

Kenelerde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün moleküler yöntemlerle araştırılması*

Anıl İÇA¹, Hülya ÇETİN²

¹Dumlupınar Üniversitesi, Zoonozlar Uygulama ve Araştırma Merkezi; ²Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, Türkiye.

Özet: Keneler zorunlu kan emici ektoparazitlerden olup birçok ölümcül hastalık etkeninin de vektörü olarak bilinmektedir. Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsü (KKKAV) kene kaynaklı önemli virüslerden biri olup *Bunyaviridae* ailesinde, *Nairovirus* cinsinde yer almaktadır. Bu çalışmada, Kütahya yöresindeki çiftlik hayvanlarından toplam 228 olgun kene toplanmış ve bunların laboratuvar ortamında tür teşhisleri yapılmıştır. *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* olmak üzere toplam altı tür saptanmıştır. Bu kenelerden türlerine ve cinsiyetlerine göre 88 havuz oluşturulmuştur. Bu havuzlardan virüs tespiti ve virüsün S segmentinin sekansını belirleyebilmek için reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nested-PCR kullanılmıştır. Analizler sonucunda KKKAV yalnızca *H. marginatum* türüne ait kene örneklerinden oluşturulmuş 10 havuzda saptanmıştır. Pozitif bulunan izolatların filogenetik analizleri sonucunda, çalışmada elde edilen virüs izolatının Güneybatı Rusya, Kosova ve Türkiye’de önceden belirlenmiş suşlar ile aynı clusterda yer aldığı tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Kene, KKKAV virüsü, Kütahya, nested-RT-PCR, S segmenti.

Molecular investigation of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus in ticks

Summary: Ticks are obligatory blood-sucking ectoparasites and known as the vectors of many deadly diseases. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever (CCHF) virus is an important tick-borne virus in the family *Bunyaviridae*, genus *Nairovirus*. In our study, the total of 228 mature ticks were collected from farm animals in the region of Kutahya and the identifications of these species were made in the laboratory. A total of six species belong to *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* were identified. 88 pools were consisted accordance with these species and genders. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and Nested-PCR were used in order to identify the virus and to determine the S segment sequence of the virus from the pools. The presence of CCHF virus was only detected in 10 pools consisted from *H. marginatum*. As a result of the phylogenetic analysis of the positive isolates, it was determined that CCHF viruses isolated in this study clustered together with the strains predetermined in Southwestern Russia, Kosovo and Turkey.

Keywords: CCHF virus, Kütahya, nested-RT-PCR, S segment, tick.

Giriş

Keneler, tropik ve subtropik iklim kuşaklarında, gerek bizzat kendileri kan emerek, gerekse birçok hastalık etkeninin vektörü olarak, hayvan ve insan sağlığını tehdit eden en önemli ektoparazitlerdendir. Günümüzde, dünyada kabul edilen yaklaşık 899 kene türü tespit edilmiştir (5). Türkiye’de ise 2 aileye bağlı 10 soyda 33 kene türünün, Türkiye kene faunasını oluşturduğu bildirilmiştir (3, 4).

Kenelerin direkt zararlarından başka, birçok viral, bakteriyel, riketsial, spiroketal, protozoer ve helmint hastalık etkenlerine mekanik ve biyolojik vektörlük yapıtları, bu şekilde hayvan ve insanlarda birçok hastalığın

yayılmasında rol oynadıkları görülmektedir (17). Kenelerin taşıdıkları bu hastalık etkenlerinin en önemlilerinden biri KKKAV’dür. Bu virus, *Bunyaviridae* ailesine bağlı *Nairovirus* cinsine ait 80-120 nm çapında, yaklaşık 5-7 nm kalınlığında zarflı bir RNA virüsüdür. (10). KKKAV’ü viral genom üç negatif polariteli L, M ve S RNA segmentinden oluşmaktadır. L (Large) segmenti viral RNA bağımlı RNA polimerazı, M (Medium) segmenti, iki önemli glikoproteini (GC ve GN), S (Small) segmenti ise yapısal protein olan nükleokapsit proteinini (NP) kodlamaktadır (10, 16).

Bu virüs meydana getirdiği kanamalar nedeni ile insanlarda hayatı tehdit edebilen, kene kaynaklı zoonotik

* İkinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

akut bir hastalık olan KKKK'a neden olmaktadır (7, 8). İnsan enfeksiyonu, kene ısırması ya da enfekte hayvan veya KKKK hastasının kan veya diğer vücut sıvılarına maruz kalma ile ortaya çıkmaktadır (6).

Türkiye'de KKKK ilk olarak Tokat ve çevresinde 2002 yılında tespit edilmiştir. Olgular yoğun olarak Kelkit vadisi ve çevresindeki kırsal alanlarda çiftçilik ve hayvancılıkla uğraşan kesimlerde görülmüştür (18). Bu vakalar sonrasında KKKAV saptanan bölgelerde yapılan ayrıntılı kene taramalarında *H. marginatum*, *H. detritum*, *R. bursa*, *R. (Boophilus) annulatus*, *Hae. parva*, *H. excavatum*, *H. anatolicum*, *R. turanicus* ve *I. ricinus* kenelerinde virüs yönünden pozitiflik saptanmıştır (1, 14, 22). Buna karşın, şu ana kadar elde edilen verilere göre Türkiye, Balkanlar, Kırım ve Kafkaslar'da; sadece *Hyalomma marginatum*'un KKKAV'nun ana vektörü olduğu bildirilmiştir (23).

Bu çalışmada, Kütahya yöresinde çiftlik hayvanlarında görülen kene türlerini tespit edilmesi, kenelerde KKKAV'nun varlığının araştırılarak virüsün yöredeki varlığının belirlenmesi, potansiyel vektör olabilecek kene türlerinin tespit edilmesi ve elde edilecek virüs izolatlarının filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Saha çalışmaları, kenelerin toplanması ve tür teşhislerinin yapılması: Bu çalışmanın materyalini, Ege Bölgesinde bulunan Kütahya iline bağlı 21 köyde saha çalışmaları sonucunda, sığır, koyun ve keçilerden toplanan ve teşhis anahtarlarına uygun olarak tür teşhisleri yapılan keneler oluşturmuştur (12).

Kenelerden total RNA ekstraksiyonu: Sahadan toplanıp laboratuvara getirilen ve tür teşhisleri yapılan toplam 228 adet keneden, türlerine ve cinsiyetlerine göre 88 adet kene havuzu oluşturulmuştur (Tablo 1). Bu kene havuzları sıvı azot (-196 °C) içerisinde muhafaza edilmiştir. RNA izolasyonu için, sıvı azottan alınan keneler RNase-free pestil yardımı ile ezilmiştir. Ezilerek toz haline getirilen kenelerden GeneJET™ RNA purifikasyon kiti (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) ile üreticisinin talimatlarına uygun olarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucunda elde edilen RNA'nın varlığı MOPS Denature Formaldehit Jel Elektroforezi ile teyit edilmiştir.

cDNA sentezi: Elde edilen Total RNA'lardan RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen Corp. USA) kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak cDNA elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'ler kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve nested-PCR: Çalışmada 88 adet total RNA havuzlarından elde edilen cDNA örnekleri, bir pozitif (KKKAV viral RNA'sı Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'dan sağlanmıştır) bir de negatif kontrol kullanılarak RT-PCR ile incelenmiştir. 25 µl final konsantrasyonda hazırlanan PCR reaksiyonunda, 12 µl Dreamtaq mastermix (Thermo Fisher Scientific Inc. USA), 0,5 µl Eecf-F₁ (5'-TTG TGT TCC AGA TGG CCA GC-3') (100 pmol/ µl), 0,5 µl Eecf-R₁ (5'-CTT AAG GCT GCC GTG TTT GC-3') (100 pmol/ µl) primerleri ve 9,5 µl deiyonize su ve 2,5 µl cDNA kullanılır.

Tablo 1. Araştırma merkezlerinden toplanan kene türleri.
Table 1. Tick species collected from research areas.

Sıra No	Araştırma Merkezi	<i>Hyalomma marginatum</i>	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>	<i>Rhipicephalus turanicus</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>
1	Akçamescit	39	1	-	-	-	-
2	Yenice	27	4	-	-	-	-
3	Sırören	3	-	21	1	11	-
4	Kozluca	4	-	-	-	-	-
5	Elmalı	4	-	-	-	3	-
6	Kumarı	4	-	-	-	-	-
7	Kalburcu Çiftliği	-	-	5	-	-	-
8	Kükürt	2	-	-	-	-	-
9	Andız	4	-	1	2	-	-
10	Ahiler	2	-	-	-	-	-
11	Dedik	6	-	-	-	-	-
12	Kirazpınar	3	-	-	-	-	-
13	Karaağaç	16	-	-	-	1	-
14	Karacaören	3	-	-	3	-	-
15	Yazlıca	-	-	-	3	-	-
16	Kızılcaören	-	-	3	-	-	-
17	Körs	3	-	-	21	-	-
18	Emet	15	-	-	-	-	-
19	Çavuş Çiftlik	1	1	-	-	-	-
20	Işıkara	2	-	-	-	1	2
21	Enne	-	6	-	-	-	-

mıştır. PCR protokolü 95°C'de 2 dakika, 44 siklus 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 1 dakika 72°C'de 2 dakika ve 72 °C'de 10 dakika şeklinde uygulanmıştır. Nested-PCR reaksiyonunda aynı reaksiyon karışımında Eecf-F₂ (5'-GAA GCA ACC AAR TTC TGT GC-3') ve Eecf-R₂ (5'-AAA CCT ATG TCC TTC CTC GC-3') primerleri kullanılarak yapılmıştır. PCR protokolünde annealing ısı 57 °C olarak değiştirilmiştir. Elde edilen ürünler %1'lik agarose jelde görüntülenmiştir.

Klonlama, DNA sekanslama ve sekans analizleri: Nested-PCR sonucunda elde edilen ve saflaştırılan ürünler Topo-TA kiti (Invitrogen Corp. USA) ile klonlanmıştır. Pozitif kolonilerden elde edilen plazmidler GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) protokolüne uygun olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış plazmidler M13 üniversal primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekans BLASTn algoritması kullanılarak Genbankta mevcut homologları ile hizalama analizlerine tabi tutulmuştur. Elde edilen izolata ait nükleotid dizisi filogenetik analiz amacıyla Mega 6 programında GenBank'a (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) kayıtlı diğer benzer sekanslarla hizalama analizleri gerçekleştirilmiş, Neighbour Joining metodu ve Kimura 2 Parameter modeli kullanılarak yüzdesel identikleri saptanmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur (19,21).

Bulgular

Kene sonuçları: İncelemesi yapılan hayvanlardan toplam 228 adet sert kene toplanmıştır. Toplanan kenele-

rin, 138'i (%60,5) *H. marginatum*, 30'u (%13,1) *R. sanguineus*, 30'u (%13,1) *R. bursa*, 16'sı (%7) *R. turanicus*, 12'si (%5,2) *D. marginatus* ve 2'si (%0,8) *R. (Boophilus) annulatus* olarak teşhis edilmiştir. Toplanan kene türlerinin araştırma merkezlerine göre dağılımları Tablo 1'de, oluşturulan kene havuzlarının kene türlerine göre dağılımları ise Tablo 2'de verilmiştir. Yörede baskın kene türü olarak *H. marginatum* tespit edilmiştir.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi virüsünün RT-PCR ve nested-PCR ile tespiti: Kene havuzlarından yapılan PCR sonucunda 307 bp uzunluğunda gen bölgesi amplifiye edilmiştir. Nested-PCR sonucunda 211 bp büyüklüğünde PCR ürünü elde edilmiştir (Şekil 1). İncelenen 88 kene havuzunda sadece *H. marginatum*'lardan oluşan 10 havuzda pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 3). Saha çalışması yapılan köylerden yalnızca Akçamescit'de 8 havuzda, Yenice ve Karaağaç'da birer havuzda virüsün varlığı tespit edilmiştir.

Sekans analizi: Pozitif belirlenen havuzlardan bir izolatanın (Akçamescit) sekans analiziyle KKKAV'nün S segmentinin varlığı teyit edilmiştir. Elde edilen sekansın virüsün S segmentinin 211 bp'lik gen bölgesine ait GenBank'ta kayıtlı diğer sekanslar ile yapılan filogenetik analizleri sonucunda, Kütahya suşunun Rusya, Kosova ve Türkiye'deki diğer izolatların da yer aldığı clusterda bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Kütahya suşunun incelenen diğer suşlarla yapılan karşılaştırmalarında %84-99 arasında değişen oranlarda identiklik tespit edilmiştir (Şekil 3).

Tablo 2. Kene havuzları.

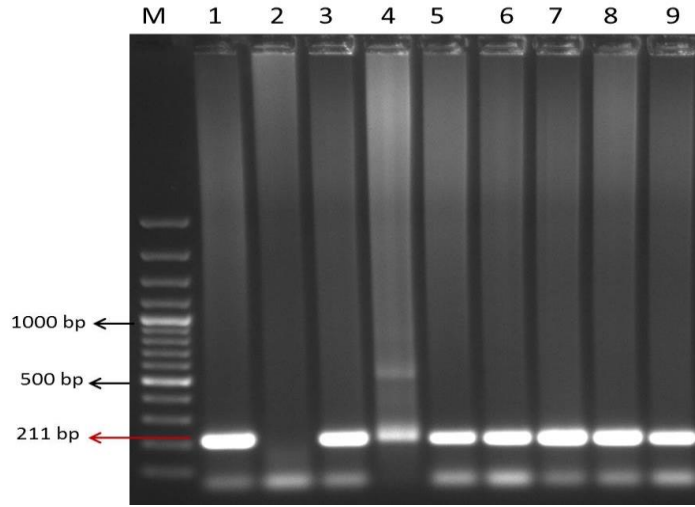
Table 2. Tick pools.

Kene Türü	Havuz	Kene Sayısı	Dişi	Erkek
<i>Hyalomma marginatum</i>	59	138	44	94
<i>Dermacentor marginatus</i>	5	12	5	7
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	10	30	25	5
<i>Rhipicephalus bursa</i>	7	30	14	16
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	6	16	14	2
<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>	1	2	-	2
Toplam	88	228	102	126

Tablo 3. Nested-RT-PCR yöntemi ile kene havuzlarında KKKAV'nün araştırılması.

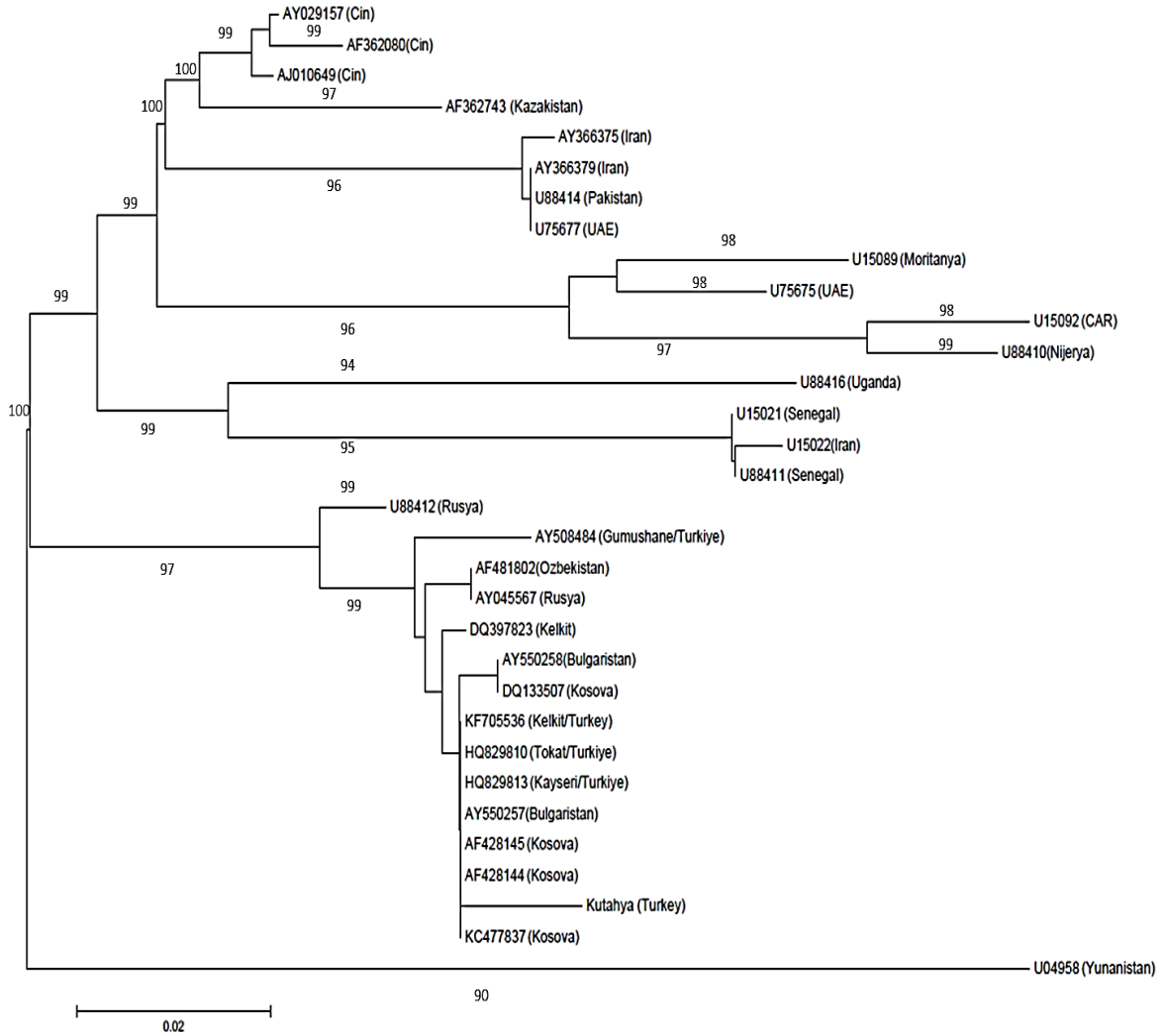
Table 3. Detection of CCHFV by nested RT-PCR in tick pools.

Kene Türleri	Kene Sayıları	Havuz Sayıları	Pozitif Havuzların Sayısı
<i>Hyalomma marginatum</i>	138	59	10 (8 dişi+2 erkek)
<i>Dermacentor marginatus</i>	12	5	0
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	30	10	0
<i>Rhipicephalus bursa</i>	30	7	0
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	16	6	0
<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>	2	1	0
Toplam	228	88	10



Şekil 1. Nested-PCR sonucu elde edilen pozitif ampliconların jel elektroforezde görünümü (M: DNA marker, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3-9: KKKAV pozitif *Hyalomma marginatum* havuzları).

Figure 1. Nested-PCR positive samples on agarose gel (M: DNA marker, 1: Positive control, 2: Negative control, 3-9: CCHFV positive *Hyalomma marginatum* pools).



Şekil 2. KKKAV virüsünün S segmentine göre filogenetik ağacı (Neighbour Joining – Kimura 2 Parameter modeli). Ölçek bölgeye göre nükleotid değişimini göstermektedir.

Figure 2. Phylogenetic tree based on the small (S) segment of CCHFV (Neighbour Joining – Kimura 2 Parameter Model). The scale shows the nucleotide variation respect to region.

Seçilen Suşlar Arasındaki % Nükleotid İdentikliği	
Kütahya_(Turkey)	
AF428144_(Kosova)	99
AF428145_(Kosova)	99 100
AY550258(Bulgaristan)	98 100 100
AY550257(Bulgaristan)	99 100 100 100
DQ133507_(Kosova)	98 100 100 99 100 99
DQ397823_(Kelkit)	98 100 99 99 99 99
AF481802(Ozbekistan)	98 99 99 99 99 99 100
AY045567_(Rusya)	97 98 98 98 98 98 98
AY508484_(Gumushane)	97 98 98 97 98 97 98
U88412_(Rusya)	90 92 92 91 92 91 91
AF362743_(Kazakistan)	92 94 94 93 94 93 93
AY029157_(Cin)	92 94 94 93 94 93 93
AY010649_(Cin)	92 94 94 93 92 92 92
AF362080(Cin)	91 93 93 92 93 92 92
U88416_(Uganda)	86 88 88 87 88 87 87
AY396375_(Iran)	88 90 90 90 90 90 91
AY366379_(Iran)	89 91 91 90 91 90 91
U88414_(Pakistan)	89 91 91 90 91 90 91
U75677_(UAE)	86 88 88 87 88 87 87
U15089_(Montanyel)	86 88 88 88 88 87 87
U75675_(UAE)	86 88 88 88 88 87 87
U15092_(CAR)	84 85 85 84 85 84 84
U88410(Nijerya)	85 86 86 85 86 85 86
U15021_(Senegal)	87 89 89 89 89 89 88
U15022(Iran)	87 88 88 88 88 87 87
U88411_(Senegal)	87 89 89 89 89 89 88
U04958_(Yunanistan)	85 85 85 85 85 85 85
KC477837_(Kosova)	99 100 100 100 100 100 100
HQ829813_(Kayseni)	99 100 100 100 100 100 100
HQ829810_(Tokat)	99 100 100 100 100 100 100
KF705536_(Kelkit)	99 100 100 100 100 100 100

Şekil 3. KKKA virüsü Kütahya izolatının GenBank'taki diğer suşlarla olan yüzdesel identikliği.

Figure 3. Percent identity of CCHFV Kütahya strain and other strains in Genbank.

Tartışma ve Sonuç

KKKA ölkemizin de içinde bulunduğu, Afrika, Asya, Güneydoęu Avrupa ve Ortadoęu'da bildirilen vaka sayısı ile dünyanın en yaygın kene kaynaklı hastalıklardan biridir. Coęrafi dağılımının, birinci derecede önemli vektörü olan *Hyalomma* cinsi kenelerin varlığına bağlı olduğu bildirilmiştir (13).

KKKAV *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Ornithodoros*, *Boophilus*, *Dermacentor* ve *Ixodes* spp. gibi kene türlerinde de saptanmıştır. Ancak, kene türlerinde virüsün saptanmış olması, kenelerin vektör oldukları anlamına gelmemektedir (11). Balkanlar, Kırım ve Kafkaslar'da; *H. marginatum*, İran, Pakistan, Türkmenistan ve Tacikistan'da; *H. anatolicum*, Orta Asya ve Çin'de; *H. asiaticum*, Afrika'da ise *H. rufipes* KKKA virüsünün ana vektörleridir (23).

Kütahya yöresinde kene faunasının tespitine yönelik olarak yapılan bir çalışmada *I. ricinus*, *I. hexagonus*, *R. (Boophilus) annulatus*, *D. marginatus*, *H. marginatum*, *Hae. parva*, *Hae. sulcata*, *Hae. punctata*, *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*'dan oluşan 11 kene türü tespit edilmiştir (15). Yürüttüğümüz bu çalışmada toplanan kene türleri bölgedeki daha önceki verilerle uyumluluk göstermektedir (15). Toplanan kene türleri içinde *H. marginatum*'un sayıca daha fazla olması dikkat çekici bulunmuştur.

Türkiye'de KKKA ilk olarak Tokat ve çevresinde 2002 yılında tespit edilmiştir (18). Türkiye'de KKKAV saptanan bölgelerde yapılan ayrıntılı kene taramalarında *H. marginatum*, *H. detritum*, *R. bursa*, *R. (Boophilus) annulatus*, *Hae. parva*, *H. excavatum*, *H. anatolicum*, *R. turanicus* ve *I. ricinus* kenelerinde virüs yönünden pozitiflik saptanmıştır (1, 14, 22). Karadeniz bölgesinde Kelkit vadisinde yapılan bir çalışmada toplanan kene türlerinden oluşturulan kene havuzlarından *H. marginatum* ve *R. bursa* türlerinde pozitiflik saptanmıştır (22). Türkiye'nin kuzeyindeki illerden (Samsun, Sinop, Ordu, Giresun, Tokat, Amasya ve Sivas) sığır, koyun, keçi ve mandalardan toplanan sert kenelerde yapılan bir çalışmada, *H. excavatum*, *H. anatolicum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *R. bursa*, *R. turanicus* ve *I. ricinus* türlerinde virüs yönünden pozitiflik belirlenmiştir (1). Orta Karadeniz bölgesinde koyun ve keçilerden toplanan olgun kenelerden *H. detritum*, *H. marginatum*, *R. bursa* ve *R. turanicus*'da RT-PCR ile virüs tespit edilmiştir (2). Ankara civarında koyun ve keçilerden toplanan olgun kenelerde yapılan bir çalışmada, real-time RT-PCR ve nested RT-PCR yöntemleri ile *R. bursa*, *H. marginatum* ve *Hae. parva*'da pozitiflik saptanmıştır (14). Tokat ilinde endemik bir alanda real-time RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri ile yapılan bir çalışmada; *Hae. concinna*, *H. anatolicum*, *H. detritum*, *H. marginatum*, *H. turanicum*, *R. bursa* ve *R. turanicus* türlerinde virüs belirlenmiştir (20). Marmara Bölgesi'nde bir çalışmada Çanakkale-Biga, Bursa-Orhaneli, Bursa-Keles, Balıkesir ve Bilecik'te, hayvan-

lardan toplam 740 adet olgun kene toplanmıştır. Toplanan olgun kenelerden 73 kene havuzu oluşturulmuş, bunlar ELISA ve real-time RT-PCR yöntemleri ile KKKA bakımından test edilmiştir. Bursa-Orhaneli ve Bilecik'de koyun, keçi ve sığırlardan toplanan kenelerde pozitif sonuçlar bulunmuştur. İncelemesi yapılan 73 havuzdan virüs bakımından 9 kene havuzunda pozitif sonuç elde edilmiştir. Kene havuzlarından 3 *R. turanicus*, 2 *R. bursa*, 2 *D. marginatus* ve 2 *H. marginatum* havuzunda virüs bulunmuştur (24). Tokat ilinde kirpilerden toplanan kenelerde real-time RT-PCR ile yapılan çalışmada *H. aegyptium*'da virüs yönünden pozitiflik saptanmıştır (9).

Bu çalışmada, Kütahya yöresinde *Ixodidae* ailesinde yer alan *H. marginatum*, *D. marginatus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *R. turanicus*, *R. (Boophilus) annulatus* türleri tespit edilmiştir. Bu türlerden oluşturulan kene havuzlarının RT-PCR ve nested PCR yöntemi ile KKKA bakımından yapılan incelemelerinde, *H. marginatum*'dan oluşturulmuş 10 havuzda, virüs yönünden pozitiflik saptanmıştır. Baskın kene türü olarak tespit edilen *H. marginatum* yörede daha önce kene türlerinin tespitine yönelik çalışmalarla (15) uyumluluk göstermektedir. Kenelerde virüsün tespitine yönelik çalışmalarda diğer bazı kene türlerinde de pozitiflik bulunmasına karşın *H. marginatum*'un bulunduğu yerlerde yüksek oranda pozitifliğin bulunması bu kenenin rolünü güçlendirmektedir. Virüsün pozitif bulunduğu kene türleri potansiyel vektör olmakla birlikte birçoğunun vektörlük rolü bulunmamaktadır. Farklı kene türlerindeki pozitiflik, yörede virüsün varlığını, muhtemel rezervuar hayvanlar arasındaki sirkülasyonu ve riski göstermekle birlikte kesin olarak vektörlüğü ifade etmemektedir. Vektörlüğün ortaya konulabilmesi için detaylı epidemiyolojik verilere ihtiyaç bulunmaktadır. Ölkemizde 2005 yılından itibaren başlayan saha çalışmalarının sonucunda KKKA epidemileri ile ilişkili kene türünün *H. marginatum* olduğu ortaya konmuştur (23). Kütahya yöresinde *H. marginatum*'larda pozitifliklerin bulunduğu yerlerde daha önce insanlarda, sporadik olarak görülen KKKA vakalarının bulunması bu kene türünün yörede vektörlüğünü destekler niteliktedir.

Virüsün S segmentindeki genetik çeşitlilik ile virüsün coğrafik yayılımı ilişkilidir. Virüsün S segmentinin filogenetik analizleri, viral izolatların iki Avrupa, üç Afrika ve bir Asya olmak üzere yaklaşık altı dalda kümeye coğrafik olarak ayrıldığını göstermiştir (13).

Bu çalışmada, *H. marginatum* havuzundan elde edilen KKKA'nın S segmentinin 211 bp nükleotid dizisi genel olarak; Kosova (AF428144, AF428145, KC477837), Bulgaristan (AY550257) ve Türkiye'de daha önce tespit edilmiş (HQ829813, HQ829810, KF705536) nükleotid dizileri ile %99; Rusya (AY045567), Özbekistan (AF481802) ve yine Türkiye'de (DQ397823) izole edilen diğer suşlar ile %98 oranında benzerlik göstermiştir. En az nükleotid benzerlik oranı CAR (U15092) suşunda %84 olarak tespit edilmiş-

tır. S genin sekans çalışması sonucunda elde edilen filogenetik ağaçta, aynı clusterda yer alan Kosova (AF428144, AF428145, AY550258, DQ133507), Türkiye (AY508485, DQ397825, DQ397823, DQ397824, DQ397826), Rusya (AF481802, AY045567, U88412) ve Bulgaristan'dan (AY55025) elde edilen suşlar ile birlikte Kütahya suşu da aynı clusterda yer almıştır. Bu sonuçlar Türkiye'de elde edilen diğer izolatlarla ilişkin veriler sunan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (18,22).

Sonuç olarak, bu çalışma ile Kütahya yöresinde çiftlik hayvanlarında görülen kene türleri tespit edilmiştir. Bu kene türlerinden *H. marginatum*'da KKKAV yönünden pozitiflik görülmüştür. Bu sonuç, yöremizde KKKAV varlığını ve hastalık riskini ortaya koymaktadır. Aynı zamanda çalışma sonuçları bu yörede insanlarda sporadik KKKAV vakalarının ortaya çıkışında *H. marginatum*'un rolü olduğunu destekler niteliktedir. Kütahya yöresinde saptanan virüsün filogenetik incelemesi sonucunda, Türkiye'deki yerleşik suşlarla benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu özellikleri ile daha önceden yapılan çalışmalara paralel olarak KKKAV virüsünün farklı ülkelerdeki suşlarla benzer nükleotid yapısı göstermesi, virüsün aynı kökenden geldiğinin bir kanıtı olarak düşünülmektedir. Diğer kene türlerinde virüsün varlığını ve vektör potansiyelinin araştırılacağı daha kapsamlı çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı kanaatindeyiz.

Kaynaklar

1. Albayrak H, Ozan E, Kurt M (2010): *Molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) but not West Nile Virus (WNV) in hard ticks from provinces in Northern Turkey*. Zoonoses Public Hlth, **57**, 156-160.
2. Albayrak H, Ozan E, Kurt M (2012): *Serosurvey and molecular detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus (CCHFV) in Northern Turkey*. Trop Anim Health Prod, **44**, 1667-1671.
3. Aydın L, Bakırcı S (2007): *Geographical distribution of ticks in Turkey*. Parasitol Res, **101**, 163-166.
4. Bakırcı S, Saralı H, Aydın L, et al. (2011): *Distribution and seasonal activity of tick species on cattle in the West Aegean region of Turkey*. Exp Appl Acarol, **56**, 165-178.
5. Barker SC, Murrell A (2004): *Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names*. Parasitol, **129**, 15-36.
6. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, et al. (2013): *Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity*. Antivir Res, **100**, 159-189.
7. Bossi P, Tegnell A, Baka A, et al. (2004): *Bichat guidelines for the clinical management of glanders and melioidosis and bioterrorism-related glanders and melioidosis*. Eurosurveillance, **9**, 17-18.
8. Burt FJ, Swanepoel R (2005): *Molecular epidemiology of African and Asian Crimean-Congo hemorrhagic fever isolates*. Epidemiol Infect, **133**, 659-666.
9. Ekici M, Keskin A, Bursalı A, et al. (2013): *Investigation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks (Acari: Ixodidae) infesting on hedgehogs in Turkey*. J New Res Sci, **2**, 31-38.
10. Ergönül Ö (2006): *Crimean-Congo hemorrhagic fever*. Lancet Infect Dis, **6**, 203-214.
11. Ergönül Ö (2009): *Kırım Kongo Kanamalı Ateşi*. Ankem Derg, **23**, 234-240.
12. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, et al. (2004): *Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region*. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.
13. Fajs L, Jakupi X, Ahmeti S, et al. (2014): *Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Kosovo*. PLoS Negl Trop Dis, **8**, 2647.
14. Hekimoğlu O, Ozer N, Ergunay K, et al. (2012): *Species distribution and detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) in field-collected ticks in Ankara province, Central Anatolia, Turkey*. Exp Appl Acarol, **56**, 75-84.
15. İça A, Aslan F (2015): *Kütahya yöresinde yayılış gösteren kene türlerinin araştırılması*. Türkiye Parazitoloj Derg, Basıkıda.
16. Karaca C (2012): *Kırım Kongo kanamalı ateşi hastalarında serum nitrik oksit düzeylerinin klinik ve prognoz ile ilişkisi*, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
17. Karaer Z, Yukarı BA, Aydın L (1997): *Türkiye Keneleri ve Vektörlükleri*. 363-434. In: MA Özcel, N Daldal (Eds), Parazitoloji'de Artropod Hastalıkları ve Vektörler. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No: 13, İzmir.
18. Kartı SS, Odabasi Z, Kortan V, et al. (2004): *Crimean-Congo hemorrhagic fever in Turkey*. Emerg Infect Dis, **10**, 1379-1384.
19. Saitou N, Nei M (1987): *The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. Mol Biol Evol, **4**, 406-425.
20. Tekin S, Bursalı A, Mutluay N, et al. (2012): *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in various ixodid tick species from a highly endemic area*. Vet Parasitol, **186**, 546-552.
21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994): *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice*. Nucleic Acids Res, **22**, 4673-4680.
22. Tonbak S, Aktas M, Altay K, et al. (2006): *Crimean-Congo hemorrhagic fever virüs: Genetic analysis and tick survey in Turkey*. J Clin Microbiol, **44**, 4120-4124.
23. Vatanserver Z (2008): *Vektör kenelerin ekolojisi*, II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu. Kasım 2008. Ankara. 27-36.
24. Yesilbağ K, Aydın L, Dinçer E, et al. (2013): *Tick survey and detection of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in tick species from a non-endemic area, South Marmara region, Turkey*. Exp Appl Acarol, **60**, 253-261.

Geliş tarihi: 14.09.2015 / Kabul tarihi: 12.10.2015

Yazışma adresi:

Prof. Dr. Anıl İça
Dumlupınar Üniversitesi
Zoonozlar Uygulama ve Araştırma Merkezi,
Kütahya, Türkiye.
e-mail: anil.ica@dpu.edu.tr