

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER PROGRAMI
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ İLİNDEKİ SOKAK KÖPEKLERİNDE
DIROFILARIA IMMITIS* VE *DIROFILARIA
***REPENS*'İN MULTİPLEKS-PZR İLE TESPİT**
EDİLMESİ, *WOLBACHIA* DNA'SININ PZR İLE
ARANMASI VE *DIROFILARIA IMMITIS*
SEROPREVALANSININ BELİRLENMESİ

Ayşe Türkan ÇİFTÇİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

2012

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

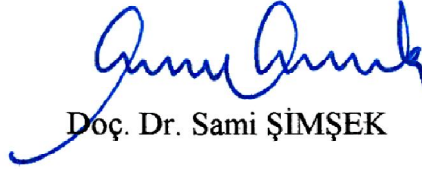
Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek

Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK

Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

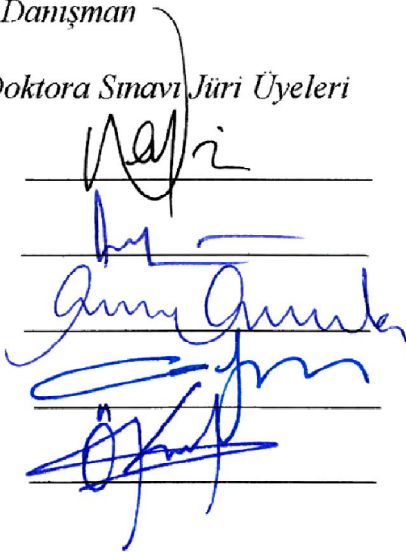
Prof. Dr. Nazir DUMANLI

Prof. Dr. Ergün KÖROĞLU

Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK

Doç. Dr. Cem Ecmel ŞAKİ

Doç. Dr. Ömer KIZIL



İTHAF SAYFASI

Bu tezi çok saygıdeğer babam Abdullah KOÇ ve annem Havva KOÇ'a
ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı bana yüksek lisans tezi olarak veren ve çalışmalarım süresince hiçbir zaman desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Sami ŞİMŞEK'e, araştırma süresince laboratuvar aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Parazitoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan hocalarıma, örneklerin toplanmasındaki desteğinden ötürü Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Murat YÜKSEL'e, manevi desteğinden dolayı eşim Doç. Dr. Mehmet ÇİFTÇİ ve kızlarım Fatma İrem ve Elvin Havva'ya ve bu çalışmayı 110O934 nolu proje ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	4
4. GEREÇ VE YÖNTEM	16
4.1. İstatistik Analiz.....	18
5. BULGULAR.....	19
6. TARTIŞMA.....	29
7. KAYNAKLAR	38

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Dirofilariozisin Dünyanın Farklı Ülkelerindeki Yaygınlığı.....	11
Tablo 2. Dirofilariozisin Ülkemizin Farklı Şehirlerindeki Yayılışı	12
Tablo 3. Çalışmada İncelenen Filarial Etkenler ve <i>Wolbachia</i> 'nın Yaş ve Cinsiyete Göre Pozitiflik Durumu	21
Tablo 4. Köpeklerde Saptanan Filarial Etkenler ile <i>Wolbachia sp</i> 'nin Yaş ve Cinsiyetle İlişkisi.	22
Tablo 5. Köpeklerden Elde Edilen Serum ve Kan Örneklerine Ait ELISA ve PZR Bulguları.....	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Multipleks-PZR ile belirlenen bandların görünümü. M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp); 24
- Şekil 2.** *Wolbachia* wsp primerleriyle çoğaltılmış PZR ürünlerinin görünümü. M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp);..... 24
- Şekil 3.** Çalışmada *Dirofilaria immitis* olarak belirlenen örneklerin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması. 25
- Şekil 4.** Çalışmada *Dirofilaria repens* olarak belirlenen örneğin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması. 26
- Şekil 5.** Çalışmada *Wolbachia* olarak belirlenen örneklerin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması..... 27
- Şekil 6.** *Dirofilaria immitis* örneklerinin genetik ağaç görünümü..... 28
- Şekil 7.** *Dirofilaria repens* örneğinin genetik ağaç görünümü..... 28
- Şekil 8.** *Wolbachia* örneklerinin genetik ağaç görünümü. 28

KISALTMALAR LİSTESİ

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	: Ribozomal Deoxyribonucleic Acid
IFAT	: Indirekt Floresan Antikor Testi
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

1. ÖZET

Dirofilaria immitis ve *Dirofilaria repens* köpeklerde parazitlenen en yaygın nematodlardandır. Bu çalışmanın amacı, sokak köpeklerinden elde edilen kan örneklerinde tek bir multipleks-PZR metoduyla her iki paraziti eş zamanlı olarak tespit etmek ve *D.immitis*'in yayılışını ELISA yöntemiyle belirlemektir. PZR amplifikasyonunda parazitin mitokondrionunun (12S rDNA) small subunit ribozomal RNA gen bölgesi, serolojik tanı amacıyla da ticari ELISA kiti kullanıldı. Çalışmanın diğer bir amacı da dirofilariosisin patogenezesinde önemli bir rol oynayan *Wolbachia*'nın PZR ile belirlenmesiydi. Bu çalışma için 161 sokak köpeğine ait kan ve serum örneği toplanmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. DNA izolasyonundan sonra bütün örnekler *D.immitis* ve *D.repens* için multipleks PZR ile ve *Wolbachia* için de konvansiyonel PZR ile spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmış, serum örnekleri de ticari ELISA kitiyle çalışılmıştır. Bu çalışma ile incelenen toplam 161 köpeğin üçünde (% 1.8) sadece *D.immitis*, birinde (% 0.6) *D.repens* ve üçünde (% 1.8) de miks enfeksiyon belirlenmiştir. Öte yandan çalışmaya dahil edilen 161 köpeğin 10'unda (% 6.2) *Wolbachia sp.* etkenine rastlanmıştır. Bu çalışma ile serum örneği ticari ELISA kiti ile analiz edilen 161 köpeğin altısında (% 3.7) *D.immitis* bakımından seropozitiflik saptanmıştır. Bu proje ile ülkemizde ilk kez *D. immitis* ve *D. repens*'in multipleks-PZR ile eş zamanlı tespiti gerçekleştirilmiş, bunun yanısıra ticari ELISA kiti ile bahsi geçen köpeklerdeki *D. immitis* seroprevalansı belirlenmiştir. Yine bu örneklerde *Wolbachia* bakterisinin varlığı bölgemizde ilk kez araştırılmıştır. Dirofilariozisin yörede ciddi bir sorun olmamasına rağmen, sokak köpeklerinin enfeksiyon kaynağı olmaya devam ettiği kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Wolbachia sp.*, PZR, Multipleks-PZR, ELISA, Elazığ.

2. ABSTRACT

DETECTION OF *DIROFILARIA IMMITIS* AND *DIROFILARIA REPENS* BY MULTIPLEX-PCR, INVESTIGATION OF *WOLBACHIA* DNA BY PCR AND DETERMINATION OF *DIROFILARIA IMMITIS* SEROPREVALANCE IN STRAY DOGS OF ELAZIG PROVINCE

Dirofilaria immitis and *Dirofilaria repens* are the most common species of filarial nematodes described in the dogs. In this research we aimed to perform a single-step multiplex PCR to detect and differentiate simultaneously and unequivocally *D.immitis* and *D.repens* on DNA extracted from canine peripheral blood and also detect the seroprevalance of *D.immitis* by ELISA. The amplification was performed using a set of primers designed on a portion of the small subunit ribosomal RNA gene of the mitochondrion (12S rDNA). We also aimed to PCR detection of the *Wolbachia* which is play an important role in *D.immitis* biology and contributes to the inflammatory pathology of the heartworm. For this aim, 161 blood and sera samples were collected from stray dogs and stored at -20 °C until used. After the DNA extraction, all samples will be worked with *Dirofilaria* primers by multiplex-PCR and *Wolbachia* primers by conventional PCR besides ELISA for serology. In this study, three of examined dogs (1.8 %) were found to be infected with only *D.immitis*, one of them (0.6 %) with *D.repens* and three of them (1.8 %) with both parasites. Besides, 10 out of 161 (6.2 %) were detected as infected with *Wolbachia* sp. Lastly, the

seroprevalence of dirofilariosis in examined dogs were found to be 3.7 % (6/161). The simultaneous detection of both *D. immitis* and *D. repens* has been achieved for the investigation of *Wolbachia* bacteria in those samples were made first time in our region. As a result, it was concluded that although dirofilariosis is not a serious problem in the region, stray dogs still continue to be a source of infection.

Key Words: *Dirofilaria immitis*, *D.repens*, *Wolbachia sp.*, PCR, Multiplex-PCR, ELISA, Elazig.

3. GİRİŞ

Dirofilaria immitis, evcil köpeklerin en önemli filarial nematodlarından biri olup, köpeklerde kalp kurdu hastalığına (Dirofilariozis) neden olmaktadır (1). Bu parazitin doğal konağı köpekler ile kurt ve koyote gibi yabani kanideler olmakla birlikte enfeksiyon evcil kedi de dahil olmak üzere dingo, kaplan, ayı, panda, şempanze, orangutan, fok balıkları, su samuru, tavşan, rakun, geyik, at ve insanlarda da şekillenebilmektedir (1-4). *D. immitis*'in biyolojisinde *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia* ve *Psoropha* cinslerine bağlı 60'ın üzerinde sivrisinek türü vektör görevini görmektedir (4). Erişkin parazitler karnivorlarda kalbin sağ ventrikülü ile pulmoner arterlere yerleşirken, mikrofilerleri perifer kan, iç organlar ve serebrospinal sıvıda bulunurlar (2).

Parazitler uzun, ince ve beyaz renkte olup küçük yuvarlak bir ağıza sahiptir. Erkekler 12-18 cm uzunlukta, 0.5-1 mm genişliktedir ve arka uçları spiral tarzda kıvrılmıştır. Kuyrukta küçük kaudal kanat ile 5 çift perianal, 6 çift postanal papil yer alır. Spikülümmler eşit olmayıp sağ spikülüm 175-229 µm, sol spikülüm 300-375 µm'dir. Dişileri 25-31 cm uzunlukta, 1-1.3 mm genişlikte olup arka uçları küttür. Vulvanın ön uca uzaklığı 2.7 mm, anüsün arka uca uzaklığı ise 175 µm'dir. Kanda görülen mikrofilerleri 270-325 X 5-7.3 µm, kılıfsız, düz bir vücut ile kuyruğa sahip olup, ön kısmı gittikçe incelenerek sonlanmaktadır (2,4).

Dişi parazitin uterusunda gelişen yumurtalar ince vitellin bir membranla çevrili olup, embriyonun gelişip uzamasıyla bu membran bir kılıf halini alır. Yumurtayı terk etme esnasında membran kaybolur ve perifer kana geçen

mikrofilerler kılıfsız gözükür. Sivrisineklerin dişileri tarafından kanla birlikte alınan mikrofilerler 48 saat içerisinde (26 °C’de) orta bağırsak kısmını terk edip malpighi kanallarına göç ederek distal hücrelere yerleşirler. Yaklaşık olarak dördüncü güne doğru larvalar hareketsiz kalır, boyları kısalır ve kalınlaşırlar (5,6). Takriben 10. gün malpighi kanallarında ilk gömlek değiştirme sonucu ikinci dönem larvalar gelişir. Enfeksiyondan 13 gün sonra ikinci gömlek değiştirme sonucu üçüncü dönem larva haline gelirler. Yüksek aktiviteye sahip üçüncü dönem larvalar, sivrisineklerin mikrofiler alımından 17 gün sonra malpighi kanallarını parçalar ve hemosel yoluyla baş ve ağız kısmına göçerek labiuma ulaşırlar (5). Köpekler, sivrisineklerin kan emmesi esnasında enfekte olmakta ve sonkonak dokusuna geçen üçüncü dönem larvalar aktif göçle derialtı dokusu, üst karın bölgesi ile göğüs boşluğundaki kaslara göç ederek 3-12 gün içinde gömlek değiştirip 4. dönem larva haline ulaşmaktadırlar. Dördüncü dönem larvalar enfeksiyondan 50-70 gün sonra tekrar gömlek değiştirerek beşinci dönem larva veya genç olgun haline gelirler. Bunlar enfeksiyondan 70 gün sonra kalbe ulaşır 90. güne kadar göçlerini tamamlamış olarak seksüel olgunluğa erişirler ve mikrofilerleri enfeksiyondan 190-197 gün sonra kanda görülmeye başlar (5,6).

Dirofilaria immitis’in nakli üç önemli faktöre bağlıdır: 1- Vektör sivrisineğin mevcudiyeti, 2- Serbest yaşamlı etçil populasyonunun genişliği, 3- Uygun sıcaklık değerleri (7). Birçok sivrisinek türünün *D. immitis*’in arakonağı olabilmesi ve çoğu yerleşim biriminde sokak köpeği populasyonunun fazla olması nedeniyle *D. immitis*’in naklinde belirleyici faktör uygun sıcaklık değerleridir. Yapılan çalışmalar sivrisinekteki larval gelişmenin 18-34 °C arasındaki sıcaklıklarda 8-29 gün sürdüğünü ortaya koymuştur (7,8).

Dirofilaria immitis enfeksiyonunda, erişkin parazitlerin üreme periyodunun 2-7 yıla, yaşam sürelerinin 7 yıla kadar sürebildiği kaydedilmektedir. Perifer kandaki mikrofilere ise 2-7.5 yıl canlılıklarını sürdürebildiği bildirilmiş olup transplasental geçiş sonucunda neonatal yavrularda mikrofilere görülebileceği kaydedilmiştir (2,5,6). *D.immitis* enfeksiyonlarında mikrofilere her zaman görülebilmesine karşın perifer kandaki en yüksek düzeyin akşam ve gece saatlerine rastladığı, perifer kandaki mikrofilere kısmen çevre sıcaklığına bağlı olarak, sıcak aylarda belirgin bir artış gösterdiği belirtilmiştir (9).

Vektör görevi gören sivrisinekler tatlı ve tuzlu su, büyük ve küçük su birikintileri, bataklık alanlar gibi farklı akuatik ortamlarda gelişebilmekte ve bu bölgeler enfeksiyon için risk taşımaktadır. *Dirofilaria immitis* ve diğer filarial türler üzerinde yapılan çalışmalarda, arakonaktaki gelişim için 24-32 °C'nin ideal olduğu, 21 °C'nin altındaki sıcaklıkların gelişmeyi geciktirdiği, 16 °C'nin altındaki sıcaklıkların ise parazitler için ölümcül olduğu bildirilmektedir. Köpeklerin enfeksiyona duyarlı ve birçok sivrisinek türünün etkili olması, yeterli sayıda sivrisinek yoğunluğu ve uygun sıcaklıktaki patent enfeksiyon alanlarının bulunması yeni enfeksiyon odaklarının oluşması için yeterlidir (2,3,4).

Dirofilaria immitis'in erişkinleri kalp ve pulmoner arterlerde yerleşmekte olup kan ile beslenmekte, pulmoner sirkülasyon, kalp, karaciğer ve böbrekleri etkileyen çeşitli sistemik bozukluklara sebep olmaktadır (5). Pulmoner arterlerdeki parazitler güçlü bir yangısal reaksiyonun oluşumuna, endotelde dejenerasyona ve kanda pıhtılaşmalara yol açarak kalbin daha çok çalışmasına ve zorlanmasına sebep olmaktadır. Pulmoner arterlerdeki genişleme, emboli ve

düzensiz görünüm, pulmoner hipertansiyon, sağ ventriküler dilatasyon ve hipertrofiye neden olarak sağ ventriküler yetmezliğe yol açmaktadır (5). Ayrıca parazite karşı ortaya çıkan yangı hücrelerinin aşırı artışı ile yüksek antikor düzeyinin pulmoner kapillarlardaki mikrofilerleri yıkımlaması sonucu akciğerde non-enfeksiyöz pneumoni (pulmoner eozinofilik granulomatosis) tablosu şekillenebilmektedir (10). Parazitlerin kendiliğinden veya tedavi sonrası ölümü, pulmoner trombo-embolizme sebep olarak akciğer parankimasında periarterial granülomlar oluşabilmektedir (6). Enfekte köpekler tedavi edilmediği takdirde immun sistem kronik olarak stimüle edilmektedir (Kronik İmmun Stimulasyon). Yüksek düzeyde bulunan antikorlar göz, böbrek, kan damarları ve eklemlerin hassas membranlarında presipite olarak birçok bozukluğa neden olabilmektedir. Bu alanlara yerleşen antikorlar bölgeye yangı hücrelerinin gelmesine sebep olarak büyük bir doku hasarı ve ağrı tablosunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır (11). Böbrek bozuklukları (glomerulonefritis) kronik immun stimulasyon neticesinde ortaya çıkabildiği gibi, mikrofilerlerin glomeruler epitelyumda meydana getirdikleri travma ve bazı köpeklerde görülen amyloidosis neticesinde de görülebilmektedir (2,4,5).

Mikrofilerlerin kanda yoğunluklarının artması çeşitli dokularda kapillar damarların tıkanmasına yol açabilir. Nitekim, meme bezlerinde küçük kan damarları ve kapillarlardaki mikrofilerlerin bu bezde çeşitli patolojik lezyonlara yol açtığı kaydedilmiştir (12). Parazitin mikrofilerlerine karşı gelişen aşırı duyarlılık neticesinde enfekte hayvanlarda kaşıntılı, papüllü veya ülserli dermatid gibi çeşitli deri hastalıklarının ortaya çıkabildiği belirtilmiştir (5). Bununla birlikte perifer kandaki mikrofiler yoğunluğunun kalp veya pulmoner arterlerde mevcut

erişkin parazit sayısı veya enfeksiyon şiddeti ile orantılı olmadığı kaydedilmektedir (2,4).

Dirofilaria immitis enfeksiyonunun düşük parazit yoğunluğuna bağlı olarak daha çok subklinik seyrettiği kaydedilmektedir (5). Klinik tablonun 25'in üzerinde parazit bulunduğunda ortaya çıktığı, 100'ün üzerinde parazit varlığında enfeksiyonun çok ağır seyrettiği belirtilmektedir. Akut veya yavaş seyirli olarak ortaya çıkan sağ kalp yetmezliği, hasta hayvanlarda egzersiz intoleransı ile birlikte asites, göğüs ve periton boşluğunda sıvı toplanması gibi belirtilere neden olmaktadır (2,4). Kardiopulmoner hastalık tablosunda asemptomatikten kronik öksürük, solunum güçlüğü, anormal akciğer ve kalp sesleri ile aritmiye kadar değişik şekillerde klinik belirtiler ortaya çıkmakta, akciğerde anormal kan pıhtılaşması nedeniyle burun kanaması şekillenebilmektedir (4).

Dirofilaria immitis'e oranla daha az patojen olan, bu nedenle de üzerinde daha az durulan *D. repens* köpek, kedi, aslan, tilki ve sporadik olarak da insanların derialtı bağ dokusuna yerleşen bir parazittir (2). İplik şeklinde, beyazımtırak saman sarısı renginde bir nematod olan *D. repens*'in erkekleri 4.8-8.2 cm. uzunluğunda, 300-450 mikron genişliğindedir. Dişileri daha büyük olup uzunlukları 10-17 cm genişlikleri ise 450-650 mikrondur. Kılıfsız olan mikrofilerlerinin uzunlukları 268-360 mikron, genişlikleri ise 5-8 mikrondur (2,13,14). Parazitin biyolojisi *D. immitis'e* benzemekte, arakonak görevini *Anopheles*, *Aedes*, *Armigeres*, *Mansonia* ve *Culex* cinslerine bağlı sivrisinekler ile Tabanidae ailesine bağlı *Haematopoda variegata*'nın üstlendiği kaydedilmektedir (4). Gelişme, sineğin malpighi tüplerinde olmakta, enfektif dönem olan üçüncü larval safhaya geçiş ısıya bağlı olarak 9-15 gün sürmektedir. Daha sonra

sivrisineğin ağız organeline giren larva, sineğin kan emmesi esnasında sonkonak köpeğe geçmekte ve bu enfektif üçüncü dönem larvalar gelişimini tamamlayıp derialtı dokulara yerleşerek erişkin *D. repens* haline geldikten sonra ve mikrofilerleri kan dolaşımına geçmektedir. Prepatent süre 6 ay, patent süre ise en az 2-3 yıldır. Bir dişi parazit günde yaklaşık 5000 mikrofiler çıkarmaktadır. Mikrofilerler gebelik sırasında plasenta ile anneden yavruya da geçebilmektedir (2,14).

Erişkin parazitler deri altı bağ dokusunda görülmekte, bu nedenle de *D. immitis* kadar patojen olmamakta ve genellikle herhangi bir hastalık belirtisi görülmemektedir. Bazen larvalar deride ekzama karakterli deri dökülmesine, bazen de pruritise neden olabilmektedir. Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip olan *D. repens*, daha çok Güney Avrupa, Güney Amerika, Asya ve Afrika gibi sıcak ülkelerde görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avustralya'da rastlanmadığı bildirilmektedir. *D. repens*'e Türkiye'deki yerli köpeklerde ilk kez 1962 yılında İstanbul'da rastlanmıştır. Daha sonra Elazığ ve Ankara'daki köpeklerde de parazitin varlığı saptanmıştır. Bu olaylarda toplam 110 adet erişkin parazit toplanmış ve bu parazitlerin hepsine de deri altı bağ dokusunda rastlanmıştır (2, 14-17).

Dirofilaria repens'e gerek Türkiye'de, gerekse dünyanın birçok ülkesinde özellikle İtalya'da insanlarda da rastlanmıştır. İnsanların deri altı bağ dokusunda bulunan ve tür teşhisi yapılamayan *Dirofilaria* türleri uzun yıllar *D. conjunctivae* olarak isimlendirilmiştir. Birçok yazar yaklaşık 100 yıl *D.conjunctivae* olarak bilinen parazitin de insanlardaki olgunlaşmamış *D.repens* olduğunu ileri sürmektedir (2,14,18,19). İnsanlarda hiçbir zaman ergin şeklini kazanamadığı

bildirilen (20), *D. repens*'e (*D. conjunktivae*) Türkiye'de ilk kez Unat (21) tarafından 1942 yılında İstanbul'da bir gencin karın derisi altındaki nodülde rastlanmıştır. Daha sonra yine aynı araştırmacı tarafından başka bir gencin sağ kasığındaki nodülden çıkarılan parazitin de *D. repens* (*D. conjunktivae*) olduğu saptanmıştır (21). Bu iki olaydan başka aynı parazite Balıkesir'in Sındırgı ilçesi İbikler köyünden ve Samsun'un Terme ilçesi Yerli köyünden birer kadında rastlanmıştır (19,20).

Köpeklerde *Dirofilaria* enfeksiyonlarının teşhisinde klinik, parazitolojik, immunoserolojik ve moleküler yöntemler ile radyoloji, anjiyografi ve ultrasonografi gibi diğer bazı tanı yöntemlerinden faydalanılmaktadır. Direkt kan muayene yöntemi, sürme preparat yöntemi, saponin konsantrasyon yöntemi, mikrohematokrit-kapillar sedimentasyon yöntemi, modifiye knott tekniği, membran filtrasyon tekniği, asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemi perifer kanda mikrofilere aranması yöntemlerindendir. Bu yöntemler özellikle kanda mikrofilere sayısının az olduğu dönemlerde, enfeksiyonun erken dönemlerinde ve deneyimli elemanların olmadığı zamanlarda kesin sonuç vermemektedir (4).

Dirofilaria immitis enfeksiyonlarında Indirekt Floresan Antikor (IFA) testi, Counterimmunoelktroforezis, Latex Aglutinasyon, Koaglutinasyon, Hemaglutinasyon ve ELISA gibi immunoserolojik tanı yöntemleri de kullanılmaktadır. Antikor testlerinden IFAT yüksek duyarlılıkta olup özellikle bağırsakta yerleşen nematodlar ile *D. reconditum* ve *D. repens* ile çapraz reaksiyon vermesi nedeniyle düşük spesifiteye sahiptir. Antijen testlerinin antikor testlerine oranla daha yüksek spesifite verdiği kaydedilmekte, sadece *D. repens* ile çapraz reaksiyon gözlenebileceği belirtilmektedir. Mevcut antijen testleri yalnızca

dişi üreme organlarından kaynaklanan antijenlere karşı oluşan antikorları saptadığı, gelişmemiş veya sayılarının az olduğu durumlar (<3) ile yalnızca erkek parazitlerin mevcut olduğu durumlarda etkili sonuç alınmadığı kaydedilmektedir. Günümüzde bu amaçla antijen testi olarak ELISA, diğer testlere nazaran tercih edilmekte ve birçok ticari kit (DiroCHEK, Assure/CH, UNI-TEC, PetChek, Snap, CITE Semi-Quant) kullanılmaktadır. Bu kitlerle yapılan araştırmalarda sensitivitenin % 64.5-87.3, spesifitenin ise % 95.9-100 arasında değiştiği bildirilmiştir (4,22-25).

Köpeklerde *D. immitis*'in prevalansı ile ilgili hem Türkiye hem de dünyanın değişik ülkelerinde çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 1. Dirofilariozisin Dünyanın Farklı Ülkelerindeki Yaygınlığı

Parazit türü	Ülke	Köpek sayısı	Kullanılan Teknik	Yaygınlık	Kaynak
<i>D. immitis</i>	ABD	148	ELISA	% 0.3	26
<i>D. immitis</i>	İspanya	114	Modifiye Knott, PZR ve ELISA	% 0, % 1.6 ve % 2.6	27
<i>D. immitis</i>	Güney Kore	848	ELISA	% 40	28
<i>D. immitis</i>	Tayvan	664	ELISA	% 13.8 (şehir) % 12.1 (kırsal)	29
<i>D. repens</i>	İspanya	114	Modifiye Knott, PZR ve ELISA	% 84.6	27
<i>D. repens</i>	İtalya	351	Modifiye Knott	% 0.8	30
<i>D. repens</i>	Güney Kore	81	ELISA	% 20.9	31

Tablo 2. Dirofilariozisin Ülkemizin Farklı Şehirlerindeki Yayılışı

Parazit türü	Şehir	Köpek sayısı	Kullanılan Teknik	Yaygınlık	Kaynak
<i>D. immitis</i>	Ankara	627	Nekropsi	% 0.6	32
<i>D. repens</i>	Elazığ	283	Basit Teknik	% 7.06	16
<i>D. immitis</i>	Elazığ	120	Nekropsi	% 5	17
<i>D. repens</i>	Elazığ	120	Nekropsi	% 2.5	17
<i>D. immitis</i>	Bursa	100	Nekropsi	% 2	33
<i>D. immitis</i>	Bursa	168	Basit teknik	% 2.98	34
<i>D. immitis</i>	Kayseri	50	Nekropsi	% 12	35
<i>D. immitis</i>	Sivas	50	Nekropsi	% 6	36
<i>D. immitis</i>	Van	106	Basit Teknik	% 46.2	37
<i>D. immitis</i>	Aydın	158	Modifiye Knott	% 13.9	38
<i>D. immitis</i>	Ankara	300	Natif, Modifiye Knott, membran filtrasyon	% 6.3	39
<i>D. repens</i>	Ankara	300	Natif, Modifiye Knott, membran filtrasyon	% 0	39
<i>D. immitis</i>	İstanbul İzmir	380	ELISA	% 1.52 % 0	40
<i>D. immitis</i>	Kayseri	280	Membran filtrasyon ve ELISA	% 9.6	41
<i>D. immitis</i>	Adapazarı İzmit Mersin Ankara Elazığ	211	ELISA, PZR	% 12.3 % 18.3 % 10.5 % 14.8 % 0	42
<i>D. immitis</i>	Hatay	269	Modifiye knott, ELISA	% 26	43
<i>D. immitis</i>	Erzurum	123 123 93	PZR Basit Teknik ELISA	% 8.1 % 4.8 % 2.1	44

Gioia ve ark. (45), köpeklerde *D. immitis* ve *D. repens*'in eş zamanlı tespitine yönelik multipleks-PZR ile yaptıkları bir çalışmada, 12 adet *D. immitis*, 12 adet *D. repens* ve iki de miks enfeksiyonlu köpekte yaptıkları multipleks-PZR

analiziyle türleri tek bir PZR işlemiyle tespit edebilmişler ve sensitiviteyi 4 mikrofiler/ml kan olarak belirlemişlerdir.

Wolbachia, *Rickettsiaceae* familyasına ait, gram negatif bir alfa protoeobakteridir. *Wolbachia* ilk kez 1924 yılında Herting ve Wolbach tarafından sivrisineğin üreme dokularında saptanmıştır. Bunun ilk tanımlanması aynı sinek türünde 1936 yılında *Wolbachia pipientis* olarak Herting tarafından yapılmıştır. Bu bakteri obligat, hücre içi organizma olup, bazı artropod ve nematodlarda genelde kütikula altında hypodermisteki hücrelerin içinde, bazen dişilerde ovaryum, ookist ve uterustaki embriyonik gelişim devrelerinde bulunur. Bu durum bakterinin vertikal olarak taşınabildiğini de göstermektedir. Kokoid veya basilliform şeklinde olan bu bakteri, çift membranlı, ribozomal granüllü ve ortalama 0,8-1,3 µm uzunluğunda olup dünya genelinde çok yaygındır. Yapılan araştırmalarda 63 artropod türünün (Aracnida 2, Insecta 61) 48'inde (% 76), 20 filarial nematod türünün 18'inde (% 90) *Wolbachia* tespit edilmiştir. *Wolbachia* insekt türlerinin en az % 20'sini filarial nematodların ise neredeyse tamamını enfekte eder (46-55).

Diğer filarial türlerde olduğu gibi, *D. immitis* ve *D. repens*'de de *Wolbachia* hücre içinde bulunan bir bakteridir. *Wolbachia*, *D. immitis*'de bir nesilden diğerine maternal olarak nakledilir ve bu bakteri parazitin bütün yaşam dönemlerinde elde edilebilir. Bütün *D. immitis* parazitleri *Wolbachia*'ları barındırır. Bakteri, parazitin bütün gelişme dönemlerinde bulunur ve lateral kordun hypodermal hücrelerinde ve dişilerde ise üreme organlarında yerleşir. *Dirofilaria* ve *Wolbachia* arasındaki simbiyotik ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte filarial parazitlerin bakterinin gelişmesi ve replikasyonu

için gerekli olan aminoasitleri sağladığı, diğer taraftan *Wolbachia* bakterilerinin ise *Dirofilaria* türlerinin metebolizması için gerekli olan glutathione ve haem gibi çeşitli önemli molekülleri ürettiği  ne sürülmektedir. Bu açıdan filarial enfeksiyonlar için yeni kontrol/tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bu simbiyotik ilişki anahtar rol üstlenmektedir (56-58).

Wolbachia, gram-negatif bakteri olması sebebi ile filarial enfeksiyonlarda patogeneze ve immün yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. *Wolbachia* hem canlı parazitlerden hem de parazitlerin doğal ölümü, mikrofilarial yıkımlanma ve farmakolojik müdahale sonrası ölen parazitlerden serbest kalmaktadır (59). Enfeksiyonun insan ve fare modellerinde bakterinin salınımının sitokinlerin regülasyonu, n trofiler artış ve spesifik immünglobulinlerin artışı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. *D. immitis* enfeksiyonu sonucu doğal olarak ölen köpeklerde bakterinin mikrofilarilerin normal olarak sirküle ettiği özellikle böbrek ve karaciğer gibi organlarda yoğunlaştığı belirlenmiştir (56). Bunun yanında mikrofilaremi köpeklerde gizli enfekte köpeklere oranla daha güçlü spesifik bir immün yanıt belirlenmiştir. Bu durum da mikrofilarilerin yıkımlanmasının dirofilariosisli köpeklerde *Wolbachia* için önemli bir kaynak olduğu hipotezini desteklemektedir. Bunun yanında *D. immitis*'ten açığa çıkan *Wolbachia*'nın kininlerin nötrofillerde pro-inflamat r sitokin üretimini uyardığı gösterilmiştir (60).

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerle tedaviyle filarialar *Wolbachia* yönünden negatif hale getirilebilirler. Bu inflamatuvar yanıt, parazit doğal yollardan veya antiparaziter tedavi ile elimine edildiğinde daha da ciddi olabilir. Ancak *Wolbachia*'sız parazitlerin ölmesi neticesinde konakta daha az yoğunlukta

yangısal reaksiyonların oluştuğu bilinmektedir. Bu nedenle filariasiste antiparaziter tedaviden önce tetrasiklin grubu antibiyotiklerle *Wolbachia*'ların elimine edilmesi paraziter tedavi sonucunda oluşabilecek yangısal reaksiyonların şiddetinin azaltması bakımından önemli görülmektedir. *D. immitis* ile deneysel enfekte köpeklerde doxycycline'in ivermectin ve melarsomine ile birlikte verilmesi neticesinde oluşan pulmoner patolojinin, melarsominin tek başına verilmesinde oluşandan daha az olduğu gösterilmiştir. Daha ilgini, son yapılan çalışmalar ivermectin/doxycycline kombinasyonunun adultisid olduğunu ortaya koymuştur. Bu da *Wolbachia*'nın dirofilariosisin patogenesisinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir (61-65).

Dirofilaria immitis ile enfekte hayvanlarda dolaşımda *Wolbachia* antik rlarına ve dokularda ise *Wolbachia* antijenlerine rastlanmıştır (57). *Wolbachia* yüzey proteini, köpek nötrofil şemotaksis ve IL-8 üretimini uyarmaktadır. Bu proteinle köpek vasküler endotelial hücrelerinin uyarılması, cyclooxygenase-2, 5-lipooxygenase, leukotriene B4, intracellular adhesion molecules, E-cadherin ve vascular endothelial growth factor' n üretimine yol açmaktadır (66,67).

Bu çalışmanın amacı, sokak köpeklerinde tek bir PZR reaksiyonu ile *D. immitis* ve *D. repens*'in multiplex-PZR ile eşzamanlı tesbiti; *D. immitis*'in endosimbiontu olan *Wolbachia* DNA'sının klasik PZR ile araştırılması ve sokak köpeklerinde *D. immitis* seroprevalansının ticari ELISA kiti kullanılarak belirlenmesidir.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan köpek kanları, Elazığ Belediyesi ile Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi arasında imzalanan sokak hayvanlarının rehabilitasyonu anlaşması çerçevesinde 2010 yılı içerisinde Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine kısırlaştırılmak amacıyla getirilen sokak köpeklerinden elde edilmiştir. Proje için Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 09.12.2010 tarih, 2010/15 toplantı sayısı ve 114 nolu kararıyla etik kurul izni alınmıştır. Bu amaçla 161 sokak köpeğinden anestezi esnasında EDTA'lı tüplere 5 ml kan örneği alınmış, ayrıca bu köpeklerden serum örnekleri elde edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmış, köpeklerin yaş, cinsiyet ve ırkları protokole kaydedilmiştir. DNA izolasyonu aşamasında öncelikle -20 °C'den çıkarılıp oda ısısında çözdürülen kan örneklerinden 125 µl alınıp üzerine 600 µl lysis buffer ve 20 µl Proteinase-K (20 mg/ml) konulup 1 gece 56 °C'de bekletildikten sonra Fermentas Genomic DNA Purification Kit (MBI, Litvanya) ile total genomik DNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra nematod türlerinin 12S rDNA'sını çoğaltan genel primerler 12SF (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3') ve 12SRdeg (5'-ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3') ile *D. immitis* forward primeri (12SF2B 5'-TTTTTACTTTTTTGGTAATG-3') ile *D. repens* reverse primeri (12SR2 5'-AAAAGCAACACAAATAA(CA)A-3') aynı tüpte PZR işlemine tabi tutuldu. PZR karışımı 50 µl olacak şekilde hazırlandı ve içerisine her örneğin genomik DNA'sından 5 µl ayrıca 5 µl 10 X PCR Buffer, 5 µl MgCl₂, 1.25 mM dNTP, 0.5 IU Taq DNA polymerase ve herbir primer çiftinden 20 pmol konuldu. PZR şartları; 92 °C'de 1 dakika ön denaturasyon, 92 °C'de 30 saniye, 52

°C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika (40 siklus) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşmuştur. PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV transilluminatörde görüntülendi. Metot, Gioia ve ark. (45)'nin bildirdiği şekilde fakat birtakım küçük değişikliklerle uygulandı. Bütün işlemlerde laboratuvarımızda mevcut olan *D. immitis* ve *D. repens* pozitif kontrol DNA'ları ve negatif kontrol kullanılmıştır. Enfekte bir köpekten nekropsi sonucu elde edilen erişkin *D. immitis*'ten izole edilen genomik DNA pozitif kontrol olarak kullanılırken, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Alparslan Yıldırım'dan temin edilen mikrofilere mik bir köpek kanından izole edilen gDNA da *D.immitis* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise *Dirofilaria* negatif bir anneden doğan yavru bir köpekten alınan kan örneği kullanılmıştır. *D. repens* pozitif kontrol gDNA ise Luigi Venco'dan (Veterinary Hospital "Citt'a di Pavia", Viale Cremona Pavia, Italy) temin edilen erişkin *D. repens*'den elde edildi.

Eldeki genomik DNA örneklerinde *Wolbachia* DNA'sının aranması amacıyla *Wolbachia wsp* (wolbachia surface protein) genini çoğaltan spesifik primerler ile (Forward 5'- TGGTCCAATAAGTGATGAAGAACTAGCTA-3', reverse 5'-AAAATTAAACGCTACTCCAGCTTCTGCAC-3') PZR yapılmıştır. Bu amaçla; 5 µl 10X PZR buffer, 5 µl MgCl₂, 125 µM dNTP, her primer çiftinden 20 pmol, 0.2 µl Taq DNA Polymerase (5 IU) ve 5 µl genomik DNA içeren PZR karışımı hazırlanmış ve 94 °C'de 3 dakika; 94 °C'de 1 dakika, 52 °C'de 1 dakika ve 72 °C'de 1 dakika (40 siklus) ve 72 °C'de 5 dakika son uzama aşamalarından oluşan PZR şartlarına tabi tutulmuştur. Takiben PZR ürünleri % 1.4'lük agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyandıktan sonra ve UV transilluminatörde

görüntülenmiş ve yaklaşık 630 bp'lik band veren örnekler pozitif kabul edilmiştir. Bu işlem Zhou ve ark. (68)'nın bildirdiği şekilde uygulanmıştır.

Örnekler içerisinde seçilen altı *Dirofilaria* ve iki *Wolbachia* numunesinin DNA sekans analizi ticari bir firmaya (Iontek, İstanbul-Türkiye) yaptırılarak GenBank'ta yayınlanmış sekans sonuçlarıyla BLAST analizi yapılarak kıyaslanmış ve PZR bulgularının doğrulanması yapılmıştır.

Serum örneklerinin ticari ELISA kitiyle işlenmesi amacıyla Filarcheck (Agrolab, Italy) kiti kullanılmış ve kit protokolü takip edilmiştir. Bu test kiti ile monoklonal antikorlarla kaplanmış mikropatlara eklenen test serumlarındaki *D. immitis* antijenlerinin varlığı araştırılmıştır. Test neticesinde pozitif örnekler, içerisindeki antijenin yoğunluğuna göre değişen derecede mavi renkte gözlenirken, negatif ve örnekler renksiz kaldığı saptandı.

4.1. İstatistik Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 15.0 (69) paket programında 2X2'lik düzende Fischer's Exact testi ve Pearson's Ki Kare testleri kullanıldı.

5. BULGULAR

Bu çalışmada PZR ile bütün filarial örneklerde yaklaşık 500 bp'lik band gözlenirken, *D. immitis* örneklerinde 204 bp, *D. repens* örneklerinde ise 327 bp'lik band gözlemlendi. Yani, sadece *D. immitis* ile enfekte köpeklerde 500 bp ve 204 bp olmak üzere iki band; sadece *D. repens* ile enfekte köpeklerde 500 bp ve 327 bp olmak üzere iki band; heriki türle miks enfeksiyonda ise 500 bp, 327 bp ve 204 bp olmak üzere üç band belirlenirken, negatif kontrollerde herhangi bir band gözlenmedi (Şekil 1). Buna göre, bakısı yapılan 35 erkek köpeğin ikisinde (% 5.7) sadece *D. immitis*, birinde (% 2.8) sadece *D. repens* ve birinde de (% 2.8) miks (hem *D. immitis* hem *D. repens*) enfeksiyon tespit edildi. Öte yandan incelenen 126 dişi köpeğin birinde (% 0.8) *D. immitis* ve ikisinde (% 1.5) miks enfeksiyon belirlenmiş bu örneklerin hiçbirinde *D. repens* tespit edilememiştir. *D. immitis* saptanan köpeklerle (% 4.2), *D. repens* belirlenen bir köpeğin (% 1.4) 2-4 yaş grubundan olduğu buna karşın miks enfeksiyon gözlenen köpeklerden ikisinin (% 2.8) 2-4 yaş ve birinin de (% 4.7) 4 yaş üstü gruplarda bulunduğu ortaya konmuştur. Neticede bu çalışma ile incelenen toplam 161 köpeğin üçünde (% 1.8) sadece *D. immitis*, birinde (% 0.6) *D. repens* ve üçünde (% 1.8) de miks enfeksiyon belirlenmiştir (Tablo 3).

Dirofilaria sp. örneklerinin DNA sekans analizi neticesinde bir örneğin *D. repens*, üç örneğin *D. immitis* ve iki örneğin de *Wolbachia sp.* olduğu teyid edilmiştir. İki *Dirofilaria* örneğinde ise sekans sonucu elde edilememiştir. Çalışmada, *D. immitis*, *D. repens* ve *Wolbachia* olarak belirlenen örneklerin sekans sonucu ile gen bankta yayınlanmış sekansların kıyaslanması sırası ile Şekil

3, 4 ve 5'te; bu kıyaslamalara ait genetik ağaç görünüşleri ise Şekil 6, 7 ve 8'de verilmiştir.

Yapılan PZR analizi neticesinde *Wolbachia sp.* için agaroz jelde yaklaşık 630 bp band veren örnekler pozitif kabul edilmiştir (Şekil 2). Buna göre, erkek köpeklerin dördünde (% 11.4) ve dişi köpeklerin de altısında (% 4.7) *Wolbachia sp.* belirlenmiştir. Bu etkenin saptandığı köpeklerin üçü (% 4.3) 0-1 yaş, altısı (% 8.4) 2-4 yaş ve biri (% 4.7) de 4 yaş üstü gruptaydı. Neticede, çalışmaya dahil edilen toplam 161 köpeğin 10'unda (% 6.2) *Wolbachia sp.*'ye rastlanmıştır (Tablo 3).

Wolbachia sp., dört örnekte tek başına, iki örnekte *D. immitis*, bir örnekte de *D. repens* ile birlikte bulunmuş, üç örnekte ise miks enfeksiyon gözlenmiştir (Tablo 4).

Ticari ELISA kiti ile analiz edilen 161 köpeğe ait serum örneğinin altısında (% 3.7) *D. immitis* yönünden seropozitiflik saptanmıştır. Bu test ile bakısı yapılan 0-1 yaş grubundaki 69 köpeğin ikisinde (% 2.9) ve 2-4 yaş grubundaki 71 köpeğin dördünde (% 5.6) seropozitiflik elde edilmiştir. Cinsiyete göre bakıldığında çalışmaya dahil edilen 35 erkek köpeğin ikisinde (% 5.7) ve 126 dişi köpeğin dördünde (% 3.2) seropozitiflik belirlenmiştir. Ticari ELISA kiti ile seropozitif bulunan bu köpeklerin üçünde aynı zamanda PZR ile de *D. immitis* tespit edilmiştir. (Tablo 5).

Tablo 3. Çalışmada İncelenen Filarial Etkenler ve *Wolbachia*'nın Yaş ve Cinsiyete Göre Pozitiflik Durumu

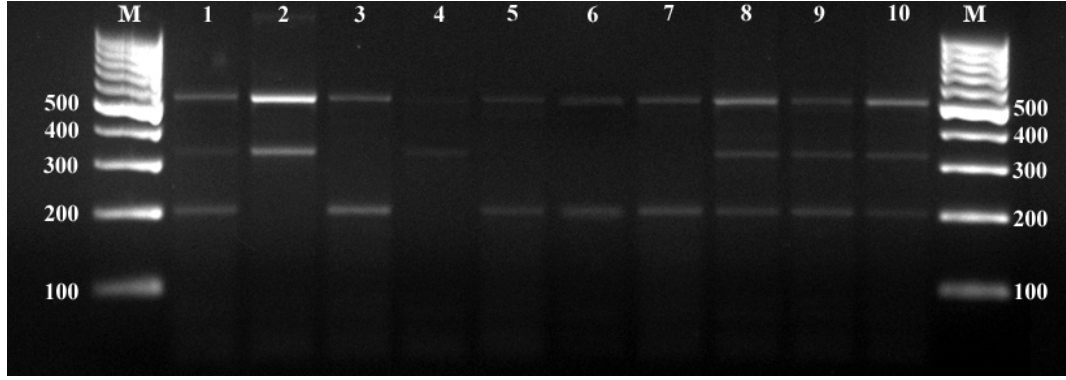
		İncelenen köpek sayısı	Sadece <i>D. immitis</i>			Sadece <i>D. repens</i>			Miks			<i>Wolbachia</i>				
			n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>		
Cinsiyet	Erkek	35	2	5.7	0.119	1	2.8	0.217	1	2.8	0.523	4	11.4	0.226		
	Dişi	126	1	0.8		-	-		2	1.5		6	4.7			
					χ^2	<i>p</i>		χ^2	<i>p</i>		χ^2	<i>p</i>		χ^2	<i>p</i>	
Yaş	0-1	69	-	-	3.8 75	0.14 4	-	-	1.2 76	0.52 8	-	-	2.628 0.269	3	4.3	1.098 0.57 7
	2-4	71	3	4.2			1	1.4			2	2.8		6	8.4	
	4>	21	-	-			-	-			1	4.7		1	4.7	
Toplam		161	3	1.8			1	0.6			3	1.8		10	6.2	

Tablo 4. Köpeklerde Saptanan Filarial Etkenler ile *Wolbachia sp*'nin Yaş ve Cinsiyetle İlişkisi.

		İncelenen köpek sayısı	<i>Wolbachia</i> sp + <i>D. immitis</i>			<i>Wolbachia</i> sp + <i>D. repens</i>			Miks			Sadece <i>Wolbachia</i> sp.						
			n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>	n	%	<i>p</i>				
Cinsiyet	Erkek	35	1	2.8	0.389		1	2.8	0.217		1	2.8	0.523		1	2.8	1.000	
	Dişi	126	1	0.8			-	-			2	1.5			3	2.3		
					χ^2	<i>p</i>			χ^2	<i>p</i>			χ^2	<i>p</i>			χ^2	<i>p</i>
Yaş	0-1	69	-	-	2.56 7	0.2 77	-	-	1.27 6	0.52 8	-	-	2.6 28	0.26 9	2	2.8	0.61 6	0.7 35
	2-4	71	2	2.8			1	1.4			2	2.8			2	2.8		
	4>	21	-	-			-	-			1	4.7			-	-		
Toplam		161	2	1.2			1	0.6			3	1.8			4	2.4		

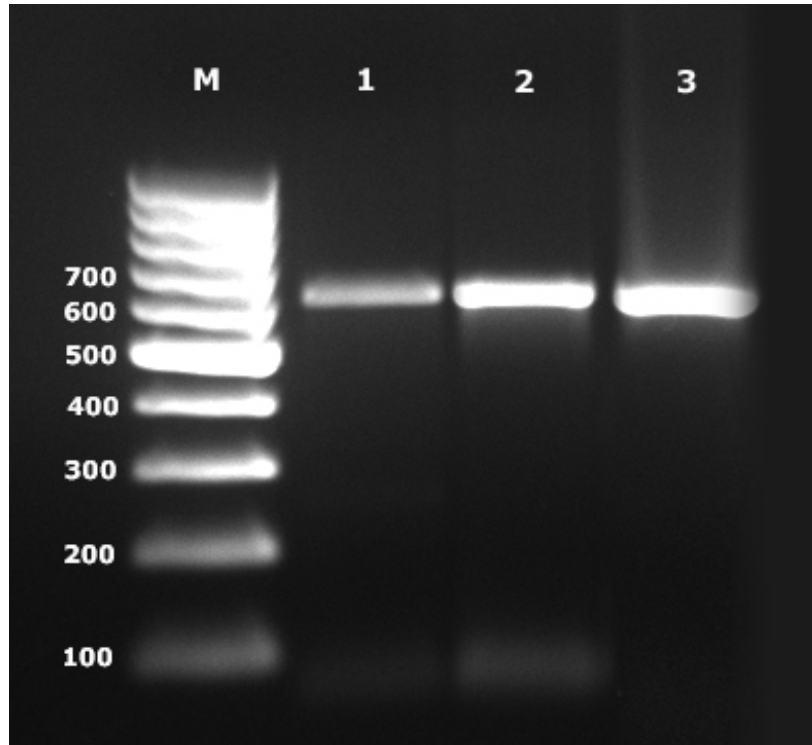
Tablo 5. Köpeklerden Elde Edilen Serum ve Kan Örneklerine Ait ELISA ve PZR Bulguları

		İncelenen köpek sayısı	ELISA				PZR+ELISA			
			n	%	<i>p</i>		n	%	<i>p</i>	
Cinsiyet	Erkek	35	2	5.7	0.612		2	5.7	0.119	
	Dişi	126	4	3.2			1	0.8		
			n	%	χ^2	<i>p</i>	n	%	χ^2	<i>p</i>
Yaş	0-1	69	2	2.9	1.665	0.435	-	-	3.875	0.144
	2-4	71	4	5.6			3	4.2		
	4>	21	-	-			-	-		
Toplam		161	6	3.7			3	1.8		



Şekil 1. Multipleks-PZR ile belirlenen bandların görünümü. M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp);

1: Miks enfeksiyon pozitif kontrol (500 bp, 327 bp ve 204 bp); 2: *Dirofilaria repens* pozitif kontrol (500 bp ve 327 bp); 3: *Dirofilaria immitis* pozitif kontrol (500 bp ve 204 bp); 4: Sadece *D. repens* bulunan örnek; 5, 6, 7: Sadece *D. immitis* bulunan örnek; 8, 9, 10: Miks enfeksiyon belirlenen örnekler.



Şekil 2. *Wolbachia* wsp primerleriyle çoğaltılmış PZR ürünlerinin görünümü. M: Moleküler ağırlık belirleyicisi (100 bp);

1, 2: Pozitif örnekler (630 bp); 3: Pozitif kontrol.

EU182327	T - - - - -	- - - - - TAA	AACAGATATA	14
Di-1		- - - - -		14
Di-2		- - - - -		14
Di-3	GAGAGAGAAA	CGTATAG . . T		30
EU182327	TATTTGGCTT	ATGGATTTAT	TTTTCATGTG	44
Di-1				44
Di-2				44
Di-3				60
EU182327	TTACTATTGT	TAATTTTCTT	TGGATTAATT	74
Di-1				74
Di-2				74
Di-3				90
EU182327	TTTAATTTTT	TTGTTGAAAT	TGGAAAAGAA	104
Di-1				104
Di-2				104
Di-3				120
EU182327	AGTAATTTTT	TCTTAATGTA	ATAATGAATT	134
Di-1				134
Di-2				134
Di-3				150
EU182327	TAATAAATAA	AGTGGTACAA	ACCATCCGTC	164
Di-1				164
Di-2				164
Di-3				180
EU182327	AAT			167
Di-1	. . .			167
Di-2	. . .			167
Di-3	. . .			183

Şekil 3. Çalışmada *Dirofilaria immitis* olarak belirlenen örneklerin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması.

			20		
D1	--TTTTTTTT	TATTCTTTTT	TATGTTTTTT	28	
AM779777	AC.....			30	
		40		60	
D1	TTTGTAATAA	GTTTTGATTT	TTTTGTATTT	58	
AM779777				60	
		80			
D1	TTTTGTAATA	TTTAAAATTT	GTTTTTTGAA	88	
AM779777				90	
	100		120		
D1	CTGGATTAGT	ACCCAGGTAA	TCAAAGTTTA	118	
AM779777				120	
		140			
D1	TTAATTTCGGG	AGTAAAGTTT	TGTTTAAACC	148	
AM779777				150	
	160		180		
D1	GAAAAAATAT	TGACTGACTT	TAGATTTTTT	178	
AM779777				180	
		200			
D1	TTTGGAAATAT	GTGTTTTTTGG	AGAGCCCTCT	208	
AM779777				210	
	220		240		
D1	TTTTTGGTGA	ATTTTATTGG	CACATGTATG	238	
AM779777				240	
		260			
D1	ATTGTTTAGT	TTTTATGTTA	TTTGTGTTGC	268	
AM779777				270	
	280		300		
D1	TTTTATGTTT	TTTTGCATTT	AAAACAGATA	298	
AM779777	T.....			300	
		320			
D1	TATATTTGGC	TTATAAATTT	ATTTTTTCATG	328	
AM779777				330	
	340		360		
D1	TATTACTATT	ATTAATTTTT	TTTGGATTTA	358	
AM779777				360	
		380			
D1	TTTTTTATTT	TATTTTTTGAA	ATTGGAAAAG	388	
AM779777				390	
	400		420		
D1	AAAGTAATTT	TTTCTTTATG	TGTTAATGAA	418	
AM779777				401	
		440			
D1	TTTAATAAAT	AAAGTGGTAC	AAACA	443	
AM779777	-----	-----	-----	401	

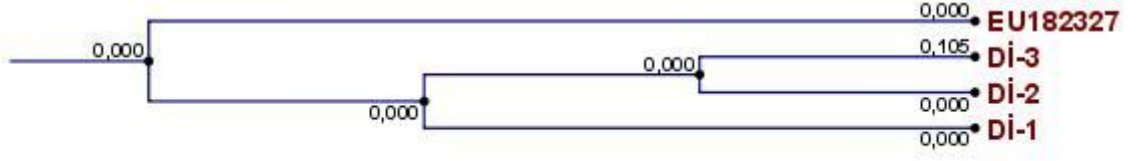
Şekil 4. Çalışmada *Dirofilaria repens* olarak belirlenen örneğin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması.

```

                20
AF481163 TAGTTACTAT ATTCTTTTC AATACAACGG 30
W1 -----
W2 C.TAA ----- 6
                40
AF481163 TGAATTTTA CCTCTTTTC CAAAAGTTGA 60
W1 -----
W2 -----AC ----- 19
                80
AF481163 TGGTATTACC TATACGAAAG ACAATAGTGA 90
W1 -----
W2 ----- 49
                100
AF481163 TTACAGTCCA TTAAAAGCGT CTTTCTAGC 120
W1 -----
W2 ----- 79
                140
AF481163 TGGTGGTGGT GCGTTTGGTT ACAAATGGA 150
W1 -----
W2 ----- 109
                160
AF481163 CGACATCAGG GTTGATGTTG AAGGAGTTTA 180
W1 -----
W2 ----- 139
                200
AF481163 TTCATACCTA AACAAAAATA ATGTTACAGA 210
W1 -----
W2 ----- 169
                220
AF481163 TGCAAGATTT ATGCCAGATA CTATTGCAGA 240
W1 -----
W2 ----- 199
                260
AF481163 CAGTGTAACA GCAATTTTCAG GACTAGTTAA 270
W1 -----
W2 ----- 229
                280
AF481163 CGTTTATTAC GATATAGCAA TTGAAGATAT 300
W1 -----
W2 ----- 259
                320
AF481163 GCCTATCACT CCATATATTG GTGTTGGTGT 330
W1 -----
W2 ----- 289
                340
AF481163 TGGTGCAGCG TATATTAGCA CTCCTTTGAA 360
W1 -----
W2 ----- 319
                380
AF481163 AGACGCTGTG AATGATCAAA AAAGTAAATT 390
W1 -----
W2 ----- 349
                400
AF481163 TGGTTTTGCT GGTCAAGTAA AAGCTGGTGT 420
W1 -----
W2 ----- 379
                440
AF481163 TAGTTATGAT GTAACCTCCGG AAGTCAAAC 450
W1 -----
W2 ----- 409
                460
AF481163 TTATGCTGGA GCTCGTTATT TCGGTTCTTT 480
W1 -----
W2 ----- 439
                500
AF481163 TGGTGCTCAT TTGATAAAG ATGCTGCTGC 510
W1 -----
W2 ----- 469
                520
AF481163 AGGCAAAGAC AAAGGGGAAC TCAAAGTTCT 540
W1 -----
W2 ----- 499
                560
AF481163 TTACAGCACT GTTGGTGCAG AAGC 564
W1 -----
W2 ----- 523

```

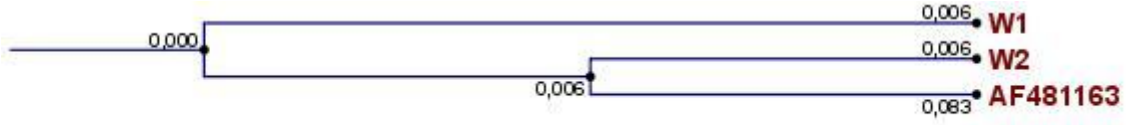
Şekil 5. Çalışmada *Wolbachia* olarak belirlenen örneklerin sekans sonucu ile genbank'ta yayınlanmış sekansın kıyaslanması.



Şekil 6. *Dirofilaria immitis* örneklerinin genetik ağaç görünümü.



Şekil 7. *Dirofilaria repens* örneğinin genetik ağaç görünümü.



Şekil 8. *Wolbachia* örneklerinin genetik ağaç görünümü.

6. TARTIŞMA

Köpeklerde parazitlenen filarial nematodlar, hem bu hayvanlarda oluşturdukları enfeksiyonlar ve hem de zoonotik özellikleri sebebi ile büyük önem arz etmektedirler. Hastalık etkenlerini insan ve hayvanlara nakleden çeşitli soy ve türden çok sayıda Arthropod türü saptanmış olup, bu türleri dünyanın her tarafında yaygın olarak bulunması, bu enfeksiyonun yayılışındaki en önemli faktör olarak ortaya çıkmıştır. Konuya ilişkin çeşitli ülkelerde bugüne kadar yapılan çalışmalar, daha çok köpeklerde ağır kardio-pulmoner bozukluklara ve bazen de ölüme yol açan *D. immitis*'in yayılış ve epidemiyolojisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Dirofilaria immitis'in köpeklerdeki yayılışı Amerika'da (70) sahipli köpeklerde % 5.4, sokak köpeklerinde % 12.5 olarak belirlenmiştir. Yine Macy ve ark. (26), ELISA ile % 0.3 oranında bir yaygınlık tespit etmişlerdir. İspanya'da, iki farklı bölgeden elde edilen 114 köpek kanı Modifiye Knott, PZR ve ELISA testleriyle incelenmiş ve sırasıyla % 0, % 1.6 ve % 2.6 oranlarında yaygınlık saptanmıştır (27). Güney Kore'de daha önce kemoprofilaksi almayan 848 köpek *D. immitis* enfeksiyonu yönünden ELISA ile incelenmiş ve % 40 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (28). Tayvan'da, ELISA ile 664 köpek incelenmiş ve şehir merkezinde % 13.8, kırsal alanlarda ise % 12.1 oranlarında prevalans belirlenmiştir (29).

Taşan (17), Elazığ'da 120 köpeğin nekropsi incelemesini yapmış ve *D. immitis*'i % 5 oranında tespit etmiştir. Kayseri yöresinde yapılan bir çalışmada 280 köpekten elde edilen kan örnekleri *D. immitis* bakımından membran filtrasyon ve ELISA teknikleriyle incelenmiş ve % 9.6 oranında prevalans

belirlenmiştir (41). Yine bu parazitin yaygınlığı Van'da (37) % 46.2, Aydın'da (38) % 13.9 olarak tespit edilmiştir. Öncel ve Vural (40), İstanbul ve İzmir'den elde ettikleri toplam 380 sokak köpeğine ait kanda *D. immitis* antijenini ELISA ile araştırmışlar ve seropozitifliği İstanbul'da % 1.52 olarak saptarken İzmir'de seropozitiflik belirleyememişlerdir. Şimşek ve ark. (42), Adapazarı, İzmit ve Mersin illerinde *D. immitis* seroprevalansını sırasıyla % 12.3, % 18.3 ve % 10.5 olarak bulmuşlardır. Bu yörelerden ilk ikisindeki yüksek seropozitiflik ekonomik olarak gelişmiş bölgelerde olması nedeniyle anlamlı bulunurken, Mersin gibi daha sıcak ve nemli bir iklime sahip ve sivrisinek aktivitesinin daha fazla olduğu bir ilde seropozitifliğin nispeten düşük çıkması toplanan örnek sayısının az olmasına bağlanmıştır. Elazığ ilinde hiç seropozitiflik bulunamaması incelenen köpeklerin hepsinin 0.1-2 yaş grubunda olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada Ankara'da elde edilen % 14.8'lik seropozitiflik daha önce özellikle ELISA ile yapılan çalışmalardan yüksek bulunmuştur. Yine Şimşek ve ark. (44), Erzurum ilinde ELISA ile 93 sokak köpeğinde % 2.1'lik seroprevalans belirlemişlerdir. Bu çalışmada ise serum örneği ticari ELISA kiti ile analiz edilen 161 köpeğin altısında (% 3.7) *D. immitis* bakımından seropozitiflik saptanmıştır. Seropozitif köpeklerin üçünde (% 1.8) PZR ile de *D. immitis* tespit edilmiştir. Bununla birlikte dirofilariosis vakalarında % 10-67 oranında gizli enfeksiyonların (köpeklerde erişkin *D. immitis*'in mevcut olup immun sistemdeki reaksiyonlar sonucu kanda mikrofilerlerin görülmediği durumlar) söz konusu olduğu bildirilmiş olup (71), bu durum göz önüne alındığında bu çalışmada elde edilen seropozitifliğin daha da artabileceği düşünülmüştür.

Dirofilaria immitis enfeksiyon riskinin yaş faktörü ile ilgili olarak değişkenlik gösterdiği kaydedilmekle birlikte (4,28,29,72), bazı yazarlar (73,74) *D. immitis* enfeksiyonunda köpeğin yaşının etkili olmadığını, bütün yaş gruplarında enfeksiyonun görülebileceğini kaydetmektedir. Bazı yazarlar (4,28,72) ise yaşın artması ile orantılı olarak enfeksiyon oranının artış gösterdiğine, özellikle 3-7 yaş arasında daha yaygın (% 6.1-53.8) olduğuna dikkat çekmektedirler. Fan ve ark. (29), *D.immitis* enfeksiyonunu 6 yaş üstü köpeklerde (% 23.7), 1-3 (% 6.3) ve 3-6 (% 14.1) yaş arası köpeklere oranla daha yaygın bulmuşlardır. Şimşek ve ark. (42), köpeklerde yaş gruplarına göre *D. immitis* enfeksiyonunda en yüksek prevalansı 3-5 yaş grubunda (% 17.5) belirlerken, 0,1-2 yaş grubunda (% 11.8) daha düşük bir prevalans belirlemişler, ayrıca 6 yaş ve üstü gruptan bakısını yaptıkları 11 köpekte pozitiflik saptayamamışlardır. Bu çalışmada ise PZR ile sadece *D. immitis* gözlenen köpeklerin hepsi (% 4.2) 2-4 yaş grubundaydı. Benzer şekilde ELISA ile seropozitif bulunan köpeklerin % 2.9'u (2/69) 0-1 yaş grubundayken, % 5.6'sı (4/71) 2-4 yaş grubundaydı. Enfeksiyonun yayılışının nispeten yaşlı köpeklerde daha yüksek olması, parazitin prepatent periyodunun uzun olması ile konak-parazit ilişkisinde yaşlı köpeklerin muhtemelen vektörlere daha uzun süre maruz kalmasıyla açıklanmaktadır (29). Bu çalışmada, 2-4 yaş grubunda 0-1 yaş grubuna göre daha yüksek pozitiflik belirlenmesine rağmen 5 ve üstü yaş grubunda pozitiflik saptanamamasının nedeninin ilgili literatürde de belirtildiği üzere (75) yaşlı köpeklerde bağışıklık sisteminin parazitin olgunlaşmasını engellemesi yada mevcut paraziti steril hale getirmesi olabilir.

Köpeklerde *D. immitis* enfeksiyonunda, cinsiyetin etkisinin olmadığı kaydedilmekte (4,29,74,76) veya genel olarak bu parazite erkek köpeklerde dişilerden daha çok rastlandığı bildirilmektedir (72). Bu farklılığın dişi köpeklerin durağan yapısına karşın erkek köpeklerin koruyucu, av veya spor amacıyla daha çok tercih edilmesi, erkek köpeklerin dolaşma eğilimlerinin fazlalığı sebebiyle, sivrisineklere maruz kalma risklerinin dişilere göre daha yüksek olmasından ileri gelebileceği kaydedilmektedir (72). Buna karşı Şimşek ve ark. (42), dişi köpeklerdeki yayılımı (% 14.4) erkek köpeklerden (% 10.7) daha yüksek bulmuşlardır.

Bu çalışmada ELISA ile test edilen 35 erkek köpeğin ikisinde (% 5.7) ve 126 dişi köpeğin dördünde (% 3.2) seropozitiflik belirlenmiştir. Benzer şekilde PZR ile erkeklerde % 5.7 ve dişilerde % 0.8'lik pozitiflik tespit edilmiş ve diğer çalışmalarda bildirildiği gibi erkek köpeklerdeki pozitifliğin daha yüksek olduğu görülmüş, bunun bir nedeni yukarıda da belirtildiği şekilde erkek köpeklerin daha hareketli olmaları ve dolaşmaları nedeniyle arakonaklara maruz kalma şanslarının daha yüksek olması olabilir.

Köpeklerde filarial enfeksiyonların tanısında dolaşımdaki mikrofilerlerin morfolojik tanısı, sirküle olan parazit antijenlerinin serolojik olarak teşhisi, dolaşımdaki mikrofilerlerin histokimyasal veya immuno-histokimyasal olarak boyanması veya moleküler yöntemlerle yapılabilir. Dolaşımdaki mikrofilerlerin morfolojik tanısı her zaman kolay olmamakta ve potansiyel yanlış yorumlamalara yol açabilmektedir. Nitekim bu teknikler deneyimli personele ihtiyaç göstermesi, koruyucu olarak tedavi edilmiş köpeklerde morfolojik değişimli mikrofilerlerin gözlenmesi ve birden fazla filarial etkenle enfeksiyon

durumlarında ayırım güçlüğü gibi zorluklara sahiptir. Serolojik yöntemlerde de olası çapraz reaksiyonlar nedeniyle bazı çekinceler mevcuttur. Bu nedenle özellikle PZR'nin de içinde bulunduğu moleküler yöntemler hem mikrofilerlerin tanısı hemde çoklu enfeksiyonlarda etkenlerin ayırımı açısından çok olumlu sonuçlar vermektedir (77-79). Ancak parazitin tek cinsiyetli olması (sadece erkek ya da dişi), ilaç tedavisi neticesinde mikrofilerlerin dolaşımdan uzaklaştırılması, immunolojik nedenlerle parazitin üreme potansiyelinin düşmesi gibi nedenlerle her zaman kanda mikrofiler görülememektedir (4). Bu nedenlerden dolayı serolojik ve moleküler testlerin kombine bir şekilde kullanılması faydalı olacaktır. Bu çalışmada serolojik olarak % 3.7'lik bir pozitiflik saptanmasına rağmen PZR ile % 1.8'lik pozitiflik belirlenmiştir. Bu durumun yukarıda da açıklandığı şekilde olası çapraz reaksiyonlar, parazitin tek cinsiyetli olması (mikrofiler üretememesi), mikrofilariisid ile sağaltım olasılığı, genel antiparaziter ilaçlamanın mikrofilerleri dolaşımdan uzaklaştırması veya köpeklerin immunolojik olarak parazitin biyotik potansiyelini sınırlandırması ile ilgili olabileceği kanaatine varılmıştır.

Dirofilaria immitis'e oranla daha az patojen olan, bu nedenle de üzerinde daha az durulan *D. repens* köpek, kedi, arslan ve kırmızı tilkilerde bulunur. Erişkinleri son konakların deri altı bağ dokusunda, mikrofilerleri ise perifer kanında ve lenf aralıklarında görülür. İplik şeklinde, beyazımtırak saman sarısı renginde bir nematod olan *D. repens*'in erkekleri 4.8-8.2 cm, dişileri ise 10-17 cm büyüklüğündedir (2).

Erişkin parazitler deri altı bağ dokusunda görülmekte, bu nedenle de *D. immitis* kadar patojen olmamakta ve genellikle herhangi bir hastalık belirtisi görülmemektedir. Bazen larvalar deride ekzama benzeri deri dökülmesine, bazen

de kaşıntıya neden olabilmektedir (2). Dünyada geniş bir yayılım alanına sahip olan *D. repens*, daha çok Güney Avrupa, Güney Amerika, Asya ve Afrika gibi sıcak ülkelerde görülmektedir. Kuzey Amerika ve Avustralya'da rastlanmadığı bildirilmektedir (3). *D. repens*'e Türkiye'deki yerli köpeklerde ilk kez 1962 yılında İstanbul'da rastlanmıştır (15). Daha sonra Elazığ ve Ankara'daki köpeklerde de parazitin varlığı ortaya konmuştur (16,17,80). Taşan (16), Elazığ ilinde, 283 köpekten elde ettiği kan örneklerini incelemiş ve 53 (% 18.7) köpekte mikrofiler kaydetmiştir. Perifer kanda mikrofiler saptanan köpeklerin 20'sinde bu mikrofilerlerin *D. repens* mikrofilerleri, 28'indekilerin ise nonspesifik mikrofilerler olduğunu kaydeden araştırmacı 5 köpekte de heriki türün mikrofilerlerini aynı anda saptadığını bildirmiştir. Çalışmada *D. repens* mikrofilerleri yönünden pozitif bulunan köpeklerin 6'sına nekropsi yapıldığı ve erişkin *D. repens*'lerin bulunduğu kaydedilmiştir (16). Yine Taşan (17), Elazığ'da 120 köpeğin nekropsi incelemesini yapmış ve *D. immitis*'i % 5, *D. repens*'i ise % 2.5 oranlarında tespit etmiştir. Yıldırım (39), Ankara yöresinde Kasım 2000-Ocak 2002 tarihleri arasında natif, Modifiye Knott ve membran filtrasyon yöntemleriyle bakısını yaptığı 300 köpekte *D. immitis*'in prevalansını % 6.3 olarak saptamış, *D. repens* mikrofilerlerine ise rastlamamıştır.

Bu çalışma ile PZR ile test edilen 161 köpeğin birinde yalnız başına ve üçünde de *D. immitis* ile birlikte olmak üzere dört köpekte (% 2.5) *D. repens*'e rastlanmıştır. Bu sonuçlar, Taşan (17)'ın Elazığ ilinde otopsisini yaptığı köpeklerde *D. repens* için belirlediği % 2.5'lik oranla benzer bulunmuştur.

Canlı hayvanlarda dirofilariasis'in teşhisi diğer filariyal enfeksiyonlarda olduğu gibi genellikle kan muayenelerinde mikrofilerleri görerek yapılır. Ancak

mikrofilerlerden tür teşhisini yapmak oldukça güçtür. Bunun için mikrofilerlerin özel olarak tespit edilip boyanması ve böylece mikrofilerdeki embriyolojik oluşumların yerlerinin ve diğer morfolojik özelliklerinin belirlenmesi gerekir. Çünkü bu hücrelerin ön uca olan uzaklıkları ile mikrofilerin en ve boylarının ölçüleri tür ayırımında en önemli kriterlerdir. Mikrofilerlerin tür teşhislerinde kandaki hareket şekillerinden, santimetreküp kandaki miktarlarından, hatta boyanma sürelerinden de faydalanılmaktadır (81). Özellikle *D. immitis* ve *D. repens*'in mikrofilerlerinin tür ayırımında asit fosfataz yöntemiyle histokimyasal boyama yöntemi en sık kullanılan yöntemdir. Ancak, kullanılan kimyasalların raf ömrünün kısa olması ve güvenilir sonuçlar almak için taze örneklerle ihtiyaç duyulması gibi olumsuzlukları da vardır (82). Bu nedenle son yıllarda bu iki türün moleküler yöntemlerle ayırımına yönelik çalışmalar yapılmıştır (45,77,78,83). Bu çalışmada Gioia ve ark. (45) tarafından *D. immitis* ve *D. repens*'in eş zamanlı tespitini sağlayan multipleks-PZR düzeni kullanılmıştır. Adı geçen çalışmada, heriki parazitin mitokondrial 12S rRNA gen bölgesini çoğaltan primer çiftleriyle multipleks-PZR uygulanmış ve kontrol gDNA örneklerinde miks enfeksiyonlar tespit edilmiştir. Bu çalışma ile de yukarıda belirtilen primerler kullanılarak doğal enfekte köpeklerdeki *D. immitis* ve *D. repens* ile miks enfeksiyonlar eş zamanlı olarak belirlenmiştir.

Wolbachia pipientis, *Riketsia* soyundan gram negatif hücre içi bir bakteri olup, *D. immitis*, *Wolbachia*'nın mutual bir taşıyıcısıdır (62,84). *Wolbachia*, *D. immitis*'de bir nesilden diğerine maternal olarak nakledilir ve bu bakteri parazitin bütün yaşam dönemlerinde elde edilebilir. Bütün *D. immitis* parazitleri *Wolbachia*'ları barındırır ve bakteri, parazitin bütün gelişme dönemlerinde

bulunur. Benzer şekilde *D. repens*'in de *Wolbachia*'yı taşıdığı bildirilmiştir (57,85).

Wolbachia filogenisinde birkaç gen kullanılmaktadır. Bunlar *wsp*, *ftsZ*, *citrate synthase* *gltA*, *groEL* *chaperone* ve *16S ssr RNA*'dır (54,86-88). Bu çalışmada PZR işleminde başlangıçta *ftsZ* geni kullanılmış, ancak nonspesifik bandların elde edilmesi nedeniyle *Wolbachia* yüzey proteinini determine eden *wsp* geni tercih edilmiş ve incelenen 161 köpeğin 10'unda (% 6.2) PZR ile pozitiflik belirlenmiştir. Türkiye'de bu konuyla ilgili yapılmış çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Sarali ve ark. (89), İzmir ve Aydın illerinden elde ettikleri 150 köpek kanında *D. immitis*'in prevalansını % 12.3 olarak bulmuşlardır ve hem bu örneklerde hem de erişkin parazitlerin hepsinde *Wolbachia* 16S rRNA geninin 1043-1055 bp'lik bölgesini çoğaltmışlardır. Bizim çalışmamızda ise gerek tek başına gerekse miks olarak *D. immitis* ve *D. repens*'in belirlendiği altı örnekte de *Wolbachia* PZR sonucu pozitif çıkarken herhangi bir *Dirofilaria* etkeni saptanmayan dört örnekte pozitiflik belirlenmiştir. Bu durumda ya bu dört örneğin herhangi bir *Dirofilaria* türüyle enfekte olduğu ve PZR işleminin bu pozitifliği saptayamadığı yada alternatif olarak bu köpeklerde *Wolbachia* sp'yi taşıyan başka bir etken bulunduğu kanaati hasıl olmuştur.

Bu çalışma ile Elazığ ilindeki sokak köpeklerinde *D. immitis* ve *D. repens*'in multipleks-PZR ile eş zamanlı tespiti ülkemizde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Böylelikle adı geçen metod kullanılarak bundan sonra yapılacak çalışmalara örnek teşkil edilmiştir. Türkiye'de günümüze kadar gerek PZR ve gerekse ELISA ile yapılan çalışmaların hemen tamamı *D. immitis* yaygınlığını belirlemeye yönelik olmuş, *D. repens* neredeyse ihmal edilmiştir.

Ancak bu çalışmada izlenen metod ile araştırıcılara bundan sonra tek bir PZR reaksiyonu ile heriki paraziti aynı anda belirleme olanağı sunulmuştur. Bu verilerin yanısıra ticari ELISA kiti ile bahsi geçen köpeklerdeki *D. immitis* seroprevalansı belirlenmiş ve yöredeki güncel prevalans ortaya konulmuştur. Yine rneklerde *Wolbachia* bakterisinin varlığı bölgemizde ilk kez araştırılmıştır. Bu vesile ile dirofilariosisin patogenezinde önemli bir yer tuttuğı son yıllarda daha iyi anlaşılan *Wolbachia*'nın önemine de dikkat çekilmiştir. Neticede adı geçen filarial etkenlerin çok yaygın olmasa da varlığının devam ettiğı belirlenmiş, bu sokak köpeklerinin enfeksiyon kaynağı olmaları nedeniyle ilaçlanması gerektiğı kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Georgi JR, Georgi ME. *Helminths*, In: Parasitology for Veterinarians, eds: Dyson, J, Kimler, D, Dick, E. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995: 200-203.
2. Soulsby E.J.L. *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, ed. Baillire and Tindal, 7th, London, 1982.
3. Anderson RC. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission. 2nd Ed. CABI Publishing, New York, 2000: 467-509.
4. Yıldırım A. Ankara ve çevresindeki köpeklerde filarial etkenlerin prevalansı. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji AD, Doktora tezi, Ankara, 2003.
5. Grieve RB, Lok JB, Glickman LT. Epidemiology of canine heartworm infection. Epidemiological Review, 1983; 5: 220-246.
6. Courtney CH. Transmission and life cycle of heartworm. Calif. Vet., Special Edition. 1989; 8.
7. Fortin JF, Slocombe JOD. Survival of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* exposed to low temperatures. Proceedings of the Heartworm Symposium, 1980: 13-16.
8. Slocombe JOD, Surgeoner GA, Srivastava B. Determination of Heartworm transmission period and its use in diagnosis and control. Proceedings of the Heartworm Symposium, 1989: 19-26.
9. Grieve RB, Lauria S. Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilaria in canine and murine hosts. Acta Tropica 1983; 40: 121-127.
10. Katoch VC, Jithendron KP. A short note on the *Dirofilaria immitis* infection in a dog. Indian Vet J 1999; 76: 459-460.
11. Knight DH. Pathophysiology of Heartworm disease, Calif Vet Special Edition, 1989: 16-17.
12. Ortega-Moreno J, Ribas-Del-Rio F, Ramirez-Gasca T. Microfilariae in the mammary gland of a Bitch. Vet Rec 1994; 135: 231-232.
13. Güralp N. *Helmintoloji*, 2. Baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1981: 505-515.
14. Levine HD. Nematode parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1968.
15. Merdivenci A. Bir köpekte *Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911) olgusu ve insan dirofilariyozuna toplu bir bakış. Pendik Veteriner Araştırma Enstitüsü Dergisi 1970; (1): 121-129.

16. Taşan E. Elazığ ve yöresindeki köpeklerde filaria'ların yayılışı, Doğa Bilim Dergisi 1983; 7: 67-70.
17. Taşan E. Elazığ kırsal yöre köpeklerinde helmintlerin yayılışı ve insan sağlığı yönünden önemi. Doğa Bilim Dergisi 1984; 8: 160-167.
18. Gutierrez, Y. 1984 Diagnostic features of zoonotic filariae in tissue sections. Hum Pathol 1984; 15(6): 514-525.
19. Merdivenci A, İçli N. İnsanda *Dirofilaria repens* (Railliet et Henry, 1911) enfeksiyonu vakası. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 1970; 33: 463-470.
20. Zeybek H, Öge A. Ülkemizde bir kadının gözünde görülen ilk Dirofilariasis olgusu. Türk Veteriner Hekimler Derneği Dergisi 1977; 47(1): 52-54.
21. Unat EK, Vural S, Özkaya İ. Türkiye'de ikinci Dirofilariasis Conjunctivae vak'ası. Yeni Tıp Alemi Dergisi 1969; 18: 3.
22. Thisted JP, Whorton J, Hibbs CM, et al. Comparison of four serotests for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. Am J Vet Res 1987; 48: 328-345.
23. Courtney CH, Zeng QY. Sensitivity and specificity of two Heartworm antigen test. Canine Practice 1993; 18: 20-22.
24. Hoover JP, Campbell GA, Fox JC, Claypool PL, Mullins SB. Comparison of eight diagnostic blood tests for Heartworm infection in dogs, Canine Practice 1996; 21, 11-19.
25. Courtney CH, Zeng QY. Comparison of Heartworm antigen test kit performance in dogs having low Heartworm burdens. Vet Parasitol 2001; 96: 317-322.
26. Macy DW, Cheney JC, Taton-Allen G. Prevalence of circulating Heartworm antigen in dogs in Northeastern Colorado. Cornell Vet 1991; 81: 379-387.
27. Cancrini G, Allende E, Favia G, et al. Canine Dirofilariosis in two cities of Southeastern Spain. Vet Parasitol 2000; 92: 81-86.
28. Song KH, Lee SE, Hayasaki M, et al. Seroprevalence of Canine Dirofilariosis in South Korea. Vet Parasitol 2003; 114: 231-236.
29. Fan CK, Su KE, Lin YH, et al. Seroepidemiologic survey of *Dirofilaria immitis* infection among domestic dogs in Taipei city and mountain aboriginal districts. Vet Parasitol 2001; 102: 113-120.
30. Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G. A prevalence survey and risk analysis of Filariosis in dogs from the Mt. Vesuvius Area of Southern Italy. Vet Parasitol 2001; 102(3): 243-352.

31. Song KH, Park JE, Lee DH, Lee SH, Shin HJ. Serological update and molecular characterization of *Dirofilaria immitis* in dogs, South Korea. Res Vet Sci 2010; 88: 467-469.
32. Pamukçu AM, Ertürk E. 1933-1960 yılları arasında Ankara ve yöresinde köpeklerde görülen hastalıklara toplu bir bakış. Ankara Üniv Vet Fak Derg 1961; 8: 323-346.
33. Tinar R, Coşkun ŞZ, Doğan H, ve ark. Bursa yöresi köpeklerinde görülen helmint türleri ve bunların yayılışı. T Parazitol Derg 1989; 13: 113-120.
34. Coşkun ŞZ, Tinar R, Akyol ÇV, Aydın L, Demir Ş. Doğal enfekte köpeklerde *Dirofilaria immitis* mikrofilerlerine ivermektinin etkisi. Uludağ Üniv Vet Fak Derg 1992; 11:121-128
35. Şahin İ, Gödekmerdan A, Ekinci N, Özcan M, Şen İ. Kayseri yöresi köpeklerinde *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) ve diğer parazitlerin yayılışı. T Parazitol Derg 1993; 17: 77-82.
36. Ataş AD, Özçelik S, Saygi G. Sivas sokak köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi, T Parazitol Derg 1997; 21; 305-309.
37. Ağaoğlu Z, Akgül Y, Ceylan E, Akkan H. Van yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in yaygınlığı. YYÜ Vet FakDerg 2000; 11: 41-43.
38. Voyvoda H, Paşa S. Aydın'ın bazı ilçe köyleri ile İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde Leishmaniosis ve Dirofilariosis'in prevalansı. Turk J Vet Anim Sci 2004; 28: 1105-1111.
39. Yıldırım A. Ankara ve çevresindeki köpeklerde filarial etkenlerin prevalansı. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2004; 51(1): 35-40.
40. Öncel T, Vural G. Seroprevalence of *Dirofilaria immitis* in stray dogs in İstanbul and İzmir. Turk J Vet Anim Sci 2005; 29: 785-789.
41. Yıldırım A, İca A, Atalay O, Duzlu O, İnci A. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri province, Turkey. Res Vet Sci 2006; 82: 358-363.
42. Şimşek S, Utuk AE, Köroğlu E, Rishniw M. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. J Helminthol 2008; 82: 181-186.
43. Yaman M, Guzel M, Koltas IS, Demirkazık M, Aktas H. Prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from Hatay province, Turkey. J Helminthol 2009; 83: 255-260.
44. Şimşek S, Özkanlar Y, Balkaya I, Aktas MS. Microscopic, Serologic and molecular surveys on *Dirofilaria immitis* in stray dogs, Turkey. Vet Parasitol 2011; 183: 109-113.
45. Gioia G, Lecová L, Genchi M, et al. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. Vet Parasitol 2010; 172: 160-163.

46. Hertig M, Wolbach SB. studies on Rickettsia-like microorganisms in insects. J Med Res 1924; 44: 329-374.
47. Lo N, Paraskevopoulos C, Bourtzis K, et al. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 654-657.
48. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. Annu Rev Entomol 1997; 42: 587-609.
49. Cordaux R, Michel- Salzat A, Bouchon D, *Wolbachia* infection in Crustaceans: Novel hosts and potential routes for horizontal transmission. J Evol Biol 2001; 14: 237-243.
50. Sinkins SP, O'Neill LS. *Wolbachia* as a vehicle to modify insect populations. In: Insect trasngensis-methods and applications (Eds: Handler AM, James AA). Boca Raton, CRC Press, 2000: 271-284.
51. Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of Artropod reproduction. Annu Rev Microbiol 1999; 53: 71-102.
52. Bordenstein SR, Fitch DA, Werren JH. Absence of *Wolbachia* in nonfilariid Nematodes. J Nematol 2003; 35(3): 266-270.
53. Jeyaprakash A, Hoy MA. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: WSP sequences found in 76% of sixty-three Arthropod species. Insect Mol Biol 2000; 9(4): 393-405.
54. Werren JH, Zhang W, Guo LR. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of Arthropods. Proc R Soc: Biol Sci 1995; 261: 55-63.
55. Bandi C, Trees AJ, Bratting NW. *Wolbachia* in Filarial Nematodes: Evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and tratment of Filarial diseases. Vet Parasitol 2001; 98: 215-238.
56. Kramer LH, Immunopathogenesis of Filarial infections in dogs and cats: A role for *Wolbachia* endosymbiont? In: Mappe parassitologiche 8-Dirofilaria. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Ed.: Genchi C, Rinaldi L, Cringoli G, Series Ed.: Cringoli G, 80137, Naples-Italy, 2007: 69-72.
57. Kozek WJ. What is new in the *Wolbachia*/Dirofilaria interaction? Vet Parasitol 2005; 133: 127-132.
58. Foster J, Ganatra M, Kamal I, et al. The *Wolbachia* Genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic Nematode. Plos Biol 2005; 3: 121-129.
59. Taylor MJ, Cross HF, Ford L, et al. *Wolbachia* bacteria in Filarial immunity and disease. Parasite Immunol 2001; 23: 401-409.

60. Morchon R, Ferreira AC, Martin- Pachó J, et al. Specific IgG antibody response against antigens of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont bacterium in cats with natural and experimental infections. *Vet Parasitol* 2004; 125: 313-321.
61. Taylor MJ. Wolbachia in the inflammatory pathogenesis of human filariasis. *Ann New York Acad Sci* 2003; 990: 444-449.
62. McCall JW, Genchi C, Kramer L, Bandi C, Casiraghi M. *Heartworms and Wolbachia*. In: *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine. 22nd Annual Scientific Forum, Baltimore, MD, May 1-June 4, (2005).*
63. Makepeace BL, Rodgers L, Trees AJ. Rate of elimination of *Wolbachia pipiens* by doxycycline in vitro increases following drug withdrawal. *Antimicrob Agents and Chemother* 2006; 50: 922-927.
64. Kramer L, Grandi G, Leoni M, et al. Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection. *Vet Parasitol* 2008; 158: 191-195.
65. Bazzocchi C, Mortasino M, Grandi G, et al. Combined ivermectin and doxycycline treatment has microfilaricidal and adulticidal activity against *Dirofilaria Immitis* in experimentally infected dogs. *Int J Parasitol* 2008; 38: 1401-1410.
66. Bazzocchi C, Genchi C, Paltrinieri S, et al. Immunological role of the endosymbionts of *Dirofilaria Immitis*: The Wolbachia surface protein activates canine neutrophils with production of IL-8. *Vet Parasitol* 2003; 117: 73-83.
67. Simon F, Morchon R, Rodriguez-Barbero A, et al. *Dirofilaria immitis* and Wolbachia-derived antigens: Its effect on endothelial mammal cells. *Vet Parasitol* 2008; 158: 223-231.
68. Zhou W, Rousset F, O'Neill S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using Wsp gene sequences. *Proc R Soc Lond B* 1998; 265: 509-515.
69. SPSS, Inc. SPSS for Windows Release 11.5 (6 Sep. 2002), Standard Version, Copyright SPSS Inc., 1989-2002. Chicago.
70. Thrasher JP, Gould KG, Lynch MJ, Haris CC. Filarial infection of dogs in Atlanta, Georgia. *J Am Vet Med Assoc* 1968; 153: 1059-1062.
71. Whiteley HE. Your diagnostic protocol for *Dirofilaria immitis* infection in dogs. *Vet Med* 1988; 83: 328-345.
72. Montoya JA, Morales M, Ferrer O, Molina JM, Corbera JA. The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Grand Canaria, Canary Island, Spain (1994-1996), *Vet Parasitol* 1998; 75: 221-226.

73. Rowley J. The prevalence of Heartworm infection in three countries in North Carolina. *Canine Practice* 1981; 8: 46-48.
74. Martin TE, Collins GH. Prevalence of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in Greyhounds. *Aust Vet J* 1985; 62: 159-163.
75. Glickman LT, Grieve RB, Breitschwerdt EB, et al. Serologic pattern of canine heart worm (*Dirofilaria immitis*) infection. *Am J Vet Res* 1984; 45:1178-1183.
76. Theis JH. Public health aspects of Dirofilariasis in the United States. *Vet Parasitol* 2005; 133: 157-180.
77. Casiraghi M, Mazzocchi C, Mortasino M, Ottina, E, Genchi C. A simple molecular method for discrimination common filarial Nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet Parasitol* 2006; 141: 368-372.
78. Mar PH, Yang IC, Chang GN, Fei AC. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Vet Parasitol* 2002; 106: 243-252.
79. Rishniw M, Barr S, Simpson KW, et al. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2006; 135: 303-314.
80. Doğanay A. Ankara köpeklerinde görülen helmint türleri, bunların yayılışı ve halk sağlığı yönünden önemi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1983; 30 (4): 550-561.
81. Doğanay A, Şahal M. Türkiye’de köpeklerdeki Dirofilariasis sorunu ve insan sağlığı açısından önemi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1987; 34 (2): 277-287.
82. Peribáñez MA, Lucientes J, Arce S, et al. Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, leucognost-SP. *Vet Parasitol* 2001; 102: 173-175.
83. Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M. Advances in the identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* by a PCR-based approach. *Parassitologia*, 1997; 39: 401-402.
84. Rossi MI, Aguiar-Alves F, Santos S, et al. Detection of *Wolbachia* DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Exp Parasitol* 2010; 126: 270-272.
85. Grandi G, Morchan R, Kramer L, Karthasev V, Simon F. *Wolbachia* in *Dirofilaria repens* an agent causing human subcutaneous dirofilariosis. *J Parasitol* 2008; 94(6): 1421-1423.
86. Bandi C, Anderson TJ, Genchi C, Blaxter ML. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial Nematodes. *Proc R Soc: Biol Sci* 1998; 265: 2407-2413.

87. Casiraghi M, Anderson TJ, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. A phylogenetic analysis of filarial Nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 2001; 122: 93-103.
88. Casiraghi M, Bordenstein SR, Baldo L, et al. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: Clustering of Arthropod and Nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* Tree. *Microbiology* 2005; 151: 4015-4022.
89. Sarali H, Aypak S, Karagenç T. Köpeklerdeki *Dirofilaria* türlerinde *Wolbachia*'nın belirlenmesi. 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi özet kitabı, 248, 1-7 Kasım 2009, Adana.

8. ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Ayşe Türkan ÇİFTÇİ
- 2. Doğum Yeri ve Tarihi** : Maçka - TRABZON 13.03.1976
- 3. Medeni Durumu** : Evli
- 4. Yabancı Dili** : İngilizce
- 5. Eğitimi**
- İlk Öğretim : 1988, Adilcevaz İlk Öğretim Okulu, Bitlis
- Lise Eğitimi : 1993, Mehmet Akif Ersoy Lisesi, Elazığ
- Yüksek Okul : 2001, F. Ü. Veteriner Fakültesi
- 6. Çalıştığı Kurumlar** : Keban Belediyesi (2002-2007)
- Sarıyer İlçe Tarım Müdürlüğü (2007-2008)
- Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü
- (2008- Devam Ediyor)