

AVANOS YÖRESİ SOKAK KÖPEKLERİNDE *DIROFILARIA IMMITIS*'İN PREVALANSININ BELİRLENMESİ

THE PREVALENCE OF *DIROFILARIA IMMITIS* IN STRAY DOGS IN AVANOS PROVINCE

Feray YABANERİ¹, Abdullah İNCİ^{2*}, Alparslan YILDIRIM², Zuhale ÖNDER²
Arif ÇİLOĞLU², Önder DÜZLÜ²

¹ Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Parazitoloji AD, Kayseri

² Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Parazitoloji AD, Kayseri

ÖZ

Bu çalışma, Avanos ve çevresindeki sokak köpeklerinde filarial nematod enfeksiyonlarının prevalansını tespit etmek amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında farklı yaş, cinsiyet ve ırktan olmak üzere toplam 138 sokak köpeğinden kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri öncelikle natif, modifiye knott ve membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemleri ile perifer kandaki mikrofiller yönünden incelenmiştir. Sonraki basamakta toplanan kanlardan genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen genomik DNA'lar *Dirofilaria immitis*'in 5.8S-ITS2-28S ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) spesifik gen bölgelerini parsiyel olarak amplifiye eden primerler ile PCR analizine tabii tutulmuşlardır. PCR analizi sonucunda, 138 köpeğin 3'ü (%2.17) *D. immitis* pozitif olarak belirlenmiş, diğer filarial nematod enfeksiyonlarına ise rastlanmamıştır. Moleküler olarak pozitif belirlenen 3 örneğin 2'sinde perifer kan muayene yöntemleri ile mikrofillerler saptanmıştır. Pozitif belirlenen izolatlardan birine ait PCR ürünü jelden pürifiye edilerek her iki gen bölgesi için çift yönlü sekans analizlerine tabii tutulmuştur. Sekans analizi sonucu Avanos yöresinden elde edilen *D. immitis* izolatının Dünya'da GenBank veri tabanına kayıtlı homolog izolatlarla 5.8S-ITS2-28S ve parsiyel COI gen bölgelerinin çoklu hizalama analizlerine göre sırasıyla %99.5-%100 ve %94.3-%100 identiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışma ile Avanos yöresi sokak köpeklerinde *D. immitis* enfeksiyonlarının hem mikroskopik hem de moleküler yöntemlerle prevalansı belirlenmiş ve pozitif belirlenen bir izolatın 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonu ve filogenetik analizi yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Avanos, *Dirofilaria immitis*, köpek, moleküler karakterizasyon, prevalans

* Yüksek lisans tezinden özetlenmiş olan bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TLY-2013-4316 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Makale Geliş Tarihi : 16.03.2017
Makale Kabul Tarihi: 19.06.2017

ABSTRACT

This study was carried out to determine the prevalence of filarial nematode infections in stray dogs in Avanos and vicinity. For this aim, a total of 138 blood samples were collected from stray dogs in different ages, sexes and breeds between May-September 2013. The blood samples were firstly examined by wet mount (direct microscopic examination), modified knott's and membrane filtration-acid phosphates histochemical staining techniques in order to detect the circulating microfilaria in peripheral blood. In the next step, genomic DNA extraction was obtained from collected blood samples, and the obtained genomic DNAs were analyzed by PCR with primers amplifying specific gene regions of 5.8S-ITS2-28S and cytochrome oxidase subunit 1 (COI) of *Dirofilaria immitis*. Three (2.17%) out of 138 blood samples were found to be *D. immitis* positive whereas no other filarial nematode species were detected. Two out of three positive samples determined as molecularly positive were also found positive by peripheral blood examination techniques. The PCR product belonging to one of positive isolates was gel purified and sequenced in both directions for two gene regions. The identity rates between the obtained *D. immitis* isolate obtained from Avanos region and the other homologous isolates from the world GenBank were determined as 99.5%-100% and 94.3%-100% according to the phylogenetic analyses of 5.8S-ITS2-28S and COI gene regions, respectively. Both microscopic and molecular methods the prevalence of *D. immitis* from stray dogs of Avanos region was revealed and the molecular characterization and phylogenetic analyses of isolate for 5.8S-ITS2-28S and COI gene regions were investigated in this study.

Keywords: Avanos, *Dirofilaria immitis*, dog, molecular characterization, prevalence

Corresponding Author: Prof. Dr. Abdullah İNCİ
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, 38039, Kayseri, Türkiye
İş Tel:0 352 2076666/29940
e-mail: ainci@erciyes.edu.tr

GİRİŞ

Köpeklerin kalp kurdu olarak bilinen *Dirofilaria immitis*, nematoda sınıfının Filarioidea üst ailesinde yer alan, sivrisineklerle biyolojik olarak nakledilen zoonotik karakterli bir parazittir. Parazit heteroksen gelişen bir nematod olup ara konak olarak; Diptera takımında, Nematocera alttakımında, Culicidae ailesinde, Toxorhynchitinae, Culicinae ve Anophelinae alt ailelerinde yer alan *Anopheles*, *Aedes*, *Psorophora*, *Culex*, *Myzorrhynchus*, *Taeniorhynchus*, *Ayzorrhynchus*, *Mansonia* ve *Armigenes* cinsi sivrisineklerde, sonkonak olarak ise; başta köpekler olmak üzere, kedi, kurt, aslan, kaplan, geyik, tavşan, rakun, tilki, ayı, su samuru, dingo, fok balıkları, denizaslanı, at, şempanze, orangutan gibi hayvanlar ve insanlarda gelişim göstermektedir (1-3). Son konaklarda esas olarak kalbin sağ ventrikulusu, pulmoner arter, sağ atrium ve vena cava'ya, nadir olarak da camera oculi anterior ve periton boşluğuna yerleşmektedir. Köpeklerde filarial nematodların oluşturduğu patojenite, parazitin türü, sayısı, lokalizasyon yeri, hayvanın genel durumu gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. *Dirofilaria immitis*, köpeklerde meydana getirdiği enfeksiyon bakımından diğer filarial nematodlara göre daha patojendir (4).

Türkiye'de *D. immitis*'in prevalansı üzerine yapılan çalışmalarda daha çok mikrofilere yönelik konvansiyonel kan muayenesi teknikleri kullanılmış olmakla birlikte, son yıllarda duyarlılık ve özgünlüğü yüksek serolojik ve moleküler teşhis yöntemlerinin de kullanıldığı görülmektedir. Bunun yanında moleküler karakterizasyon çalışmalarının ise çok sınırlı olduğu ve bu konuda yapılan çalışmaların yetersiz olduğu dikkati çekmektedir (5,6).

Bu çalışmada, Türkiye'nin iç ve dış turizm potansiyeli yüksek yöreleri arasında yer alan Nevşehir'in Avanos ilçesi ve civarında sokak köpeklerinde *D. immitis*'in moleküler epidemiyolojisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Araştırma yöresinde *D. immitis*'in moleküler prevalansı belirlenmiş ve pozitif izolatlardan birinin 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerine göre moleküler karakterizasyonu yapılmış ve filogenetik yapılanması ortaya konmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma Sahası

Çalışma, Mayıs-Eylül 2013 tarihleri arasında Avanos'un farklı ilçe ve köylerindeki toplam 138 sokak köpeği üzerinde yürütülmüştür.

Kan Örneklerinin Toplanması ve Mikrofilerler Yönünden Perifer Kan Muayenesi

Köpeklerden kan örnekleri, Avanos Belediyesi'nce yürütülen "Sokak Köpeklerini Kısırlaştırma Projesi" kapsamında yakalanıp genel amaçlı (özellikle zoonotik hastalıklar yönünden) kontroller için alınan kan örneklerinden ve/veya ovariohysterectomie (kısırlaştırma operasyonu) esnasında alınan kan numunelerinden sağlanmıştır. Çalışma süresince toplam 138 köpekten steril EDTA'lı (di-sodium ethylenediamine tetra-acetate) ve heparinli tüplere alınan kan örnekleri Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilmiştir. Kan örneği alınan köpeklerin yaş, cinsiyet ve ırkları ile buldukları merkez ve örnek alma tarihleri kayıt altına alınmıştır (Tablo I). Kan örneklerinin her birine protokol numarası verilmiş,

heparin'li tüplere alınan kan örnekleri aynı gün veya +4°C'de bekletilip ertesi gün natif, modifiye knott ve membran filtrasyon yöntemleri (7) ile incelenmiştir. DNA ekstraksiyonuna tabii tutulacak EDTA'lı kan örnekleri ise analizleri yapılmaya kadar derin dondurucuda (-20°C) muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA İzolasyonu

-20°C'de EDTA'lı tüplerde muhafaza edilen kan örneklerinden genomik DNA (gDNA) izolasyonu, ticari kan gDNA ekstraksiyon kiti (Axygen® AxyPrep™ Blood Genomic DNA Purification Miniprep Kits, Corning®) ile yapılmıştır. Final elüsyon 50µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen gDNA miktarları Nanodrop spektrofotometre (ACT Gene ASP-3700) kullanılarak ölçülmüş ve gDNA ekstraktları kullanılabilecek kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Genomik DNA ekstraktları, *D. immitis*'in farklı iki gen bölgesinden sırasıyla 5.8S-ITS2-28S gen bölgesinin 542-bp kısmını amplifiye eden DIDR-F1 (5'-AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG-3' F) ve DIDR-R1 (5'-AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA-3' R) ve COI gen bölgesinin 203-bp kısmını amplifiye eden DICOIF1 (5'-AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3') ve DICOIR1 (5'-ACA GGC ACT GAC AAT ACC ATT-3' R) ile ilgili protokole (8) göre PCR reaksiyonuna tabii tutulmuştur. PCR analizlerinin geçerliliğinin ve herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığının test edilmesi amacıyla her analizde pozitif kontrol olarak standardize edilmiş referans örneklerine ait genomik DNA'lar, negatif kontrol olarak ise sterilize edilmiş deiyonize su kullanılmıştır.

Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) %1.5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabii tutularak, CLP Jel Dökümantasyon Sistemi ve Gene Snap from Syngene analiz programı (UVP INC Uplant, CA) ile görüntülenip analiz edilmiştir.

Dirofilaria immitis'in 5.8S-ITS2-28S ve COI Gen Bölgelerinin Sekansı ve Filogenetik Analizi

Her iki gen bölgesi için PCR analizleri sonucu pozitif belirlenen örneklerden seçilen bir izolata ait PCR ürünü High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kullanılarak jel pürifiye edilmiştir. Pürifikasyon sonrası jel pürifiye PCR ürünü *D. immitis*'in 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin parsiyel sekansının ortaya konması amacıyla çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Forward ve reverse sekansların BioEdit Sequence Alignment (9) ve Geneious 5.5.5 (10) yazılımları ile ikili hizalamaları yapılarak final dizilim elde edilmiştir. Her iki gen bölgesi yönünden elde edilen nükleotid dizilimlerinin blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri yapıldıktan sonra Dünya'da GenBank'a kayıtlı diğer benzer izolatlar ile Mega 5.0 (11) ve Geneious 5.5.5 (10) yazılımlarında çoklu hizalamaları yapılarak filogenetik yapılanmaları belirlenmiş ve moleküler karakterizasyonları ortaya konmuştur.

BULGULAR

PCR analizleri sonucu incelemesi yapılan 138 köpekten üçü (%2.17) *D. immitis* ile enfekte bulunmuştur. PCR analizi sonucu pozitif belirlenen üç köpekten ikisinde natif, modifiye knott ve membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama (Şekil I) yöntemleri ile perifer kan muayenesinde mikrofiler saptanmış buna karşın bir

köpekte ise kanda mikrofiler görülmezken PCR analizlerinde *D. immitis* pozitif belirlenmiştir. Konvansiyonel perifer kan muayenesinde diğer filarial nematodlara ait mikrofilere rastlanmamıştır. Pozitif belirlenen köpeklerin yaş grupları, ırk ve cinsiyetleri ile teşhis yöntemlerine göre dağılımları Tablo I'de verilmiştir. *Dirofilaria*

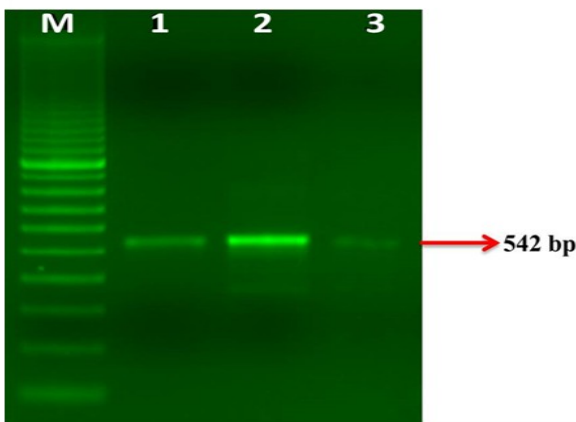
immitis 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerini amplifiye eden primer setleri ile izolatlara ait gDNA'ların PCR amplifikasyonu sonucu agaroz jel üzerinde sırasıyla 542-bp ve 203-bp spesifik DNA fragmentleri belirlenmiştir (Şekil II, III). Avanos yöresinde sokak köpeklerinden elde edilen *D. immitis* izolatının parsiyel COI gen bölge-



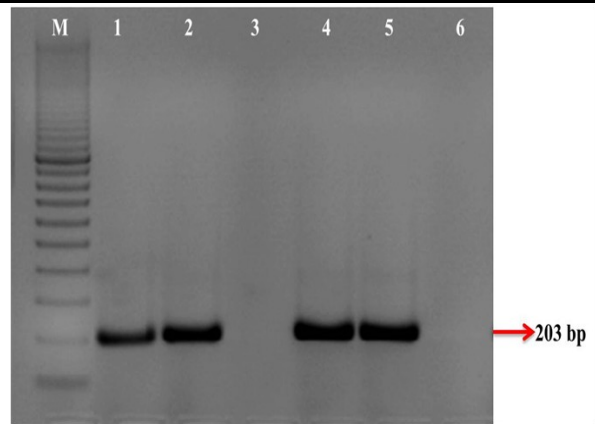
Şekil I. *D. immitis* mikrofilere. A: Natif muayene B: Modifiye Knott C: Membran Filtrasyon-Asit Fosfatiz Histokimyasal boyama yöntemi. EP: Bosaltım Deligi, AP: Anal Delik (orijinal)

Tablo I. Farklı teşhis yöntemlerine göre *D. immitis* pozitif belirlenen köpeklerin cinsiyet, ırk ve yaşa göre dağılımı

Faktör	İncelenen köpek sayısı	Natif Muayene	Modifiye Knott Yöntemi	Membran Filtrasyon Yöntemi	PCR	
					COI Gen Bölgesi	5.8S-ITS2-28S Gen Bölgesi
Cinsiyet						
Dişi	77	1	1	1	2	2
Erkek	61	1	1	1	1	1
Yaş Grubu						
0.5-1	62	1	1	1	2	2
2-4	71	1	1	1	1	1
≥ 5	5	-	-	-	-	-
İrk						
Çoban köpeği	38	1	1	1	1	1
Kangal	30	-	-	-	-	-
Melez	56	1	1	1	1	1
Terrier	14	-	-	-	1	1
Toplam	138	2	2	2	3	3



Şekil II. *D. immitis* pozitif izolatların parsiyel 5.8S-ITS2-28S gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1-3: Pozitif izolatlar



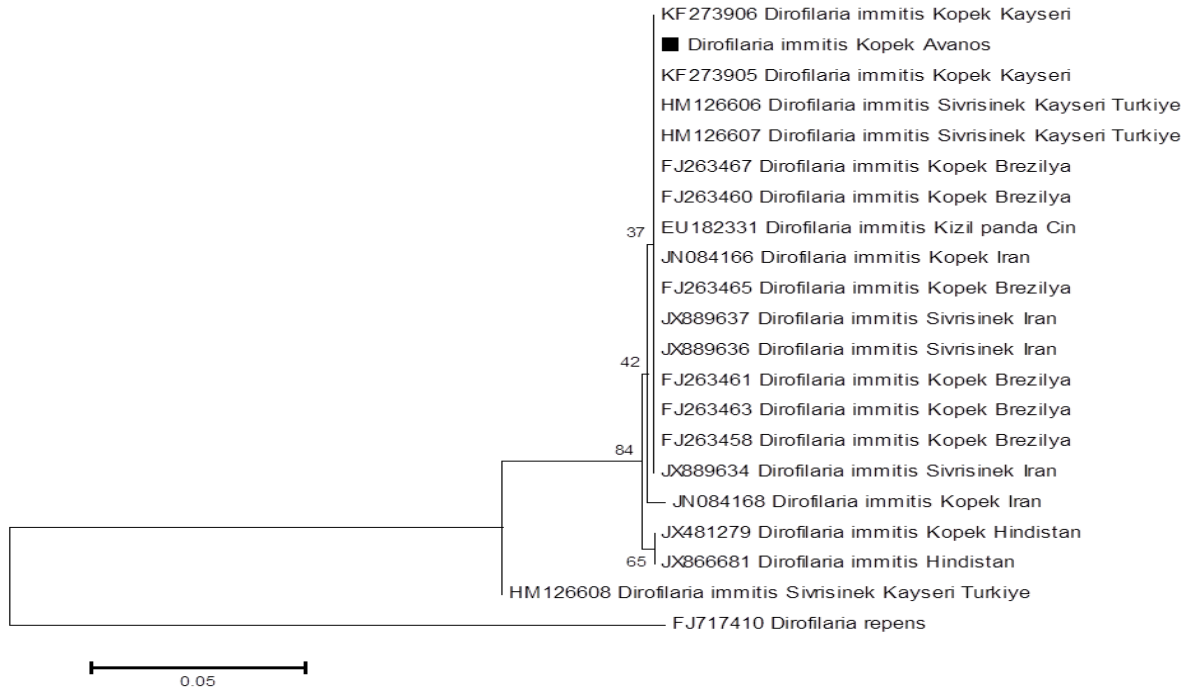
Şekil III. *D. immitis*'in parsiyel COI gen bölgesini amplifiye eden primerler ile PCR sonucu elde edilen ampliconların jel elektroforezde görünümü. M: Marker; 1,2 ve 4: Pozitif izolatlar; 3: Negatif izolat; 5: Pozitif kontrol; 6: Negatif kontrol

sinin blastn analizlerine göre Brezilya'da insandan izole edilen *D. immitis* izolatu (Aksesyon No: HQ540424) ile % 5.7 genetik farklılık gösterdiği, diğer izolatlarla ise % 100 identik olduğu belirlenmiş ve filogenetik ağaç üzerinde (Şekil IV) ilgili izolatlarla monofiletik cluster oluşturdukları görülmüştür. *D. immitis* izolatının 5.8S-ITS2-

28S gen bölgesinin blastn analizlerinde dünyadan farklı bölgelerden kaydedilmiş izolatlarla %99.5-%100 oranlarında identiklik gösterdiği saptanmıştır. COI gen bölgesinde olduğu gibi ilgili izolatu köpek ve vektör sivrisineklerden izole edilmiş diğer izolatlarla filogenetik ola-



Şekil IV. Avanos yöresinde saptanan *D. immitis* izolatu ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların parsiyel COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining-Tamura Nei modeli, Bootstrap:1000). ■ : Avanos izolatu; Dış grup olarak *D. repens*



Şekil V. Avanos yöresinde saptanan *D. immitis* izolatu ile GenBank'a kayıtlı diğer benzer bazı izolatların 5.8S-ITS2-28S gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri (Neighbour Joining-Tamura Nei modeli, Bootstrap:1000). ■ : Avanos izolatu; Dış grup olarak *D. repens* (FJ717410) kullanılmıştır. Ölçek çizgisi bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

rak (Şekil V) monofiletik kümelenme gösterdiği belirlenmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpeklere yerleşen filarial nematodlar, hem hayvanlarda meydana getirdikleri hastalık hem de zoonoz özellik göstermeleri nedeniyle Dünya'da artan bir öneme sahiptir. Çeşitli ülkelerde bu parazitlerin yayılışı ve epidemiyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar genellikle köpeklerde ağır kardiopulmoner bozukluklara ve bazen de ölüme yol açan *D. immitis* üzerine yoğunlaşmıştır (4,12). Köpeklerde *D. immitis* enfeksiyonunun oluşmasında sıcaklık, nem ve sivrisineklerin bulunması gibi ekolojik faktörlerin yanı sıra yaş ve barınma şartları da önemli bir rol oynamaktadır (13).

Türkiye'de günümüze kadar köpeklerde *D. immitis* üzerine çalışmalarda yoğun olarak konvansiyonel tekniklerin kullanıldığı, serolojik ve moleküler teşhis yöntemlerinin kullanımının ise son yıllarda arttığı görülmektedir. Bunun yanında moleküler karakterizasyon çalışmalarının ise çok sınırlı olduğu ve bu konuda yapılan çalışmaların yetersiz olduğu görülmüştür (5,6). Dünya'nın hemen her yerinde olduğu gibi Türkiye'nin de birçok bölgesinde *D. immitis* üzerine çalışmalar yapılmış ve enfeksiyon prevalansının değişik oranlarda seyrettiği tespit edilmiştir. Öge ve ark. (14) membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama ve ELISA yöntemleri ile 280 köpekten 26'sında (%9.3); Yıldırım (15) membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemi ile 300 köpekten 19'unda (%6.3) *D.immitis* enfeksiyonu belirlemişlerdir. Aydın'da Voyvoda ve Paşa (16) modifiye knott tekniği ile 158 köpekten 22'sinde (%13.9) *D. immitis* mikrofilari tespit etmişlerdir. İzmir'den 28 ve Aydın'dan 122 olmak üzere toplam 150 köpek üzerinde Sarali (17)'nin yaptığı bir çalışmada direkt kan muayenesi ile 4, modifiye knott yöntemi ile 7, membran filtrasyon yöntemi ile 6 ve PCR ile 15 köpekte *D. immitis* belirlenmiştir. Taşçı ve Kılıç (18)'in Kars yöresinden 120 ve Iğdır yöresinden 120 olmak üzere toplam 240 köpek üzerinde yaptıkları bir çalışmada, *D. immitis*'in prevalansını PCR ile %25, ELISA ile %30 ve membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemi ile %21.7 olarak belirlemişler ve ELISA ile antijen pozitif tespit edilen 72 köpekten 26'sında (%36.1) hem membran filtrasyon-asit fosfataz hem de PCR yöntemleri ile *D. immitis* mikrofilari tespit edememişler ve bu köpeklerde enfeksiyonun gizli (okult) seyrettiğini bildirmişlerdir. Kayseri'deki bir çalışmada, membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama, ELISA ve PCR yöntemleri ile incelenen 280 köpekten 27'sinde (%9.6) *D. immitis* tespit edilmiş, parazit ile enfekte köpeklerin 8'inde (%29.6) de gizli (okult) enfeksiyon belirlenmiştir (5). Konakta mikrofilarielerin tespiti her zaman mümkün olmamakta, köpeklerin %10-67'sinde erişkin parazit var olduğu halde mikrofilari görülememektedir (5,18). Çalışmamızda örneklemeye alınan farklı yaş, cinsiyet ve ırka ait 138 sokak köpeğinin 3'ünün (%2.17) PCR analizleri ile *D. immitis* pozitif olduğu saptanırken iki örnekte yalnızca natif, membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama ve modifiye knott yöntemleri ile *D. immitis* pozitifliği belirlenmiştir. Çalışmada belirlenen prevalans oranının yukarıdaki çalışmalarda bildirilen oranlardan daha düşük olduğu dikkati çekmiştir. Prevalans oranlarının çalışma yörelerine göre değişik-

kenlik göstermesinin örnek toplanan alanlardaki sivrisinek popülasyonu ile doğrudan ilgili olabileceği düşünülmektedir. Sivrisinek türlerinin yayılışında coğrafik bölge ve ekolojik özelliklerin önemli olduğu bilinmektedir. Değişik habitatları seçen sivrisinek türlerinin çevresel faktörlere karşı toleransları yüksek olmakta, buna karşın az sayıda habitat tipinde üreyebilen türlerin ise toleransı az olmaktadır (19). Genel olarak da toleransı yüksek olan türlerin geniş alanlara yayılabildiği ve popülasyon yoğunluklarının da diğer türlere göre yüksek olduğu bilinmektedir (19,20). Çalışma alanı olan Avanos yöresi, vektör sivrisinekler için uygun sıcaklık, nem, su kaynakları, bitki örtüsü, iklim, yağış, rüzgâr gibi çevresel faktörlere sahip bir yapıya sahip olması ile *D. immitis* enfeksiyonlarının yayılışı için elverişli bir ekosistem olduğu görülmüştür. Her ne kadar çalışmamızda prevalans oranı %2 civarı belirlenmiş olsa da reel anlamda bu oranın yükseliş gösterebilme riski bulunmaktadır.

Avanos yöresi sokak köpeklerinde yürütülen bu çalışmada belirlenen prevalans oranının yukarıdaki araştırmacıların belirledikleri prevalans oranlarından daha düşük çıkmasının nedenlerinden bir diğeri de, çalışmada incelenen 5 yaş ve üzeri köpek sayısının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim köpeklerde *D. immitis* enfeksiyonunun prevalansı yaş ilerledikçe artmaktadır. *D. immitis* enfeksiyonunun yayılışının yaşlı köpeklerde daha yüksek düzeyde olması, parazitin prepatent periyodunun uzun olması ile konak-parazit ilişkisinde yaşlı köpeklerin muhtemelen vektörlere daha uzun süre maruz kalmasıyla açıklanmaktadır (14).

Filarial tip nematodların teşhisinde kada mikrofilari saptanmasında konvansiyonel yöntemler günümüzde özellikle rutin analizlerde sık olarak kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerden membran filtrasyon yönteminin, natif, sürme preparat ve modifiye knott yöntemlerine oranla daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (5,6,21). Bununla birlikte bazı araştırmacılar (19,22) membran filtrasyon ve modifiye knott yöntemlerinin eşit duyarlılıkta olduğunu ve natif yönteme oranla konsantrasyon yöntemlerinin %50-90 daha duyarlı olduğunu kaydetmektedirler. Williams ve ark. (22), membran filtrasyon ve modifiye knott yöntemlerinin, 1 mikrofilari/ml yoğunluğunda bile oldukça başarılı olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca membran filtrasyon yönteminin daha hızlı ve güvenilir olmasıyla modifiye knott yönteminden daha avantajlı olduğu ve bu testin rutinde tavsiye edilebilir olduğu bildirilmektedir (7,23). Modifiye knott yönteminde, özellikle mikrofilarielerin ayırımında baş ve kuyruk kısımlarının net görüldüğü ve morfolojik ölçümlerin genellikle bu teste göre yapıldığı, ancak maliyetinin düşük olması, santrifüje gereksinim duyulması ve yetersiz santrifüj sonucunda mikrofilari kaybının olabileceği bildirilmektedir (24,25). Membran filtrasyon yönteminde ise daha hızlı sonuçlar alındığı ve belirli bir sahada fazla sayıda mikrofilarielerin incelenebileceği, buna karşın, saptanan mikrofilarielerin bazen baş veya kuyruk kısımlarının membran üzerindeki porlara girmesiyle bu bölgelerin incelenmesinin zor olduğu ve filtrasyon tertibatındaki temizlik yetersizliğinin pozitif örneklerde bulunan mikrofilarielerin bir diğeri kan örneğine bulaşmasına yol açabileceği belirtilmektedir (22,24). Çalışmamızda kullanılan perifer kan muayenesi tekniklerinin tümünde aynı sayıda pozitiflik saptanmış ve yöntemler arası her-

hangi bir duyarlılık farklılığı gözlenmemiş olmakla birlikte çeşitli araştırmacıların (7,15,23) belirttiği gibi membran filtrasyon testi uygulanabilirlik ve spesifik teşhis amacıyla asit fosfataz histokimyasal boyama yöntemiyle birlikte kullanıldığında daha etkin bir teknik olarak değerlendirilmiştir.

Parazitlerin teşhis ve ayrımlarında kullanılan konvansiyonel yöntemler sıklıkla spesifik identifikasyonda yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle filarial parazitlerin spesifik teşhisinde de özellikle nükleik asit tabanlı yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (26). Mikrofilaremi görülen köpek ve kedilerde başta PCR, Nested PCR ve Real Time PCR gibi moleküler tanı yöntemleri ile filarial enfeksiyonların kesin teşhisi sağlanmış ve konvansiyonel yöntemlerde ortaya çıkabilecek hatalı identifikasyonların önüne geçilmiştir (13,27-29). Ayrıca söz konusu teknikler miks enfeksiyonların saptanmasında da oldukça duyarlıdır. Filarial enfeksiyonların teşhisinde daha çok internal transcribed spacer 2 (ITS2), 5S rRNA, 12 S rRNA, 16S rRNA, 28S rRNA ve mitokondriyal cytochrome oxidase subunit 1 (mt-COI) gibi gen bölgeleri kullanılmakta ve bu bölgelerden dizayn edilen spesifik primerler ile amplifikasyon sonucu teşhise gidilmektedir. Aynı zamanda bu PCR ürünlerinin pürifiye edilip klonlanması ve sekanslanması ile de olası intra ve interspesifik varyasyonlar tespit edilebilmekte ve filogenetik analizler yapılabilmektedir (8,29,30). Nitekim bu çalışmada da COI ve 5.8S-ITS2-28S gen bölgeleri yönünden PCR analizleriyle incelenen köpeklerden üçünde pozitiflik belirlenirken perifer kan muayene teknikleri ile PCR pozitif iki örnekte pozitiflik saptanmıştır. Bu açıdan moleküler tabanlı yöntemlerden biri olan PCR'ın konvansiyonel yöntemlere kıyasla daha duyarlı sonuçlar verdiği konfirme edilmiştir. Ancak köpeklerde erişkin parazitlerin var olup perifer kanda mikrofilaremi bulunmadığı gizli (okult) enfeksiyonlar göz önüne alındığında moleküler ve serolojik testlerin bir arada kullanılması ile daha etkin sonuçlar alınabileceği görülmektedir.

Ribozomal RNA universal olması ve değişken domainlerle birlikte yüksek korunmuş bölgeleri içermesiyle organizmalarda filogenetik ilişkilerin çalışılmasında en iyi gen bölgelerinden birisi olarak nitelenmektedir (31,32). Köpeklerde filarial nematodların ribozomal RNA gen bölgesine göre filogenetik yapıları üzerine çeşitli çalışmalar yapılmış ve filarial nematod türlerinin bu gen bölgesine göre yüksek düzeyde korunmuş olduğu ortaya çıkarılmıştır (26,33,34). Nitekim çalışmamızda da ribozomal 5.8S-ITS2-28S gen bölgesi filogenetik analiz sonuçları incelenen izolatlar arasında yüksek identiklik görülmüş çalışmada karakterize edilen *D. immitis* izolatı monofiletik olarak homologlarıyla cluster oluşturmuştur. Mitokondriyal DNA verileri tür düzeyinde filogenilerin çözülmesinde oldukça etkindir. Mitokondrideki genlerin sıralanması değişkendir ve bu genler geniş kodlama yapmayan DNA'lar ile ayrılırlar. Mitokondriyal genom kendini sıklıkla tekrar düzenler ve böylece aynı hücrede birçok tekrar düzenlenmiş formlar görülebilir. Filogenetik ve popülasyon genetiği çalışmalarında mitokondriyal DNA kullanımı artan bir şekilde popülerite kazanmıştır. Cytochrome c oxidase enzimi elektron transport zincirinin çok iyi bilinen bir proteindir ve hem bakteri hem de mitokondride bulunur. COI ve COII genleri cytochrome c oxidase

kompleksindeki yedi polipeptidten ikisini kodlar. COI geni yaklaşık 894 bp bir bölgeden oluşur ve özellikle insektlerde olmak üzere çok yakın ilişkili türlerden soy, alt aile, aile ve takımlara kadar geniş ölçekte hiyerarşik düzeydeki filogenetik problemlerin çözülmesinde kullanılmaktadır (35). Mt-COI diğer protein kodlayan genlerle kıyaslandığında daha yavaş evrimleşen bir gen bölgesidir ve moleküler filogenilerin tahmininde yaygın olarak kullanılmaktadır (35-37). Mt COI gen bölgesi köpeklerde filarial nematodların identifikasyonunda ve filogenetik yapılanmalarında da yaygın olarak kullanılmış (38-40) ve tür ayrımında göstermiş olduğu interspesifik diversite ile uygun bir gen bölgesi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ilgili gen bölgesinin ribozomal DNA genlerine oranla göstermiş olduğu intraspesifik heterojenite ile filarial nematodlarda tür içi genetik farklılıkların ortaya konmasında ve ekolojik bazda filogenetik ilişkilerin araştırılmasında daha duyarlı olduğu vurgulanmıştır (38). Benzer olarak çalışmamızda da mt-COI intraspesifik nükleotid diversitesi ribozomal DNA gen bölgesine göre yüksek belirlenmiş ve incelenen izolatlar yine monofiletik cluster oluşturarak filogenetik yapılanma göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Avanos yöresi sokak köpeklerinde *D. immitis* enfeksiyonlarının moleküler prevalansı %2.17 olarak bulunmuş ve bir izolatın 5.8S-ITS2-28S ve COI gen bölgelerinin moleküler analizi ve filogenetik karakterizasyonu yapılmıştır. Bunun yanında çalışmada konvansiyonel yöntemlere kıyasla moleküler tabanlı teşhis yöntemlerinin daha etkin ve duyarlı olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Soulsby E.J.L. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals (7 th ed). Bailliere Tindall 1982; 307-312.
2. Nayar J.K. Mosquito-borne dog heartworm disease. University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, <http://hammock.ifas.ufl.edu> Erişim tarihi: 15.05.2014.
3. Merdivenci A. Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyomorfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılışı ve sağlık önemleri). İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, İstanbul 1984. Yayın No: 3215.
4. Anderson RC. Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission (2nd ed.), New York, CABI Publishing 2000; 467-509.
5. Yıldırım A, İca A, Atalay O, et al. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri province. Res Vet Sci 2007a; 82:358-363.
6. Yıldırım A, İca A, Aslan Ö ve ark. Kayseri yöresi köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in membran filtrasyon-asit fosfataz histokimyasal boyama, antijen ELISA ve PCR yöntemleri ile karşılaştırılması, XV. Ulusal Parazitoloji Kongresi. Kayseri ve Ürgüp, 18-23 Kasım 2007b; ss 140-141.
7. Acevedo RA, Ciencias L, Theis JH. Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. Am J Vet Res 1981; 42:537-540.

8. Rishniw M, Barr SC, Simson KW, et al. Discrimination between six species of canine microfilariæ by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol* 2006; 135:303-314.
9. Hall TA. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41:95-98.
10. Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al (2014). Geneious v5.5, Available from <http://www.geneious.com> (22.04.2014).
11. Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 10 2731-2739.
12. Barriga OO. Dirofilariasis. In: Steele JH, Schultz MG (eds), *Parasitic zoonoses. Vol II. Florida* 1982; pp 93-110.
13. Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, et al. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol* 2003; 118:195-202.
14. Öge H, Doğanay A, Öge S, Yildirim A. Prevalence and distribution of *Dirofilaria immitis* in domestic dogs from Ankara and vicinity in Turkey. *Deut Tierarztl Wochenschr* 2003; 110:69-72.
15. Yıldırım A. Ankara ve Çevresindeki Köpeklerde Filarial Etkenlerin Prevalansı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2003.
16. Voyvoda H, Paşa S. Aydın'ın bazı ilçe ve köyleri ile İzmir'in Selçuk ilçesindeki köpeklerde Leishmaniosis ve Dirofilariosis'in prevalansı. *Türk J Vet Anim Sci* 2004; 28:1105-1111.
17. Saralı H. Köpeklerdeki *Dirofilaria* Türlerinde *Wolbachia*'nın Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın 2009.
18. Taşçı GT, Kılıç Y. Kars ve Iğdır civarındaki köpeklerde *Dirofilaria immitis*'in prevalansı ve potansiyel vektör sivrisinek türleri üzerine araştırmalar. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18:A29-A34.
19. Şimşek FM. Şanlıurfa İli Sınırları İçerisinde Bulunan Sivrisinek Türleri (Diptera: Culicidae) ve Sıtma Vektörlerinin Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2004.
20. Eisen L, Bolling BG, Blair BJ, et al. Mosquito species richness, composition, and abundance along habitat-climate-elevation gradients in the northern Colorado Front Range. *J Med Entomol* 2008; 45:800-811.
21. Seward RL. 2001. Canine heartworm disease. <http://heartwormsociety.org/>. (15.05.2014).
22. Williams JF, Williams CSF, Signs M, Hokama L. Evaluation of a polikarbonat filter for the detection of microfilaræmia in dogs in central Michigan. *JAVMA* 1977; 170:714-716.
23. Wylie JP. Detection of microfilariæ by a filter technique. *JAVMA* 1970; 156:1043-1405.
24. Courtney CH. Detection and differentiation of microfilariæ. *Calif Vet Special Edition* 1989; 9-11.
25. Calvert A. Confirming a diagnosis of heartworm infection in dogs. *Vet Med* 1987; 82:232-237.
26. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y, Scott AL. Detection and differentiation of filarial parasites by universal primers and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73:895-900.
27. Casiraghi M, Bazzocchi C, Mortarino M. A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Vet Parasitol* 2006; 141:368-372.
28. Thanchomnang T, Intapan PM, Lulitanond V, et al. Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis. *Vet Parasitol* 2010; 168:255-260.
29. Lee SE, Kim HC, Chong ST, et al. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Vet Parasitol* 2007; 148:149-155.
30. Liu J, Song KH, Lee SE, et al. Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyeonggi province, South Korea. *Vet Parasitol* 2005; 130:125-129.
31. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51:221-271.
32. George EF, Pechman CR, Woese CR. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to prokaryotic systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1977; 27:44-57.
33. Sanpool O, Tantrawatpan C, Thanchomnang T, et al. Pyrosequencing using SL and 5S rRNA as molecular markers for identifying zoonotic filarial nematodes in blood samples and mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016; 16:326-333.
34. Rossi A, Peix Á, Pavlikovskaya T, et al. Genetic diversity of *Dirofilaria* spp. isolated from subcutaneous and ocular lesions of human patients in Ukraine. *Acta Trop* 2015; 142:1-4.
35. Patwardhan A, Ray S, Roy A. Molecular markers in phylogenetic studies-A Review. *J Phylogen Evolution Biol* 2014; 2:131.
36. Russo CA, Takezaki N, Nei M. Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Mol Biol Evol* 1996; 13:525-536.
37. Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol Biol Evol* 1996; 13:933-942.
38. Huang H, Wang T, Yang G, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Dirofilaria immitis* of China based on COI and 12S rDNA genes. *Vet Parasitol* 2009; 160:175-179.
39. To KK, Wong SS, Poon RW, et al. A novel *Dirofilaria* species causing human and canine infections in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3534-3541.
40. Suzuki J, Kobayashi S, Okata U, et al. Molecular analysis of *Dirofilaria repens* removed from a subcutaneous nodule in a Japanese woman after a tour to Europe. *Parasite* 2015; 22:2.