. Bu sebeple mücadeleye uzun süre devam edilmelidir (24).

Sürekli olarak hayvanların vücudu ve yaşadığı ortam gözlenmeli, oluşabilecek yeni bulaşların önüne geçilmelidir. Bu amaçla insektisid kullanılmayacak kadar genç ve genel durumu kötü hayvanların tüyleri sık dişli bir tarakla taranarak pire yönünden kontrol edilmelidir (24).

Dış çevrede; örneğin ilaçlamanın pratik olmayacağı geniş bahçelerde, büyük alanlarda, organik atık ve materyaller çevreden uzaklaştırılmalı, otlar biçilip kısaltılmalı ve pirelerin gelişme dönemlerinin yerleşebileceği ortamlar bozulmalıdır (24).

Pire mücadelesi ve kontrolünde aşağıdaki durumlardan dolayı bazı durumlarda başarısızlıklar söz konusu olabilmektedir (24).

- Hayvan sahiplerinin talimatlara ve mücadele stratejisinde belirtilen önemli noktalara yeterince dikkat etmemeleri,
- Yapılacak işlemlerin çok olması, zahmetli oluşu ve ilaçların pahalılığından dolayı hayvan sahiplerinin mücadeleyi yarım bırakmaları,
- Alerjik veya alerjik olmayan hayvanlarda uygun olmayan topikal ilaçların kullanılması,
- Enfestasyonlu bölgelerde ve alanlarda insektisid uygulamalarındaki yetersizlikler,
- Çevre ilaçlamasında kısa, etkili ve sadece erişkin pire öldürücü kimyasalların kullanılması,
- Evlerde ilaç uygulamalarından kısa bir süre sonra halı, kilim gibi eşyaların ve zeminin yıkanarak ilaç etkinliğinin azaltılması.

2.10 PİRELERİN ARA KONAK ve VEKTÖR OLARAK ÖNEMLERİ

Pirelerin hayvanlarda ve insanlarda ciddi hastalıklara yol açan patojenik ajanların naklinde önemli olduğu bilinmektedir (5). Önemli pire türleri ve naklettikleri hastalık etkenleri Tablo 2.4'de verilmiştir.

Tablo 2.4 Pire türleri, konakları ve naklettiği hastalık etkenleri (5)

Pire Türü	Konak	Naklettiği Hastalık Etkeni
<i>Ctenocephalides felis felis</i>	Kedi, köpek, insan, fare, rat, primat, maymun	<i>Dipylidium caninum</i> (AK), <i>Hymenolepis nana</i> , <i>H.dimunata</i> (AK), <i>Dipetalonema (Acanthocheilonema) reconditum</i> (VEK), <i>Yersinia (Pasteurella) pestis</i> (VEK) veba, <i>Rickettsia typhi mooseri</i> (VEK) murin tifüs, <i>Bartonella henselae</i> (kedi tırnağı hastalığı)
<i>Ctenocephalides canis</i>	Köpek, kedi, insan	<i>D. caninum</i> , <i>H.nana</i> (AK), <i>D. (Acanthocheilonema) reconditum</i> (VEK) <i>Y. pestis</i> (VEK) veba
<i>Pulex irritans</i>	İnsan, köpek, kedi, domuz, rat	<i>D. caninum</i> , <i>H.nana</i> (AK), <i>D. (Acanthocheilonema) reconditum</i> (VEK) <i>Y. pestis</i> (VEK) veba, <i>R. typhi</i> (moosen) (VEK) murin tifüs
<i>Tunga penetrans</i>	İnsan, domuz, babon	
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Rat (<i>Rattus norvegicus</i> , <i>R.rattus</i>), fare (<i>Mus musculus</i>), diğer kemiriciler	<i>H.dimunata</i> , <i>H.nana</i> (AK) <i>Y. pestis</i> (VEK) veba, <i>R. typhi</i> (mooseri)(VEK) murin tifüs, <i>Haemobattionella muris</i> (VEK)
<i>Leptopsylla segnis</i>	Fare, rat	<i>R. typhi</i> (mooseri)(VEK) murin tifüs
<i>Ceratophyllus (Nosopsyllus) fasciatus</i>	Rat, fare	<i>H.dimunata</i> (AK) <i>Y. pestis</i> (VEK) veba, <i>R. typhi</i> (mooseri)(VEK) murin tifüs, <i>Trypanosoma lewisi</i>
<i>Ceratophyllus gallinae</i>	Tavuk, kümes hayvanları, insan, pet hayvanları	
<i>Ceratophyllus columbae</i>	Güvercin	
<i>Ceratophyllus garei</i>	Ördek, su kuşları	
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	Tavuk, güvercin, ördek, kemirgen, köpek, kedi, at, insan	<i>R. typhi</i> (mooseri) (VEK) murin tifüs, <i>Y.pestis</i> (VEK) veba, <i>Salmonella tyhpimurium</i>
<i>Spillopsyllus cuniculi</i>	Tavşan	Tavşan mxyomatozis virüsü (VEK) <i>Trypanosoma cuniculi</i> , <i>Trypanosoma nabiasi</i>

AK: Ara konak, **VEK:** Vektör

Helmintler: *Dipylidium caninum*, köpek, kedi ve insan pireleri tarafından taşınmaktadır. Son konak dışkısında bulunan bu sestodun yumurtaları, pire larvaları tarafından beslenirken alınır ve pirenin vücut boşluğunda gelişerek sistiserkoyid formuna dönüşür. Konak tarafından kaşınma ve yalanma sırasında, erişkin pireler yutulduğunda etkenler son konağa geçmektedir. İnsanlarda, pire ile enfestasyonlu pet hayvanları ile temas esnasında alınan pireler özellikle çocuklar tarafından tesadüfen yutulabilmektedir. Benzer şekilde *Hymenolepis nana* ve *H. diminuta*, kedi ve rat pireleri tarafından taşınmaktadır. *Dipetalonema reconditum*'un mikrofilere ise kedi piresinin konaktan kan emmesi sırasında konağa bulaştırılmaktadır (5, 20, 25).

Bakteriler: Veba hastalığı etkeni *Yersinia (Pasteurella) pestis* kemirgen hayvanlarda ve insanlarda görülmektedir. Bu bakteri zoonotik karakterli ve öldürücüdür. Pireler tarafından nakledilen en önemli hastalıktır. Vektörlerinin özellikle kemirici, köpek, kedi ve insan pireleri (elliden fazla soy) olduğu bildirilmiştir (26). Etken, erişkin pire bağırsağında gelişmekte; ön midelerinde çoğalan bakteriler tam veya yarım tıkaç oluşturmaktadır. Özellikle *Xenopsilla* soyu pireler kan emebilmek için önce kusarak tıkaçı atar ve böylece konağı enfekte etmektedir. Bu hastalık subtropikal bölgelerde, sığanlar ve insanlar arasında bir yayılım göstermektedir. Eski çağlarda geniş bir coğrafyada büyük salgınlara yol açmıştır. Günümüzde insanlarda veba hastalığı nadir olarak görülse de Afrika, Asya, Güney Amerika ve Amerika Birleşik Devletlerinin batı eyaletlerindeki yabani rodentlerde (Sylvatik Veba) hala varlığını sürdürmektedir (5, 20, 25).

Bartonella (Rochalimaea) henselae'nin sebep olduğu kedi tırmığı hastalığı, bütün dünyada zoonik karakterli bir hastalık olup, özellikle immun yetmezliği olan insanlarda; proliferatif, deride neovasküler oluşumlar ve iç organlarda lezyonlarla ortaya çıkmaktadır. Etken, kedi pirelerinin bağırsağında bulunmakta, pire dışkısı ile kedi ve insanlara bulaşmaktadır. Aynı zamanda insanların kedi ile teması esnasında tırmıkla oluşan çiziklerden de bulaşabilmektedir. Etken kedilerde önemli bir hastalık belirtisi göstermemektedir (5, 25, 27).

Rickettsialar: *Rickettsia typhi (mooseri)*, kemirgenlerde ve insanlarda endemik tifüse yol açmaktadır. *R. pavlovskyi* yabani kemirgenler ve insanlarda hemorajik nefritis'e, *R. coneri* ise köpek ve insanlarda Marsilya hummasına neden olmaktadır. Önceden Rickettsialar grubunda yer alan *Coxiella burnetii* yabani ve evcil hayvanlardan insanlara

geçerek Q humması enfeksiyonuna sebep olmaktadır. Bu bakterinin esas vektörü keneler olmasına rağmen sıçan piresi tarafından da nakledilebilmektedir. Rickettsialar pirelerin bağırsağında çoğalmaktadır. Etkenler, enfekte pire dışkısının, ısırık yerlerine ve gıda maddelerine bulaşması veya enfekte ellerin ağıza, göze sürülmesiyle insanlara geçmektedir. Uygun şartlarda etkenlerin pire dışkısında beş yıla kadar canlı kaldığı belirlenmiştir (5, 25).

Virüsler: Tavşan myxomatosis virüsü, tavşan piresi *Spilopsyllus cuniculi* tarafından bulaştırılmaktadır. Virüs Avrupa ve Avustralya'da tavşanlarda yaygın bir şekilde görülmektedir. Bu etkene tavşan bakıcılarında da rastlanmıştır (5, 28).

Tularemia: Tularemi, *Francisella tularensis* enfeksiyonunun sebep olduğu kemirgen ve lagomorfların bakteriyel zoonoz bir hastalığıdır. Ölüm oranı %5'in altında olmasına rağmen, insanlardaki vakalar ciddi olmaktadır. En önemli vektörleri keneler ve sineklerdir. Pirelerin vektörlük potansiyelleri tularemi açısından önemsiz olarak nitelenmektedir (29, 30). Bununla birlikte, pirelerin bazı durumlarda *F. tularensis*'i mekanik olarak taşıdığı bildirilmiştir (15).

Pirelerin Zoonotik Önemi: Pireler (Siphonoptera) kan emen ve morfolojik olarak eşsiz ektoparazitlerdir. Bütün dünya'da insanlarda dâhil olmak üzere birçok sıcakkanlı hayvandan kan emmektedirler. İnsan ve hayvanlardan kan emerek beslenen Pulicidae ailesindeki birçok pire türü ve Ceratophyllidae, Leptopsyllidae ya da Vermipsyllidae ailesindeki diğer önemli pireler ile Hystrichopsyllidae ve Rhopalopsyllidae ailesindeki pireler medikal ve veteriner öneme sahiptirler. İnsan piresi (*Pulex irritans*), kedi piresi (*Ctenocephalides felis*), köpek piresi (*Ctenocephalides canis*), oriental rat piresi (*Xenopsylla cheopis*) ve insan etine gömülen pire (*Tunga penetrans*) hem insanlarda hemde hayvanlarda zoonotik enfestasyonlara sebep olmaktadır. Pireler önemli derecelerde rahatsızlıklara ve pire ısırığına bağlı olarak çeşitli sekonder enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Pire ısırığına bağlı olarak konakta alerjik reaksiyonlar ve dermatitis gelişebilmektedir. Bunlara ilaveten pire enfestasyonlarında yoğun irritasyon ve myxomatosis, Q fever, tularemia, murin tifus, sylvatic epidemik tifus, veba, murin trypanosomiasis, tavşan trypanosomiasisi, canine filariasis, şerit (*Dipylidium caninum*), rodent şeriti (*Hymenolepis diminuta*) ve cüce şerit (*Hymenolepis nana*) gibi çeşitli hastalık etkenlerini nakletmektedirler (31).

2.11 PİRELER ÜZERİNE YAPILMIŞ MOLEKÜLER VE FİLOGENETİK ÇALIŞMALAR

Moleküler tekniklerin gelişimi ile birçok ektoparazitin soy, tür ve alttür identifikasyonlarının daha güvenilir bir şekilde yapıldığı gözlenmiştir (8, 32). Bu ektoparazitlerden bütün dünyada ve Türkiye’de memelileri ve kuşları enfekte eden çeşitli pire türlerinin spesifik teşhisleri için çeşitli moleküler markırlar (ITS1, ITS2, 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rDNA, Elongation Factor 1-alpha, cox1, cox2) kullanılmıştır (32-35). DNA barkodlama gibi moleküler identifikasyon teknikleri pire çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmıştır (34, 35). Nitekim insan ve diğer omurgalı konakların çeşitli pire türlerinin genetik diversitesi, kriptik türler, popülasyon yapısı ve filogenileri üzerine yapılan moleküler çalışmalarda mt-COI gen bölgesi yaygın bir şekilde kullanılmış ve tür içerisinde çeşitli cladelere ve haplotiplerin varlığı ortaya konmuştur (8, 35-38).

Vobis ve ark., (32) Almanya, Macaristan, Amerika, Avustralya, Brezilya ve Güney Afrika’da topladıkları 7 farklı türe (*X. cheopis*, *A. erinacei*, *C. canis*, *C. felis*, *T. penetrans*, *P. irritans*, *N. fasciatus*) ait toplam 31 pire türü arasındaki filogenetik yakınlığı incelemek amacıyla internal transcribed spacer 1 (ITS1), internal transcribed spacer 2 (ITS2) ve mitochondrial 16S ribosomal RNA (mt16S-rDNA) gen bölgelerinin sekanslarındaki nükleotit farklılıklarını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar (32) bu gen bölgelerinin pire türlerini ayırt etmede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda ilgili gen bölgelerinde *C. felis* ve *T. penetrans*’ın aynı tür içerisindeki farklı izolatları arasında bazı farklılıkların olduğunu da tespit etmişlerdir. Bunun yanında *C. felis* izolatları arasındaki farklılığı belirlemek için 4 farklı random binding primer kullanmışlar ve bu primerlerin de farklı *C. felis* izolatları arasında ayırım yapabildiğini rapor etmişlerdir.

Slapeta ve ark., (36), Avustralya’nın 5 farklı eyaletinde 2009-2010 yılları arasında veteriner kliniğine getirilen 291 hayvandan (151 köpek, 69 kedi ve 71 kategorize edilemeyen köpek veya kedi) 2530 pire örneği toplamışlardır. Morfolojik analizler ile en yaygın türün kedi piresi *C. felis felis* (%98.8, 2500/2530) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (36), *C. felis felis*’in mt-COI gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda Avustralya’da bu türün tek haplotipinin olduğunu rapor etmişlerdir.

Lawrence ve ark., (35) Çek Cumhuriyeti ve Romanya’da sahipli kedi ve köpeklerden toplam 163 pire (97 adet Çek Cumhuriyeti, 66 adet Romanya) toplayarak pirelerin morfolojik ve moleküler analizlerini yapmışlardır. Morfolojik analizler sonucunda pirelerin 59’u (%60,82) *C. felis felis*, 30’u (%30,93) *C. canis*, 7’si (%7,22) *C. gallinae* ve 1’i (%1,03) *N.fasciatus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan *C. felis felis* türünün *cox1* geninin mt-DNA sekansı sonucunda bu türün *cox1* haplotip 1 içerisinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda kedi ve köpeklerde yüksek oranda görülen *C. canis* türünün mt-DNA sekansı sonucunda bu türün kedi piresi *C. felis orientise* sister clade olduğunu rapor etmişlerdir.

Zurita ve ark., (37) farklı coğrafik bölgelerde (İspanya, İran ve Güney Afrika) köpeklerden (*Canis lupus familiaris*) topladıkları *C. felis* ve *C. canis* türlerinin ITS1, ITS2, 18S rRNA ve *cox1* gen bölgelerinin sekansları ile bu iki türün taksonomik durumlarını ve populasyon içi çeşitliliği ve spesifik sekans farklılıklarını araştırmışlardır. 18S rRNA parsiyel gen bölgesinin *C. canis* ve *C. felis* türlerini ayırt etmede ve bu türler içindeki filogenetik ilişkiyi belirlemede yeterli olmadığını, ancak ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin *Ctenocephalides* soyunun belirlenmesinde spesifik olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (37) aynı zamanda *C. felis*’in *cox1* mtDNA sekansında 3 ana haplotipin bulunduğunu ve *cox1* sekansında birçok endonükleazın tanımlanmış olduğunu ve bu endonükleazların, *C. felis*’in farklı haplotiplerinin ve *C. felis* ve *C. canis* tür ayrımında kullanılabilirliğini belirlemişlerdir.

Lawrence ve ark., (34) Avustralya, Fiji, Tayland ve Seyşeller de kozmopolitan bir tür olan kedi piresi *C. felis*’in alt tür bazında tanımlanmasını doğrulamak amacıyla iki mitokondrial markır (*cox1* ve *cox2*) kullanmışlardır. Araştırmacıların (34) *cox1* ve *cox2* tabanlı filogenetik çalışmaları sonucunda *C. felis* içerisinde 5 farklı clade’in bulunduğunu ve *C. felis felis* olarak tanımlanan alttürün iki clade (Clade I ve Clade IV) içerisinde kümelendiğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar (34) her iki gen bölgesinin *Ctenocephalides* türlerinin populasyon yapısını ve filogenilerini açıklamada uygun genetik markırlar olduklarını rapor etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Pire Örneklerinin Toplanması

Çalışma materyalini oluşturan pire örnekleri, 2015-2016 yılları arasında Kayseri yöresinde çeşitli hayvan barınakları (köpek ve kedi barınakları ile koyun ağılları) ile çeşitli binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanmıştır. İlgili alanlarda tespit edilen pireler, üzerlerine alkollü pamuk bastırılarak forsepsler yardımıyla toplanmış ve içerisinde %70 etanol bulunan vida kapaklı viallere konulmuştur. Örneklere protokol numarası verilerek kayıtları sağlanmıştır. Toplanan pire örnekleri soğuk zincir altında laboratuvara intikal ettirilmiştir.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1 Pire Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu

Laboratuvara getirilen pire örnekleri stereo-mikroskop altında incelenmiş ve ilgili teşhis anahtarlarına göre tür identifikasyonları gerçekleştirilmiştir (1, 39-43). Entegre digital kamera sistemiyle (BX41 Olympus) pirelerin morfolojik özellikleri görüntülenmiş ve veriler kayıt altına alınmıştır. Kayıt altına alınan pire örnekleri moleküler analizlerde kullanılmak üzere %70 etil alkol içerisinde muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2 Genomik DNA İzolasyonu

%70 etil alkol içerisinde muhafaza edilen pire örneklerinin moleküler karakterizasyonları için tür bazlı olarak seçilen izolatlardan bireysel olarak genomik DNA ekstraksiyonu yapılmıştır.

Pirelerden genomik DNA ekstraksiyonu, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda bulunan ekstraksiyon ünitesinde yapılmıştır. %70'lik etil alkol solüsyonu içerisinde muhafaza edilen örneklerin her biri önce steril DNA'se RNA'se free mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve üzerlerine sıvı azot ilave edilerek steril pestle ile toz haline getirilmiştir. Daha sonra tüplerin üzerine 20µl

proteinase K ve 150 µl Digestion Solution ilave edilerek hemen 1dk vortekslenmiş ve 56°C'de 1 gece su banyosunda tutulmuştur. Tüplerden DNA ekstraksiyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit) ile üreticinin açıklamalarına göre aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- a) 1 gece su banyosunda bekletilen tüpler üzerine 20 µl RNase A eklenerek 30 sn vortekslenmiştir.
- b) Daha sonra 200 µl Lysis solüsyon eklenmiş ve homojen bir karışım oluncaya kadar yaklaşık 15 sn vortekslenmiştir.
- c) Tüpler üzerine 400 µl 50% etanol eklenmiş ve yine vortekslenmiştir.
- d) Vorteks işlemini takiben karışım pipet yardımıyla alınarak GeneJET Genomic DNA Purification Column içerisine konulmuş ve 6000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- e) Santrifüj sonunda dibe çöken süpernatantlar dökülmüş ve miniprep columnlar yeni 2 ml'lik toplama tüplerinin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep columnlar içerisine ilk yıkama solüsyonu olan 500 µl Wash Buffer I ilave edilerek 8000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- f) Miniprep columndan süzülerek ependorfun dibine çöken sıvı uzaklaştırılmış ve miniprep columnlar tekrar bu tüplerin içerisine yerleştirilmiştir. Miniprep kolonlar içerisine 500 µl of Wash Buffer II ilave edilerek maksimum g'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- g) Yıkama işlemi sonucu dibe süzülen sıvı kısım uzaklaştırılarak miniprep columnlar boş ependorflar içerisine yerleştirilmiştir. Herhangi bir solüsyon eklenmeden boş tüpler maksimum g'de 1 dakika santrifüj edilerek yıkama solüsyonları içerisindeki etanolün tamamen uçması sağlanmıştır.
- h) Herbir örneğe ait miniprep columnlar 1,5 ml'lik yeni ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine, Elution Buffer'dan 50 µl ilave edilerek oda ısısında 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 8000 g'de 1 dakika santrifüj yapılarak

genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA'lar analize tabi tutulana kadar derin dondurucuda (-20 °C) muhafaza edilmiştir.

Elde edilen genomik DNA ekstraktlarından alınan örnekler Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) cihazında işlenerek DNA izolasyon etkinliği ve total genomik DNA miktarları (ng/μl) belirlenmiştir.

3.2.3 Mitokondrial Cytochrome Oxidase Subunit I Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Elektroforezi

Pirelerden elde edilen genomik DNA ekstraktları mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mt-COI) gen bölgesinin parsiyel 709 bp fragmentini amplifiye eden LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') ve HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGT GACCAAAAATCA-3') (44) primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur.

Reaksiyon karışımı 25μl final konsantrasyonda; 2,5 μl 10XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.4 μM her bir primer, 0.2 mM her bir dNTP, 2U Taq DNA polymerase ve 10-20ng template DNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

Laminar kabin içerisinde steril şartlarda hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 0,5 ml'lik DNA'se ve RNA'se free ependorf tüpleri içerisine konulmuştur. Tüpler thermalcycler cihazına (Thermo Hybaid) yerleştirilerek amplifikasyona tabi tutulmuştur.

Mt-COI gen bölgesinin amplifikasyonu için gerekli PCR şartları aşağıda verilmiştir (44).

- | | |
|-----------------|-------------|
| 1. 96 °C 1 dk | 1 siklus |
| 2. 94 °C 1 dk | } 35 siklus |
| 3. 55 °C 1 dk | |
| 4. 72 °C 1,5 dk | |
| 5. 72 °C 10 dk | 1 siklus |

PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans

örneklere ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır. Mt-COI gen bölgesi yönünden PCR ile amplifikasyon sonucu elde edilen ampliconların görüntülenmesi amacıyla yatay elektroforez tankı (CLP) kullanılmıştır. Toplam hacim 1 lt olacak şekilde; 980 ml deiyonize su üzerine 20 ml 1XTAE (Tris-acetate-EDTA) buffer eklenerek elde edilen solüsyon, hem jel hazırlanmasında hem de elektroforez tankının içerisinde doldurulmasında kullanılmıştır. Ürünlerin görüntülenmesinde %1,5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin her birinden 10 µl alınıp 90 V'da 50 dk, jel elektroforeze tabii tutulmuştur. Sonuçlar Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

3.2.4 Klonlanma ve Plazmid Pürifikasyonu

Mt-COI gen bölgesi yönünden PCR analizlerinde pozitif belirlenen ve uygun konsantrasyonda olan izolatlardan seçilmiş ampliconlar ilgili gen bölgesinin kayıpsız sekansının elde edilebilmesi amacıyla klonlanmış ve plazmid pürifikasyonu yapılmıştır. Uygulanan klonlama basamakları aşağıda verilmiştir.

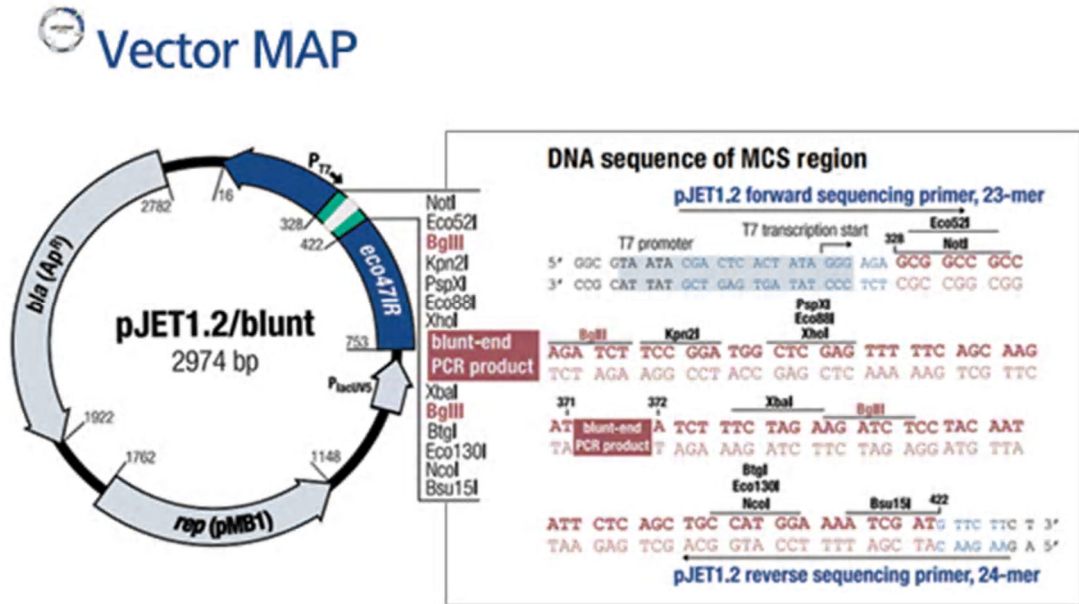
Ligasyon basamağı: Mt-COI gen bölgelerinin PCR'ı sonucu jel üzerinde belirlenen ampliconlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Jel pürifiye örneklerin klonlanmasında CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır. Klonlama reaksiyonu kullanıcının önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde hazırlanmış ve yapılmıştır:

2X Reaction Buffer	15 µl
PCR product (10 ng/ µl)	1,5 µl
DNA Blunting enzyme	1,5 µl
Toplam	18 µl

Hazırlanan karışım vortekslenip santrifüj edildikten sonra 70 °C'de su banyosunda 5 dk inkübe edilerek hemen buz üstüne alınmıştır.

Karışım üzerine daha sonra 1 µl pJET1.2/blunt CloningVector (50 ng/ µl) ve 1 µl T4 DNA Ligaz eklenerek son hacmi 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 5 dk oda

sıcaklığında bekletildikten sonra 5 µl'si transformasyon için kullanılmıştır. pJET1.2/blunt CloningVector haritası Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 pJET1.2/blunt CloningVector Haritası

Transformasyon Basamağı: 5 µL'lik ligasyon ürünü buz üzerinde tutulan *E. coli* TOP 10 hücrelerine eklendi ve buz üzerinde 30 dk inkübe edildi. Karışım, önce 42°C'de 1 dk daha sonra buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra üzerine 250 µL SOC Medium eklenmiştir. 37°C'de çalkalayıcı üzerinde 1.5 saat inkübe edilen transformasyon karışımı LB (Lurie-Bertani) katı besiyerine ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.

LB katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet uçları ile alınarak yeniden LB katı besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 1 gece daha inkübasyona bırakılmıştır.

Koloni Screening PCR: LB katı besiyerinde üreyen kolonilerin rekombinant plasmidi içerip içermediğini anlamak için Koloni PCR yapılmıştır. Koloni PCR için 10 µl ITaq master mix'i, 0,4 µl pJET1.2 Forward ve pJET1.2 Reverse primerleri ile bir karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma katı besiyerinde üreyen kolonilerden steril pipet ucu ile alınan örnekler bulaştırılarak toplam 20 µL'lik karışımlar hazırlanmıştır. Thermalcyclerda protokol initial denaturation: 95 °C'de 3 dk; 25 siklus, denaturation: 94 °C'de 30 s, annealing: 60 °C'de 30 s, extension: 72 °C'de 1 dk; final extension: 72

°C'de 10 dk olacak şekilde programlanmıştır. PCR sonucu elde edilen ampliconlar %1.5'lük agaroz jelde yürütülüp görüntülenmiştir.

Plazmid DNA: Pozitif bulunan kolonilerden plazmid DNA'sı elde etmek için LB katı besiyerinden steril özeler ile alınan koloniler ampisilinli 5 ml'lik LB sıvı besiyerlerine ekimi yapılarak 37°C'de sallayıcı üzerinde bir gece inkübe edilmiştir. Üreme gözlenen sıvı besiyerlerinden alınan örnekler 2 mL'lik ependorflar içerisine alınarak 6000g'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım dökülüp pelet daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Peletten plazmid izolasyonu için Axygen plazmid pürifikasyon kit prosedürü takip edilmiştir. Axygen plazmid pürifikasyon ticari kitinin önerileri doğrultusunda plazmid ekstraksiyon işlemi şu şekilde yapılmıştır:

- 1- -20 °C'de saklanan peletin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandıktan sonra üzerine 250 µl Buffer S1 eklenmiş ve vortekslenmiştir.
- 2- Üzerine 250 µl Buffer S2 eklenmiş ve el ile 6 kez hafifçe çalkalanmıştır.
- 3- Daha sonra üzerine 350 µl Buffer S3 eklenmiş ve yine el yardımı ile hafifçe 8 kez çalkalanmıştır
- 4- Karışım daha sonra 12,000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir
- 5- Santrifüj sonrası supernatant alınıp AxyPrep Plazmid Miniprep column içine konulup 12,000×g'de 1 dk santrifüj yapılmıştır
- 6- Alttaki toplama tüpüne süzülen sıvı boşaltılmış ve üstteki Miniprep column tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir.
- 7- Yıkama amacıyla her bir Miniprep column üzerine 500 µl Buffer W1 ilave edilerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir
- 8- Santrifügasyondan sonra alta süzülen sıvı uzaklaştırılmış ve Miniprep column aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir
- 9- Tüp üzerine 700 µl Buffer W2 eklenerek 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu basamak 2 kez tekrar edilmiştir.

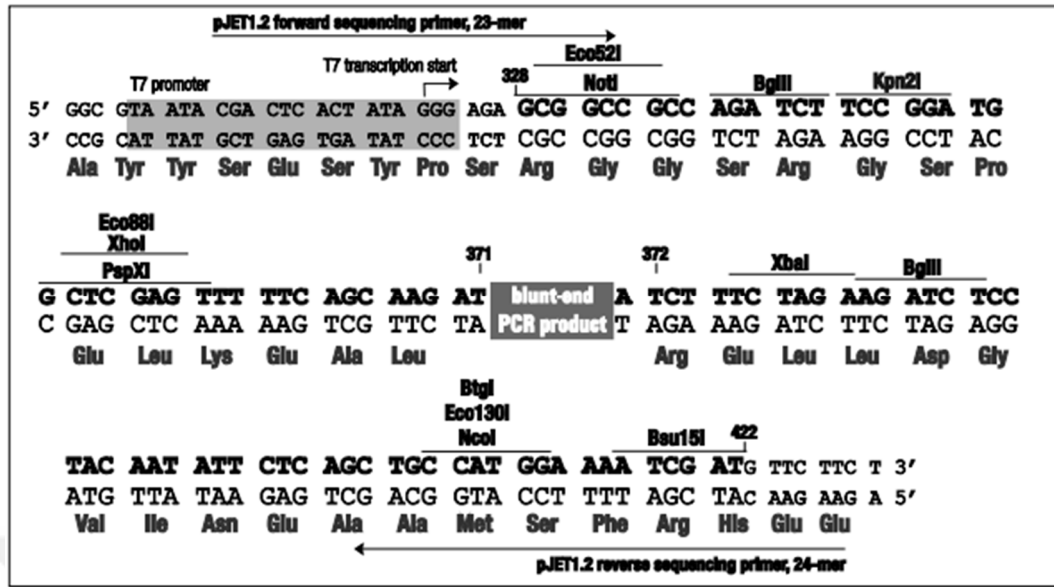
10- Toplama tüpüne süzülen sıvı tekrar uzaklaştırılmıştır. Miniprep column bu kez, yeni 2 ml'lik DNA'se RNA'se free bir tüp içerisine yerleştirilmiş ve membrana bağlanan Buffer W2'yi uzaklaştırmak için 12.000×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

11- Santrifüj sonrası Miniprep column temiz bir 1.5 ml'lik tüp içerisine yerleştirilmiş ve plazmid DNA'sı elde etmek amacıyla üzerine 60 µl Eluent eklenmiş ve oda ısında 1 dk beklendikten sonra 12.000 ×g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

12- Santrifüj işlemi sonrası 1,5 ml'lik steril tüp içerisine süzülen sıvı plazmid DNA'sı, sekanslamaya gönderilinceye kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Restriksiyon ve PCR Analizleri: İzole edilen rekombinant plazmidler, restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve vektör spesifik primerler ile PCR analizleri yapılarak klonlanan genin varlığı yönünden araştırılmıştır. Enzim kesimi için Aval ve Xbal (Thermo Scientific) enzimleri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Elde edilen plazmid DNA'sını restriksiyon enzimleri ile kesmek için aşağıdaki oranlarda master mix hazırlanmıştır:

Steril PCR grade Su	13 µl
10X FastDigest® buffer	2 µl
DNA	4 µl
FastDigest® enzyme	1 µl
Toplam	20 µl



Şekil 3.2 Aval ve XbaI (Thermo Scientific) enzimlerinin bağlanma noktaları

Karışım vortekslenmiş ve 37 °C'de 5 dk su banyosunda inkübe edildikten sonra %1.5'lik agaroz jele yüklenerek klonlanan genin varlığı yönünden incelenmiştir. Plazmid DNA'ların amplifikasyonu amacıyla pJET1.2 Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3', Thermo Scientific) ve pJET1.2 Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3', Thermo Scientific) primerleri kullanılmış ve PCR sonrası ampliconlar % 1,5 'luk agaroz jel üzerinde görüntülenmiştir.

3.2.5 Sekans ve Filogenetik Analizler

Mt-COI gen bölgesinden elde edilmiş olan plazmid DNA'lar pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Çift yönlü DNA dizisi belirlenen plazmidlere ait kromotogramlar dikkatlice analiz edildikten sonra Geneious 8.1.4 (45) yazılımı ile forward ve reverse dizilimlerin pairwise alignmentları yapılarak, vektör DNA'sı ile kıyaslanmış, insert olmuş hedef gen bölgesi belirlenmiş ve izolatlara ait final dizilimler elde edilmiştir. Elde edilen sekansların blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra GenBank'ta mevcut homolog izolatlara ait ilgili gen bölgesi sekanslarıyla Geneious 8.1.8 (45) yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak interspesifik ve intraspesifik nükleotid farklılıkları belirlenmiştir. Filogenetik yapıların belirlenmesinde Bayesian analizleri (BA) uygulanmıştır. BA analizlerinde sekans evrimi için en uygun modelin

belirlenmesinde jModelTest 2 (46) kullanılmış ve en düşük Akaike Bilgi Kriteri (AIC) değerine sahip General Time Reversible + Gamma distributed (GTR+G) modeli filogenetik ağacın oluşturulmasında kullanılmıştır. Bayesian analizleri Geneious 8.1.8 (45) yazılımı üzerinden MrBayes plugin (47) kullanılarak gerçekleştirilmiş, Markov Chain Monte Carlo taramaları 1.100,000 jenerasyon için 4 zincirle ve ağaç örnekleme her 200 jenerasyonda bir (ilk 100,000 ağaç “burn in” olarak çıkarılmıştır). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır.



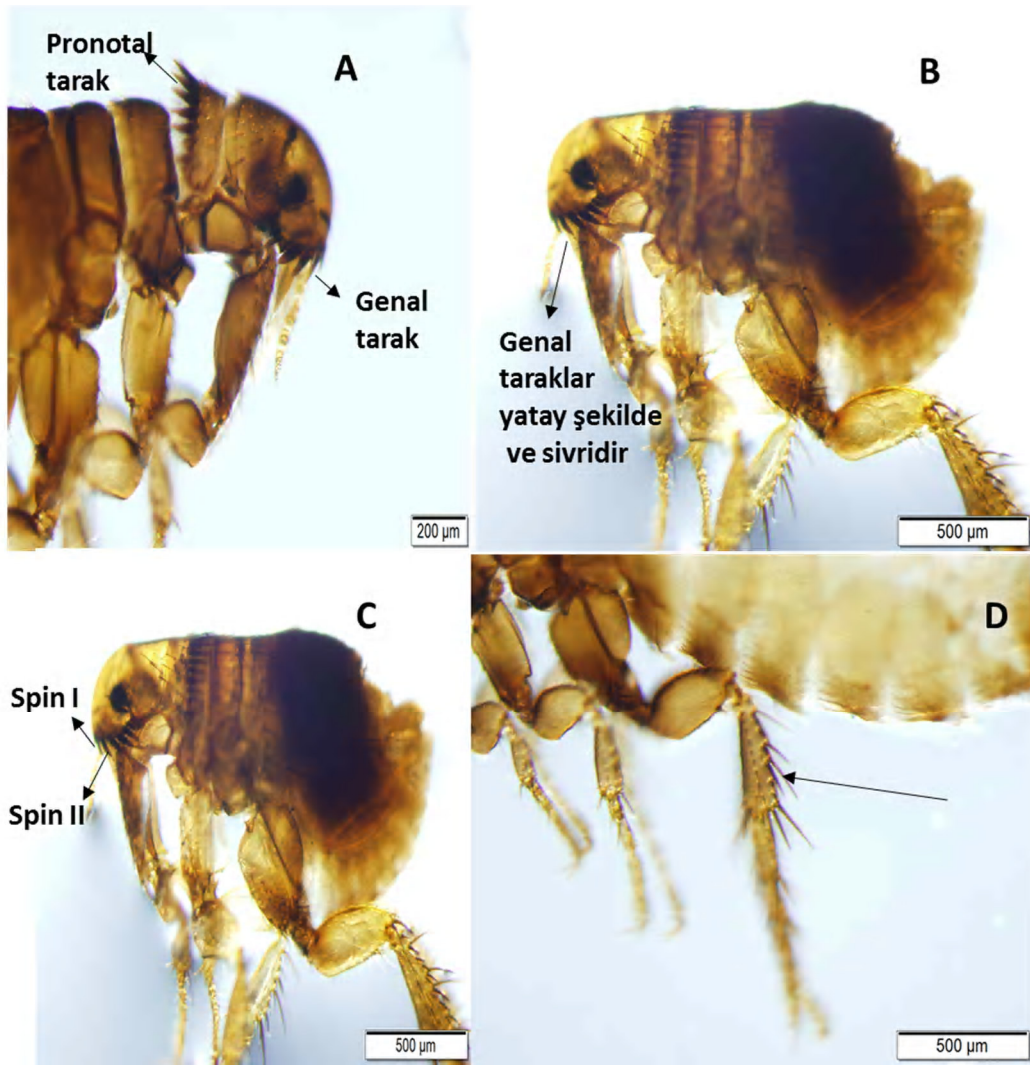
4. BULGULAR

4.1 MORFOLOJİK İDENTİFİKASYON SONUÇLARI

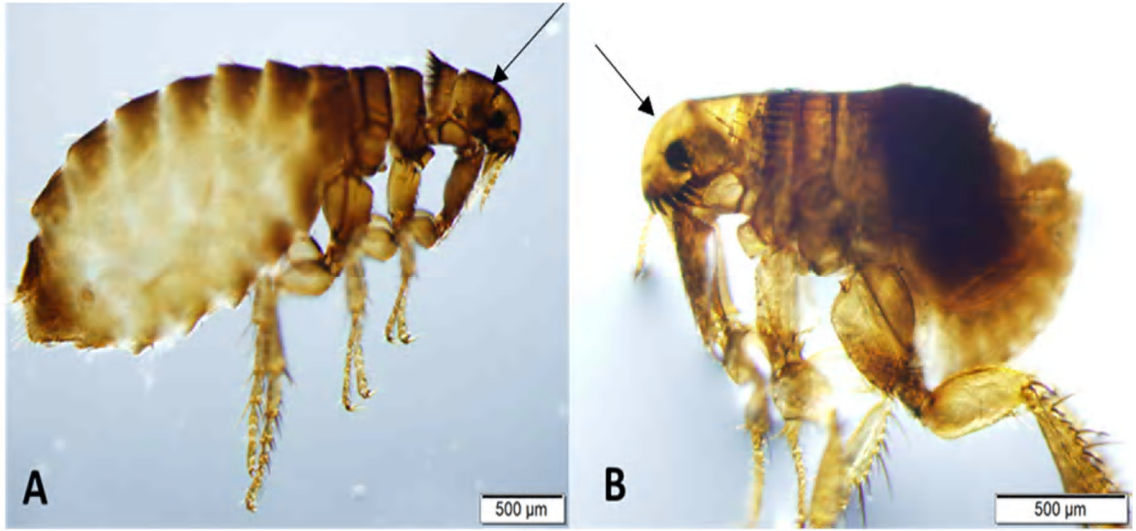
Araştırmada hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplam 100 adet pire örneği toplanmıştır. Pire türlerine ait örneklerin morfolojik özelliklerine göre identifikasyonları ilgili teşhis anahtarlarına göre incelenmiş ve görüntülenmeleri sağlanmıştır. Morfolojik identifikasyonlarla saptanan pire örneklerinin 45'i *C. canis*, 20'si *C. felix* ve 35'i ise *P. irritans* olarak teşhis edilmiştir. İdentifiye edilen pire örneklerinin önemli bazı morfolojik özellikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.1-4.6).

Ctenocephalides canis

- 1- Genal ve pronotal taraklar gözlenmiştir (Şekil 4.1A)
- 2- Genal taraklar yatay şekildedir ve spinler sivridir (Şekil 4.1B)
- 3- Spin I'in uzunluğu Spin II'den belirgin bir şekilde kısadır (Şekil 4.1C)
- 4- Hind tibiada spin çıkan 8 adet çentik bulunmaktadır (Şekil 4.1 D)
- 5- Baş her iki cinsiyette de anterior olarak konvektir (Şekil 4.2)



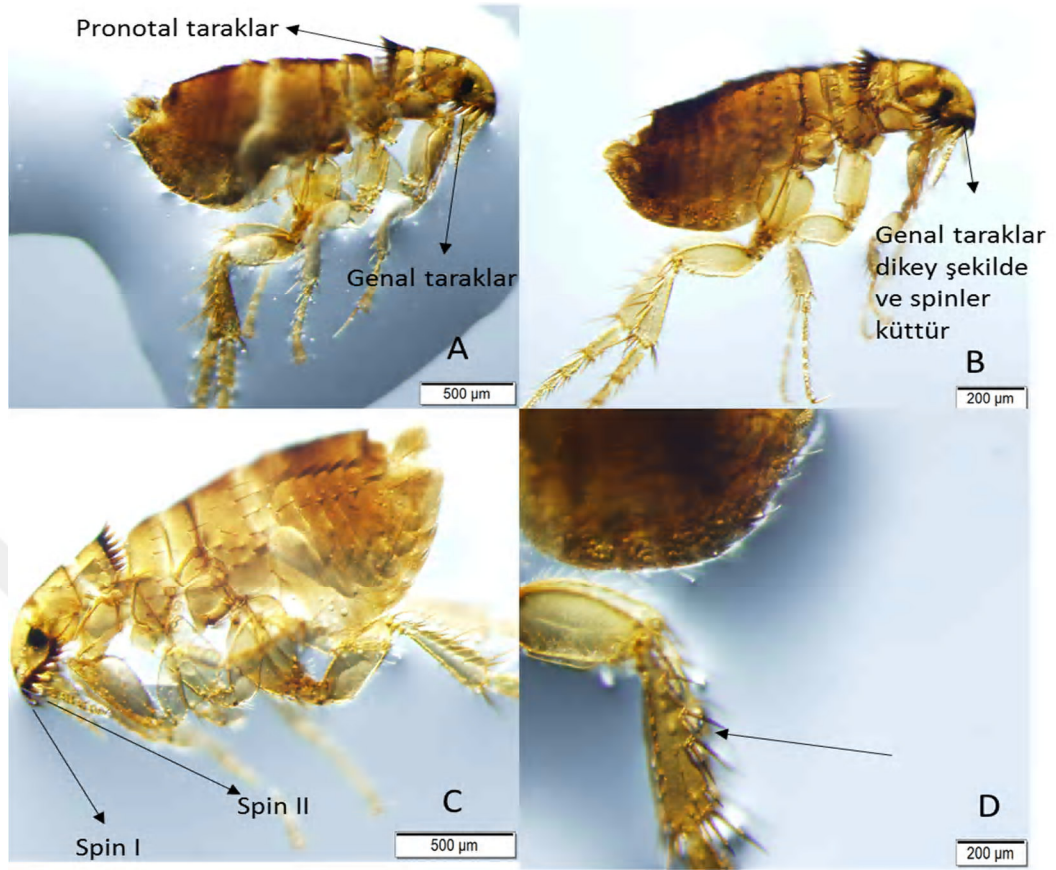
Şekil 4.1 *C. canis* bazı morfolojik özellikleri



Şekil 4.2 *C. canis* A:Dişi B: Erkek

Ctenocephalides felis

- 1- Genal ve pronotal taraklar gözlenmiştir (Şekil 4.3A)
- 2- Genal taraklar dikey şekildedir ve spinler küttür (Şekil 4.3B)
- 3- Spin I ve Spin II'nin uzunluğu yaklaşık olarak aynıdır (Şekil 4.3C)
- 4- Hind tibiada spin çıkan 6 adet çentik bulunmaktadır (Şekil 4.3D)
- 5- Baş anterior olarak konveks değildir (Şekil 4.4)



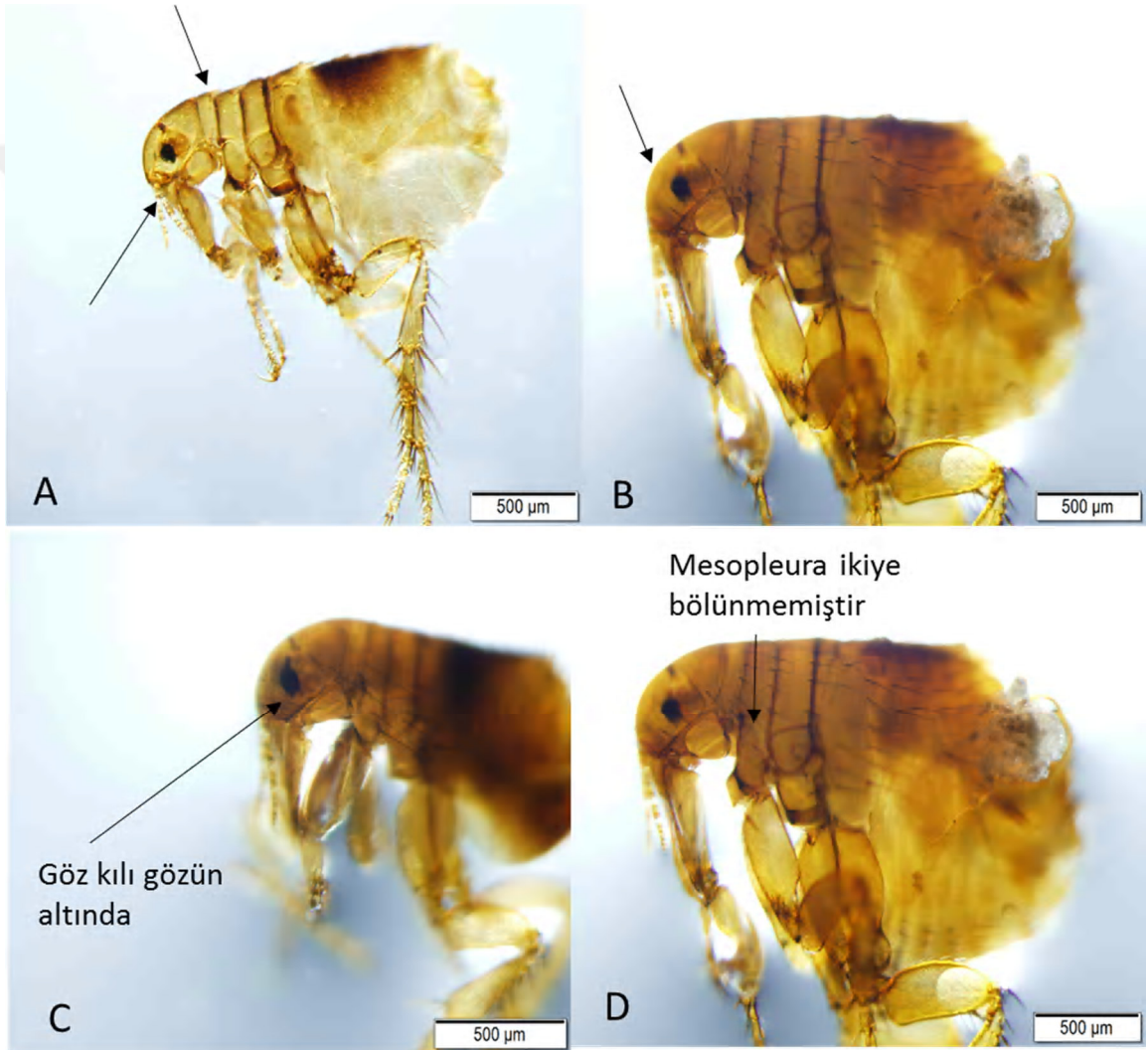
Şekil 4.3 *C. felis* bazı morfolojik özellikleri



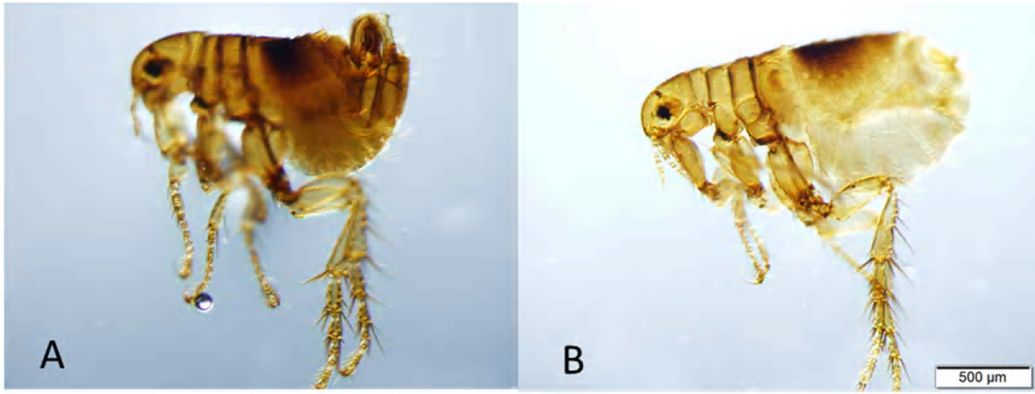
Şekil 4.4 *C. felis* Erkek

Pulex irritans

- 1- Genal ve Pronotal taraklar yoktur (Şekil 4.5A)
- 2- Fron (alın) yumuşak olarak yuvarlaktır (Şekil 4.5B ve Şekil 4.6)
- 3- Göz kılı gözün altında bulunmaktadır (Şekil 4.5C)
- 4- Mesopleura ikiye bölünmemiştir (Şekil 4.5D)

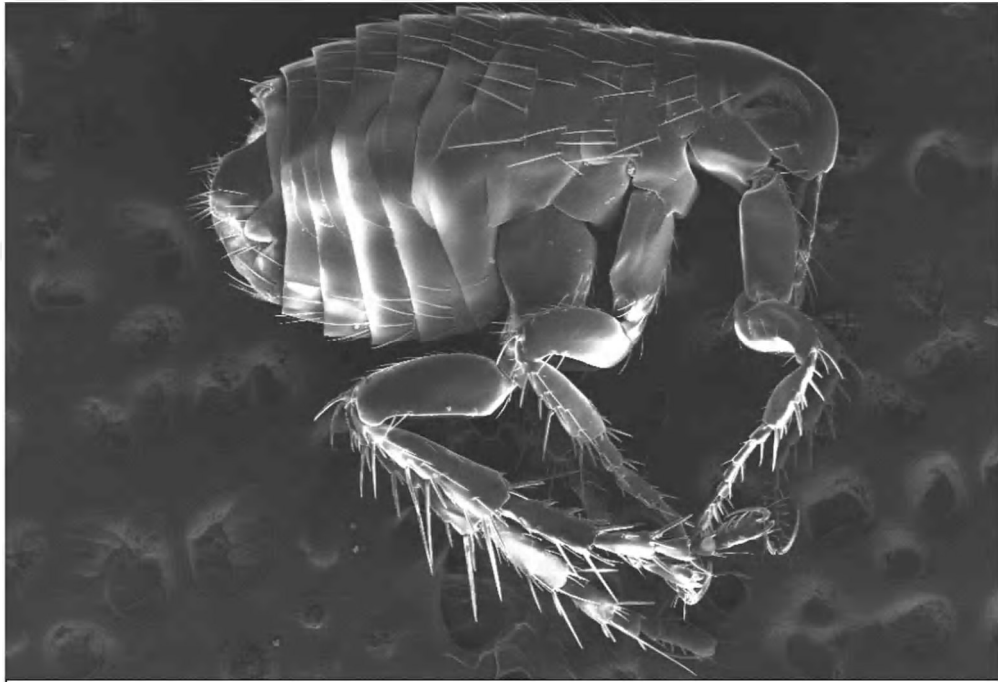


Şekil 4.5 *P. irritans* bazı morfolojik özellikleri



Şekil 4.6 *P. irritans* A: Erkek B: Dişi

Aynı zamanda *Pulex irritans* pire örneğinin taramalı elektron mikroskopu [Scanning Electron Microscope (SEM)] görüntüsü Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7 *P. irritans*'ın taramalı elektron mikroskopik görüntüsü (Orijinal)

Enfeste hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplam 100 adet pire örneği toplanmış olup pire türlerinin toplanma yerlerine göre dağılımları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü üzere en yaygın tür *C. canis* olmuş bunu sırasıyla *P. irritans* ve *C. felis* türleri izlemiştir.

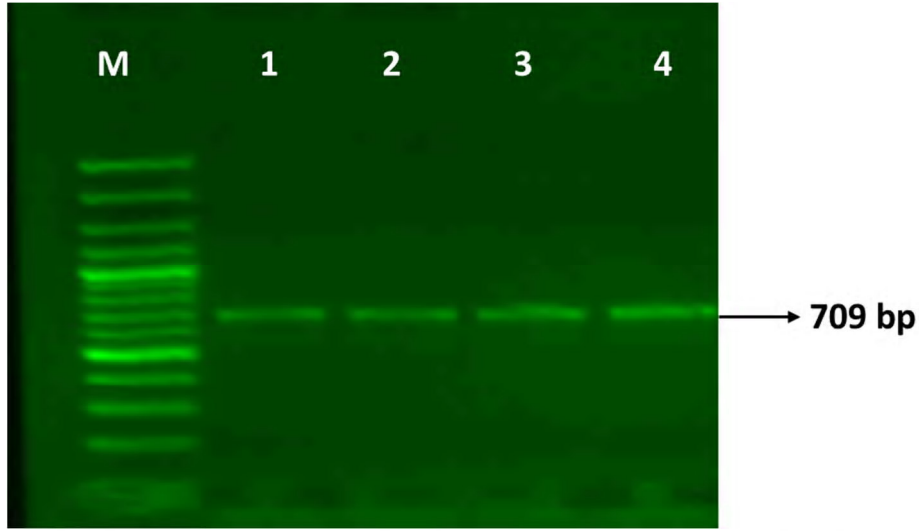
Tablo 4.1 Örneklene pire türleri, cinsiyetleri ve toplanma yerlerine göre dağılımları

Örnek toplama alanı	<i>C. canis</i>		<i>C. felis</i>		<i>P. irritans</i>		Toplam	
	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek	Dişi	Erkek
Koyun ağılları	6	3	2	3	3	7	11	13
Köpek barınakları	7	8	8	2	9	5	24	15
Kedi barınakları	10	8	1	3	7	2	18	13
Bina bodrum ve sığınak alanları	1	2	-	1	1	1	2	4
Toplam	24	21	11	9	20	15	55	45

4.2 MOLEKÜLER ANALİZ SONUÇLARI

4.2.1 Mt-COI Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

Enfeste barınaklar ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından belirlenen pire örneklerinden filogenetik analizler amacıyla seçilen *C. canis*, *C. felis* ve *P. irritans* türleri için onar adet izolatin mt-COI gen bölgesini amplifiye eden spesifik primerlerle amplifikasyonları sonucu agaroz jel üzerinde hedef büyüklükte (709 bp) ampliconlar gösterdiği belirlenmiştir. Bazı örneklere ait mt-COI gen bölgesi ampliconlarının agaroz jel üzerinde görünüşleri Şekil 4.8'de verilmiştir.

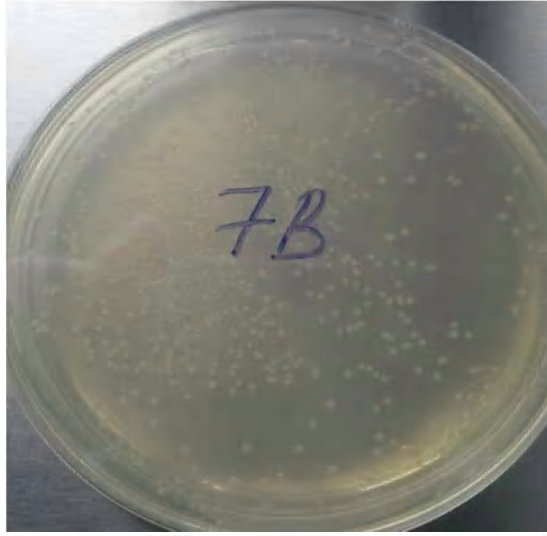


Şekil 4.8 Pire türlerinin parsiyel mt-COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen pozitif ampikonların jel elektroforezde görünümü M: Marker (100bp); 1-2: *C. canis*; 3: *C. felis*,4: *P. irritans*

4.2.2 Mt-COI Gen Bölgesinin Klonlanması

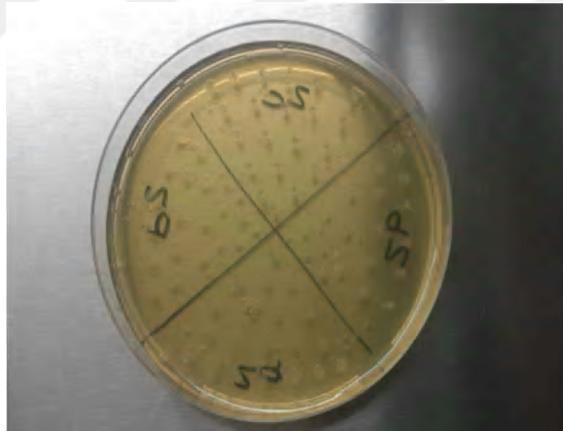
Enfeste barmaklar ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanan pire türlerine ait izolatların mt-COI gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu için *C. canis* belirlenen 5, *C. felis* belirlenen 2 ve *P. irritans* belirlenen 4 izolat sekansların kayıpsız elde edilebilmesi için klonlanmıştır. Bu amaçla ilgili izolatların PCR analizleri sonucu jel üzerinde belirlenen ampikonlar High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir.

Elde edilen jel pürifiye örnekler CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA) kullanılarak pJET1.2/blunt klonlama vektörüne insert edilmiştir. Daha sonra ligasyon ürünü *E. coli* TOP 10 kompetan hücrelere transforme edilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrası ampicylin LB besi yerinde oluşan koloniler Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



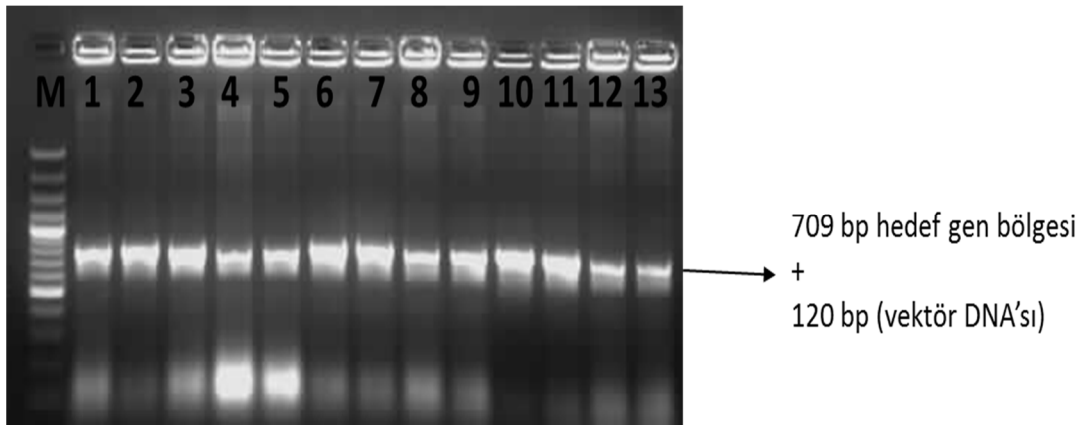
Şekil 4.9 Transformasyon sonucu besi yerinde oluşan koloniler

Katı besi yerinde üreyen kolonilerden seçilen tek koloniler, transformasyon etkinliğini artırmak amacıyla steril pipet uçları ile alınıp ayrı ayrı tekrar LB katı besi yerine ekilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Transformasyon basamağında 2. inkübasyon basamağı sonucu oluşan koloniler

Bölümlenmiş kolonilerden seçilen tek koloniler vektör spesifik primerlerle PCR analizlerine tabii tutulmuştur (Şekil 4.11). Koloni PCR sonuçlarını takiben ilgili gen bölgeleri yönünden pozitif saptanan tek bir koloni seçilerek sıvı besi yerine aktarılmış, bir gece 37°C'de inkübasyondan sonra üreyen transforme hücreler santrifüj ile çöktürülmüştür. Daha sonra transforme hücrelerden plazmid pürifikasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.11 Transforme hücrelerde mt-COI gen bölgesinin koloni PCR'ı sonucu amplikonların jel agarozda görünümü. M: Marker (100bp); 1-13 İzolatlara ait insert mt-COI gen bölgesi

4.2.3 Mt-COI Gen Bölgesinin Sekans ve Filogenetik Analizleri

Morfolojik analizlerle tür teşhisleri belirlenen pirelerin mt-COI gen bölgesinden elde edilen toplam 11 plazmid DNA (*C. canis*: ERU-Ccan-4,5,7,9,13; *C. felis*: ERU-Cfel 1,2 ve *P. irritans*: ERU-Pirr 1, 13,20,25) izolatlarının vektör spesifik pJET1.2 forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekans analizleri sonucu Blastn algoritması kullanılarak tür ve/veya alt tür bazında konfirmasyonları sağlanmış olup ilgili izolatlar KY865409-19 aksesyon numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Mt-COI gen bölgesi yönünden sekans analizlerine dâhil edilen izolatların GenBank aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.2 Klonlama ve plazmid pürifikasyonuna tabii tutulan genomik DNA izolatlarının aksesyon numaraları ve izolatlara ait bilgiler

İzolat	Tür	GenBank Aksesyon Numarası
ERU-Ccan-4	<i>C. canis</i>	KY865409
ERU-Ccan-5	<i>C. canis</i>	KY865410
ERU-Ccan-7	<i>C. canis</i>	KY865411
ERU-Ccan-9	<i>C. canis</i>	KY865412
ERU-Ccan-13	<i>C. canis</i>	KY865413

ERU-Cfel- 1	<i>C. felis</i>	KY865414
ERU-Cfel- 2	<i>C. felis</i>	KY865415
ERU-Pirr -1	<i>P. irritans</i>	KY865416
ERU-Pirr -13	<i>P. irritans</i>	KY865417
ERU-Pirr- 20	<i>P. irritans</i>	KY865418
ERU-Pirr- 25	<i>P. irritans</i>	KY865419

Çalışmada araştırma yöresinde çeşitli alanlarda *C. canis*, *C. felis* ve *P. irritans* olarak belirlenen pire türlerine ait mt-COI gen bölgesinin 616-673 bp kısmını içeren toplam 11 sekans başarıyla elde edilmiştir. Mt-COI gen bölgesi yönünden nükleotid dizileri ortaya konan pire izolatlarının nükleotid kompozisyonları Tablo 4.3'de verilmiştir. Filogenetik analizlere dâhil edilen pire izolatlarının pairwise alignmentları sonucu tür/alt türler arası ve tür içi identiklik oranları ise Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.3 Mt-COI sekansları sağlanan pire izolatlarının nükleotid kompozisyonları

İzolat	Nükleotid kompozisyonu (%)						Toplam Baz Sayısı
	T	C	A	G	T+A	C+G	
ERU-Ccan-4	39,1	15,5	30,9	14,6	69,9	30,1	658,0
ERU-Ccan-5	39,4	15,5	30,5	14,7	69,8	30,2	673,0
ERU-Ccan-7	39,5	15,4	30,4	14,8	69,9	30,1	671,0
ERU-Ccan-9	39,1	15,7	30,0	15,2	69,1	30,9	663,0
ERU-Ccan-13	38,5	16,4	30,7	14,4	69,2	30,8	616,0
ERU-Cfel- 1	38,2	16,5	30,6	14,7	68,9	31,1	620,0

ERU-Cfel- 2	38,0	16,3	30,9	14,8	68,9	31,1	627,0
ERU-Pirr- 1	40,9	15,4	27,9	15,8	68,8	31,2	638,0
ERU-Pirr- 13	41,2	15,2	28,1	15,5	69,4	30,6	633,0
ERU-Pirr- 20	40,7	15,3	27,7	16,3	68,4	31,6	621,0
ERU-Pirr- 25	41,6	14,9	27,8	15,7	69,4	30,6	644,0

Tablo 4.4 Mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların türler arası ikili hizalama farklılıkları

	Tür/Alt tür	1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>C. canis</i>		0,011	0,016	0,015	0,015	0,016	0,016	0,020
2	<i>C. orientis</i>	0,058		0,016	0,015	0,015	0,015	0,015	0,021
3	<i>C. felis felis</i> Clade I	0,097	0,099		0,004	0,004	0,007	0,007	0,023
4	<i>C. felis felis</i> Clade IV	0,089	0,090	0,008		0,004	0,005	0,006	0,022
5	<i>C. felis felis</i> Clade V	0,089	0,089	0,011	0,007		0,007	0,007	0,021
6	<i>C. felis strongylus</i> Clade II	0,100	0,098	0,024	0,014	0,021		0,007	0,022
7	<i>C. felis felis</i> Clade III	0,100	0,093	0,029	0,021	0,026	0,026		0,021
8	<i>P. irritans</i>	0,157	0,158	0,169	0,159	0,155	0,167	0,160	

Tablo 4. 4’de görüleceği üzere, çalışmada saptanan izolatların soy bazında genetik analizlerinde *C. canis* izolatlarının %5,8±1,1, %8,9±1,5, %9,7±1,6, %10,0±1,6 ve 15,7±2,0 genetik farklılıklarla sırasıyla, *C. orientis*, *C. felis* Clade IV, V, *C. felis* Clade I, *C. felis* Clade II,III ve *P. irritans* türlerine genetik olarak yakın olduğu belirlenmiştir. *C. felis felis* Clade I içinde bulunan izolatların 0,8±0,4, %1,1±0,4, %2,4±0,7, %2,9±0,7, %9,7±1,6, % 9,9±1,6 ve %16,9±2,3 genetik farklılıkla sırasıyla *C. felis* Clade IV, *C. felis* Clade V, *C. felis strongylus* Clade II, *C. felis felis* Clade III, *C. canis*, *C. orientis* ve *P. irritans* türlerine genetik olarak daha yakın olduğu tespit edilmiştir. *Pulex irritans* izolatlarının ise en yakın identikliği %15,5±2,1 genetik farklılıkla *C. felis felis* Clade V izolatları ile gösterirken, en uzak identikliği ise 16,0±2,1 oranı ile *C. felis felis* Clade III izolatları ile göstermiştir.

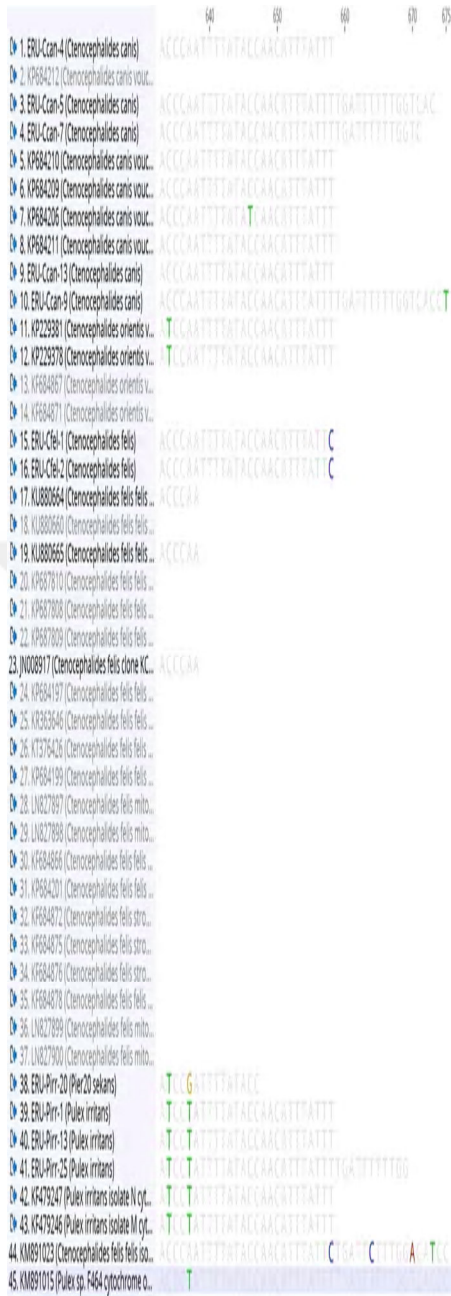
Dünyadan GenBank’a kaydı yapılan ve Kayseri yöresinden elde ettiğimiz *C. felis* izolatlarının tür bazlı olarak %1,3, *C. canis* izolatlarının %0,1, *C. orientis* izolatlarının %0,5 ve *P. irritans* izolatlarının ise %2,6 identik oldukları saptanmıştır (Tablo 4.5).

Tablo 4.5 Mt-COI gen bölgesine göre incelenen izolatların tür içi ikili hizalama farklılıkları

	Tür	
1	<i>C. canis</i>	0,001
2	<i>C. felis</i>	0,013
3	<i>P. irritans</i>	0,026
4	<i>C. orientis</i>	0,005

Araştırma yöresinde mt-COI gen bölgesi sekans analizleri ile karakterizasyonları yapılan pire izolatları ile Dünya'dan GenBank'a kayıtlı bazı pire izolatlarının, parsiyel mt-COI gen bölgelerinin çoklu hizalamaları ve nükleotid kıyaslamaları Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



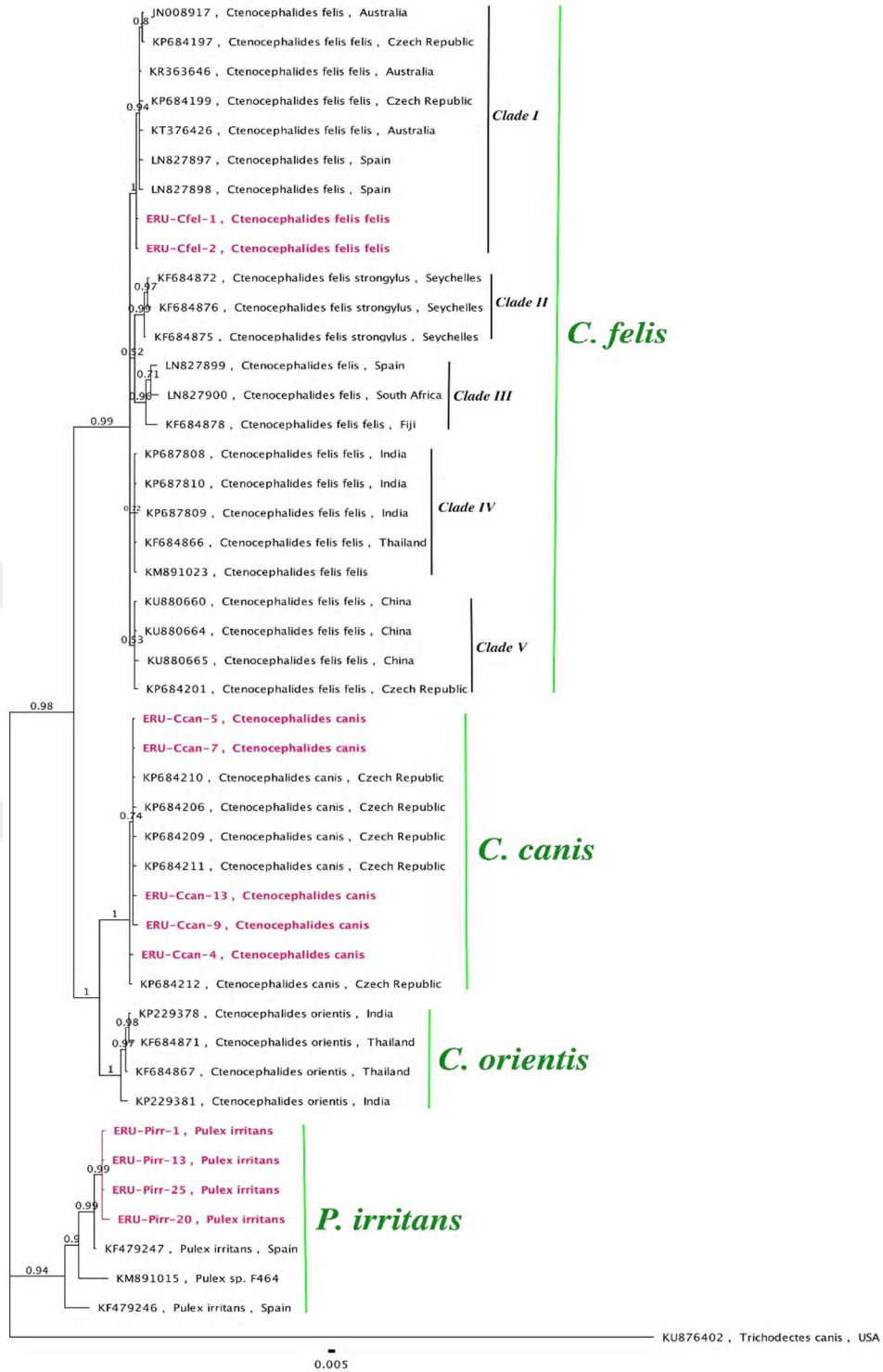


Şekil 4.12 Sekans analizi yapılan pire izolatları ile Dünyadaki diğer bazı pire izolatlarının mt-COI gen bölgesine göre nükleotid dizilimlerinin çoklu hizalamaları

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere mt-COI gen bölgesine göre *Ctenocephalides* ve *Pulex* soylarındaki pire türlerine ait izolatlar arasında türler arasında ve tür içinde çeşitli nükleotid varyasyonları belirlenmiştir.

4.2.4 Mt-COI Gen Bölgesi Filogenetik Analiz Sonuçları

Mt-COI gen bölgesi filogenetik analiz sonuçlarıyla, morfolojik analiz ile tür tayini yapılan pireler değerlendirilerek konfirmasyonları yapılmıştır. İzolatların mt-COI gen bölgesinin Bayesiyen filogenisine göre oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.13'de verilmiştir. Bayesian filogenisine göre oluşturulan filogenetik çözünürlük yüksek posterior olasılıklarla desteklenmiştir. Çalışmada morfolojik analizlerle *C. felis* olarak tanımlanan ve moleküler karakterizasyonla ERU-Cfel1-2 olarak isimlendirilen izolatlar, filogenetik ağaç (Şekil 4.13) üzerinde görüleceği üzere farklı ülkelerden rapor edilmiş *C. felis* izolatlarıyla birlikte cluster oluşturmuştur. ERU-Cfel1-2 izolatları Avustralya, Çek Cumhuriyeti ve İspanya izolatları ile birlikte *C.felis felis* Clade I içerisinde kümelenmiştir. ERU-Cfel1-2 izolatlarının İspanya'dan izole edilmiş *C. felis* izolatı (GenBank aksesyon: LN827898) ile %100 identik oldukları belirlenmiştir. *Ctenocephalides canis* ERU-Ccan-5,7,13,9,4 izolatlarının Çek Cumhuriyetinden bildirilmiş AL-346-1 (GenBank aksesyon: KP684210), AL-342-5 (GenBank aksesyon: KP684206) ve AL-342-3 (GenBank aksesyon: KP684209) izolatları ile %100 identik oldukları belirlenmiş ve *C. canis* tür grubu içerisinde birlikte kümelenmişlerdir (Şekil 4.13). *P. irritans* ERU-Pirr-1,13,25,20 izolatları kendi aralarında %100 identik oldukları ve grup içinde kümelenme gösterdikleri görülmüştür. İlgili izolatlar en yüksek identikliği İspanya'dan rapor edilmiş *P. irritans* izolatıyla (GenBank aksesyon: KF479247) göstermiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 Pire izolatlarının mt-COI gen bölgesi Bayesian inference (BI) analizine göre filogenetik ilişkileri. Çalışmada belirlenen izolatlar kırmızı ve kalın karakterde yerleştikleri kümeler yeşil renkte gösterilmiştir. Node'ların önündeki rakamlar Bayesian olasılığını göstermektedir. Ölçek çizgisi yerleşim yeri başına nükleotid değişimini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bit, pire, akar ve kene gibi ektoparazitler kan emmeleri esnasında insanları ve hayvanları enfeste etmekte, dermatitis gelişimine veya vektör-borne hastalıkların nakline neden olmaktadır (48). Siphonoptera dizisi içerisinde yer alan Pulicidae, Ceratophyllidae, Leptopsyllidae ve Tungidae ailesindeki 246 soya ait toplam 2575 tanımlanan türü ile pireler, Dünya'nın birçok bölgesinde ve Türkiye'de veteriner ve halk sağlığı açısından oldukça önemli ektoparazitlerdir (8, 33, 49).

Global olarak kliniklerde kedi ve köpeklerdeki dermatolojik olguların yaklaşık %50'sinin pirelerden kaynaklı olduğu ve Amerika Birleşik Devletlerinde pire kontrol ürünlerine her yıl yaklaşık bir milyar dolar harcandığı bildirilmiştir (35, 50). İnsan ve hayvanlar arasındaki sürekli etkileşim, pireler ile zoonotik patojenlerin taşınımını kolaylaştırmaktadır. Ergin devrelerinde geçici parazit olan pireler çok fazla konak seçiciliği göstermemekte ve geniş bir konakçı spektrumundan kan emdikleri belirtilmektedir. Örneğin, *Ctenocephalides felis* piresine 50 farklı konak üzerinde rastlandığı bildirilmiştir. Bu özellikleri sebebi ile vektörlükleri çok gelişmiş olup, çok çeşitli virüs ve bakterinin naklinde rol almaktadırlar (5). Pireler tarafından bulaştırılan en önemli enfeksiyon *Y. pestis*'in neden olduğu veba hastalığıdır. Aynı zamanda Amerika'da murine tifüs (endemik tifüs) hastalığının etkeni *Rickettsia typhi* ve kırsal epidemik tifüs'ün etkeni *Rickettsia prowazekii*'ye vektörlük yaptıkları da bildirilmiştir (25). Son yıllarda, rickettsiyal türler içerisinde *Rickettsia felis* identifiye edilmiştir. İlk olarak tifüs ya da ateşli grup riketsiyali içerisinde bulunsada yapılan filogenetik çalışmalarda *R. felis*'in, riketsiyallerin genetik olarak farklı bir geçiş grubu olduğu belirlenmiştir. Bu tür *R. typhi*'den genetik olarak farklı olmasına rağmen kozmopolit kedi piresi ile bağlantılı olduğu gözlemlenmiştir (25). Pirelerin aynı zamanda kedi tırmığı hastalığı (CSD) etkeni *Bartonella henselae* gibi bazı *Bartonella* türlerini naklettikleri bildirilmiştir (51). Ayrıca, pireler *Dipylidium caninum* ve *Hymenolepis diminuta* gibi helmintlerin vektörlüğü de yapmaktadırlar. *Tunga penetrans*'in tropikal bölgelerde

insanların derileri içerisine yerleşerek ağrı, kaşıntı ve irinleşmeye neden olduğu bildirilmiştir (5).

Pireler üzerine yapılan araştırmaların son yıllarda artış gösterdiği görülmekte olup Türkiye’de çeşitli konaklarda pireler üzerine yapılmış çalışmalar oldukça sınırlı olup mevcut çalışmalarında yalnızca morfolojik teşhise dayalı olduğu görülmektedir (Dinçer, 1971). Bu çalışmalardan; Dinçer (53), Ankara ve çevresinde kedi, köpek ve tilkilerde bulunan pire türlerini incelemek için yaptığı bir çalışmada, 4 aileye ait 6 soy ve 9 tür tanımlanmıştır. Araştırmacının (53) 50 kediden 346 (268 dişi, 78 erkek), 50 köpekten 553 (387 dişi, 166 erkek) ve 50 tilkiden 1692 (1071 dişi, 621 erkek) adet olmak üzere toplam 2591 pire örneğini morfolojik analizlerle %31,91’ini *P. irritans*, %29,79’unu *C. canis* ve %11,92’sini ise *C. felis felis* olarak tanımlanmıştır.

Doğanay (52), kedi ve köpeklerde bulunan ektoparazitleri incelemek amacıyla yaptığı çalışmada morfolojik teşhisler ile *C. canis*, *C. felis* ve *P. irritans*’ın köpek ve kedilerde yaygın bir şekilde bulunduğunu bildirmiştir. Dinçer ve ark. (53) Elazığ yöresinde sokak kedilerinde görülen iç ve dış parazitleri ve bunların yayılış oranlarını tespit etmek amacıyla yaptıkları araştırmada, sokak kedilerinde *C.canis*’i %5.5 oranında bulduklarını bildirmişlerdir. Gülanber ve ark., (54) 1999 ve 2000 yıllarında İstanbul’da bazı pet kliniklerine getirilen pire ile enfekte 50 köpekten toplam 574 pire toplamışlardır. Araştırmacılar (54) morfolojik analizler ile topladıkları pirelerin 544’ünün (%94.8) *C. felis felis* ile, 28’inin (%4.88) *C. canis* ile 2’sinin (%0.35) ise *P. irritans* ile enfeste olduğunu belirlemişlerdir.

Aksın ve ark. (55)’nin Elazığ’ın kırsal kesimlerinde bulunan pire enfestasyonu yönünden ön tanısı konulan iki koyun çiftliğinde insan, koyun, kedi, köpek, tavuk ve horozdan topladıkları toplam 231 pire örneğinin morfolojik analizler ile %34.7’sinin *C. canis*, %33.3’ünün *C. felis*, %21.6’sının *P. irritans* ve %10.4’ünün *Xenopsylla cheopis* türlerine ait olduğunu belirlemişler ve yoğun enfeste olan bu çiftlikleri %5’lik Solfac (Cyfluthrin) ve %1 toz Bolfo (Propoxur) ile ilaçlamışlardır. Araştırmacılar (55) ilaçlama sonunda enfeste çiftliklerde pire enfestasyonunun görülmediğini kaydetmişlerdir. Yine Elazığ ve çevresindeki yabani tavşanlarda ektoparazitlerin yayılışlarını belirlemek amacıyla Ekim 1999-Mart 2000 tarihleri arasında yapılan bir çalışmada toplam 38 yabani tavşanın 4’ünün (%14,82) *C. canis* ile enfeste olduğu bildirilmiştir (56).

Erzurum'da köpeklerin ektoparazitlerini belirlemeye yönelik yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, kırsal alanda yaşayan toplam 48 köpek (26 erkek ve 22 dişi) ektoparazitlerin varlığı yönünden makroskobik olarak incelenmiştir. İnceleme sonucunda 21 köpeğin (9 erkek, 12 dişi) *C. canis*, *C. felis*, *Rhipicephalus sanguineus* ve *Sarcoptes scabiei* var. *canis* ile enfeste olduğunu ve enfestasyon oranlarının sırasıyla %31.25, 54.17, %6.25 ve %2.08 olarak belirlendiği rapor edilmiştir (57). Mevcut çalışmamız Kayseri yöresinde pire enfestasyonuna maruz kalmış hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanmış ergin pire örnekleri üzerine yapılan bir çalışma niteliğinde olup çalışma sonucunda ilgili alanlardan toplanan toplam 100 adet ergin pire örneğinin morfolojik klasifikasyonları yapılmış ve pire türlerinin 45'inin *C. canis*, 20'sinin *C. felis* ve 35'inin *P. irritans* olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçların Türkiye'de morfolojik analizlerle yapılmış pire çalışmalarından elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında en yaygın türün *C. canis* olduğu belirlenmiş ve çalışmamızın sonucunun diğer araştırmacıların (53, 55, 56) çalışmalarının sonuçlarına paralel olduğu görülmüştür.

Pirelerin cins ve tür identifikasyonları genellikle çeşitli morfolojik özelliklerine göre yapılmaktadır. Bu morfolojik özellikler, son derece karışık genital organlarının yapısı, seta ve spinlerin varlığı ve dağılımı olmaktadır. Bu özellikler tür teşhisi için güvenilir olmasına rağmen alt türlerin ve sister grupların belirlenmesinde ve filogenetik yapının ortaya çıkarılmasında yetersiz kalmaktadır (8). Siphoneptara dizisinde Pulicidae ailesinde bulunan *Ctenocephalides* cinsi için de 13 tür ve alt tür bulunmaktadır. Bu türlerden kedi piresi olarak isimlendirilen *C. felis* türünde dört alt tür (*C. felis felis*, *C. felis orientis*, *C. felis strongylus* ve *C. felis damarensis*) bulunmakta ve bu alttürler morfolojik olarak birbirinden ayrılabilir. Ancak bazı zamanlarda morfolojik identifikasyonlar tür tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Örneğin Afrotropikal bölgede ve Asya'da yapılan bir çalışmada sefalik profilinin yapısına göre *C. felis strongylus* türü, *C. canis* olarak yanlış identifiye edilmiştir (58). Bunun yanında evcil köpekler genellikle *C. canis*'ten daha çok *C. felis felis* ile enfeste olmalarına rağmen, Paleartik ve Neartik bölgelerde veba hastalığına neden olan pire türlerinin belirlenmesi için toplanan *Ctenocephalides* pireleri ise konaklarına göre isimlendirilmişlerdir (59). Bu şekilde tür teşhisi için kullanılan bazı taksonomik anahtarlarda bazı özellikler yanlış yorumlanabilmektedir (60). Bu nedenle pirelerin soy, tür, alttür ve sister grup

yakınlığının belirlenmesinde çeşitli moleküler teknikler (COI-barkodları veya diğer moleküler markerlar) kullanılmaya başlanmıştır. Böylece örneklerin tür düzeyinde DNA barkod identifikasyonlarını takiben yeni morfolojik karakterlerin bulunması veya yalnızca morfolojik karakterler kullanılarak yapılan tür identifikasyonlarının konfirmasyonu mümkün olmuştur (8, 32, 34, 35, 60, 61). Bu kapsamda, çeşitli pire türlerinin moleküler filogenileri üzerine birçok araştırmanın (32, 34, 35) yapıldığı görülmektedir. Türkiye’de günümüze kadar pire türlerinin moleküler identifikasyonu üzerine herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu açıdan çalışmada Kayseri yöresinde pire enfestasyonuna maruz kalmış hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanan *C. canis*, *C. felis* ve *P. irritans*’ın moleküler karakterizasyonlarının ortaya konulması amaç olarak belirlenmiş ve bu türlerin Türkiye’de ilk genotipleme verileri sağlanmıştır.

Moleküler tekniklerin gelişimi ile pirelerin soy, tür ve alttür ayrımlarının daha güvenilir bir şekilde yapıldığı gözlenmiştir (8, 32). Pire türlerinin tür içerisindeki farklılıklarının belirlenmesinde çeşitli moleküler markırlar (ITS1, ITS2, 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rDNA, Elongation Factor 1-alpha, *cox1*, *cox2*) kullanılmaktadır (8, 33, 34, 35). Buna karşın pirelerde *Wolbachia pipientis* gibi endosymbiont bakterilerin varlığının, mt-DNA’da genetik çeşitliliğin azalmasına veya artmasına neden olduğu bildirilmiştir (62). Bu nedenle bazı araştırmacılar artropodların tarihsel gelişimini açıklamada mtDNA’nın tek başına yeterli bir markır olmadığını böylece nükleer DNA’nın gelişimini ortaya çıkarmak için filogenetik çalışmalarda nükleer DNA’yı kodlayan genleri ve tür içi çalışmalarda ise mikrosatellitlerin kullanımını ve gelişimini önermişlerdir (63-66).

DNA barkodlama yaklaşımları gibi moleküler identifikasyon tekniklerinin pire çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaya başlandığı görülmektedir (34, 35). DNA barkodlama tür düzeyinde bilgi sağlayan DNA bölgelerinin amplifikasyonu ve sekanslanması temeline dayanmaktadır. Birçok hayvan grubu için mt-COI gen bölgesinin parsiyel 648 bp kısmının oldukça kullanışlı bir barkodlama bölgesi olduğu ortaya çıkarılmıştır (61, 67, 68). Cytochrome c oxidase enzimi, bakteri ve mitokondrilerde bulunan geniş transmembran protein kompleksidir. Mitokondrinin membranında yer alan elektron transport zincirindeki en son enzimidir. Mt-COI gen bölgesi, ökaryotlarda göstermiş olduğu intraspesifik polimorfizm ile filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılan mitokondrial gen bölgelerinin başında gelmektedir

(69). Nitekim insan ve diğer omurgalı konakların çeşitli pire türlerinin genetik diversitesi, kriptik türler, popülasyon yapısı ve filogenileri üzerine yapılan moleküler çalışmalarda mt-COI gen bölgesi yaygın bir şekilde kullanılmış ve tür içerisinde çeşitli cladelerin ve haplotiplerin varlığı ortaya konmuştur (8, 34-38).

Vobis ve ark., (32) topladıkları 7 farklı türe (*X. cheopis*, *A. erinacei*, *C. canis*, *C. felis*, *T. penetrans*, *P. irritans*, *N. fasciatus*) ait toplam 31 pire türü arasındaki filogenetik yakınlığı incelemek amacıyla internal transcribed spacer 1 (ITS1), internal transcribed spacer 2 (ITS2) ve mitochondrial 16S ribosomal RNA (mt16S-rDNA) gen bölgelerinin sekanslarındaki nükleotit farklılıklarını karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar (32) bu gen bölgelerinin pire türlerini ayırt etmede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda ilgili gen bölgelerinde *C. felis* ve *T. penetrans*'ın aynı tür içerisindeki farklı izolatları arasında nükleotit farklılıklarının olduğunu da tespit etmişlerdir. Bunun yanında *C. felis* izolatları arasındaki farklılığı belirlemek için 4 farklı random binding primer kullanmışlar ve bu primerlerin de farklı *C. felis* izolatları arasında ayırım yapabildiğini rapor etmişlerdir.

Slapeta ve ark., (36), 2009-2010 yılları arasında Avustralya'nın beş farklı veteriner kliniğinde 291 hayvandan (151 köpek, 69 kedi ve 71 kategorize edilemeyen köpek veya kedi) topladıkları 2530 pire örneğinde en yaygın türün kedi piresi *C. felis felis* olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar (36), *C. felis felis*'in mt-COI gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda Avustralya'da bu türün tek haplotipinin olduğunu da rapor etmişlerdir.

Çek Cumhuriyeti ve Romanya'da sahipli kedi ve köpeklerden toplanan toplam 163 pirenin (97 adet Çek Cumhuriyeti, 66 adet Romanya) morfolojik ve moleküler analizleri yapılmıştır. Morfolojik analizler sonucunda pirelerin 59'u (%60,82) *C. felis felis*, 30'u (%30,93) *C. canis*, 7'si (%7,22) *C. gallinae* ve 1'i (%1,03) *N. fasciatus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanmış *C. felis felis* türünün *cox1* geninin mt-DNA sekansı sonucunda bu türün *cox1* haplotip 1 içerisinde bulunduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda kedi ve köpeklerde yüksek oranda görülen *C. canis* türünün mt-DNA sekansı sonucunda bu türün kedi piresi *C. felis orientise* sister clade olduğu kaydedilmiştir (35).

Zurita ve ark., (37) farklı coğrafik bölgelerde (İspanya, İran ve Güney Afrika) köpeklerden topladıkları *C. felis* ve *C. canis* türlerinin ITS1, ITS2, 18S rDNA ve *cox1*

gen bölgelerinin sekansları ile bu iki türün taksonomik durumlarını araştırmışlardır. 18S rRNA parsiyel gen bölgesinin *C. canis* ve *C. felis* türlerini ayırt etmede ve de bu türler içindeki filogenetik ilişkiyi belirlemede kullanışlı olmadığını, ancak ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin ise *Ctenocephalides* soyunun spesifik belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar (37) aynı zamanda *C. felis* cox1 mtDNA sekansı ile *C. felis*'in 3 ana haplotipin bulunduğunu, cox1 sekansında birçok endonükleaz bulunduğunu ve bu endonükleazların *C. felis*'in farklı haplotiplerinin belirlenmesinde ve *C. felis* ve *C. canis* tür ayrımında başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Lawrence ve ark., (34) Avustralya, Fiji, Tayland ve Seyşeller de kozmopolitan bir tür olan kedi piresi *C. felis*'in alt tür bazında identifikasyonu konfirme etmek amacıyla iki mitokondrial markır (cox1 ve cox2) kullanmışlardır. Araştırmacıların (Lawrence ve ark., 2014) cox1 ve cox2 tabanlı filogenetik çalışmaları sonucunda, *C. felis* içerisinde 5 farklı clade'in olduğunu ve *C. felis felis* olarak identifiye edilen alttürün iki clade (Clade I ve Clade IV) içerisinde toplandığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar (34) her iki gen bölgesinin *Ctenocephalides* türlerinin popülasyon yapısını ve filogenilerini açıklamada uygun genetik markırlar olduklarını rapor etmişlerdir.

Lawrence ve ark., (34, 35, 70), Avustralya'da *C. felis* içerisinde beş farklı Clade'in olduğunu rapor etmişlerdir. Yeni Zelanda'nın Güney ve Kuzey adaları ile Avrupa'da yapılan mitokondrial gen bölgesi sekans analizlerine göre kedi piresinin genellikle dominant Clade I içerisinde bulunduğu bildirilmiştir (35, 38).

Çalışmamızda mt-COI gen bölgesi sekans analizleriyle karakterize edilen ve barkodlanan *C. felis* izolatlarının (ERU-Cfel1,2) yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile paralellik (34, 35, 38, 70) gösterip *C. felis felis* Clade I içinde bulunduğu ve Avustralya, Çek Cumhuriyeti ve İspanya izolatları ile birlikte kümelendiği belirlenmiştir. Aynı zamanda ERU-Cfel1-2 izolatlarının İspanya'dan izole edilmiş *C. felis* izolatı (GenBank aksesyon: LN827898) ile %100 identik oldukları saptanmıştır. Morfolojik analizlerle *C. canis* olarak identifiye edilen ERU-Ccan-5,7,13,9,4 izolatlarının tür bazlı olarak *C. canis* içerisinde buldukları ve Çek Cumhuriyetinden bildirilmiş AL-346-1 (GenBank aksesyon: KP684210), AL-342-5 (GenBank aksesyon: KP684206) ve AL-342-3 (GenBank aksesyon: KP684209) izolatları ile %100 identik

oldukları belirlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen *P. irritans* ERU-Pirr-1,13,25,20 izolatlarının kendi aralarında identik oldukları ve filogenetik ağaçta tür içinde aynı yerde kümelenmiş ve en yüksek identikliği İspanya'dan rapor edilmiş *P.irritans* izolatıyla (GenBank aksesyon: KF479247) gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.13). Neticede Kayseri yöresinden toplanan pire örneklerinin mt-COI sekans ve filogenetik analiz sonuçları, araştırma yöresinde pire türlerinin genetik karakterde popülasyon yapısını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışması ile Kayseri yöresinde çeşitli hayvan barınakları ile binaların bodrum ve sığınak alanlarından toplanan pire örneklerinin morfolojik analizlerini takiben mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gen bölgesinin moleküler karakterizasyonları yapılmış ve barkodlamaları sağlanarak Türkiye için ilk moleküler veriler olarak GenBank veri tabanına kayıtları sağlanmıştır. Karakterize edilen tüm izolatların dünyada GenBank'a kayıt edilmiş mevcut homolog izolatlarla birlikte filogenetik yapılanmaları belirlenmiştir. Bu çalışma aynı zamanda Türkiye'de yayılış gösteren pire türleri üzerine morfolojik ve moleküler tabanlı çalışmaların birlikte yürütülerek geniş çaplı araştırma projelerinin hayata geçirilmesi, özellikle pire kaynaklı vektör-borne hastalıkların epidemiyolojisi ile kontrol ve mücadele yöntemlerinin şekillendirilmesi model oluşturması açısından da oldukça önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Lewis RE. Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. Part 8. New taxa described between 1984 and 1990, with a current classification of the order. Entomol Soc Am 1993; 30: 239-256.
2. Gracia MJ, Lucientes J, Castillo JA, et al. *Pulex irritans* infestation in dogs. Vet Rec 2000; 147:748-749.
3. Dinçer Ş. Ankara ve çevresinde kedi (*Felis domesticus*), köpek (*Canis familiaris*) ve tilki (*Vulpes vulpes*)'lerde bulunan pire (Siphoneptera)'ler üzerinde sistematik araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Yayınları 1971; 277.
4. Mullen GL, Durden LA. Medical and Veterinary Entomology. Academic Press 2002.
5. Bitam I, Dittmar K, Parola P, et al. Fleas and flea-borne diseases. Int J Infect Dis 2010; 14: 667-676.
6. Aydın MF, Dumanlı N. Pire Enfestasyonları. In: Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. Özcel MA eds. Meta Basım Matbaacılık, İzmir, 2008; 300-1303.
7. Vuruşaner C, Gülanber A. Siphoneptera (Pireler). In: Arthropodoloji. Eds, Karaer Z, Dumanlı N. Medisan Yayınevi, Ankara 2015;265-280.
8. Whiting MF, Whiting AS, Hastriterb MW, Dittmar K. A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. Cladistics 2008; 24: 677-707.
9. Wall R, Shearer D. Veterinary Ectoparasites. Biology, Pathology and Control. Second Edit, Blackwell Science Ltd, Osney Mead, Oxford OX2 0EL, 25 John Street, London, 2001.
10. Zajac AM, Conboy GA. Veteriner Klinik Parazitoloji, Çeviren: Yıldız K. 7th Ed. Medipress, Malatya, 2009.

11. Bowman DD, Hendrix CM, Lindsay DS, et al. *Feline Clinical Parasitology*. Iowa State University Press, Iowa, 2002; 469.
12. Mathison BA, Pritt BS. Laboratory identification of arthropod ectoparasites. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 48-67.
13. Traversa D. Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. *Parasites & Vectors* 2013; 6: 59.
14. Dik B. *Veteriner Entomoloji*. Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, 2003.
15. Hopla CE. The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med* 1974; 18: 25-53.
16. Kahn CM. Fleas and Flea Allergy Dermatitis. *The Merck Veterinary Manual*. 9th ed. Whitehouse Station, NJ, Merck & Company, 2005: 710-715.
17. Carter GR. External parasitic diseases of dog and cats. GR David ed. *A Concise Guide to Infectious and Parasitic Diseases of Dogs and Cats*. Ithaca: International Veterinary Information Service [www. ivis. org](http://www.ivis.org). 2001.
18. David GB. *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*, 2th Ed. Wiley-Blackwell, 2008;552.
19. Rust MK, Dryden MW. The biology, ecology, and management of the cat flea, *Annu Rev Entomol* 1997; 42: 451-73.
20. Blagburn BL, Dryden MW. Biology, treatment, and control of flea and tick infestations *Vet Clin Small Anim* 2009; 39: 1173-1200.
21. Wilkerson MJ, Bagladi-Swanson M, Wheeler DW, et al. The immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs, an experimental study. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99: 179-192.
22. Beugnet F, Franc M. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. *Trends Parasitol* 2012; 28: 267-79.

23. Kaya S, Karaer Z. Pireler ve Mücadele Programları. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji, Ed: (Kaya S, Pirinççi I, Bilgili A). Cilt 2, Medisan, Ankara, 2000.
24. Dryden MW, Rust MK. The cat flea: biology, ecology and control Vet Parasitol 1994; 52: 1-19.
25. Eisen RJ, Gage KL. Transmission of flea-borne zoonotic agents. Annu Rev Entomol 2012; 57: 61-82.
26. Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, et al. Plague: Past, present, and future. PLoS Med 2008;5.
27. Fournier PE, Lelievre H, Eykyn SJ, et al. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. Medicine (Baltimore) 2001;80: 245-51.
28. Franc M. Fleas and methods of control. Rev Sci Tech 1994;13: 1019-37
29. Petrisheva, P. 1965. Vectors of Diseases of Natural Foci. I.P.f.S. Translations, Jerusalem.
30. Düzlü Ö, İnci A, Yıldırım A, Gümüşsoy S. 2014. Kayseri yöresinden toplanmış Ixodid kene ve sivrisinek türlerinde *Francisella tularensis*'in Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonu. ERÜ Dış Kaynaklı ACİP Projesi, Proje No: TDA-2014-5172.
31. Durden LA, Hinkle NC. Fleas (Siphonaptera). In: Medical and Veterinary Entomology. Mullen GR, Durden LA, editor. Academic Press, San Diego, USA; 2009;115-136.
32. Vobis M, D'Haese J, Mehlhorn H, et al. Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers. Parasitol Res 2004; 94: 219-226

33. Marrugal A, Callejon R, de Rojas M, et al. Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitol Res* 2013; 112: 2289-2298.
34. Lawrence AL, Brown GK, Peters B, et al. High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Med Vet Entomol* 2014; 28: 330-6.
35. Lawrence AL, Hii SF, Jirsova D, et al. Integrated morphological and molecular identification of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and dog fleas (*Ctenocephalides canis*) vectoring *Rickettsia felis* in central Europe. *Vet Parasitol* 2015; 210: 215-223.
36. Slapeta J, King J, McDonell D, et al. The cat flea (*Ctenocephalides f. felis*) is the dominant flea on domestic dogs and cats in Australian veterinary practices. *Vet Parasitol* 2011; 180: 383-388.
37. Zurita A, Callejon, R, De Rojas M, et al. *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization? *Syst Entomol* 2016; 41: 567-579.
38. Chandra S, Forsyth M, Lawrence AL, et al. Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from cats and dogs in New Zealand: Molecular characterisation, presence of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* and comparison with Australia. *Vet Parasitol* 2017; 234: 25-30.
39. Gil Collado J. Pulgas españolas parásitas de roedores. *Rev Iber Parasitol* 1949; 9: 214-258.
40. Gil Collado J. Insectos y ácaros de los animales domésticos. Ed Salvat 1960; 20: 305-325.

41. Beaucournu JC, Launay H. Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditerranéen occidental. *Féd Franc Soc Sci Nat* 1990;548.
42. Beaucournu JC, Ménier K. Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasite* 1998; 5: 3-16.
43. Ménier K, Beaucournu JC. Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. *J Med Entomol* 1998; 35: 883- 890.
44. Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994; 3: 294-299.
45. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 2012; 28: 1647-1649.
46. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 2012; 9: 772.
47. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 2001; 17: 754-755.
48. Azarm A, Dalimi A, Mohebbi M, et al. Morphological and molecular characterization of *Ctenocephalides* spp isolated from dogs in north of Iran. *J Entomol Zool Stud* 2016; 4: 713-717.
49. Dobler G, Pfeffer M. Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasite Vectors* 2011; 4: 139.
50. Kramer F, Mencke N. Flea biology and control. Springer, Berlin Heidelberg New York, 2001.

51. McElroy KM, Blagburn BL, Breitschwerdt EB, et al. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends Parasitol* 2010; 26: 197-204.
52. Doğanay A. Türkiye’de kedi ve köpeklerde görülen parazitler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1992; 39: 336-348.
53. Dinçer Ş, Cantoray R, Taşan E. Elazığ sokak kedilerinde görülen iç ve dış parazitler ile bunların yayılış oranları üzerinde araştırmalar. *FÜ Vet Fak Derg* 1980; 5: 7-15.
54. Gülanber A, Tüzer E, Keleş V. Flea infestation of dogs in Istanbul, Turkey. *J Fac Vet Med Univ Istanbul* 2002; 28: 219-225.
55. Aksın N, Erdoğan Z, Aksın NE. İki koyun çiftliğinde yaşayan insan ve hayvanlarda bulunan pire türleri ve bunların kontrolleri. *Türkiye Parazit Derg* 2004; 28: 146-149.
56. Aksın N, Aksın NE. Elazığ yöresindeki yabani tavşanlarda ektoparazit türlerinin yaygınlığı. *Türkiye Parazit Derg* 2002; 26.
57. Aldemir, OS. Epidemiological study of ectoparasites in dogs from Erzurum region in Turkey. *Revue Méd. Vét* 2007; 158: 148-151.
58. Beaucournu JC, Kock D. Deux puces nouvelles pour le Kenya: Description du mâle de *Ctenocephalides chabaudi* Beaucournu & Bain, 1982 et de *Xenopsylla trispinis tenuis* n. subsp. *Senck biol* 1990; 70: 251-260
59. Beaucournu JC. Notes sur les siphonaptères parasites de carnivores en France. *Ann Parasit Hum Comp* 1973; 48: 497-516.
60. Linardi PM, Santos JLC. *Ctenocephalides felis felis* vs *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera:Pulicidae): some issues in correctly identify these species. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 4: 345-354.

61. Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Med* 2003a; 270: 313-321.
62. Ballard JWO, Whitlock MC. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 2004; 13: 729-744.
63. Dean MD, Ballard KJ, Glass A. et al. Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics* 2003; 165: 1959-1969.
64. Shoemaker DD, Ahrens M, Sheill L, et al. Distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environ Entomol* 2003; 32: 1329-1336.
65. Hurst GDD, Jiggins FM. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 2005; 272: 1525-1534.
66. Kodandaramaiah U, Simonsen TJ, Bromilow S, et al. Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: *Wolbachia* mediated discordance between morphology, mitochondria and nuclear markers in a butterfly species. *Ecol Evol* 2013; 3: 5167-5176.
67. Hajibabaei M, Singer GA, Hebert PD, et al. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet* 2007; 23: 167-172.
68. Hebert PD, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Med* 2003b; 270: 96-99.

69. Khalimonchuk O, Rödel G. Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 2005; 5: 363-388.
70. Lawrence AL, Hii SF, Chong R, et al. Evaluation of the bacterial microbiome of two flea species using different DNA-isolation techniques provides insights into flea host ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 2015a; 91: 1-11.



KAYSERİ YÖRESİNDEKİ HAYVAN BARINAKLARINDAN TOPLANMIŞ PİRELERİN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI

ORIJINALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**4**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.researchgate.net
İnternet Kaynağı

%**1**

2

www.turkiyeparazitolderg.org
İnternet Kaynağı

%**1**

3

AKSİN, Nursel, ERDOĞMUŞ, Zerrin and
AKSİN, N. Eda. "İki koyun çiftliğinde yaşayan
insan ve hayvanlarda bulunan pire türleri ve
bunların kontrolleri", TUBITAK, 2004.
Yayın

%**1**

4

www.deepdyve.com
İnternet Kaynağı

<%**1**

5

LAWRENCE, A. L., G. K. BROWN, B. PETERS,
D. S. SPIELMAN, V. MORIN-ADELINE, and J.
ŠLAPETA. "High phylogenetic diversity of the
cat flea (Ctenocephalides felis) at two
mitochondrial DNA markers : High phylogenetic
diversity of the cat flea", Medical and

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nursafa ATİŞ

Uyruğu: (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 5 Kasım 1978, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 0 532 664 38 55

email: nursafaatis@gmail.com

Yazışma Adresi: Güllük mah. Yurt cad. Yiğit sk. Vakıf Göğebekân işhamı No:6/402

Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lise	Talas Lisesi/Kayseri	1996
Lisans	Niğde Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2013-	Biofan İlaçlama, Biyosidal-Haşere ve kemirgen kontrol	Mesul Müdür