

Kayseri'nin Felahiye Yöresinde *Dirofilaria immitis*'in Vektör Sivrisineklerde Moleküler Biyolojik Tanısı

Zuhal BİŞKİN, Önder DÜZLÜ, Alparslan YILDIRIM, Abdullah İNCİ

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET: Bu çalışmada, Kayseri'nin Felahiye yöresinde *Dirofilaria immitis*'in potansiyel vektörlerin moleküler olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Haziran-Ağustos 2008 ayları arasında toplam 11 noktadan sivrisinek örnekleme yapılmış ve yakalanan sivrisinekler laboratuara canlı olarak getirilmiştir. *Dirofilaria immitis*'in larval gelişimini sağlamak amacı ile sivrisinekler *in vitro* ortamda 7 gün canlı tutulmuştur. İnkubasyondan sonra sivrisinekler uygun teknikle öldürülmüş ve tür teşhisleri yapılmıştır. Toplanan 301 adet dişi sivrisinekten 96'sının (%31,9) *Aedes vexans*, 205'inin (%68,1) ise *Culex pipiens* olduğu belirlenmiştir. Enfektif ve enfekte sivrisinek türlerin belirlenebilmesi için her bir örneğin baş-toraks ve abdomeni diseke edilerek, tür ve toplanma bölgesine göre gruplanmış toplam 54 adet havuz (2-17 örnek/havuz) oluşturulmuştur. Havuzlardan genomik DNA ekstrakte edilmiş ve tür spesifik primerler kullanılarak PCR ile incelenmiştir. Toplam 54 havuzdan *Ae. vexans*'ların baş-gövde ve karınlarından oluşan iki havuzda *D. immitis* DNA'ları saptanmıştır. Araştırma yöresinde gözlenen minimum enfeksiyon oranı (MIRs) % 0,33 olarak belirlenmiştir. *Aedes vexans*'lardan oluşturulan 20 havuzda MIRs %1,04 olarak saptanmış, *Cx. pipiens*'lerden oluşturulan 34 havuzda ise *D. immitis* DNA'larına rastlanılmamıştır. Sonuç olarak *Aedes vexans* türünün araştırma yöresinde *D. immitis*'in potansiyel vektörü olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: *Dirofilaria immitis*, Kayseri, PCR, sivrisinek, vektör

The Molecular Diagnosis of *Dirofilaria immitis* in Vector Mosquitoes in Felahiye District of Kayseri

SUMMARY: This study was designed to determine the potential vectors of *Dirofilaria immitis* by molecular techniques in Felahiye district of Kayseri. Mosquitoes were sampled from 11 points between June-August 2008 and collected live samples were brought to laboratory. In order to allow the larval development, mosquitoes were incubated in *in vitro* conditions for seven days. After this mosquitoes were killed and species identifications were done. Among the totally collected 301 mosquitoes, 96 (31.9%) were belonging to *Aedes vexans* and 205 (68.1%) to *Culex pipiens*. Head-thorax and abdomens of each sample were dissected to determine the infective and infected mosquitoes and totally 54 pools (2-17 sample/pool) were constituted according to species and collected region. Genomic DNA was extracted from pools and analyzed by PCR using species specific primers. *Dirofilaria immitis* DNA was found in 2/54 of the pools formed with one head-thorax and one abdomen pool of *Ae. vexans*. The minimum infection rate (MIRs) was calculated as 0.33 % in the study area. MIRs of 20 pools consisted from *Ae. vexans* was determined as 1.04 %. No filarial DNA was detected in 34 pools consisted from *Cx. pipiens*. Consequently, *Ae. vexans* was the active potential vector of *D. immitis* in the study area.

Key Words: *Dirofilaria immitis*, Kayseri, mosquito, PCR, vector

GİRİŞ

Dirofilaria immitis başta köpekler olmak üzere karnivorlarda esas olarak kalbin sağ ventrikulusu, pulmoner arter, sağ atrium ve vena cava'ya, ender olarak da camera oculi anterior ve periton boşluğuna yerleşen ve vektörlü gelişim gösteren zoonotik karakterli bir parazittir (1). *Dirofilaria immitis*'in biyolojisinde *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*

ve *Psorophora* cinslerine bağlı 70'in üzerinde sivrisinek türünün potansiyel vektörlük yapabildiği kaydedilmiştir (6). Sivrisineklerin vektörlük potansiyelleri üzerine vektör ömrü, mikrofiler periodisitesi, ısı, mevsim, konak uygunluğu, uçuş alanı, konak seçimi, vektör zorunluluğu, kesin konak faktörleri ve yıl içindeki yeni nesil sayısı gibi birçok faktör etki etmektedir (2, 20, 24).

Patojenlerin PCR tabanlı tekniklerle belirlenmesi, birbirine oldukça benzer olan filarial nematodlar gibi vektör kaynaklı hastalıklar üzerine bölgesel araştırmalarda parazitlerin ayrımının güvenilir bir şekilde yapılmasında imkan sağlamış aynı zamanda geniş sayıda örneğin analiz edilmesinde de oldukça kullanışlı olmuştur. Ancak filarial parazit-

Makale türü/Article type: **Araştırma / Original Research**

Geliş tarihi/Submission date: 28 Nisan/28 April 2010

Düzeltilme tarihi/Revision date: 24 Haziran/24 June 2010

Kabul tarihi/Accepted date: 02 Ağustos/02 August 2010

Yazışma /Corresponding Author: Alparslan Yıldırım

Tel: (90) (352) 338 00 05 Fax: -

E-mail: yildirima@erciyes.edu.tr

lerin farklı gelişim dönemleri PCR-tabanlı metotlarla ayırlamamakta bu yüzden larval dönemlerin gelişimini sağlamak için sivrisinekler *in vitro* koşullarda uygun süreler canlı tutulmaktadır (17). Enfektif ve enfekte sivrisineklerin belirlenmesi için de, sivrisineklerin baş-gövde (L3 dönemi) ve karınları (L1-L2 dönemi) ayrı ayrı incelenmektedir (5).

Dünyada köpeklerde geniş bir yayılışa sahip olan filarial nematodların Türkiye'de köpeklerdeki durumu hakkında yapılan çalışmaların son yıllarda artış gösterdiği dikkati çekmektedir (19, 25, 26). Ancak bu parazitler için vektörlük yapan artropod türlerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada köpeklerde *D. immitis*'in yaygın bulunduğu Kayseri'nin Felahiye yöresinde (25, 26) potansiyel sivrisinek vektörlerin moleküler olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Saha Çalışmaları

Araştırma Sahası: Çalışma *D. immitis*'in köpeklerde varlığı saptanan (25, 26) Kayseri'nin Felahiye ilçesinde yürütülmüştür. Bu amaçla Haziran-Temmuz 2008 tarihleri arasında yerleşim merkezlerine yakın toplam 11 alandan ayda iki kez sivrisinek örnekleme yapılmıştır.

Sivrisinek Örneklerinin Toplanması: Ergin dişi sivrisineklerin yakalanması amacıyla karbondioksitli (Kurbuz hazneli) CDC ışık tuzakları (All-Weather LED EVS Traps, 2780, BioQuip Products CA 90220, USA) ve kimyasal atraktanlı tuzaklar (BG-Sentinel Trap, 2880, BioQuip Products CA 90220, USA) kullanılmıştır. Tuzaklar 17.³⁰-19.⁰⁰ saatleri arasında aktive edilmiş ve ertesi gün 07.⁰⁰-08.³⁰ saatleri arasında geri toplanmıştır. Yakalanan sivrisinekler tutuldukları fileler içinde laboratuara canlı olarak getirilmiştir.

Laboratuvar Çalışmaları

Sivrisineklerin *In vitro* İnkubasyonu, Tür Teşhisleri, Diseksiyonu ve Sivrisinek Havuzlarının Oluşturulması: Laboratuara canlı olarak getirilen sivrisinekler, muhafaza kabinlerine (Collapsible cage, 1450B, BioQuip Products CA 90220, USA) konulmuştur. Bu kabinler 25-27°C ve ~% 90 nisbi nemdeki etüve yerleştirilmiş ve 12:12 [Aydınlık (L): Karanlık (D), Saat (h)] fotoperiyot uygulanmıştır. Olası *D. immitis* 2. ve 3. dönem larvalarının gelişimine imkan sağlamak ve bu şekilde vektörlük potansiyellerini belirleyebilmek için dişi sivrisinekler söz konusu koşullarda yedi gün canlı tutulmuştur. Sivrisinekleri beslemek amacı ile % 10 Sukroz (C₁₂H₂₂O₁₁) solüsyonu kullanılmıştır. Solüsyon petri kaplarına konarak kabinin zeminine yerleştirilmiş ve günde iki kez yenilenmiştir (17). İnkubasyon periyodunun sonunda kabinler -20°C'e konularak yaklaşık beş dakika bekletilmiş ve sivrisineklerin ölümü sağlanmıştır. Sivrisinekler, tür teşhisleri yapılana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Bilgisayar destekli stereo mikroskop altında yapılan tür teşhisleri, çeşitli tür ayırımına ilişkin kaynaklar (11, 16) ve elektronik ortamda yazılı Avrupa Sivrisinekleri

Tür Ayırım Anahtarı (18) kullanılarak yapılmıştır. Enfeksiyonu nakletme yeteneğindeki dişi sivrisinekler ayrılmış, türe ve toplandıkları noktalara göre gruplandırılmış, moleküler teşhise kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Moleküler teşhisten önce, filarial parazitlerin farklı gelişim dönemlerinin PCR-tabanlı metotlarla ayırımı mümkün olmadığından enfektif ve enfekte sivrisineklerin belirlenebilmesi amacıyla tür teşhisi yapılan her bir dişi sivrisineğin baş-gövde (enfektif) ile karınları (enfekte) diseke edilerek havuzlar oluşturulmuştur (5). Havuzlardaki sivrisinek sayısı tür ve bölgeye göre 2-17 arasında değişmiştir.

DNA Ekstraksiyonu: Araştırma bölgelerinden yakalanan sivrisineklerden oluşturulan genomik DNA havuz sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir. Havuzlardan genomik DNA'ların elde edilmesi amacıyla AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kiti (AP-MN-MS-GDNA-250, Axygen Biosciences, USA) üreticinin açıklamalarına göre kullanılmıştır. Elde edilen ekstraktlar PCR'da işlenene kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA Amplifikasyonu ve Elektroforez: Havuzlardan elde edilen genomik DNA ekstraktları *D. immitis*'in farklı iki gen bölgesinden sırasıyla 16S rRNA gen bölgesinin 440 bp (5' - GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC -3' F; 5' - CAA AGG CGT ATT TAC CGC CAC -3' R) (8) ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin 203 bp (5' - AGT GTA GAG GGT CAG CCT GAG TTA-3' F; 5' - ACA GGC ACT GAC AAT ACC ATT-3' R) (14) DNA fragmentlerini amplifiye eden iki ayrı tür spesifik primer ile kontrollü olarak ilgili referanslardaki protokole göre (8, 14) PCR reaksiyonuna tabii tutulmuştur. Reaksiyon karışımı her iki primer seti için de 25µl final konsantrasyonda hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda bulunan *D. immitis* ile enfekte köpek kanları 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.

Enfeksiyon Oranlarının Hesaplanması: Gözlenen minimum enfeksiyon oranının (MIRs) hesaplanmasında aşağıdaki standart formül kullanılmıştır (17):

$$\frac{\text{Pozitif sivrisinek havuzu sayısı}}{\text{Toplam incelenen sivrisinek sayısı}} \times 100$$

Parazitlerin binominal dağılımına göre, beklenen enfeksiyon oranları ayrıca değerlendirilmiş ve aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (4).

$$P = 1 - \sqrt[k]{n/N}$$

n: Negatif havuz sayısı

N: İncelenen toplam havuz sayısı

k: Her bir havuzdaki ortalama sivrisinek sayısı

BULGULAR

Çalışma Yöresinde Saptanan Sivrisinek Türleri ve Dağılım Oranları: Çalışmada araştırma bölgesinde *Aedes vexans* (Meigen, 1830) ve *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) türlerine ait toplam 301 adet dişi sivrisinek örneği toplanmıştır. Araştırma yöresinde saptanan sivrisinek türlerinin örnek toplama bölgelerine göre dağılımı Tablo 1’de verilmiştir. Tablo 1’de görüldüğü gibi *Cx. pipiens* %68,1 ile en yaygın tür belirlenmiş bunu %39,1 ile *Ae. vexans* türü izlemiştir.

Moleküler Analiz Sonuçları: Çalışmada toplanan sivrisineklerden oluşturulan ve tür ile toplama merkezine göre kategorize edilen DNA havuzlarının PCR sonuçları Tablo 3’de verilmiştir. İncelenen toplam 27 baş+gövde havuzunda bir ve 27 karın havuzunda bir olmak üzere toplam iki havuzda her iki primer çifti ile de *D. immitis* DNA’ları saptanmıştır. Pozitif saptanan her iki havuzun aynı gruba ait *Ae. vexans* baş+gövde ve karın havuzları olduğu belirlenmiştir. Bu şekilde *Ae. vexans* için enfektif havuz oranı %10,0 belirlenmiş, yalnız enfekte havuza rastlanılmamıştır. *Culex pipiens* baş+gövde ve karınlarından oluşan toplam 34 havuzda *D. immitis* DNA’ları saptanmamıştır. *Dirofilaria immitis* spesifik 16S rRNA gen bölgesinin 440-bp ve cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin 203-bp DNA fragmentlerini amplifiye eden primer setleri ile PCR reaksiyonu sonucunun agaroz jelde görünümü Şekil 1’de gösterilmiştir.

Enfeksiyon Oranları: Araştırma süresince incelenen 301 adet dişi sivrisinekte *D. immitis* ile minimum enfeksiyon oranı (MIRs) 0,33, beklenen enfeksiyon oranı (*P*) 0,37 belirlenmiştir. İncelenen 96 adet *Ae. vexans* için MIRs 1,04, *P* 1,05 saptanmış, 205 adet *Cx. pipiens* örneğinde ise *D. immitis* enfeksiyonuna rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

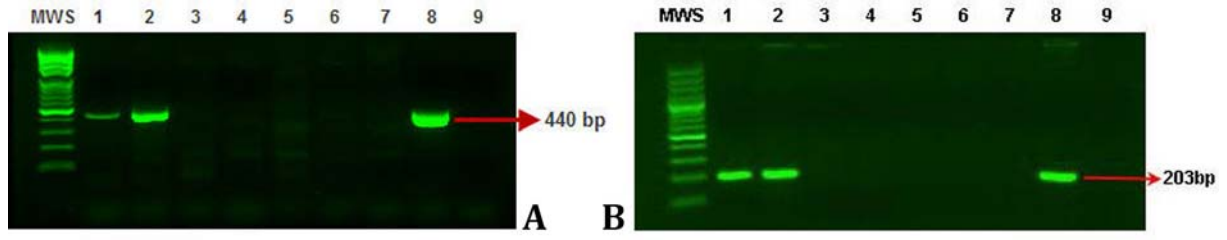
Türkiye, gerek iklimsel gerekse ekolojik faktörler yönünden filaria türlerinin yayılışı için uygun bir ülke olup son yıllarda *D. immitis*’in son konaklarda yayılışı üzerine yapılan çalışmaların hız kazandığı görülmektedir (19, 25, 26). Kayseri yöresinde yapılan parazitolojik, serolojik ve moleküler çalışmalarda (25, 26) *D. immitis*’in yayılışı % 9,6 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada örnekleme bölgelerinin seçiminde Yıldırım ve ark. (25, 26)’nın Kayseri yöresinde elde ettikleri sonuçlardan yararlanılmıştır.

Dirofilaria immitis’in vektör sivrisineklerde teşhisi amacıyla kullanılan konvansiyonel metotlarda sivrisinekler diseke edilmekte ve ışık mikroskobu kullanılarak saptanabilen larvaların morfolojik teşhisine gidilmektedir (24). Fakat bu metodun duyarlılık ve özgüllüğünün oldukça düşük olduğu, fazla sayıda örnek işleneceği zaman hem zaman alıcı hem de maliyetinin yüksek olduğu belirtilmiştir (24). Son yıllarda sivrisineklerde vektörlük potansiyelinin ortaya konmasında moleküler tekniklerden yararlanılma-

ya başlanılmış, duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksek teşhisle söz konusu olumsuzluklar giderilmiştir. *Dirofilaria immitis*’in 16S rRNA geninin, ökaryotik genlerde sık olarak çoklu kopyalar sunması, aynı soydaki ve yakın diğer soylardaki diğer parazitlerden ayırma spesifik bölgeler içermesi nedeni ile tür özgüllüğü belirlenmesinde iyi bir hedef olduğu bildirilmektedir (24). Benzer şekilde *D. immitis*’in cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gen bölgesinin de filarial enfeksiyonların teşhisinde oldukça spesifik bir hedef olduğu tespit edilmiştir (14). Bu çalışmada göstermiş oldukları özgüllük nedeni ile söz konusu her iki gen bölgesinden dizayn edilen primerler kontrollü olarak sivrisineklerde *D. immitis* larvalarına ait DNA’ların aranmasında tercih edilmiştir.

Dirofilaria immitis, *Culex*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Anopheles*, *Armigeres* ve *Mansonia* soylarına bağlı 70’ın üzerinde sivrisinek türü ile nakledilebilmektedir (3). Türkiye’de bu soylara bağlı çeşitli türlerin varlığı bildirilmesine karşın (13) filaria enfeksiyonlardaki potansiyel vektörlüklerine yönelik günümüze kadar bir çalışma bulunmadığı dikkati çekmiştir. Sivrisinek türlerinin vektörlük potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda vektör etkinliği üzerine coğrafik alan, ekolojik faktörler ve sivrisineklerin konakçı tercihlerinin önemli etkisi olduğu kaydedilmektedir (9, 12, 15). Bir bölgede vektörlük potansiyeli belirlenen bir sivrisinek türünün diğer bazı bölgelerde vektör etkinliğinin düşük olduğu veya hiç olmadığı görülmektedir. Loftin ve ark (9), Meksika’da *D. immitis*’in vektörlerini belirlemek için yaptıkları çalışmada *Ae. vexans*’ın vektör etkinliğini %20,4 olarak belirlerken, *Cx. quinquefasciatus* ve *Cx. tarsalis*’inkileri ise sırasıyla %2,7 ve %0,4 olarak saptamışlardır. Petruschke ve ark. (12), İtalya’da her üç sivrisinek türünün de yaygın olmasına karşın *Cx. pipiens* ve *Ae. geniculatus*’un aktif vektörlük yaptığını, *Ae. vexans*’da ise parazitin larval dönemlerine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Yine İtalya’da yapılan bir çalışmada (15), *Ae. caspius*’un vektörlük potansiyelinin *Cx. modestus*, *An. maculipennis* ve *Cx. pipiens*’e oranla çok daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Tolbert ve Johnson (22), Alabama’da *An. punctipennis* ve *Ae. vexans* türlerinde enfektif L3 dönemi saptarken, *Cx. quinquefasciatus*’un daha yaygın olmasına karşın sadece L2 dönemini ihtiva ettiğini belirlemişlerdir. New York’ta vektör etkinliği üzerine yapılan bir çalışmada (21) *Ae. vexans*’ın primer vektör olduğu kaydedilmiş, *Cx. pipiens*’in ise vektör potansiyelinin düşük olduğu belirtilmiştir.

Kore’nin Gyunggi ve Gangwon bölgelerinde *D. immitis* vektörlerini belirlemeye yönelik yapılan moleküler bir çalışmada (7), *Ae. vexans*’ın *An. sinensis* ve *Cx. pipiens*’e oranla etkin vektörlük yaptığı moleküler olarak ortaya konmuştur. Bu çalışmada Kayseri’nin Felahiye yöresinden toplanan sivrisinek örneklerinden oluşturulmuş toplam 54 baş+gövde ve karın havuzunun %3,7’sinde *D. immitis* DNA’ları saptanmıştır.



Şekil 1. *D. immitis*'in 16S rRNA (A) ve Cytochrome oxidase subunit 1 (COI) (B) gen bölgelerinden dizayn edilen primerler ile PCR reaksiyonu sonuçları; MWS: Moleküler ağırlık standarti, 1: *Ae. vexans* baş-thoraks, 2: *Ae. vexans* abdomen, 3-7: Negatif saha örnekleri, 8: Pozitif kontrol, 9: Negatif kontrol

Tablo 1. Felahiye yöresinde toplanan sivrisinek örneklerinin örnekleme bölgelerine göre tür dağılımı ve oluşturulan genomik DNA havuz sayıları

Toplama Noktası	Koordinat	Sivrisinek Türü ve DNA Havuz Sayıları								Toplam			
		<i>Ae. vexans</i>				<i>Cx. pipiens</i>							
		Sayı	%	HS		Sayı	%	HS		Sayı	%	HS	
B/G	K			B/G	K			B/G	K				
N1	38°53.041'N; 35°35.455'E	40	13,3	2	2	9	3,0	1	1	49	16,3	3	3
N2	38°53.023'N; 35°35.465'E	5	1,7	1	1	2	0,6	1	1	7	2,3	2	2
N3	38°53.043'N; 35°35.120'E	7	2,3	1	1	4	1,4	1	1	11	3,7	2	2
N4	38°53.156'N; 35°35.282'E	-	-	-	-	4	1,4	1	1	4	1,4	1	1
N5	38°53.859'N; 35°37.062'E	-	-	-	-	4	1,4	1	1	4	1,4	1	1
N6	38°53.034'N; 35°35.352'E	28	9,3	2	2	-	-	-	-	28	9,3	2	2
N7	38°49.726'N; 35°34.014'E	5	1,7	1	1	17	5,6	1	1	22	7,3	2	2
N8	38°52.253'N; 35°39.587'E	2	0,6	1	1	3	1,0	1	1	5	1,6	2	2
N9	38°49.727'N; 35°34.002'E	6	2,0	1	1	7	2,3	1	1	13	4,3	2	2
N10	38°53.042'N; 35°35.217'E	3	1,0	1	1	2	0,6	1	1	5	1,6	2	2
N11	38°51.924'N; 35°15.944'E	-	-	-	-	153	50,8	8	8	153	50,8	8	8
Toplam		96	31,9	10	10	205	68,1	17	17	301	100	27	27

HS: Havuz sayısı; B/G: Baş+Gövde; K: Karın

Tablo 2. Araştırma yöresinden toplanan sivrisinek türlerinden oluşturulan DNA havuzlarının PCR sonuçları, minimum (MIRs) ve beklenen enfeksiyon oranları (P)

Nokta	Sivrisinek Türü										MIRs	P		
	<i>Ae. vexans</i>				<i>Cx. pipiens</i>				TOPLAM					
	İHS		PHS		İHS		PHS		İHS	PHS				
B/G	K	B/G	K	B/G	K	B/G	K	B/G	K					
N1	2	2	-	-	1	1	-	-	3	3	-	-	-	-
N2	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N3	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N4	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-
N5	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-
N6	2	2	1	1	-	-	-	-	2	2	1	1	3,57	4,83
N7	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N8	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N9	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N10	1	1	-	-	1	1	-	-	2	2	-	-	-	-
N11	-	-	-	-	8	8	-	-	8	8	-	-	-	-
TOPLAM	10	10	-	-	17	17	-	-	27	27	-	-	0,33	0,37
MIRs			1,04								0,33			
P			1,05								0,37			

İHS: İncelenen havuz sayısı; PHS: PCR pozitif havuz sayısı; B/G: Baş+Gövde; K: Karın

Pozitif saptanan havuzların *Ae. vexans* türüne ait olduğu belirlenmiş ve *Ae. vexans* için enfektif oran %10,0 olarak saptanmıştır. *Culex pipiens* baş+gövde ve karınlarından oluşan havuzlarda ise *D. immitis* DNA'ları saptanmamıştır. Çalışmada *Ae. vexans*'ın primer potansiyel vektör olarak bulunması *Cx. pipiens*'te ise enfeksiyona rastlanılmaması yukarıdaki bazı araştırmacıların bulguları (7, 9, 15, 21) ile paralellik göstermiştir.

Filarial parazitlerin vektör sivrisineklerdeki farklı gelişim dönemleri PCR tabanlı metotlarla ayırlanamamaktadır. Bu yüzden üçüncü dönem larva bulunduran potansiyel vektörlerin ortaya konabilmesi amacıyla, biyolojik gelişim dikkate alınarak sivrisinekler *in vitro* koşullarda uygun süre canlı tutulmaktadır. Bu şekilde larval dönemlerin gelişimine imkan sağlanarak söz konusu handikabın önüne geçilebileceği kaydedilmiştir (17). Aksi takdirde enfekte bir köpekten kan emmiş vektör potansiyeli olmayan sivrisineklerde de mikrofililer bulunacağından söz konusu yöntemlerle pozitif sonuç ortaya çıkacaktır. Bunun yanında, enfektif ve enfekte sivrisineklerin belirlenebilmesi için de, sivrisinek örnekleri gruplandırılarak baş-gövde ve karınlarından ayrı havuzlar oluşturulmakta ve parazitler DNA'lar bu havuzlarda araştırılmaktadır (5, 23). Watts ve ark. (23), *D. immitis*'in vektörlerde moleküler teşhisine yönelik olarak yaptıkları çalışmada, 100-200 sivrisinek başı ihtiva eden havuzlarda bir adet L3 bulunması durumunda dahi pozitiflik saptanabildiğini kaydetmişler ve bu şekilde PCR tabanlı yöntemlerin duyarlılığının oldukça yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İncelenen örneklerde enfeksiyon oranı (MIRs) ise (pozitif havuz sayısı / toplam incelenen örnek sayısı)x100 formülü ile elde edilmektedir (3). Masetti ve ark. (10), İtalya'da sahadan topladıkları 637 *Ae. albopictus* örneğinden oluşturulan 118 havuzdan birinde *D. immitis* DNA'sı saptamışlar ve MIRs'yi %0,16 belirlemişlerdir. Lee ve ark. (7), Kore'de sahadan topladıkları 390 adet *An. sinensis*'ten oluşturulan 25, 143 adet *Ae. vexans*'tan oluşturulan dokuz, 34 adet *Cx. pipiens*'ten oluşturulan dört havuzda *D. immitis* ile MIRs'yi sırasıyla %10,3, %22,8 ve %5,3 belirlemişlerdir. Cancrini ve ark. (3), İtalya'da 2000-2002 yılları arasında sahadan topladıkları 2721 adet *Ae. albopictus*'un baş-gövde ve karınlarından oluşturdukları 336 havuzun moleküler incelemesinde; MIRs'yi 2000, 2001 ve 2002 yılları için sırasıyla %2,67, %3,29 ve %3,64 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada toplam incelenen sivrisinek sayısı göz önüne alındığında gözlenen minimum enfeksiyon oranı (MIRs) %0,33 belirlenmiştir. *Aedes vexans* baş-gövde ve karınlarını ihtiva eden toplam 22 havuzda ise MIRs ise %1,04 olarak saptanmıştır. Bu araştırmanın bulguları, yukarıda dünyanın farklı bölgelerinden bildirilmiş olan literatürlerle uyumlu olup, aynı yörede daha önce yapılan mikroskopik sonuçları da doğrulamıştır. MIRs'nin çeşitli araştırmacıların (3, 10) bulgularına yakın olduğu dikkati çekmiştir. Aynı zamanda çalışmada

parazitlerin binominal dağılımına göre belirlenen beklenen enfeksiyon oranları (P), gözlenen minimum enfeksiyon oranları ile uyumlu bulunmuş ve saptanan enfeksiyon oranlarını doğrulamıştır.

Sonuç olarak, bu araştırmayla *D. immitis*'in Kayseri'nin Felahiye yöresinde etkin potansiyel vektörünün *Ae. vexans* olduğu moleküler olarak ortaya konmuştur. Ortaya çıkan sonuçlar yörede *D. immitis* enfeksiyonlarına ve saptanan sivrisinek türlerine karşı etkin mücadele stratejilerine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, bu çalışmanın yapılmasında maddi desteklerinden dolayı TÜBİTAK (Proje No: 107 O 533) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TSY-09-691) teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

1. **Anderson RC**, 2000. *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission* (2nd ed.). NewYork, CABI Publishing, pp. 467-509.
2. **Burgu A, Şahal M, Yıldırım A, Gazyagcı S, Adanır R, Gürcan S**, 2004. *Dirofilaria immitis* ile enfekte köpeklerde mikrofilier periodisitesinin kantitatif analizi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 51(2): 117-125.
3. **Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M**, 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol*, 118: 195-202.
4. **Cinco M, Padovan D, Murgia R, Frusteri L, Maroli M, Van De Pol I, Verbeek-De Kruif N, Rijpkema S, Taggi F**. 1998. Prevalence of *Borellia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* in Central Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 17: 134-135.
5. **Favia G, Lanfrancotti A, Della Torre A, Cancrini G, Coluzzi M**, 1996. Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*. *Parasitology*, 6: 567-571.
6. **Lai C, Tung K, Ooi H, Wang J**, 2000. Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density. *Vet Parasitol*, 90: 231-237.
7. **Lee SE, Kim HC, Chong ST, Klein TA, Lee WJ**, 2007. Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Vet Parasitol*, 148: 149-155.
8. **Liu J, Song KH, Lee SE, Lee JY, Lee JI, Hayasaki M, You MJ, Kim DH**, 2005. Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyunggi province, South Korea. *Vet Parasitol*, 130: 125-129.
9. **Loftin KM, Byford MJ, Loftin MJ, Craig ME**, 1995. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Bernalillo County, New Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*, 11(1): 90-93.
10. **Masetti A, Rivasi F, Bellini R**, 2008. Mosquito-based survey for the detection of flaviviruses and filarial nematodes in *Aedes albopictus* and other anthropophilic mosquitoes collected in northern Italy. *New Microbiol*, 31(4): 457-465.

11. **Merdivenci A**, 1984. *Türkiye Sivrisinekleri (Yurdumuzda varlığı bilinen sivrisineklerin biyo-morfolojisi, biyo-ekolojisi, yayılışı ve sağlık önemleri)*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fak Yayınları, Taş Matbaası, İstanbul, Yayın No: 3215, s: 200-337.
12. **Petruschke G, Rossi L, Genchi C, Pollono F**, 2001. Canine dirofilariasis in the canton of Ticino and in the neighboring areas of northern Italy. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 143 (3): 141-147.
13. **Ramsdale CD, Alten B, Çağlar SS, Özer N**, 2001. A revised, annotated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Turkey. *European Mosquito Bulletin*, 9: 18-28.
14. **Rishniw M, Barr SC, Simson KW, Frongillo MF, Franz M, Alpizar JLD**, 2006. Discrimination between six species of canine microfilariiae by a single polymerase chain reaction. *Vet Parasitol*, 135: 303-314.
15. **Rossi L, Pollono F, Meneguez PG, Cancrini G**, 1999. Four species of mosquito as possible vectors for *Dirofilaria immitis* piedmont rice-fields. *Parassitologia*, 41(4): 537-542.
16. **Samanidou-Voyadjoglou A, Harbach RE**, 2001. Keys to the adult female mosquitoes (Culicidae) of Greece. *European Mosquito Bulletin*, 10: 13-20.
17. **Santa-Ana M, Khadem M, Capela R**, 2006. Natural infection of *Culex theileri* (Diptera: Culicidae) with *Dirofilaria immitis* (nematoda: filarioidea) on Madeira Island, Portugal. *J Met Entomol*, 43(1): 104-106.
18. **Schaffner E, Angel G, Geoffroy B., Hervy JP, Rhaïem A, Brunhes J**, 2001. *The mosquitoes of Europe* (CD-Rom). Institut de Recherche Pour le Développement, Montpellier, France.
19. **Şimşek S, Utuk AE, Koroğlu E, Rishniw M**, 2008. Serological and molecular studies on *Dirofilaria immitis* in dogs from Turkey. *J Helminthol*, 82: 181-186.
20. **Swain V, Seth RK, Mohanty SS, Raghavendra K**, 2008. Effect of temperature on development, eclosion, longevity and survivorship of malathion-resistant and malathion-susceptible strain of *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res*, 103: 299-303.
21. **Todaro WS, Morris CD, Heacock NA**, 1977. *Dirofilaria immitis* and its potential mosquito vectors in central New York state. *Am J Vet Res*, 38(8): 1197-1200.
22. **Tolbert RH, Johnson WE**, 1982. Potential mosquito vectors of *Dirofilaria immitis* in Macon County, Alabama. *Am J Vet Res*, 43(11): 2054-2056.
23. **Watts KJ, Courtney CH, Reddy GR**, 1999. Development of a PCR and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. *Molecular and Cellular Probes*, 14: 425-430.
24. **Watts KJ, Reddy GR, Holmes RA, Lok JB, Knight DH, Smith G, Courtney CH**, 2001. Seasonal prevalence of third-stage larvae of *Dirofilaria immitis* in mosquitoes from Florida and Louisiana. *J Parasitol*, 87(2): 322-329.
25. **Yıldırım A, İça A, Atalay Ö, Düzlü Ö, İnci A**, 2007a. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri province, Turkey. *Res Vet Sci*, 82: 358-363.
26. **Yıldırım A, İça A, Atalay Ö, Düzlü Ö, İnci A**, 2007b. Kayseri Yöresi Köpeklerinde *Dirofilaria immitis*'in Membran Filtrasyon-Asit Fosfotaz Histokimyasal Boyama, Antijen ELISA ve PCR Yöntemleri ile Araştırılması. 15. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kayseri ve Ürgüp, s: 140-141.